

***In vivo* und *in vitro* Untersuchungen neuer, Thioredoxin-artiger [2Fe-2S]-Proteine**

Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzischen Technischen
Universität Kaiserslautern-Landau zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)“

genehmigte Dissertation

DE - 386

vorgelegt von

Dipl. Chem. Catharina M. Blinn

Betreuer: Prof. Dr. A. J. Pierik

Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau

13. Oktober 2023

Der praktische Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit entstand im Zeitraum Oktober 2014 bis Juli 2019 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Antonio J. Pierik an der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie.

für meine Familie

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 22.05.2019

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13.10.2023

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jörg Fahrer

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Volker Schünemann

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Zusammenfassung..... | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| Abbildungsverzeichnis | XI |
| Tabellenverzeichnis | XV |
| | |
| 1. Grundlagen | 1 |
| 1.1 Eisen-Schwefel-Cluster: Arten, Vorkommen und Funktionen | 1 |
| 1.2 Biogenese von Fe/S-Proteinen..... | 5 |
| 1.3 Zielproteine des CIA-Targeting-Komplexes | 9 |
| 1.4 Ferredoxine und Thioredoxin-artige Ferredoxine | 10 |
| 1.5 Rieske-Protein | 11 |
| 1.6 NEET-Proteine & IscR..... | 13 |
| 1.7 Aim32 und Apd1..... | 15 |
| 1.8 Zielsetzung | 20 |
| | |
| 2. Materialien | 23 |
| 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 23 |
| 2.2 Software | 25 |
| 2.3 Chemikalien..... | 26 |
| 2.4 Oligonukleotide | 30 |
| 2.5 Synthetische Gene | 37 |
| 2.6 Plasmide..... | 38 |
| 2.7 Puffer und Lösungen | 45 |
| 2.8 Bakterien- und Hefestämme | 45 |
| 2.8.1 Bakterienstämme | 45 |
| 2.8.2 Hefestämme | 45 |
| 2.9 Antikörper | 47 |
| 2.10 Weitere Materialien..... | 48 |
| | |
| 3. Methoden..... | 50 |
| 3.1 Allgemeine Arbeitstechniken..... | 50 |
| 3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> | 50 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1.2 | Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> | 50 |
| 3.1.3 | Glycerinkultur von <i>S. cerevisiae</i> | 51 |
| 3.1.4 | Messung der optischen Dichte | 52 |
| 3.2 | <i>Molekularbiologische Methoden</i> | 52 |
| 3.2.1 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 52 |
| 3.2.2 | Agarosegelelektrophorese..... | 54 |
| 3.2.3 | Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen..... | 54 |
| 3.2.4 | Restriktionsverdau | 54 |
| 3.2.5 | Ligation von DNA-Fragmenten | 55 |
| 3.2.6 | Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen | 55 |
| 3.2.7 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 56 |
| 3.2.8 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 57 |
| 3.2.9 | Gezielte Mutagenese | 57 |
| 3.2.10 | Kolonie-PCR | 59 |
| 3.2.11 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> und homologe Rekombination | 59 |
| 3.2.12 | gDNA-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i> | 60 |
| 3.2.13 | Zellextraktpräparation von <i>S. cerevisiae</i> | 61 |
| 3.2.14 | TCA-Präzipitation | 62 |
| 3.2.15 | Präparation von Mitochondrien aus Hefe | 63 |
| 3.2.16 | Natriumcarbonat-Extraktion..... | 64 |
| 3.2.17 | Schwellen von Mitochondrien | 65 |
| 3.2.18 | Digitonin Behandlung von Mitochondrien | 65 |
| 3.2.19 | Tüpfeltest..... | 66 |
| 3.3 | <i>Qualitative und quantitative Analysemethoden</i> | 67 |
| 3.3.1 | UV/Vis-Spektroskopie | 67 |
| 3.3.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-Biuret-Assay | 67 |
| 3.3.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford | 69 |
| 3.3.4 | Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts..... | 69 |
| 3.3.5 | Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 72 |
| 3.3.6 | Western Blot und Immundetektion | 74 |
| 3.3.7 | Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)..... | 76 |
| 3.3.8 | Bildung eines Nitrosyl-Komplexes zum Nachweis eines mononukleären Fe-Zentrums | 77 |
| 3.3.9 | pK _s -Wert-Bestimmung von Histidin-Liganden in [2Fe-2S]-Proteinen | 77 |
| 3.3.10 | Probenvorbereitung für Mößbauerspektroskopie | 78 |
| 3.3.11 | Redoxtitration | 79 |
| 3.3.12 | Kristallisation von Proteinen..... | 80 |
| 3.3.13 | Leu1-spezifische Aktivitätsmessung | 81 |
| 3.3.14 | Succinat-Dehydrogenase Aktivitätsmessung..... | 82 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4 | <i>Proteinexpression und Reinigung aus E. coli</i> | 83 |
| 3.4.1 | Heterologe Proteinexpression | 83 |
| 3.4.2 | Ernte und Aufschluss von <i>E. coli</i> | 84 |
| 3.4.2.1 | Aufschluss unter aeroben Bedingungen | 85 |
| 3.4.2.2 | Aufschluss unter anaeroben Bedingungen | 85 |
| 3.4.3 | Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie | 85 |
| 3.4.4 | Aufreinigung mittels Strep Tactin®-Affinitäts-chromatographie..... | 87 |
| 3.4.5 | Aufreinigung mittels Heparinchromatographie | 88 |
| 3.4.6 | Gelpermeationschromatographie | 89 |
| 3.4.7 | Konzentrierung von Proteinen | 89 |
| 4. | Ergebnisse | 90 |
| 4.1 | <i>Die Suche nach einem Phänotyp für $\Delta aim32$ und $\Delta apd1$</i> | 90 |
| 4.1.1 | Einfluss der Deletion auf die Funktion mitochondrialer und cytosolischer Enzyme | 90 |
| 4.1.2 | Einfluss von Kupferionen auf den Deletionsstamm $\Delta apd1$ | 91 |
| 4.2 | <i>Chemogenetische Screens</i> | 94 |
| 4.2.1 | Chemogenomischer Screen für Apd1 | 95 |
| 4.2.2 | Chemogenomischer Screen für Aim32 | 96 |
| 4.3 | <i>Identifizierung der Fe/S-Clusterliganden in vivo</i> | 105 |
| 4.3.1 | Apd1 | 106 |
| 4.3.2 | Aim32..... | 107 |
| 4.3.3 | Substitution der Histidin-Liganden zu Cysteinen <i>in vivo</i> | 109 |
| 4.4 | <i>High-Copy-Suppressor Screen</i> | 113 |
| 4.4.1 | High-Copy-Suppressor Screen Apd1 | 113 |
| 4.4.2 | High-Copy-Suppressor-Screen für Aim32 | 116 |
| 4.5 | <i>Lokalisierung von Aim32 und Apd1</i> | 118 |
| 4.5.1 | Sublokalisierung von Aim32 | 119 |
| 4.5.2 | N-terminale Kürzung von Aim32 | 121 |
| 4.6 | <i>Assemblierung des [2Fe-2S]-Clusters in Apd1 via CIA-Maschinerie</i> | 123 |
| 4.6.1 | Isolierung von Apd1 aus Hefe | 124 |
| 4.6.2 | Untersuchung des Clustereinbaus in Apd1 mittels ESR-Spektroskopie..... | 127 |
| 4.6.3 | Einfluss des C-terminalen Tryptophans auf das Fe/S-Cluster von Apd1..... | 136 |
| 4.7 | <i>Charakterisierung von S. cerevisiae Aim32</i> | 139 |
| 4.7.1 | Identifizierung der Fe/S-Clusterliganden von Aim32 durch Expression in <i>E. coli</i> | 140 |
| 4.7.2 | Mößbauerspektroskopie von Aim32 | 144 |
| 4.7.3 | Bestimmung des pKs-Wertes von Aim32..... | 146 |
| 4.8 | <i>Protein-Kristallisation von Apd1 aus S. cerevisiae</i> | 147 |
| 4.9 | <i>Versuche zum Nachweis eines mononukleären Fe-Zentrums</i> | 151 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.10 | Charakterisierung von <i>T. curvata</i> AAH | 151 |
| 4.10.1 | Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose..... | 152 |
| 4.10.2 | Aufreinigung mittels Twin-Strep-Tag..... | 156 |
| 4.10.3 | Aufreinigung von ungetagtem <i>TcAAH</i> | 158 |
| 4.10.4 | Aufreinigung der Varianten ohne Tag..... | 160 |
| 4.10.5 | Bestimmung des pK_s -Wertes von <i>TcAAH</i> | 165 |
| 4.10.6 | Bestimmung des Redoxpotentials von <i>TcAAH</i> | 168 |
| 4.10.7 | Mößbauerspektroskopie von <i>TcAAH</i> | 170 |
| 4.10.8 | Expression von <i>TcAAH</i> in <i>S. cerevisiae</i> | 172 |
| 5 | Diskussion | 176 |
| 5.1 | <i>Besitzen die Deletionsstämme einen Phänotyp, der auch durch eine Plasmidkopie des Gens kompensiert werden kann?</i> | 176 |
| 5.2 | <i>Strukturelle Aufklärung des Fe/S-Clusters von Aim32 und Apd1</i> | 179 |
| 5.3 | <i>Phylogenetische Analyse der Apd1/Aim32 Protein Familie und Hinweise auf mögliche Funktionen</i> | 181 |
| 5.4 | <i>Einfluss der CIA-Maschinerie auf die Reifung des Fe/S-Clusters von Apd1</i> | 182 |
| 5.5 | <i>Charakterisierung des Apd1/Aim32 Homologs aus T. curvata</i> | 185 |
| 6 | Anhang..... | 192 |
| | <i>Ergänzende Arbeiten zur „Dissertation Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung.“</i> | 200 |
| | Literaturverzeichnis..... | 205 |
| | Danksagung | 225 |
| | Lebenslauf..... | 227 |
| | Eidesstattliche Versicherung..... | 229 |

Zusammenfassung

Eisen-Schwefel-(Fe/S)-Cluster-haltige Proteine sind in allen Domänen des Lebens vertreten und gehören zu den wichtigsten Metallocofaktoren. Eines der Hauptaufgabengebiete von Fe/S-Proteinen stellt der Elektronentransport dar. Sie sind aber auch an einer Vielzahl von enzymatischen oder regulatorischen Funktionen beteiligt. Bis heute sind ca. 90 Fe/S-Proteine im Menschen bekannt und es werden verschiedene, schwerwiegende Erkrankungen mit Defekten dieser Proteine oder deren Biogenese in Verbindung gebracht. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sind nach der *yeast genome database* 39 Proteineinträge als Fe/S-Cluster bindend dotiert, jedoch sind bis heute noch etwa 10 % des Hefeproteoms nicht charakterisiert. Untersuchungen zu Fe/S-haltigen Proteinen im Modellorganismus Hefe können zum Verständnis komplexer Stoffwechselwege in höheren Eukaryoten einen entscheidenden Beitrag liefern. Die beiden [2Fe-2S]-Proteine Apd1 und Aim32 aus *S. cerevisiae* wurden mittels verschiedener *in vivo* resp. *in vitro* Methoden in dieser Arbeit näher untersucht. Im ersten Schritt wurden verschiedene Wachstumsexperimente zur Phänotypisierung von $\Delta aim32$ und $\Delta apd1$ durchgeführt. Durch die Hilfenahme einer chemogenomischen Datenbank konnten für $\Delta apd1$ -Hefezellen und durch weitere Modifikationen auch für $\Delta aim32$ Wachstumsbedingungen gefunden werden, unter denen diese Gene essenziell sind. Mittels einer Mutagenesestudie wurden mit dem angepassten chemogenomischen Screen die Liganden des [2Fe-2S]-Clusters für Aim32 und Apd1 *in vivo* identifiziert.

Bis heute ist der Zusammenhang zwischen der CIA-Maschinerie und dem Einbau von [2Fe-2S]-Clustern noch nicht aufgeklärt. Durch Ergebnisse dieser Arbeit konnten erstmals Hinweise auf den CIA-Maschinerie-abhängigen Einbau des [2Fe-2S]-Clusters durch die ESR-Spektroskopie gewonnen werden.

Das Protein Aim32 wurde nach heterologer Proteinexpression in *E. coli* spektroskopisch untersucht. Mößbauer- und ESR-Spektren wiesen eine hohe Similarität zu jenen von Apd1 auf und beide Proteine wurden Gründungsmitglieder einer neuen Klasse von [2Fe-2S]-Proteinen. Die Clusterliganden von Aim32 konnten *in vitro* identifiziert werden und durch Austausch der clusterbindenden Histidine zu Cysteinen wurde eine Änderung der ESR-Parameter detektiert, was zusammen mit den Mößbauerspektren des Proteins einen unabhängigen Nachweis für zwei Histidin-Reste in der Clusterkoordination darstellt.

Im letzten Teil der Arbeit wurde ein Protein aus *Thermomonospora curvata* näher untersucht. Das Protein zeichnet sich durch die Anwesenheit einer Sequenz des HXGGH-Motivs von Aim32/Apd1 aus, jedoch ist hier das zweite Histidin durch ein Aspartat ersetzt. UV/Vis-, ESR- und Mößbauerspektroskopie belegen die Einzigartigkeit dieses Proteins. Durch Mutagenese der clusterbindenden Aminosäuren in alternative Liganden konnte die Koordination eines [2Fe-2S]-Clusters durch zwei Cysteine, ein Aspartat und ein Histidin spektroskopisch belegt werden. Diese Arbeit lieferte grundlegende Erkenntnisse zu einer neuen Klasse von [2Fe-2S]-Proteinen mit flexibler Koordination.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| ∅ | Ohne Insert |
| <i>A. aeolicus</i> | <i>Aquifex aeolicus</i> |
| AAH | Aim32/Apd1 Homolog |
| Abb. | Abbildung |
| Aim32 | Altered Inheritance rate of Mitochondria Fe/S-Protein |
| Amp | Ampicillin |
| Apd1 | Actin patches distal, Fe/S-Protein |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp/bps | Basenpaar/e |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Celsius |
| ca. | circa |
| CAPS | 3-(Cyclohexylamino)-propan-1-sulfonsäure |
| CHES | 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure |
| cm | Zentimeter |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| CIII | Komplex III der Atmungskette |
| 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 |
| Cfd1 | <i>Cytosolic Fe/S cluster deficient</i> , Gerüstprotein |
| Δ | folgendes Gen ist bei dem Hefestamm deletiert |
| d.h. | das heißt |
| DMPD | <i>N,N</i> -Dimethyl-1,4-phenylendiamin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|--|
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DOC | Desoxycholsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Eles | Elesclomol |
| ESR | Elektronenspinresonanz |
| <i>et al.</i> | und andere |
| EtOH | Ethanol |
| Fds | Ferredoxine |
| Fe/S | Eisen-Schwefel |
| FMN | Flavinmononucleotid |
| g | Gramm |
| xg | Relative Zentrifugalkraft |
| Gal | Galaktose |
| gDNA | genomische DNA |
| Glu | Glukose |
| H ₂ O _{dd} | bidestilliertes Wasser |
| HABA | 2-[4-Hydroxy-benzenazo]Benzoessäure |
| HCl | Salzsäure |
| HEK-Zellen | Humane embryonale Nierenzellen |
| HeLa-Zellen | Humane Zelllinie, Zervixkarzinom |
| HEPES | <i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure |
| HiPIP | <i>High Potential Iron Protein</i> |
| Hydroxyharnstoff | HU |
| IMS | Intermembran Raum |
| IPMI | Isopropylmalat-Isomerase |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| IRE | <i>Iron regulatory element</i> (Eisen-regulierendes Element) |
| IRP | <i>Iron regulatory protein</i> (Eisen-regulierendes Protein) |

| | |
|-----------------|--|
| ISC | <i>Iron sulfur cluster</i> (Eisen Schwefel Cluster) Biosynthese Maschinerie |
| Kap. | Kapitel |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| Leu1 | Isopropylmalat-Isomerase aus <i>S. cerevisiae</i> |
| LB | Luria-Bertani |
| M | Molar |
| MBP | Maltosebindeprotein |
| MES | 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure |
| Met18 | <i>Methionine requiring 18</i> , Protein des Targeting-Komplexes |
| min | Minute |
| mM | Millimolar |
| MMS19 | Methylmethansulfonat-sensitiv 19, Met18- Homolog aus <i>H. sapiens</i> |
| MoCo | Molybdän-Cofaktor |
| NaDT | Natriumdithionit |
| Nar1 | <i>Nuclear prelamins A recognition factor</i> , Bindeglied der CIA-Maschinerie |
| <i>nat</i> | Genabschnitt, der dem Organismus eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin verleiht |
| Nbp35 | <i>Nucleotide-binding protein of 35 kDa</i> , Gerüstprotein |
| NEB | New England Biolabs Inc. |
| Nfs1 | <i>NiFS-like</i> , Cystein-Desulfurase |
| ng | Nanogramm |
| NP | natürlicher Promotor |
| NTA | Nitrilotriacetat |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| OD _x | optische Dichte bei x nm |
| ORF | <i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| P | Promotor |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCET | Protonen-gekoppelter Elektronentransfer |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PIPES | Piperazin- <i>N,N'</i> -bis-(2-ethansulfonsäure) |
| PMS | <i>Post mitochondrial supernatant</i> (postmitochondrialer Überstand) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| resp. | respektive |
| rpm | <i>Revolutions per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| S. | Seite |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SAM | S-Adenosyl-Methionin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SUF | <i>sulfur mobilization system</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin |
| <i>T. curvata, Tc</i> | <i>Thermomonospora curvata</i> |
| <i>TcAAH = TcApd1</i> | <i>T. curvata</i> Aim32/Apd1 Homolog |
| TLF | Thioredoxin-like Ferredoxin |
| TCA | Trichloressigsäure |
| Tetrazolium | 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid |
| TAPS | <i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolet |
| V | Volumen |
| v/v | <i>Volume per volume</i> , Volumen pro Volumen |
| verd. | verdünnt |
| vgl. | vergleiche |

| | |
|-------|---|
| Vis | <i>visible</i> (auf den sichtbaren Teil des Lichts bezogen) |
| w/v | <i>Weight per volume</i> , Masse pro Volumen |
| z. B. | zum Beispiel |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1-1: Typen von Fe/S-Clustern..... | 1 |
| Abbildung 1-2: Verschiedene Fe/S-Enzyme | 3 |
| Abbildung 1-3: Biogenese cytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine..... | 7 |
| Abbildung 1-4: Darstellung des [2Fe-2S]-Clusters von TLF aus <i>A. aeolicus</i> | 11 |
| Abbildung 1-5: Darstellung des [2Fe-2S]-Clusters im Rieske-Protein | 12 |
| Abbildung 1-6: Darstellung des [2Fe-2S]-Clusters im humanen MitoNEET | 14 |
| Abbildung 1-7: Effekt von Primaquine auf $\Delta sod2$ | 17 |
| Abbildung 1-8: Apd1 trägt einen [2Fe-2S]-Cluster koordiniert durch zwei Cysteine und zwei Histidine..... | 19 |
| Abbildung 1-9: ESR- und Mößbauerspektren von Apd1 und Varianten | 20 |
| Abbildung 3-1: Schnittstelle von <i>Dpnl</i> | 58 |
| Abbildung 3-2: Schematische Darstellung Tüpfeltest | 67 |
| Abbildung 3-3: 96-Wellplatte des Kristallisationscreenings | 81 |
| Abbildung 3-4: Die Umsetzung von 3-Isopropylmalat zu 2-Isopropylmalat durch das Enzym IPM | 82 |
| Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Reduktion von Cytochrom <i>c</i> durch SDH | 83 |
| Abbildung 4-1: Spezifische Aktivitätsmessung für Leu1 und SDH..... | 91 |
| Abbildung 4-2: Wachstum von W303-Hefezellen in Gegenwart verschiedener Cu^{2+} -Ionenkonzentration (10, 5 und 2,5 μM) und verschiedener Elesclomol-(Eles)-Konzentrationen | 92 |
| Abbildung 4-3: Aufhebung der Histidin Auxotrophie von W303 | 93 |
| Abbildung 4-4: Wachstum <i>HIS3</i> ⁺ WT-Zellen in Gegenwart von variablen $CuSO_4$ -Konzentrationen | 94 |
| Abbildung 4-5: Effekt von 3356 Substanzen auf das Wachstum des $\Delta apd1$ -Stammes .. | 95 |
| Abbildung 4-6: Tüpfeltest von WT, $\Delta apd1$ und $\Delta aim32$ in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Gallobenzophenon | 96 |
| Abbildung 4-7: Effekt von 3356 Substanzen auf das Wachstum des $\Delta aim32$ -Stammes .. | 97 |
| Abbildung 4-8: Tüpfeltest von WT und $\Delta aim32$ in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Harmalin | 98 |
| Abbildung 4-9: Deletion von <i>SOD2</i> aus der genomischen DNA von WT und $\Delta aim32$ | 99 |
| Abbildung 4-10: Wachstumskurve von WT, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$ | 100 |
| Abbildung 4-11: End-OD ₆₀₀ : von WT, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$ | 101 |
| Abbildung 4-12: Tüpfeltest auf verschiedenen Kohlenstoffquellen | 102 |
| Abbildung 4-13: Tüpfeltest auf SC-Glukose-Platten mit unterschiedlicher Primaquin Konzentration | 102 |
| Abbildung 4-14: Tüpfeltest von $\Delta aim32\Delta sod2$ mit Gallobenzophenon..... | 103 |
| Abbildung 4-15: Tüpfeltest $\Delta aim32\Delta sod2$ auf SD-Agarplatten mit und ohne Pyrogallol | 104 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 4-16: Schematischer Sequenzvergleich des TLF (<i>A. aeolicus</i>) mit Aim32 und Apd1..... | 105 |
| Abbildung 4-17: Tüpfeltest zur Identifizierung der Clusterliganden in Apd1 | 106 |
| Abbildung 4-18: Tüpfeltest für Mutanten der konservierten Histidin-Reste in Apd1 .. | 107 |
| Abbildung 4-19: Tüpfeltest zur Identifizierung der Clusterliganden von Aim32 | 108 |
| Abbildung 4-20: Tüpfeltest für Mutanten der konservierten Histidin-Reste in Aim32 | 109 |
| Abbildung 4-21: Tüpfeltest für Histidin zu Cystein-Varianten von Apd1 | 110 |
| Abbildung 4-22: Überexpression von Apd1 und Varianten in <i>S. cerevisiae</i> | 111 |
| Abbildung 4-23: Tüpfeltest der Histidin zu Cystein-Varianten von Aim32 | 112 |
| Abbildung 4-24: Überexpression von Aim32 in <i>S. cerevisiae</i> | 113 |
| Abbildung 4-25: Überprüfung der Bedingungen für den cDNA-Screen von $\Delta apd1$ | 114 |
| Abbildung 4-26: Analytisches Agarosegel der PCR des cDNA-Screens | 115 |
| Abbildung 4-27: Transformation der Klone 17, 19 und 25 des cDNA-Screens | 116 |
| Abbildung 4-28: Vorexperimente für den cDNA-Screen mit $\Delta aim32\Delta sod2$ | 117 |
| Abbildung 4-29 Lokalisierung von Aim32 und Apd1 in <i>S. cerevisiae</i> | 119 |
| Abbildung 4-30: Sublokalisierung von Aim32 | 121 |
| Abbildung 4-31: Tüpfeltest der gekürzten Varianten von Aim32 | 122 |
| Abbildung 4-32: Lokalisierung der gekürzten Varianten von Aim32 in $\Delta aim32$ | 123 |
| Abbildung 4-33: Isolierung von His ₈ -Apd1 aus Hefe | 125 |
| Abbildung 4-34: ESR-spektroskopischer Nachweis von Apd1 im Zellextrakt..... | 126 |
| Abbildung 4-35: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Inkorporierung des [2Fe-2S]- Clusters von Apd1 in W303-Zellen | 127 |
| Abbildung 4-36: Intensitäten der gemessenen g_{γ} -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in WT..... | 128 |
| Abbildung 4-37: Spezifische Aktivität von Leu1 in Gal_CFD1-Hefezellen | 129 |
| Abbildung 4-38: ESR-Signal und Western-Blot für Apd1 überexprimierende Gal_CFD1- Hefezellen..... | 130 |
| Abbildung 4-39: Intensitäten der gemessenen g_{γ} -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in Gal_CFD1 | 131 |
| Abbildung 4-40: Spezifische Aktivität von Leu1 in Gal_NAR1-Hefezellen..... | 132 |
| Abbildung 4-41: ESR-Signal und Western-Blot für Apd1 überexprimierende Gal_NAR1- Hefezellen..... | 132 |
| Abbildung 4-42: Intensitäten der gemessenen g_{γ} -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in Gal_NAR1..... | 133 |
| Abbildung 4-43: Spezifische Aktivität von Leu1 in Gal_CIA1-Hefezellen | 134 |
| Abbildung 4-44: ESR-Signal und Western-Blot für Apd1 überexprimierende Gal_CIA1- Hefezellen..... | 135 |
| Abbildung 4-45: Intensitäten der gemessenen g_{γ} -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in Gal_CIA1 | 136 |
| Abbildung 4-46: Tüpfeltest der C-terminal gekürzten Apd1-Varianten bei Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors. | 137 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 4-47: Tüpfeltest der C-terminal gekürzten Apd1-Varianten bei Expression unter Kontrolle des <i>FBA1</i> -Promotors. | 139 |
| Abbildung 4-48: Vergleich der UV/Vis- und ESR-Spektren und SDS-Gele der Mutanten mit Aim32 | 141 |
| Abbildung 4-49: Vergleich von WT-Aim32 und His zu Cys Varianten | 143 |
| Abbildung 4-50: Mößbauerspektrum von oxidiertem Aim32 | 145 |
| Abbildung 4-51: Schematische Fe/S-Clusterkoordination von Aim32 | 145 |
| Abbildung 4-52: pK _S -Wert-Bestimmung von Aim32 | 146 |
| Abbildung 4-53: Übersicht der Aufreinigung von <i>S. cerevisiae</i> Apd1 zur Kristallisation | 148 |
| Abbildung 4-54: Proteinkristalle von Apd1 | 150 |
| Abbildung 4-55: ESR-Spektrum des Nitrosyl-Proteinkomplexes | 151 |
| Abbildung 4-56: Sequenzvergleich von Aim32, Apd1 und dem Homolog aus <i>T. curvata</i> | 152 |
| Abbildung 4-57: Aufreinigung von His ₆ _TcAAH | 153 |
| Abbildung 4-58: Aufreinigung der Cystein-Varianten von TcAAH via His-Tag | 154 |
| Abbildung 4-59: Mößbauerspektrum von oxidiertem TcAAH | 155 |
| Abbildung 4-60: Analytik Aufreinigung TcAAH via Strep-Tag | 156 |
| Abbildung 4-61: Analytik und Aufreinigung der Cystein Varianten von TcAAH via Strep-Tag. | 158 |
| Abbildung 4-62: Übersicht der Aufreinigung von TcAAH ohne Tag (1) | 159 |
| Abbildung 4-63: Übersicht der Aufreinigung von TcAAH ohne Tag (2) | 159 |
| Abbildung 4-64: UV/Vis- und ESR-Spektrum von TcAAH | 160 |
| Abbildung 4-65: Schematische Übersicht der mutierten Aminosäuren von TcAAH | 161 |
| Abbildung 4-66: ESR-Spektren der Cystein-Mutanten von TcAAH | 162 |
| Abbildung 4-67: ESR-Spektren der HxGGD-Mutanten von TcAAH | 163 |
| Abbildung 4-68: Nachweis der Expression der TcAAH-Varianten über SDS-PAGE. | 165 |
| Abbildung 4-69: UV/Vis-Spektren von TcAAH und dreier Varianten bei verschiedenen pH-Werten | 166 |
| Abbildung 4-70: pK _S -Wert-Bestimmung von TcAAH und dreier Varianten. | 167 |
| Abbildung 4-71: Redoxtitration von TcAAH bei verschiedenen pH-Werten | 169 |
| Abbildung 4-72: Redoxtitration von TcAAH D183H bei pH 8 | 170 |
| Abbildung 4-73: Mößbauerspektrum von oxidiertem TcAAH | 171 |
| Abbildung 4-74: Schematische Clusterkoordination von TcAAH | 172 |
| Abbildung 4-75: Tüpfeltest von WT und $\Delta apd1$, transformiert mit Plasmiden, die TcAAH exprimieren | 173 |
| Abbildung 4-76: ESR-Spektren von in <i>S. cerevisiae</i> exprimierten TcAAH WT und D183H | 174 |
| Abbildung 4-77: Tüpfeltest von $\Delta apd1$ transformiert mit Plasmiden, die TcAAH exprimieren | 175 |
| Abbildung 5-1: Strukturformeln der 5 deutlichsten Treffer des chemogenomischen Screens für $\Delta apd1$ | 177 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 5-2: Strukturformel von Pyrogallol und verschiedener Derivate..... | 178 |
| Abbildung 5-3: Sequenzvergleich von <i>S. cerevisiae</i> Apd1 und Aim32 | 179 |
| Abbildung 5-4: Phylogenetischer Baum von Pfam06999 mit Apd1/Aim32 Homologen | 181 |
| Abbildung 5-5: Spektroskopischer Vergleich von TcAAH nach verschiedenen Aufreinigungsmethoden..... | 187 |
| Abbildung 5-6: Struktur von TcAHH visualisiert mittels Discovery Studio | 188 |
| Abbildung 5-7: Gencluster verschiedener Mitglieder der <i>Thermomonosporaceae</i> | 189 |
| Abbildung 5-8: RsrR verfügt über einen [2Fe-2S]-Cluster mit drei unterschiedlichen Liganden | 190 |
| Abbildung 6-1: Wachstum von WT und $\Delta pd1$ in Gegenwart von 100 μ M Gallobenzophenon | 192 |
| Abbildung 6-2: Wachstum von WT und $\Delta pd1$ in Gegenwart von Hydroxyharnstoff.. | 193 |
| Abbildung 6-3: Tüpfeltest verschiedener Stämme in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Gallacetophenon | 194 |
| Abbildung 6-4: Tüpfeltest verschiedener Stämme in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Gallussäure | 194 |
| Abbildung 6-5: SDS-Gele der Aufreinigung der His ₆ Aim32 Varianten | 195 |
| Abbildung 6-6: Sequenz des verwendeten synthetischen Gens von TcAAH | 195 |
| Abbildung 6-7: SDS-Gele der Aufreinigung von His ₆ _TcApd1 Varianten | 197 |
| Abbildung 6-8: SDS-Gele der Aufreinigung von TS_TcApd1 Varianten..... | 197 |
| Abbildung 6-9: Redox Titration von TcAAH bei pH 6 und pH 10 | 198 |
| Abbildung 6-10: Wachstum in Gegenwart von 50 μ M Gallobenzophenon mit und ohne Luftsauerstoff | 198 |
| Abbildung 6-11: Verwendete Größenstandards | 199 |
| Abbildung 6-12: Aktivitätsmessung von Leu1 für regulierbare CIA-Stämme (1) | 201 |
| Abbildung 6-13: Aktivitätsmessung von Leu1 für regulierbare CIA-Stämme (2) | 203 |
| Abbildung 6-14: Nachweis der Proteine mittels Immundetektion | 204 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 2-1: Primer zur Herstellung der $\Delta sod2$, W303 HIS3 ⁺ und HIS3_BY4742 Stämme | 30 |
| Tabelle 2-2: Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination | 31 |
| Tabelle 2-3: Oligonukleotide zur klassischen Klonierung | 31 |
| Tabelle 2-4: Primer zur Klonierung mit dem NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit. | 32 |
| Tabelle 2-5: Oligonukleotide zur Mutagenese. | 33 |
| Tabelle 2-6: Sequenzierprimer | 37 |
| Tabelle 2-7: Verwendete Ausgangs- und leer Plasmide | 38 |
| Tabelle 2-8: Plasmide zur Expression in <i>S. cerevisiae</i> | 39 |
| Tabelle 2-9: Plasmide zur Expression in <i>E. coli</i> | 43 |
| Tabelle 2-10: <i>E. coli</i> Stämme | 45 |
| Tabelle 2-11: <i>S. cerevisiae</i> Stämme in W303-Hintergrund | 46 |
| Tabelle 2-12: Weitere <i>S. cerevisiae</i> -Stämme in BY4742-Hintergrund | 47 |
| Tabelle 2-13: Antikörper | 47 |
| Tabelle 3-1: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika. | 50 |
| Tabelle 3-2: Zusammensetzung des Marker-Mix für das Minimalmedium | 51 |
| Tabelle 3-3: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes | 53 |
| Tabelle 3-4: Programm zur Amplifikation mittels Phusion-Polymerase | 53 |
| Tabelle 3-5: Programm zur Amplifikation mittels Taq-Polymerase | 53 |
| Tabelle 3-6: Pipettierschema für den PCR-Ansatz der Mutagenese | 57 |
| Tabelle 3-7: Programm der ersten PCR für die Mutagenese | 58 |
| Tabelle 3-8: Programm der zweiten PCR für die Mutagenese | 58 |
| Tabelle 3-9: Pipettierschema der Kolonie-PCR | 59 |
| Tabelle 3-10: Pipettierschema hypotonisches Schwellen von Mitochondrien | 65 |
| Tabelle 3-11: Pipettierschema Digitonin-Behandlung. | 66 |
| Tabelle 3-12: Pipettierschema der Verdünnungsreihe des Micro-Biuret-Assay | 68 |
| Tabelle 3-13: Pipettierschema der Verdünnungsreihe des Bradford-Assay | 69 |
| Tabelle 3-14: Pipettierschema der Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Eisengehaltes | 70 |
| Tabelle 3-15: Pipettierschema der Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Sulfidgehalts | 71 |
| Tabelle 3-16: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel | 73 |
| Tabelle 3-17: Chemikalien des Mediatormix | 79 |
| Tabelle 3-18: Verwendete Puffer in der Redoxtitration | 80 |
| Tabelle 4-1: Verdopplungszeiten der verschiedenen Stämme | 100 |
| Tabelle 4-2: <i>g</i> -Werte der H259C-Variante <i>in vivo</i> | 112 |
| Tabelle 4-3: <i>g</i> -Werte für Dithionit reduziertes gereinigtes Apd1 aus <i>E. coli</i> und Apd1 exprimiert in <i>S. cerevisiae</i> | 126 |
| Tabelle 4-4: Protein-, Eisen- und Schwefelgehalt von Aim32 und Varianten | 142 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 4-5: Konzentration und Eisengehalt der Histidin zu Cystein-Varianten von Aim32..... | 144 |
| Tabelle 4-6: Protein und Eisengehalt von ungetaggetem <i>TcAAH</i> | 160 |
| Tabelle 4-7: Konzentration und Eisengehalt ausgewählter Varianten von <i>TcAAH</i> | 164 |
| Tabelle 4-8: pK_s -Werte von <i>TcAAH</i> und dreier Varianten..... | 168 |
| Tabelle 4-9: Redoxpotentiale von <i>TcAAH</i> bei verschiedenen pH-Werten..... | 170 |
| Tabelle 5-1: Vergleich der g -Werte von Aim32 mit Referenzproteinen | 180 |
| Tabelle 5-2: Vergleich der Mößbauerparameter von <i>TcAAH</i> und SvRsrR (Pellicer Martínez, 2017) | 191 |
| Tabelle 6-1: Mößbauerparameter von <i>TcAAH</i> bei pH 7..... | 196 |
| Tabelle 6-2: Mößbauerparameter von <i>TcAAH</i> bei pH 9,4..... | 196 |
| Tabelle 6-3: Mößbauerparameter von <i>TcAAH</i> bei pH 10,7..... | 196 |

1. Grundlagen

1.1 Eisen-Schwefel-Cluster: Arten, Vorkommen und Funktionen

Eisen-Schwefel-(Fe/S)-Cluster sind mit die weitverbreitetsten Cofaktoren in der Natur und sind in allen Domänen den Lebens vertreten (Bak & Elliot, 2014). Ein Fe/S-Cluster setzt sich typischerweise in Proteinen aus nicht-Häm-Eisen und anorganischem Schwefel (S^{2-}) in unterschiedlicher Anzahl zusammen (Johnson *et al.*, 2005). Entdeckt wurden sie in den frühen 1960er Jahren im Zuge von Untersuchungen über ein eisenhaltiges, elektronentransportierendes Protein aus *Clostridium pasteurianum*, einem stickstofffixierenden Bakterium (Beinert *et al.*, 1979; Mortenson *et al.*, 1962). Zudem traten in Elektronenspinresonanz (ESR)-spektroskopischen Untersuchungen von mitochondrialen Subfraktionen bis dato unbekannte Signale einer nicht-Häm-Eisen-Spezies auf (Beinert & Sands, 1960). Fe/S-Cluster fungieren als Cofaktoren vieler Proteine, wie pflanzlichen und bakteriellen Ferredoxinen (Fds) und den Komplexen I, II und III der mitochondrialen Atmungskette (Mortenson, 1964; Lill *et al.*, 2006). Dies und ihr verbreitetes Auftreten festigen die These, dass sie in der Entwicklung aller Arten eine frühe Klasse von Proteinen repräsentieren.

Fe/S-Cluster bestehen für gewöhnlich aus Eisenionen, die neben der Überbrückung durch Sulfidionen am häufigsten durch das Schwefelatom der Seitenketten der Aminosäure Cystein komplexiert werden. Neben Cystein sind Histidin, Serin, Aspartat, Threonin, Glutamat und Arginin, aber auch externe Liganden wie CO , CN^- , H_2O und Substrate des jeweiligen Enzyms, bekannte Clusterliganden (Lill, 2009).

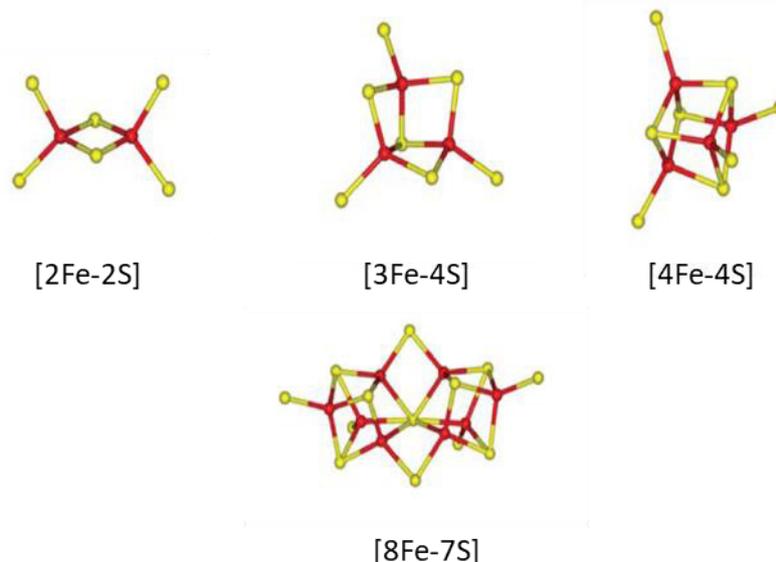


Abbildung 1-1: Typen von Fe/S-Clustern modifiziert nach (Johnson *et al.*, 2005). Rot dargestellt sind Eisenione. Gelbgefärbt sind Schwefelatome.

In Abbildung 1-1 sind die verschiedenen Haupttypen von Fe/S-Clustern dargestellt. Die am häufigsten auftretenden Clustertypen in Fe/S-Proteinen sind der rhombische [2Fe-2S]- und der kubische [4Fe-4S]-Cluster. Aus letzterem kann sich durch Verlust eines Eisenions aus einer Ecke des Würfels ein [3Fe-4S]-Cluster bilden. Als strukturell einfachster Clustertyp ist der „Fe/S-Cluster“ des Rubredoxins bekannt. Hier wird ein Eisenion von vier Cysteinliganden komplexiert. Da bei diesem jedoch ein säurelabiles Schwefelion fehlt, zählt Rubredoxin formell nicht zu den Fe/S-Proteinen (Venkateswara Rao & Holm, 2004). Manche Proteine enthalten einen zusätzlichen Cofaktor wie Sirohäm in der Sulfit-Reduktase (Siegel *et al.* 1973), Flavin in den Komplexen I und II der Atmungskette (Robinson & Lemire, 1996) oder Molybdän (Moco) in der Xanthin- oder Nitrat-Reduktase (Mendel & Bittner, 2006). Einzigartig sind der doppelkubane [8Fe-7S]-Cluster und der [7FeMo-9SC]-FeMoco Cluster als Cofaktor in Nitrogenasen (Meyer *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2005).

Fe/S-Cluster sind in eukaryotischen Zellen im Cytosol, in den Mitochondrien, im endoplasmatischen Retikulum und im Zellkern vertreten. Die bekanntesten mitochondrialen Fe/S-Proteine sind die Komplexe I-III der mitochondrialen (und bakteriellen) Atmungskette. NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase oder NADH-Dehydrogenase, auch Komplex I genannt, ist der Haupteintrittspunkt für Elektronen in die Atmungskette (Brandt, 2006). Durch ESR- und UV/Vis-Messungen von Proben aus Rinderherzen konnten acht verschiedene Fe/S-Cluster, darunter sowohl [2Fe-2S]- als auch [4Fe-4S]-Cluster, nachgewiesen werden. In Bakterien wie *T. thermophilus* sind sogar neun Cluster nachgewiesen (Gnandt *et al.*, 2016). Komplex II, Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase oder Succinat-Dehydrogenase, ist sowohl Teil der mitochondrialen Atmungskette als auch des Citratzyklus (Kita *et al.*, 1990). In diesem Komplex sind drei verschiedene Arten von Fe/S-Clustern inkorporiert: ein [2Fe-2S]-, ein [3Fe-4S]- und ein [4Fe-4S]-Cluster (Cecchini, 2003). Ubichinol:Cytochrom *c*-Oxidoreduktase verkörpert Komplex III und verfügt über einen Rieske-Typ [2Fe-2S]-Cluster (Lange & Hunte, 2001). Ein bekanntes cytosolisches Fe/S-Protein stellt die Isopropylmalat-Isomerase (IPMI, Leu1 in *S. cerevisiae*) dar. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat als zweiten Schritt der Leucin-Biosynthese und benötigt einen [4Fe-4S]-Cluster für seine Aktivität (Hsu & Schimmel, 1984). Die Sulfitreduktase Ecm17 und das ABC Protein Rli1 sind weitere Beispiele für cytosolische Fe/S-Proteine in Hefe. Auch im Zellkern finden sich Fe/S-Proteine wie die DNA-Polymerasen α , δ , ϵ , und ζ , deren katalytische Untereinheiten [4Fe-4S]-Cluster binden (Netz *et al.*, 2011).

In der Zelle sind Fe/S-Proteine an verschiedenen Prozessen beteiligt und üben die unterschiedlichsten Funktionen aus. Als bekannteste gilt der Elektronentransfer. Dieser basiert auf der Fähigkeit des Eisens zwischen den Oxidationszuständen +III und +II zu wechseln (Beinert, 1997). In der Regel fungieren sie als Ein-Elektrontransporter und heben sich dadurch von Cofaktoren wie NAD⁺, FMN oder FAD ab, die auf die Aufnahme

eines Elektronenpaars limitiert sind (Ciofi-Baffoni *et al.*, 2018). Doppelkubane [8Fe-7S]-Cluster in Nitrogenasen können in einem physiologisch relevanten Redoxpotentialbereich als Zwei-Elektronentransporter fungieren. Diese Eigenschaft ist einzigartig in der Klasse der Fe/S-Cluster.

Das Redoxpotential von Fe/S-Proteinen variiert von -700 mV bei bakteriellen, niedrig-Potential [4Fe-4S]-Ferredoxinen bis hin zu +450 mV bei hoch-Potential [4Fe-4S]-Proteinen (Brzóska *et al.*, 2006). Neben der Proteinumgebung ist das Potential abhängig von Faktoren wie dem Clustertyp und den koordinierenden Liganden, vor allem den Wasserstoffbrücken zu den Liganden und S^{2-} (Meyer, 2008). Am häufigsten in diesem Zusammenhang genannt und damit auch die prominentesten Vertreter dieser Funktionsklasse sind die obig genannten Komplexe I-III der Atmungskette. In Komplex I werden z. B. die Elektronen von NADH, einem niedrig-potenzial Elektronendonator in der mitochondrialen Matrix, über mehrere nah beieinander liegende Fe/S-Cluster und FMN zum Elektronenakzeptor Ubichinon in der inneren Membran transportiert (Wirth *et al.*, 2016). Des Weiteren sind Fe/S-Cluster auch in Redoxenzymen wie Hydrogenasen und Nitrogenasen als Elektronendonator und -akzeptor beteiligt (Lill, 2009).

Neben dem Elektronentransfer ist die Funktion des Clusters als Katalysator in einer Vielzahl biologischer Reaktionen ein wichtiges Aufgabengebiet dieser Proteinfamilie. Das klassische Beispiel ist das Enzym Aconitase des Citratzyklus. An einer Ecke des [4Fe-4S]-Clusters des Proteins wirkt ein Eisenion, welches nicht durch eine Aminosäure des Proteins sondern durch das Sauerstoffatom von Wasser oder Substrat koordiniert ist, als Lewis-Base und ermöglicht auf diesem Weg die H_2O -Abspaltung von Citrat, welches über *cis*-Aconitat zu Isocitrat konvertiert (Beinert *et al.*, 1996). Weitere wichtige Vertreter der Klasse der Enzyme mit [4Fe-4S]-Zentren stellen die Radikal-S-Adenosyl-Methionin-(SAM)-Enzyme dar, die SAM zu Methionin und einem Adenosylradikal spalten (Cheek & Broderick, 2001). Das Radikal wiederum ist für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms des jeweiligen Substrates verantwortlich.

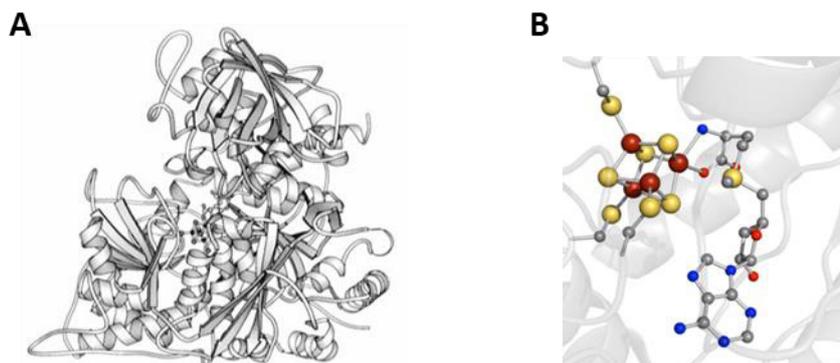


Abbildung 1-2: Verschiedene Fe/S-Enzyme. **A:** Struktur der mitochondrialen Aconitase von Schwein (Beinert *et al.*, 1996). **B:** Koordination von S-Adenosylmethionin an das [4Fe-4S]-Cluster von radikalischen SAM-Enzymen (PDB ID 3II2) (Broderick *et al.*, 2014).

Die Enzyme Biotin- und Lipoat-Synthase sind weitere Vertreter dieser Proteinfamilie. Diese Proteine haben eine Rolle bei der Insertion von Schwefelatomen in inerte CH-Bindungen. So steht neben dem SAM-Kuban, ein weiterer Fe/S-Cluster während der Bildung der Produkte Biotin- resp. Liponsäure als Schwefeldonor zur Verfügung, was eine weitere, zusätzliche Funktion der Fe/S-Cluster repräsentiert (Cicchillo & Booker, 2005; Lill, 2009, Booker, 2009; Neti *et al.* 2022; Pedroletti *et al.* 2023).

Eine vierte wichtige Aufgabe von Fe/S-Proteinen ergibt sich in der Regulation der Genexpression durch Wahrnehmung der äußerlichen oder zellulären Umgebung. Das am besten charakterisierte Beispiel in Säugern ist das cytosolische Eisen-regulierende Protein 1 (IRP1). Seine regulatorische Funktion basiert sowohl auf einem [4Fe-4S]-Cluster als auch der intermolekularen Eisenkonzentration und dient der Aufrechterhaltung der Eisen-Homöostase. Steht dieses Element in ausreichender Konzentration zur Verfügung, koordiniert das Protein seinen Cluster und fungiert als cytosolische Aconitase. Bei Mangel an Eisen in der Zelle verliert IRP1 den Cluster und lagert sich an IRE's (*iron regulatory elements*), Haarnadelstrukturen bestimmter mRNAs, welche für Proteine kodieren, die an der Eisenaufnahme, -speicherung und -verteilung in der Zelle beteiligt sind (Rouault, 2006; Walden *et al.*, 2006; Wallander *et al.*, 2006, Hernández-Gallardo & Missirlis, 2020).

In diesem Zusammenhang zu nennen ist außerdem der Transkriptionsfaktor FNR, der in Bakterien auf die Konzentration von Sauerstoff reagiert und es der Zelle so ermöglicht, ihren Stoffwechsel an eine aerobe oder anaerobe Umgebung anzupassen (Kiley & Beinert, 2003). In der Gegenwart von Sauerstoff liegt das Protein in seiner Apoform und in *E. coli* sogar als Monomer statt Dimer vor. Unter anaeroben Bedingungen kommt es zur Dimerbildung und Inkorporation eines [4Fe-4S]-Cluster pro Untereinheit. In dieser aktiven Form kann nun die DNA-Bindung erfolgen (Gruner *et al.*, 2011, Reents *et al.*, 2006). Ein weiterer Vertreter der Transkriptionsfaktoren stellt SoxR dar. Das Protein verfügt im Gegensatz zu FNR über einen [2Fe-2S]-Cluster, dessen Redoxzustand abhängig vom oxidativen Stress ist, dem die Zelle ausgesetzt ist (Crack *et al.*, 2012a; Rouault, 2019).

In vielen Fällen ist die Aufgabe des Fe/S-Clusters in Proteinen unklar, da er keine direkte Rolle in biochemischen Prozessen in der Zelle einnimmt. Eine Erklärung hierfür könnte eine strukturgebende Rolle des Cofaktors sein (Lill, 2009). Beispiele hierfür sind Fe/S-Cluster in Proteinen, wie DNA-Polymerasen, Helikasen und Nukleasen. (White & Dillingham, 2012; Netz *et al.*, 2011). Die für die Replikation von nukleärer DNA zuständigen DNA-Polymerasen Pol α , δ und ϵ tragen alle in einer katalytischen Untereinheit einen Fe/S-Cluster. In *S. cerevisiae* bildet Pol α mit Pri1 und Pri2 einen Komplex. Mutagenesestudien identifizierten vier konservierte Cysteine in Pri2 innerhalb der C-terminalen Domäne, die einen [4Fe-4S]-Cluster ligieren. Kristallisation des *S. cerevisiae*-Proteins zeigte, dass der Cluster die größere N-terminale mit der kleineren C-terminalen Region verbrückt (Sauguet *et al.*, 2010; Liu & Huang, 2015). Die [4Fe-4S]-

Cluster tragende DNA-Helikase, Rad3, im Menschen XPD, ist Teil des Transkriptionsfaktors TFIIH und spielt eine wichtige Rolle in der Öffnung des DNA-Doppelstranges und in der DNA-Reparatur (Wu & Brosh, 2012). Mutationen in humanem XPD resultieren nachweislich in drei unterschiedlichen Krankheitsbildern. Die bekannteste Krankheit wird durch die Mutation der Aminosäure Arginin 122, die direkt vor dem ersten Cysteinliganden des Fe/S-Clusters liegt, ausgelöst. Eine Mutation dieser Aminosäure führt zum Verlust der Aktivität der Helikase (Rudolf *et al.*, 2006).

Fe/S-Proteine sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt und es werden in zunehmender Anzahl Erkrankungen direkt oder indirekt mit Mutationen an deren Gene oder Genen für die Proteine der Fe/S-Biosynthese in Verbindung gebracht. Die bekannteste Krankheit, die mit einer Dysfunktion der Fe/S-Biogenese korreliert, ist Friedreich's Ataxie, eine neurodegenerative Erkrankung, die mit einer Häufigkeit von 1:50000 in der hellhäutigen Bevölkerung auftritt. Die Krankheit wird durch eine *Repeat-Expansion* von Guanin-Adenin-Adenin im ersten Intron des Gens Frataxin ausgelöst (Rouault, 2015; Cardenas-Rodriguez *et al.*, 2018).

1.2 Biogenese von Fe/S-Proteinen

Mitte der 1960er gelang es Apoproteine unter anaeroben Bedingungen allein mit reduziertem Eisen- und Sulfidionen zu rekonstituieren (Malkin & Rabinowitz, 1966). Diese Beobachtung führte lange Zeit zu der Annahme, dass Fe/S-Cluster *in vivo* spontan in Proteine inkorporiert werden. Jedoch ist dies nicht mit der Tatsache vereinbar, dass für diesen Prozess physiologisch toxische Konzentrationen an Eisen und Schwefel von Nöten wären (Johnson *et al.*, 2005; Sheftel *et al.*, 2010). Aus diesem Grund haben alle Arten des Lebens spezialisierte Maschinerien zur Assemblierung und Übertragung dieses Cofaktors entwickelt.

Prokaryoten entwickelten drei eigenständige, hochkonservierte Systeme zum Einbau des Fe/S-Cofaktors. Das Assemblierungssystem für die Stickstoff-Fixierung wurde zuerst entdeckt und ist verantwortlich für den Zusammenbau der Fe/S-Cluster in den beiden Nitrogenase-Proteinen, einem Enzym in Stickstoff-fixierenden Bakterien (Dos Santos *et al.*, 2004). Die beiden weiteren sind die ISC (*iron sulfur cluster*)-Maschinerie und das SUF (*sulfur formation*)-System, welches unter Stressbedingungen seine Anwendung findet (Ayala-Castro *et al.*, 2008). Im Zuge der Evolution wurden die ISC-Maschinerie in die Mitochondrien und das SUF-System in Chloroplasten endosymbiotisch integriert. Die drei Systeme unterliegen jedoch alle den gleichen Prinzipien. Zunächst wird der Fe/S-Cluster auf einem Gerüstprotein, genannt Scaffold-Komplex, *de novo* assembliert. Dafür muss in einem vorhergehenden Schritt Schwefel durch eine Desulfurase als Cystein zur Verfügung gestellt werden. Folgend wird in einem zweiten Schritt der Cluster über mehrere Transferproteine auf die eigentlichen Zielproteine übertragen (Lill, 2009).

Die Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine ist hochkonserviert und benötigt die Beteiligung von insgesamt 18 Proteinen (Braymer *et al.*, 2017). Im ersten Schritt wird mit der „frühen“ ISC-Maschinerie ein [2Fe-2S]-Cluster auf dem Scaffold-Protein Isu1 zusammengebaut. Hierfür wird der Desulfurase-Komplex, bestehend aus mehreren Komponenten, benötigt. Teil des Komplexes ist die Desulfurase Nfs1, das kleine Aktivator Protein Isd11, Frataxin Yfh1 und Acp1 (Wiedemann *et al.*, 2006; Braymer *et al.*, 2017). Durch die Umwandlung von Cystein zu Alanin wird ein Persulfid-Intermediat gebildet, das dem Komplex die Funktion des Schwefeldonors verleiht (Adam *et al.*, 2006; Biederbick *et al.*, 2006; van Vranken *et al.*, 2016). Eisen in reduzierter Form wird unter anderem durch die Innenmembrantransporter Mrs3 und Mrs4 aufgenommen (Zhang *et al.*, 2006). Des Weiteren wird das Ferredoxin Yah1 zur Bereitstellung von Elektronen, die Ferredoxin-Reduktase Arh1 sowie NADH/NADPH benötigt (Weber *et al.*, 2014). Im zweiten Schritt wird der Fe/S-Cluster von Isu1 auf Grx5 unter Mithilfe eines Mehrkomponenten Chaperon-Systems übertragen. Von hier wird der [2Fe-2S]-Cluster auf Zielproteine transferiert, für die Herstellung der bisher unbekannt Schwefelspezies zum mitochondrialen Export und anschließender CIA-Rekrutierung bereitgestellt oder zur Assemblierung des [4Fe-4S]-Clusters an die ISC-Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 weitergeleitet. Für den letzten Schritt der [4Fe-4S]-Cluster-Reifung wird zudem Ferredoxin und die Ferredoxin-Reduktase benötigt (Weiler *et al.* 2020). Die Übertragung dieses Clustertyps auf Zielproteine kann durch weitere ISC-Proteine wie Nfu1 und Ind1 durchgeführt werden (Lill *et al.*, 2014; Stehling *et al.*, 2014; Lill *et al.*, 1999).

Die CIA-Maschinerie ist für die Reifung cytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine zuständig und besteht bis dato aus elf Proteinen, wobei acht ubiquitär für jedes assemblierte Fe/S-Protein und in Abbildung 1-2 dargestellt sind (Paul *et al.*, 2015). Die Assemblierung und die dafür benötigten Komponenten sind hochkonserviert (Sharma *et al.*, 2010). Obwohl die Assemblierung des Clusters im Cytosol abläuft, ist sie abhängig von der ISC-Maschinerie (Lill *et al.* 2015). Durch den mitochondrialen ABC-Transporter Atm1 wird eine schwefelhaltige Komponente ins Cytosol transportiert (Srinivasan *et al.*, 2014). Ob dieser Prozess zusätzlich auch von der Sulfhydryloxidase Erv1 des Intermembranraums oder nur von Glutathion abhängig ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Ozer *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2001). Wie genau dieser Exportmechanismus stattfindet, sowie die Quelle des Eisens sind unbekannt (Netz *et al.*, 2014). Jedoch gibt es nach neuen Forschungsergebnissen erste Hinweise auf ein Fe/S-Intermediat, das aus den Mitochondrien transportiert und danach am CIA-Scaffold-Komplex zum Fe/S-Cluster assembliert wird (Pandey *et al.*, 2019).

Im ersten Schritt wird ein transienter [4Fe-4S]-Cluster auf dem Scaffold-Komplex bestehend aus Nbp35 und Cfd1 zusammengesetzt (Netz *et al.* 2007). Die beiden Proteine gehören zu der Klasse der P-loop-NTPasen und liegen als Heterotetramer *in vivo* vor (Camire *et al.*, 2015; Stehling *et al.*, 2018). Mutagenesestudien zeigen, dass die Nukleotidbindung essenziell für die Funktion als Scaffold-Komplex ist, der genaue

Mechanismus ist aber noch nicht aufgeklärt und Gegenstand aktueller Forschung (Netz *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2018; Grossman *et al.*, 2019).

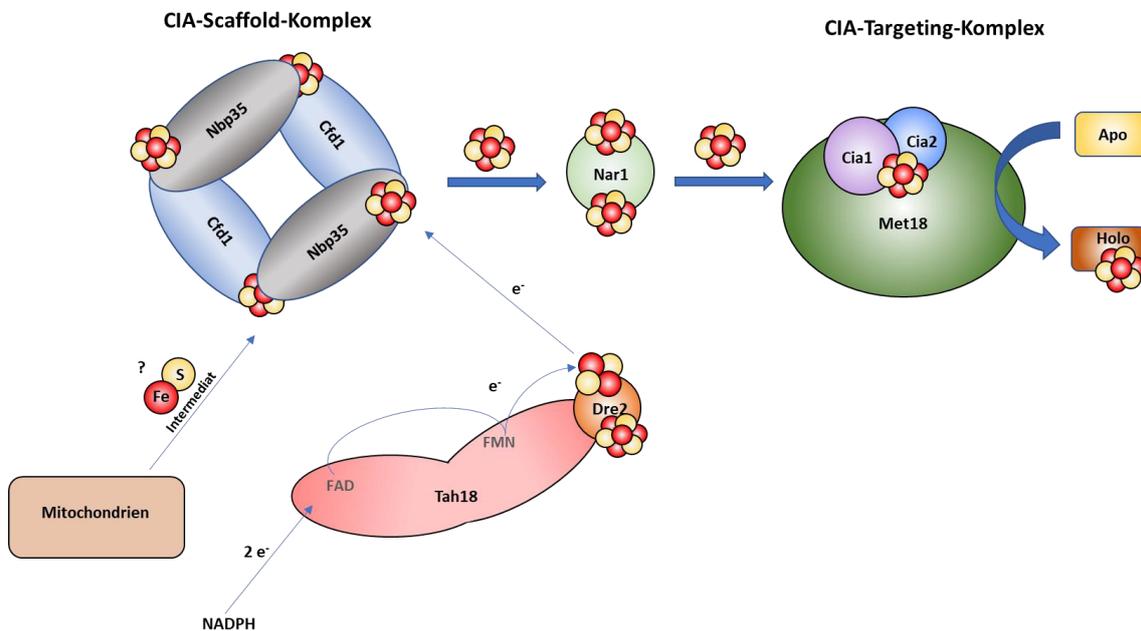


Abbildung 1-3: Biogenese cytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine. Ein transienter [4Fe-4S]-Cluster, hier schematisch dargestellt, wird zwischen Cfd1 und Nbp35 gebildet. Die Reduktionsäquivalente dafür werden von Tah18 und Dre2 bereitgestellt. Nar1 übernimmt die Rolle als Vermittler und überträgt den Cofaktor vom Scaffold- auf den Targeting-Komplex bestehend aus Cia1, Cia2 und Met18. Von hier erfolgt die Übertragung auf Apozielproteine. Eigene Darstellung, nach Netz *et al.*, (2014) und Pandey *et al.*, (2019) modifiziert.

Cfd1 wurde im Jahr 2003 als erste Komponente für eine extra-mitochondriale Fe/S-Cluster Reifung identifiziert. Es wurde eine Auswirkung von Cfd1 auf die Aktivität der cytosolischen Proteine Leu1 und tierische c-Aconitase nachgewiesen (Roy *et al.*, 2003). Nbp35 zeigt eine Aminosäuresequenzidentität von ca. 44 % mit Cfd1. Beide Proteine weisen ein hochkonserviertes CX₂C-Motif am C-Terminus auf, das sie durch [4Fe-4S]-Cluster miteinander verbrückt. Nbp35 verfügt zusätzlich über einen [4Fe-4S]-Cluster, der über ein N-terminales CX₁₃CX₂CX₅C-Motif koordiniert wird. Der Cfd1 und Nbp35 verbrückende Cluster ist nur labil gebunden und kann leicht auf Apo-Proteine übertragen werden (Netz *et al.*, 2007). Für die Assemblierung werden zudem Elektronen benötigt, die über eine Elektronentransportkette über NADPH, der Flavinreduktase Tah18 und Dre2 zur Verfügung gestellt werden. Dieser Elektronentransfer ist essenziell für die Reifung von Zielproteinen, nicht aber vom Gerüstprotein (Netz *et al.*, 2010). Dre2 wurde im Zusammenhang einer Studie über mitochondriale Eisentransportproteine entdeckt und verfügt über einen [2Fe-2S]-Cluster sowie einen [4Fe-4S]-Cluster in der C-terminalen Domäne (Zhang *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2017). Physiologischer Interaktionspartner des Proteins ist Tah18, welches FMN-, NAD(P)(H)- und FAD-bindende Regionen aufweist. Über ESR-Studien wurde die Elektronentransportkette näher

analysiert. So werden Elektronen von NADPH über die FAD- und FMN-Zentren von Tah18 auf das [2Fe-2S]-Cluster von Dre2 übertragen (Netz *et al.*, 2010).

Das Bindeglied zwischen dem CIA-Scaffold- und dem CIA-Targeting-Komplex stellt Nar1 dar. Das Protein weist Sequenzhomologie zu [Fe-Fe]-Hydrogenasen auf, besitzt aber nicht deren katalytische Aktivität. Der N-Terminus von Nar1 besitzt eine Ferredoxin-artige Domäne mit vier konservierten Cysteinen. In der C-terminalen Region finden sich ebenso vier konservierte Cysteine, die typischerweise in [Fe-Fe]-Hydrogenasen den [4Fe-4S]-Teil des katalytisch-aktiven H-Cluster koordinieren (Balk *et al.*, 2004; Nicolet *et al.*, 2000). Mutagenese- und ESR-Studien gepaart mit Strukturmodellierung identifizierten die zwei [4Fe-4S]-Cluster in der N- und C-terminalen Domäne, wobei der N-terminale Cluster zum Teil exponiert an der Außenseite des Proteins liegt und der C-terminale im Inneren des Proteins lokalisiert ist (Urzica *et al.*, 2009). Anhand von Depletionsstudien und Coimmunopräzipitation konnte die Funktion und Position von Nar1 innerhalb der CIA-Maschinerie offengelegt werden. So wurden Interaktionen des Proteins mit Cfd1 und Nbp35 und ebenso mit Cia1 nachgewiesen, jedoch hat eine Depletion von Nar1 keinen Effekt auf die Reifung des Cfd1-Nbp35-Komplexes (Balk *et al.*, 2005a; Balk *et al.*, 2005b; Netz *et al.*, 2007). Diese Abhängigkeit demonstriert, dass Nar1 nicht nur ein Mitglied, sondern auch ein Zielprotein der CIA-Maschinerie verkörpert und dadurch an seiner eigenen Reifung beteiligt wäre, was in einem Henne-Ei-Problem resultiert (Lill & Mühlenhoff, 2006).

Der eigentliche CIA-Targeting-Komplex, der mit den Apozielproteinen wechselwirkt, besteht aus den drei Proteinen Cia1, Cia2 und Met18. Cia1 ist, durch eine Kristallstruktur belegt, ein siebenblättriger β -Propeller, der pseudosymmetrisch um eine zentrale Achse orientiert ist und den WD40-Proteinen, die nachweislich an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind, angehört (Srinivasan *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2010; Li & Roberts, 2001). Entdeckt wurde das Protein als Fusionsprotein mit Cfd1 in *Schizosaccharomyces pombe*. Anhand von Coimmunopräzipitation konnte eine Interaktion von Cia1 mit Nar1, nicht aber mit Cfd1 oder Nbp35 nachgewiesen werden (Balk *et al.* 2005b). Cia2 ist ein kleines saures Protein mit einer C-terminalen DUF59-Domäne. Verschiedene Experimente in Hefe und in menschlichen Zelllinien belegen eine Interaktion von Cia2 mit den Mitgliedern des restlichen Targeting Komplexes (Stehling *et al.*, 2012; 2013). Met18 ist das größte Protein des CIA-Targeting-Komplexes, wurde zuerst in *S. cerevisiae* identifiziert und besitzt mehrere HEAT-Sequenzen am C-Terminus, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein können (Gari *et al.*, 2012). Es wird diskutiert, dass Cia2 das Zentrum des Targeting Komplexes darstellt, da eine Met18-Cia2- und Cia1-Cia2-, nicht aber eine Met18-Cia1-Interaktion bis heute nachweisbar ist (Seki *et al.*, 2013; Vo *et al.*, 2018, Odermatt *et al.*, 2019). Als Bindestellen für das Apoprotein wurde eine hochaffine Bindestelle an CIAO1 und eine weitere Bindestelle an der N-terminalen Domäne von MMS19 postuliert. Durch Flexibilität von MMS19 innerhalb

des Komplexes, können die verschiedenen Zielproteine erkannt werden (Kassube & Thomä, 2020).

Des Weiteren werden für die Biogenese die Glutaredoxine Grx3-Grx4, die durch einen [2Fe-2S]-Cluster verbrückt sind, benötigt. Jedoch werden sie nicht als Teil der CIA-Maschinerie angesehen, da sie eine höhergeordnete Funktion in der allgemeinen Eisen-Homöostase der Zelle innehaben (Mühlenhoff *et al.*, 2010; Netz *et al.*, 2014). Für die Assemblierung dieses [2Fe-2S]-Clusters werden die ISC-Maschinerie sowie die ISC-Export-Maschinerie, nicht aber die frühen CIA-Faktoren Nbp35 oder Dre2 benötigt (Lill *et al.*, 2014).

1.3 Zielproteine des CIA-Targeting-Komplexes

Bis heute sind in der Literatur nur Beispiele von [4Fe-4S]-Proteinen als Ziele der CIA-Maschinerie bekannt. Jedoch werden immer noch Targets erkannt und neue Erkenntnisse über den CIA-Targeting-Komplex gewonnen (Paul *et al.*, 2015; Odermatt & Gari, 2017; Braymer *et al.*, 2019). Die Rekrutierung vieler Apozielproteine, wie Leu1, sind abhängig vom gesamten CIA-Targeting-Komplex. Jedoch wurden auch Targets beschrieben, deren Reifung nur von bestimmten Mitgliedern des CIA-Targeting-Komplexes abhängt (Paul & Lill, 2015). So wird die Reifung und die damit verbundene Stabilität von POLD1, humanes Homolog von Pol3, nur durch die Depletion von CIA1 stark verringert, nicht aber von CIA2B oder CIA2A (Stehling *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu Hefe besitzen menschliche Zellen neben dem Cia2-Homolog CIA2B, ein weiteres Cia2-ähnliches Protein, genannt CIA2A. Während CIA2B im Allgemeinen am Mechanismus der Fe/S-Cluster-Assemblierung beteiligt ist, ist die Rolle von CIA2A spezieller Natur (Maione *et al.*, 2018). So konnte in HeLa-Zellen durch Depletion von CIA1, CIA2A und CIA2B und Messung der cytosolischen Aconitaseaktivität gezeigt werden, dass der Fe/S-Clustereinbau in IRP1 nur mit CIA2A im Zusammenhang steht (Stehling *et al.*, 2013).

Ein bekanntes Zielprotein der CIA-Maschinerie stellt die Fe/S-Helikase XPD dar. Neben der Identifizierung als [4Fe-4S]-Protein, konnte ein CIA-Maschinerie-abhängiger Einbau des Clusters nachgewiesen werden (Rudolf *et al.*, 2006; Vashisht *et al.*, 2015). Die Coimmunopräzipitation in menschlichen Zelllinien zeigt eine Komplexbildung mit allen Komponenten des CIA-Targeting-Komplexes (Vashisht *et al.*, 2015), jedoch konnte auch eine CIAO1/CIA1 und MIP18/CIA2B unabhängige Interaktion von XPD mit HEAT-Sequenzen am N-Terminus von MMS19 (*S. cerevisiae* Met18) belegt werden (Odermatt & Gari, 2017). Dieses Interaktionsmuster ist bis heute einzigartig.

Ein weiteres Protein, welches seine beiden [4Fe-4S]-Cluster auf untypische Weise erhält, stellt Rli1 dar. Für die Insertion der Cluster dieses Proteins werden zusätzlich zu den ubiquitären, zwei weitere spezielle CIA-Faktoren Lto1 und Yae1 benötigt. Lto1 verfügt über ein konserviertes C-terminales Tryptophan, welches für die Interaktion mit dem CIA-Targeting-Komplex essenziell ist. Es verfügt ebenso wie Yae1 über ein Deca-GX₃-

Motiv über welches die beiden miteinander interagieren. Yae1 wechselwirkt nun mit dem Targetprotein Rli1, dem bis heute einzigen bekannten Protein, dessen Clusterinsertion von diesem Adapter-Komplex abhängt (Paul *et al.*, 2015).

Viperin gehört zur Radikal-SAM-Enzymfamilie und ist ein Interferon-stimuliertes antivirales Protein, dessen [4Fe-4S]-Cluster und SAM-Domäne essenziell für diese Eigenschaft sind (Jiang *et al.*, 2008, Chakravarti *et al.*, 2018). Die Expression von Viperin in HEK293-Zellen inhibiert die Replikation des *Hepatitis C-Virus*. Durch Mutation konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Mutation der Clusterliganden in der Radikal-SAM-Domäne, sondern auch die Deletion oder Variation des C-terminalen Tryptophans zu Alanin zu einem Aktivitätsverlust führt (Jiang *et al.*, 2008; Upadhyay *et al.*, 2014). Die Bedeutung dieses Restes wird der Interaktion mit CIAO1 zugeschrieben, da eine Wechselwirkung von CIAO1 mit Mutanten des C-terminalen Tryptophans in Coimmuno-präzipitationsexperimenten nicht mehr nachweisbar ist (Upadhyay *et al.*, 2014). Zudem ist bekannt, dass trotz Interaktion mit allen Mitgliedern des CIA-Targeting-Komplexes nur CIAO1 kritisch für den Clustereinbau in Viperin ist (Upadhyay *et al.*, 2017).

1.4 Ferredoxine und Thioredoxin-artige Ferredoxine

Ferredoxine (Fds) sind eine Klasse von Fe/S-Proteinen, die ihren Namen von D. C. Wharton angelehnt an das „Eisen-Protein“, welches erstmals 1962 aus dem Bakterium *Clostridium pasteurianum* isoliert wurde, erhielten (Mortenson *et al.*, 1962; Valentine, 1964). Der Begriff Ferredoxin ist weitgefasst und beschreibt verschiedene kleine, lösliche, meist saure Fe/S-Proteine, die ihre Funktion im Elektronentransport zwischen Proteinen innehaben (Jung *et al.*, 1999). Die meisten Ferredoxine sind niedrig-Potential Elektronentransporter, die in zwei Klassen unterteilt wurden:

Die erste Art umfasst „bakterielle“ Ferredoxine, welche erstmalig in anaeroben Bakterien nachgewiesen wurden. Historisch zählen zu diesen Ferredoxinen mehrere Clustervarianten. So können Proteine dieser Klasse zwei [4Fe-4S]-, [4Fe-4S][3Fe-4S] oder einen [4Fe-4S]-Cluster inkorporieren (Fukuyama *et al.*, 1988). In einer Polypeptidkette von bis zu 100 Aminosäuren können zwei [4Fe-4S]-Cluster gebunden werden (Meyer *et al.*, 2001). Neben den niedrig-Potential [4Fe-4S]-Ferredoxinen gibt es HiPIPs (*High Potential Iron Proteins*). HiPIPs verfügen über ein Redoxpotential von über +350 mV (Cammack, 1973). Das HiPIP aus *Rhodospila globiformis* hat mit +400 mV ein über 100 mV höheres Redoxpotential als die meisten bekannten HiPIPs (Ambler *et al.*, 1993). Wie bei den bakteriellen [4Fe-4S]-Ferredoxinen nimmt der Cluster eine Kuban-förmige Struktur an und wird von vier Cysteinliganden komplexiert (Carter *et al.*, 1972). Die Oxidationszustände des Clusters können bei den niedrig-potenzial Ferredoxinen bei [4Fe-4S]^{1+/2+} und bei den HiPIPs bei [4Fe-4S]^{2+/3+} liegen.

Die zweite Familie dieser Klasse der Fe/S-Proteine verfügt über eine Polypeptidkette mit 90 bis 130 Resten und besitzt ein [2Fe-2S]-Cluster. Zu dieser Klasse zählen pflanzliche

Ferredoxine, die als Elektronentransporter in der Photosynthese eine wichtige Rolle spielen, sowie solche aus einer Vielzahl von Organismen, die eine Funktion im Elektronentransfer in der Redox-Kette von beispielsweise Hydroxylasen übernehmen (Hanke & Mulo, 2013; Grinberg *et al.*, 2000). Das humane Adrenodoxin und Yah1, das Ferredoxin der ISC-Maschinerie gehören auch zu dieser Klasse.

In den 1960er Jahren wurde noch eine dritte Art von niedrig-Potential-Ferredoxinen durch Aufklärung einer Primärstruktur eines [2Fe-2S]-Proteins aus *Clostridium pasteurianum* entdeckt (Meyer *et al.*, 1986). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit dieser Proteine zu Thioredoxin werden sie als Thioredoxin-artige Ferredoxine (TLF) bezeichnet (Meyer *et al.* 2006). Mittels Mößbauerspektroskopie konnte die Anwesenheit eines [2Fe-2S]-Clusters bewiesen werden (Dunham *et al.*, 1971). Ein bekannter Vertreter der TLF stammt aus dem Bakterium *Aquifex aeolicus* (AaFd4). Das [2Fe-2S]-Ferredoxin zeigt eine Thioredoxin-artige Faltung und lässt sich somit dieser Klasse von Proteinen zuordnen (Yeh *et al.*, 2000).

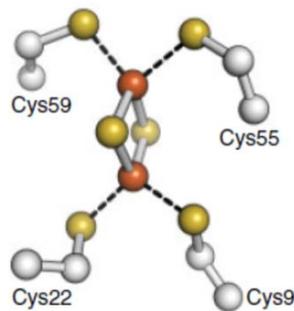


Abbildung 1-4: Darstellung des [2Fe-2S]-Clusters von TLF aus *A. aeolicus*. (PDB code 1M2A, Meyer *et al.*, 2006).

Das Protein war das erste isolierte und charakterisierte hyperthermophile [2Fe-2S]-Protein. AaFd4 liegt als Homodimer vor, wobei jede Untereinheit die Masse von 12,4 kDa und je einen [2Fe-2S]-Cluster besitzt. Ein bekannter Vertreter eines TLF-Homologs stellt eine Untereinheit des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette dar. Die NuoE-Untereinheit weist Sequenzähnlichkeiten, besonders im Bereich der clusterligierenden Cysteine, zu TLF auf. Neben der Thioredoxin-artigen Faltung unterscheiden sich diese Proteine zu Ferredoxinen in ihrer Abfolge der ersten beiden clusterbindenden Cysteine. Während man in klassischen Ferredoxinen zehn bis zwölf Aminosäuren zwischen den Liganden findet, ist die Anzahl in TLF auf vier verringert (Meyer, 2001).

1.5 Rieske-Protein

Rieske-Proteine sind redox-aktive [2Fe-2S]-Proteine. Diese Klasse hat gemeinsam, dass ihr Cluster an einem der beiden Eisenionen mittels zwei Histidinen und am anderen mit zwei Cysteinen komplexiert ist. Namensgebend für diese Art der Fe/S-Proteine war John

S. Rieske (Rieske *et al.*, 1964), der sie erstmals entdeckte und isolierte. Sie wurden als Untereinheiten des Cytochrom-*bc*₁- und des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes identifiziert. Welche Aminosäuren als koordinierende Liganden des Clusters fungieren, wurde jedoch erst in den 1980er Jahren aufgeklärt. Im Jahr 1984 wurde erstmals anhand spektroskopischer Daten postuliert, dass der Cluster von zwei nicht-Cystein Liganden koordiniert wird (Fee *et al.*, 1984). Anhand gepulster ESR-Spektroskopie und ortsgerechter Mutageneseexperimente ergaben sich erstmals Hinweise auf eine Koordination des Clusters durch zwei Histidine (Cline *et al.*, 1985; Davidson *et al.*, 1992), die aber erst durch die Lösung der Kristallstruktur eines Fragments des Rieske-Proteins des *bc*₁-Komplexes aus Rinderherzmitochondrien belegt wurde (Iwata *et al.*, 1996). Diese Koordination durch zwei Histidine und zwei Cysteine (Abb. 1-4) ist verantwortlich für ein höheres Redoxpotential von -150 bis +350 mV im Vergleich zu [2Fe-2S]-Ferredoxinen (-100 bis 500 mV), das außerdem durch die de-/protonierbaren Histidine pH-abhängig ist (Boxhammer *et al.*, 2008).

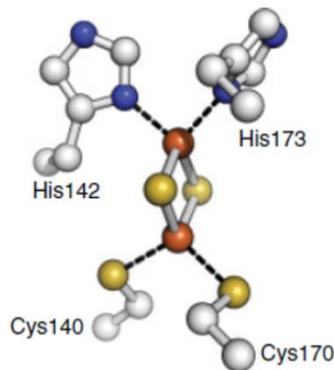


Abbildung 1-5: Darstellung des [2Fe-2S]-Clusters im Rieske-Protein. SoxF aus *Sulfolobus solfataricus* (PDB code 1JM1, Meyer *et al.*, 2006).

Rieske-Proteine sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Eine ihrer Haupteigenschaften ist die Funktion als Elektronentransporter zwischen verschiedenen Redox-Partnern. Das Rieske-Protein ist z.B. eine der Untereinheiten der Ubichinol:Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase. Im reduzierten Zustand haben beide Histidine des *bc*₁-Typ-Proteins einen relativ hohen pK_S -Wert von ca. 12,5. Sind beide Eisenionen oxidiert, hat ein Histidin einen pK_S -Wert von ungefähr 7 und das zweite einen von ca. 9,5 (Albers *et al.*, 2013). Der niedrige pK_S -Wert des ersten Histidins erlaubt eine gekoppelte Elektronen- und Protonenaufnahme bei physiologischem pH-Wert (Klingen & Ullmann, 2004).

Des Weiteren werden in der Literatur zwei Gruppen mit einem niedrigeren Potential von -150 bis + 5 mV beschrieben. Die erste Gruppe dieser niedrig-Potential-Rieske-Proteine enthält kleinere Proteine mit einer Länge von 90-110 Aminosäuren. Sie werden als Rieske-Ferredoxine bezeichnet (Boxhammer, 2008). In *E. coli* ist das Rieske-Typ Ferredoxin BphF, ein lösliches 12,1 kDa Protein und Teil der Elektronentransportkette der Ring-Hydroxylierung-Oxidase des Biphenyls. BphF transportiert innerhalb der Kette

Elektronen von einer Reduktase zur Dioxygenaseuntereinheit und fungiert somit als Transportferredoxin (Couture *et al.*, 2001).

Zur zweiten Gruppe zählen die katalytischen Untereinheiten von Rieske-Hydroxylasen und Rieske-Oxygenasen (Wackett, 2002; Ferraro *et al.* 2005). Oxygenasen im Allgemeinen sind Enzyme, die durch NADPH-Verbrauch Sauerstoff auf ihr spezifisches, oft aromatisches Substrat übertragen, wobei oft eine Ringöffnung am aromatischen Molekül stattfindet. Sie werden in Mono- oder Dioxygenasen unterteilt, je nachdem ob sie ein oder zwei Sauerstoffatome auf das Substrat übertragen. Diese Proteine sind erheblich größer als Rieske-Ferredoxine und enthalten eine zweite Domäne mit einer mononuklearen oder einem dinuklearen Eiseneinheit als aktives Zentrum (Schmidt & Shaw, 2001). Ein Rieske-Oxygenase-System kann aus bis zu drei Komponenten bestehen. Im Naphthalen-Dioxygenasesystem wird im ersten Schritt durch eine Reduktase NAD(P)H zu NAD(P)⁺ oxidiert und somit zwei Elektronen freigesetzt. Die Elektronen werden an einem Flavin-Cofaktor zwischengelagert. Nach Reduktion eines [2Fe-2S]-Transportferredoxins überträgt jenes die Elektronen schließlich zum Rieske-Zentrum der Oxygenase. Hier werden die Elektronen weiter zum mononuklearen Eisenzentrum transportiert (Ferraro *et al.*, 2005).

In Bakterien wurden Rieske-artige Zentren auch in Untereinheiten anderer Redoxenzyme wie der Arsenit-Oxidase (Ellis *et al.*, 2001) und der Nitrit-Reduktase (Lledó *et al.*, 2004) angetroffen.

1.6 NEET-Proteine & IscR

Bis heute sind drei verschiedene [2Fe-2S]-Proteine bzw. -Klassen mit der ungewöhnlichen Koordination von drei Cysteinen und einem Histidin bekannt. Namentlich sind dies der Transkriptionsfaktor IscR, Glutaredoxine wie Grx3/4-Fra2 und CDGSH- oder NEET-Proteine (Bak & Elliot, 2014). In humanen Mitochondrien sind drei CISD-(*CDGSH iron sulfur domain*)-Proteine bekannt: MitoNEET (CISD1), Miner1 (CISD2 oder NAF-1) und Miner2 (Lin *et al.*, 2007; Conlan *et al.*, 2009; Inupakutika *et al.*, 2017). NEET-Proteine verbindet zum einen die namensgebende Aminosäureabfolge Asparagin-Glutaminsäure-Glutaminsäure-Threonin im C-terminalen Bereich und zum anderen ihr Clusterbindemotif in der ca. 40 Aminosäuren langen CDGSH-Domäne. Aufgrund dieser Domäne wurde bis zur Identifikation von Histidin als vierten Liganden des [2Fe-2S]-Clusters MitoNEET als Zink-bindendes Protein angesehen (Wiley *et al.*, 2007a). Entdeckt wurde das Protein 2004 durch seine Fähigkeit Pioglitazon, ein der Thiazolidindion-Familie angehöriges Medikament zur Behandlung von Diabetes Typ 2, zu binden (Colca *et al.*, 2004). Das kleine MitoNEET (ca. 13 kDa) liegt als Homodimer vor und ist mittels einer N-terminalen Transmembranhelix in der äußeren mitochondrialen Membran verankert. Der Cterminale Teil des Proteins ragt ins Cytosol (Paddock *et al.*, 2007; Wiley *et al.*; 2007b). Die Inkorporierung des Clusters ist ISC-Maschinerie abhängig

und wird nicht über eine Komponente der CIA-Maschinerie gesteuert. Die Autoren schlagen eine Bifurkation des Fe/S-Biosyntheseweges am Intermembran Raum vor (Ferecatu *et al.*, 2014).

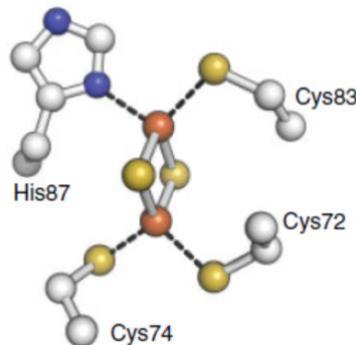


Abbildung 1-6: Darstellung des [2Fe-2S]-Clusters im humanen MitoNEET (PDB code 2QH7, Meyer *et al.*, 2006).

Die Funktion von MitoNEET ist noch nicht vollkommen aufgeklärt, jedoch finden sich mehrere Belege für eine Funktion als Clusterdonor (Tamir *et al.*, 2015). Das Protein soll beim Clusterreparaturmechanismus von IRP1 involviert sein, der vom Redox-Status des Proteins abhängt (Golinelli-Cohen *et al.*, 2016). Unter regulären zellulären Bedingungen ist der Fe/S-Cluster von MitoNEET reduziert. Ist die Zelle jedoch oxidativem Stress ausgesetzt, werden die Cluster oxidiert und der Clustertransfer zu IRP1, welches in seiner Holoform als cytosolische Aconitase fungiert, wird eingeleitet (Golinelli-Cohen *et al.*, 2017). *In vitro* Experimente zeigen zusätzlich, dass durch Komplexbildung mit Anamorsin (humanes Dre2) und NDOR1 (*NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1*, humanes Tah18) und Elektronenübertragung der Cluster von Anamorsin auf MitoNEET übertragen wird und das Protein in die Holoform umgewandelt werden kann (Camponeschi *et al.*, 2017). Weitere *in vitro* Studien belegen eine umgekehrte Clusterübertragung von MitoNEET auf Anamorsin (Lipper *et al.*, 2015). Beide Mechanismen weisen auf eine Wechselwirkung zwischen dem integralen Membranprotein und der CIA-Maschinerie hin.

Das zweite Mitglied der NEET-Proteinfamilie ist Miner1. Fehler im Spleißvorgang der mRNA dieses Vertreters resultieren im Wolfram Syndrom 2 und verursachen beispielsweise Diabetes Mellitus, Taubheit oder verkürzte Lebenszeit (Amr *et al.*, 2007). Wie MitoNEET wurde Miner1 ursprünglich als Zinkfingerprotein dotiert, bis zur Aufklärung seiner Kristallstruktur. Miner1 ist in seiner Aminosäurenabfolge zu 54% identisch mit MitoNEET und ist wie dieses in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, wurde aber auch an Membranen, die das Endoplasmatische Retikulum mit der äußeren mitochondrialen Membran verbinden, detektiert (Conlan *et al.*, 2009; Sohn *et al.*, 2013; Karmi *et al.*, 2018).

Miner2 ist das am wenigsten untersuchte Mitglied dieser Proteinfamilie. Im Gegensatz zu beiden obigen besitzt dieses Protein zwei CDGSH-Domänen und ist als Monomer in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (Cheng *et al.*, 2017; Karmi *et al.*, 2018).

Das UV/Vis-Spektrum von MitoNEET weist die typischen Merkmale eines [2Fe-2S]-Clusters auf. Die Maxima bei 340 nm, 460 nm und bei 540 nm sind charakteristisch für einen [2Fe-2S]-Cluster (Bak & Elliot, 2013). Mit den g -Werten von $g = 2,007$, $g = 1,937$ und $g = 1,897$ zeigt das ESR-Spektrum ein rhombisches Signal, das ebenso charakteristisch für diesen Clustertyp ist (Dicus *et al.*, 2010). Diese Parameter finden sich wieder in der Charakterisierung von Miner1. Das UV/Vis- als auch das ESR-Spektrum sind nahezu identisch zu MitoNEET. Im Gegensatz dazu können im ESR-Spektrum von Miner2 zwei überlappende Spezies beobachtet werden, was mit der Eigenschaft als Monomer mit zwei leicht unterschiedlichen [2Fe-2S]-Clustern im Einklang steht (Karmi *et al.*, 2018).

Der *E. coli* Transkriptionsfaktor IscR trägt einen [2Fe-2S]-Cluster und ist verantwortlich für die Regulation von mehr als 40 Genen. Neben seiner eigenen wird auch die Expression der Isc-Proteine der Fe/S-Cluster Biogenese durch IscR reguliert (Giel *et al.* 2006). Steht Eisen in ausreichender Konzentration in der Zelle zu Verfügung, fungiert Holo-IscR als Repressor des *isc*-Operons. Wenn nicht genügend Fe/S-Cluster gebildet werden, liegt Apo-IscR vor, welches nicht an die Operatorsequenz binden kann und somit nicht mehr als Repressor des *isc*-Operon fungiert. Unter Eisenmangel-Bedingungen oder oxidativem Stress ist Apo-IscR in *E.coli* einer der Aktivatoren für die Suf-Maschinerie (Crack *et al.* 2012b). Die Sequenz von IscR verfügt über drei Cysteine, welche durch Mutagenesestudien als Liganden des Clusters identifiziert wurden (Yeo *et al.* 2006). Erst später gab es durch Mößbauer- und Resonanz Raman Daten, die auf einen Liganden wiesen, der mittels Stick- oder Sauerstoffs den Fe/S-Cluster bindet. Durch Mutagenese aller konservierten, potenziellen Aminosäuren zu Alanin konnte das Histidin an Position 107 als möglicher vierter Clusterligand vorgeschlagen werden. ¹⁵N-NMR-Spektroskopie festigte die Funktion von H107 als vierten Ligand des [2Fe-2S]-Clusters (Fleischhacker *et al.* 2012).

In *S. cerevisiae* wird der Eisenstoffwechsel durch die Transkriptionsfaktoren Aft1 und Aft2 zusammen mit Grx3/Grx4 und Fra1 und Fra2 reguliert. Ein heterodimerer Komplex aus Grx3/4 und Fra2 bindet einen [2Fe-2S]-Cluster durch zwei Cystein-Reste des Glutaredoxins und einem Histidin-Rest von Fra2 (Li *et al.* 2019). Die Identität des vierten Liganden ist bisher nicht geklärt (Trnka *et al.* 2020).

1.7 Aim32 und Apd1

Die Proteine Aim32 und Apd1 der Hefe *S. cerevisiae* sind die ersten Vertreter einer neuen, in den Arbeitskreisen von Prof. A. J. Pierik und Prof. V. Schünemann identifizierten, Proteinfamilie der [2Fe-2S]-Proteine. Sie zeichnen sich durch ihr

einzigartiges HXGGH-Clusterbindemotif aus (Stegmaier *et al.*, 2019). Beide Proteine sind nur wenig erforscht und ihre Funktionen in der Zelle sind noch nicht geklärt.

Aim32

Im Jahr 2009 publizierten Forscher der Princeton University in New Jersey ein bioinformatisches Vorhersagemodell mit anschließender Analyse unbekannter mitochondrialer Proteine. Sie konnten 109 Proteine identifizieren bzw. verifizieren, deren Deletion die mitochondriale Biogenese und Vererbung beeinflusst. Sie verwendeten ein zweistufiges Modell, bei dem in der ersten Instanz Datensätze verschiedenster Quellen auf mögliche Kandidaten hin untersucht wurden. Zudem wurden hier Daten von 106 bekannten mitochondrialen Genen eingearbeitet. Von den 183 vielversprechendsten Kandidaten aus dieser Analyse waren 42 bekannte mitochondriale Proteine. Aus den übrigen 141 Kandidaten konnten weitere 83 (59 %) Proteine mit einer Rolle an der mitochondrialen Biogenese assoziiert werden. Die zweite Vorhersage deckte zusätzliche 52 potenziell in Mitochondrien lokalisierte Proteine auf, von denen 17 (53 %) verifiziert werden konnten.

Eine experimentelle Methode zur Überprüfung der bioinformatischen Studien war der „Petite-Frequency-Assay“. Im ersten Schritt werden Hefezellen mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle, in diesem Fall Glycerin, kultiviert. Überleben Zellen unter diesen Bedingungen, müssen sie über eine funktionsfähige Atmungskette und schlussfolgernd über normale, funktionsfähige Mitochondrien verfügen. Folgend werden die Kulturen auf einer glukosehaltigen Agarplatte ausgestrichen und weiter kultiviert. An diesem Punkt können nach der Zellteilung auch Tochterzellen überleben, die über nicht-funktionsfähige Mitochondrien verfügen. Von der Platte werden nun einzelne Kolonien selektiert und in Flüssigmedium mit Glukose kultiviert. Jene Zellsuspension wird nun auf Agarplatten mit Glukose und Tetrazolium aufgetragen. Zellen mit gesunden Mitochondrien nehmen dieses auf und erscheinen rot und zeigen große Kolonien. atmungsdefiziente Zellkolonien sind klein (*petite*) und weiß.

Von 193 getesteten Deletionsstämmen wiesen 79 (41 %) einen signifikanten Phänotyp bei der Vererbung der Mitochondrien auf. Einer der Deletionsstämmen, der einen schwachen Phänotyp aufwies, war ein Stamm, aus dem das Gen *AIM32* deletiert wurde. Aim ist die Abkürzung für „*Altered Inheritance rate of Mitochondria*“ und deutet daraufhin, dass der Verlust des Gens die Bildung oder der Übertragung der Mitochondrien von der Mutter- auf die Tochterzelle auf eine unbekannte Weise beeinträchtigt (Hess *et al.*, 2009).

Lalève *et al.* publizierten 2016, dass das Malaria-Medikament Primaquin (PQ) sowohl Fe/S-Proteine als auch das Wachstum unter respiratorischen Bedingungen beeinflusst. Sie testeten den Einfluss von PQ auf insgesamt 27 Deletionsmutanten, deren deletierte Gene z. B. am Abbau von oxidativem Stress, an der DNA-Reparatur oder an der

mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind. Nur zwei der getesteten Mutanten zeigten eine Sensitivität gegenüber dem Medikament, eine davon war $\Delta sod2$.

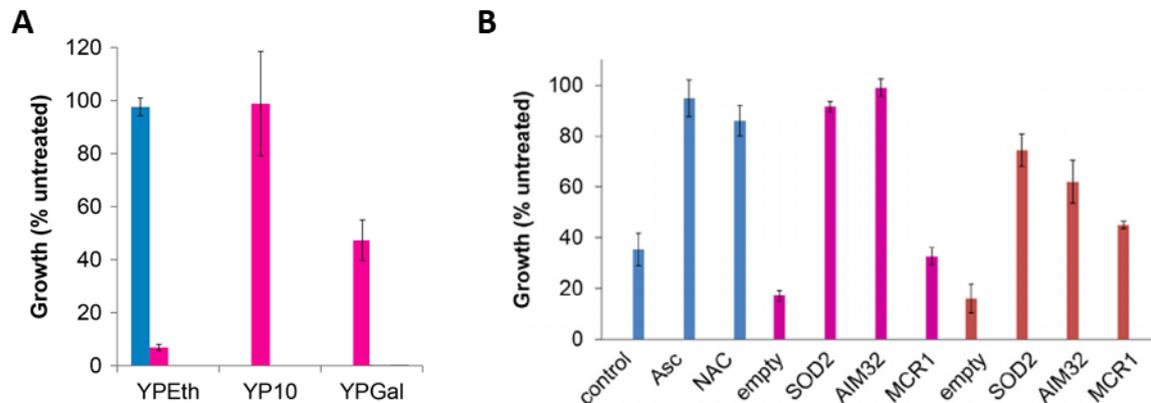


Abbildung 1-7: Effekt von Primaquine auf $\Delta sod2$. **A** Effekt von Primaquine auf das fermentative Wachstum von $\Delta sod2$. $\Delta sod2$ (magenta) und WT (blau) wurden in YP-Ethanol, YP-Glukose (10 % Glukose) oder YP-Galaktose mit $OD_{600} = 0,1$ inokuliert und mit 1 mM PQ versetzt. Die End- OD_{600} wurde nach 1-3 Tagen Kultivierung bei 28 °C bestimmt. Das Wachstum wurde als das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle angegeben. **B** Effekt von Ascorbat (Asc) resp. N-Acetylcystein (NAC) und der Überexpression von *SOD2*, *AIM32* oder *MCR1* auf die PQ-Empfindlichkeit des $\Delta sod2$ -Stammes. Nach Vorkultivierung in YP-Medium mit passender Kohlenstoffquelle wurden Kulturen mit $OD_{600} = 0,1$ inokuliert und bei 28 °C für drei Tage kultiviert. Die PQ-Empfindlichkeit wurde als Verhältnis der Zelldichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Blau: Wachstum $\Delta sod2$ versetzt mit 0,2 mM PQ mit und ohne Asc (5 mM) resp. NAC (5 mM) in YP-Ethanol. Magenta: $\Delta sod2$ und $\Delta sod2$ überexprimierend *SOD2*, *AIM32* und *MCR1* in YP-Ethanol mit 0,3 mM PQ. Braun: Wachstum $\Delta sod2$ versetzt mit 0,2 mM PQ mit und ohne Asc (5 mM) resp. NAC (5 mM) in YP-Glycerin (Lalève *et al.*, 2016).

Untersucht wurde das fermentative Wachstum dieses Deletionsstammes in Gegenwart von 1 mM PQ, dargestellt in Abbildung 1-7. WT-Zellen zeigten in YP-Ethanol nahezu keinen Wachstumsphänotyp (blau), wohingegen $\Delta sod2$ nicht lebensfähig war. Wurde Glukose als Kohlenstoffquelle verwendet war kein Phänotyp zu beobachten, bei Galaktose wurde das Zellwachstum um 50 % inhibiert.

In einem Folgeexperiment wurde durch die Transformation einer High-Copy-Plasmid-DNA-Bibliothek nach Genen gesucht, die die PQ-Sensitivität unterdrücken können. Zwei Kandidaten waren *AIM32* und *MCR1* (*mitochondrial NADH-Cytochrome b5 Reductase*) (Lalève *et al.*, 2016). Dem Protein Mcr1 wird eine wichtige Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress zugeschrieben (Lee *et al.*, 2001).

Apd1

In der Literatur wird Apd1 das erste Mal 1999 in einer Studie mit 150 Deletionsmutanten der Bäckerhefe *S. cerevisiae* beschrieben. Im Zuge dieser Studie wurde für die Deletionsmutanten eine Phänotypisierung unter verschiedenen Stressbedingungen durchgeführt. Einen Teil dieser Untersuchungen stellten Kupfer-Toxizitätstests dar. Das Schwermetall ist ein essenzielles Element für den Organismus, das als Cofaktor an einer Vielzahl von enzymatischen Reaktionen beteiligt ist (De Freitas *et al.*, 2003). Jedoch ist

Kupfer in höheren Konzentrationen toxisch für den Organismus. Hefe verfügt über eine Vielzahl von Regulations- und Entgiftungsmechanismen, die den intrazellulären Kupfergehalt kontrollieren (Butt *et al.* 1981; Fürst *et al.* 1988). Wird einer der Mechanismen beeinträchtigt, resultiert daraus eine erhöhte Sensitivität oder eine erhöhte Resistenz des Organismus auf Metallionen. Entian *et al.* testeten 121 Mutanten auf ihr Wachstumsverhalten auf Festmedium in Gegenwart von Kupfersulfat in Konzentrationen von 0–0,2 mM. Im Vergleich zum Wildtyp wiesen nur zehn Mutanten eine erhöhte Sensitivität und sechs eine erhöhte Resistenz auf. Ein Stamm, der verringertes Wachstum unter diesen Bedingungen im Vergleich zu Wildtypzellen zeigte, war $\Delta apd1$. Ein weiterer Phänotyp für diese Mutante bestand in einer Änderung der Aktinfilament Verteilung. Dieser war auch namensgebend für Apd1 (*Actin patches distal*) (Entian *et al.*, 1999).

Die Sensitivität von $\Delta apd1$ gegenüber Kupfer-Ionen wurde im Jahre 2008 durch eine weitere Hochdurchsatzstudie belegt. Jin *et al.* zeigten den Einfluss verschiedener Metallionen, darunter auch Kupfer, auf das Wachstum von Deletionsstämmen. Sie bestimmten die Verminderung des Wachstums der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp während der Exposition verschiedener Metallionen. Experimentell wurde dafür zunächst die EC_{50} -Konzentration für den WT ermittelt. Dieser Wert spiegelt jene Cu^{2+} -Konzentration im Medium wider, bei der der OD_{600} -Wert nach 20 h Inkubation um 50 % abnimmt. Für Kupfer grenzten sie diesen Bereich auf 0–10 mM $CuSO_4$ ein. Empirisch ermittelten sie 7 mM und führten mit jener Konzentration Wachstumsmessungen mit den einzelnen Deletionsstämmen durch. Mit diesen erhaltenen Daten errechnete sich der GIF (*Growth Inhibition Factor*), in dem das Wachstum des Deletionsstammes mit und ohne Metallexposition, sowie das Wachstum des Wildtypstammes mit und ohne Metallexposition berücksichtigt wird. Für $\Delta apd1$ ergab sich dabei ein GIF = 2,4. Somit weist dieser Stamm ein 2,4-fach schlechteres Wachstum in Gegenwart von 7 mM $CuSO_4$ im Vergleich zu WT auf. Insgesamt wurde die Sensitivität von 540 verschiedenen Deletionsmutanten gegenüber $CuSO_4$ getestet. Im Vergleich wiesen 79 % einen geringeren und die restlichen 21 % einen höheren GIF zu $\Delta apd1$ auf (Jin *et al.*, 2008).

In der Zeit, in der diese Arbeit entstand, wurde Apd1 erstmals als [2Fe-2S]-Protein der Familie der TLFs beschrieben, ohne spektroskopische Anhaltspunkte aus der ESR- oder Mößbauerspektroskopie. Lediglich ein UV/Vis-Spektrum, mit typischen [2Fe-2S]-Cluster Maxima bei 450 nm und 570 nm deutete auf einen inkorporierten Fe/S-Cofaktor hin (Tang *et al.*, 2015; Abb. 1-8 A). Die Autoren führten auch Mutagenesestudien zur Identifizierung der Clusterliganden durch und anhand der Daten wurden die Cysteine an den Positionen 44 und 48 sowie die Histidine an Position 255 und 259 als potenzielle Liganden (Abb. 1-8 B) vorgeschlagen. Im Zuge von *in vivo* Studien wurde das Gen in verschiedenen Stammhintergründen deletiert und anschließend die Folgen der Deletion untersucht. Die Deletion des Genes hatte jedoch keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten bei Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen.

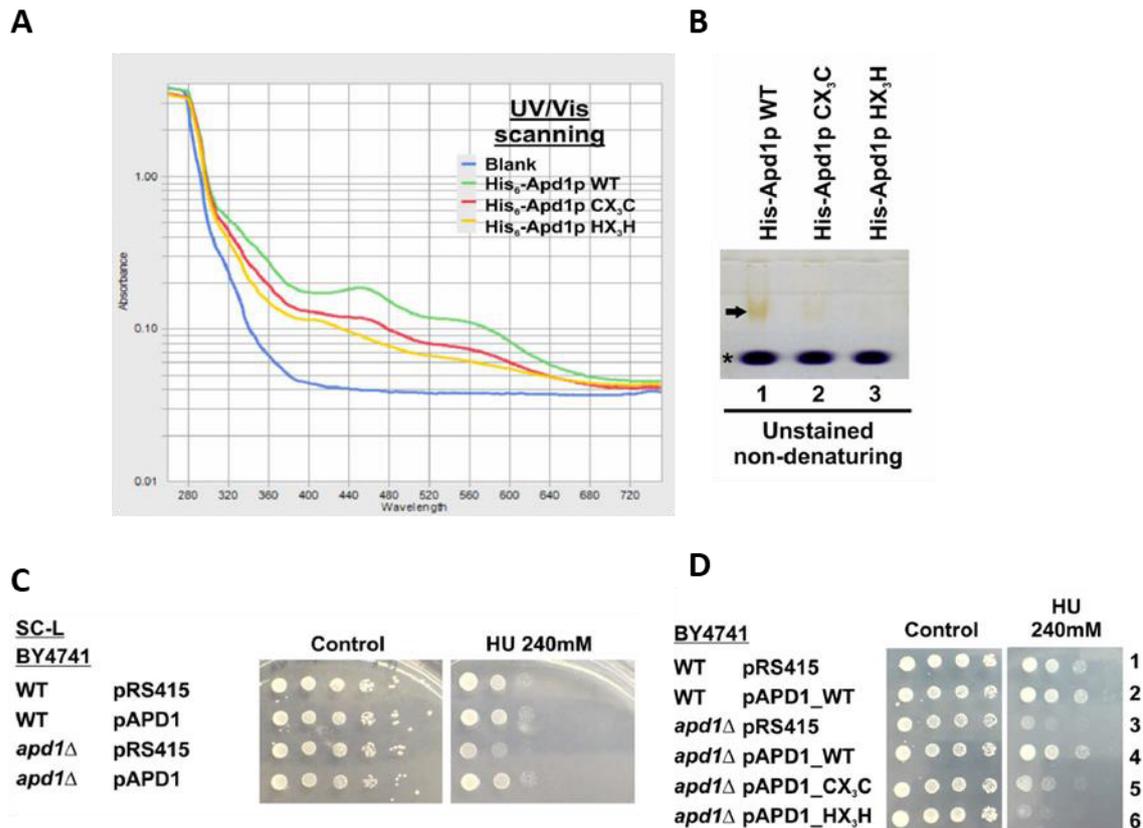


Abbildung 1-8: Apd1 trägt einen [2Fe-2S]-Cluster koordiniert durch zwei Cysteine und zwei Histidine. A UV/Vis-Spektrum von rekombinantem Apd1 und der Mutanten CX₃C und HX₃H (je 3 mg). **B** nicht-denaturierende PAGE von Apd1 und Varianten. Der Pfeil zeigt die Proteinbande an. **C & D** Tüpfeltest von WT und $\Delta apd1$. WT und $\Delta apd1$ wurden mit einem Leerplasmid oder 415_{NP}-Plasmiden, welche das Gen kodierend für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen wurden auf SC-Agarplatten mit HU in den angegebenen Konzentrationen getüpfelt (Tang *et al.*, 2015).

Tang *et al.* beschrieben jedoch weiter die Sensitivität eines $\Delta apd1$ -Stammes gegenüber Hydroxyharnstoff (HU) (Abb. 1-8 C). Im Wachstumsvergleich auf Festmedium, ist eine Wachstumshemmung des Deletionsstammes in Gegenwart von 240 mM HU im Vergleich zu WT zu verzeichnen. Diese verminderte Wachstumsrate kann durch eine transformierte Plasmid-Kopie des Gens komplementiert werden. Zu dem genauen mechanistischen Hintergrund liegen keine näheren Informationen vor, es wird jedoch angenommen, dass Apd1 eine Rolle in der Abwehr gegen diesen Stoff übernimmt. Mit dieser Methode wurden auch die putativen Clusterliganden *in vivo*, dargestellt in Abbildung 1-8 D, vorgeschlagen. Diese wurden paarweise auf Plasmiden mutiert und es wurde der Effekt der Mutation in Gegenwart von 240 mM HU untersucht. Im Vergleich zu $\Delta apd1$ mit transformiertem Leerplasmid konnte bei der Cystein-Doppelmutante ein geringes Wachstum beobachtet werden. Die gleichzeitige Mutation der Histidine resultierte in einem stärkeren Phänotyp, der der Deletion des Gens gleicht (Tang *et al.*, 2015).

Eine detailliertere spektroskopische Charakterisierung von Apd1 wurde 2019 veröffentlicht (Stegmaier *et al.*, 2019). Bei 10 K zeigt das ESR-Spektrum des WT-Proteins

ein rhombisches Signal einer Einzelspezies mit den g -Werten 2,009, 1,906 und 1,861. Werden die Aminosäuren H255 und H259 zu Cysteinen mutiert, führt dies zu einer Verschiebung aller g -Werte (Abb. 1-9, links). Dieser Effekt der Mutation lässt sich auch in den Mößbauerspektren beobachten. Bei 77 K weisen die Mößbauerparameter des WT-Apd1 auf zwei verschieden koordinierte Eisenkerne hin. Anhand der Werte wird ein Eisenion von zwei Cysteinen und eins von zwei Histidinen koordiniert. Werden die Histidine zu Cysteinen mutiert, verändern sich die Parameter und zeigen bei der Doppelmutante H255C/H259C Werte eines all-Cystein koordinierten [2Fe-2S]-Clusters auf (Abb. 1-9, rechts). Die Bestimmung des pK_S -Wertes von Apd1 im oxidierten Zustand identifizierte zwei einzelne De-/Protonierungen bei $pK_{ox1} = 7,9 \pm 0,1$ und $pK_{ox2} = 9,7 \pm 0,1$. Die Einzelmutanten zeigten entsprechend nur einen und die Doppelmutante keinen pK_S -Wert (Stegmaier *et al.*, 2019).

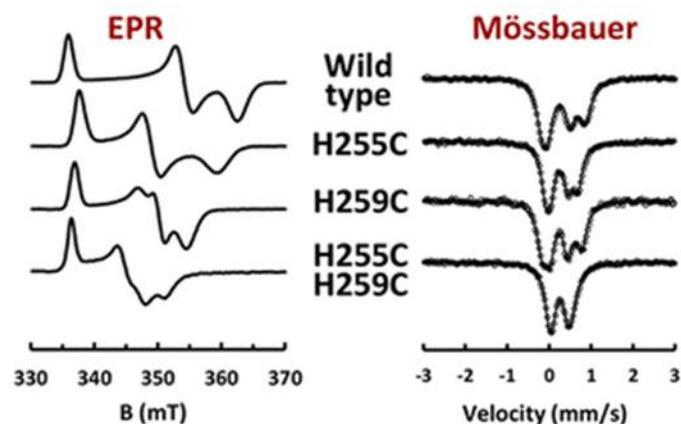


Abbildung 1-9: ESR- und Mößbauerspektren von Apd1 und Varianten. A ESR-Spektren. B Mößbauerspektren (Stegmaier *et al.*, 2019).

1.8 Zielsetzung

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist neben *E. coli* der bekannteste Modellorganismus in der Molekularbiologie. Das menschliche und das Hefe-Genom teilen sich ca. ein Drittel orthologer Gene. Durch diese Vielzahl an homologen Genen in höheren Eukaryoten lassen sich durch einfache Experimente und Studien Rückschlüsse auf komplexe Stoffwechselwege, aber auch Krankheiten ziehen (Botstein *et al.*, 2011; Kachroo *et al.*, 2015).

Metallionen sind essenziell für das Leben, mehr als ein Viertel der Proteine hängt in ihrer Funktion von ihnen ab (Waldron & Robinson, 2009). Fe/S-Proteine stellen für die Klasse der Metalloproteine einige der wichtigsten Vertreter dar. Sie sind in allen Domänen des Lebens evolutionär früh vertreten. Durch bioinformatische Sequenzanalyse des menschlichen Genoms war es möglich, das Fe/S-Proteom zu identifizieren (Andreini *et al.*, 2016). Diese Suche deckte 70 Gene auf, von denen ein Großteil auch experimentell

als Fe/S-Proteine verifiziert ist. Danach ist die Anzahl der mitochondrialen Proteine mit einem [2Fe-2S]-Cluster fast genauso hoch wie jene mit einem [4Fe-4S]-Cluster (21 und 18). Im Cytoplasma ist dieses Verhältnis stark auf die Seite der [4Fe-4S]-Proteine verschoben (18 zu 10) und im Nukleus kommen fast nur jene vor (19 zu 4).

Bioinformatische Studien, durchgeführt von Prof. A. J. Pierik, deckten ein C-terminales Tryptophan bei mehreren cytosolischen Fe/S-Proteinen auf. Ausgehend von dieser Entdeckung wird in dieser Arbeitsgruppe die „Tryptophan-Hypothese“ näher untersucht. Dabei wird angenommen, dass das C-terminale Tryptophan als Adapter oder Erkennungsmerkmal bei der Übertragung des Fe/S-Clusters vom CIA-Targeting-Komplex auf dessen Zielproteine fungiert. In Zuge der Dissertation von Dr. Carina Greth wurde dieser Zusammenhang für die cytosolischen [4Fe-4S]-Proteine Leu1 und Nar1 näher untersucht, anhand mehrerer Studien nachgewiesen und später als Teil eines Manuskripts verfasst (Marquez *et al.* 2023).

Durch Sequenzvergleich wurde basierend auf der Tryptophan-Hypothese nach weiteren potenziellen Fe/S-Proteinen gesucht. Dabei stach das Protein Apd1 heraus. In der Dissertation von Dr. Kathrin Stegmaier wurde dieses Protein und ein sehr ähnliches Protein namens Aim32 als [2Fe-2S]-Protein nach heterologer Expression in *E. coli* identifiziert. Die beiden Proteine verbindet ein einzigartiges [2Fe-2S]-Clusterbindemotif (Stegmaier, 2017).

Das erste Ziel dieser Arbeit stellte die Identifizierung der Clusterliganden der Proteine Aim32 und Apd1 *in vivo* dar. Hierfür sollten zunächst Bedingungen gefunden werden, unter denen die beiden nicht-essenziellen Gene unter Standardlaborbedingungen essenziell werden. Bereits in einer Diplomarbeit wurden Deletionsmutanten angefertigt und erste Versuche zur Phänotypisierung unternommen (Blinn, 2014). In der Literatur wird mehrmals der Effekt von Kupfer-Ionen auf den Deletionsstamm $\Delta apd1$ beschrieben. Jedoch handelt es sich dabei um Ergebnisse von Hochdurchsatzstudien und konnten nicht für den verwendeten Laborstamm bestätigt werden. Zur Untersuchung der Clusterkoordination sollten die jeweiligen Aminosäurereste in einer Plasmid-Kopie zu Alanin mutiert werden. Nach Entdeckung eines Phänotyps und Optimierung der Bedingungen sollten die verschiedenen Mutanten auf ihre Funktionalität *in vivo* mittels Tüpfeltest unter Apd1-resp. Aim32-essenziellen Bedingungen überprüft werden.

Die Suche nach der Funktion von Proteinen kann je nach Wissensstand der Suche nach einer Nadel im Heuhaufen gleichen. In dieser Arbeit sollten erste Hinweise auf die Funktion der Proteine Aim32 und Apd1 anhand eines cDNA-Screens gesammelt werden. Unter Verwendung einer von Bretscher *et al.* veröffentlichten cDNA-Bibliothek unter der Kontrolle des Gal-Promotors sollten Kandidaten gefunden werden, die bei Überexpression den Phänotyp eines $\Delta apd1$ - resp. eines $\Delta aim32$ -Deletionsstammes komplettieren können. Bei Erfolg könnte die bekannte Funktion der Kandidaten Aufschluss über die Wirkungsweise von Aim32 resp. Apd1 geben. Apd1 verfügt in der

N-terminalen Domäne über mehrere Cystein-Reste, die nicht in der Koordination des [2Fe-2S]-Clusters involviert sind. Durch Kristallisation des Proteins und durch eine ESR-spektroskopische Untersuchung sollte überprüft werden, ob Apd1 ein mononukleares Eisen-Zentrum, wie es in Rieske-Dioxygenasen zu finden ist, besitzt. Zudem sollten zur weiteren Charakterisierung der Proteine eine Lokalisierung der Proteine Aim32 und Apd1 in der Zelle und eine genauere Untersuchung verschiedener Aim32-Mutanten spektroskopisch vorgenommen werden.

In einem weiteren Teil sollte die Assemblierung des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 näher untersucht werden. In der Literatur finden sich mehrere Beispiele, die einen CIA-Maschinerie-abhängigen Einbau für [4Fe-4S]-Proteine belegen. Inwieweit diese Maschinerie für die Übertragung von [2Fe-2S]-Cluster verantwortlich ist, ist bis heute noch nicht bekannt. Apd1 besitzt ein C-terminales Tryptophan und könnte mit jenem als eine Art Erkennungssequenz mit dem CIA-Targeting-Komplex interagieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die C-terminale Kürzung des Proteins zu einem signifikanten Phänotyp unter Apd1-essenziellen Bedingungen führt (Greth, 2018). In dieser Arbeit sollte nun mit Hilfe der ESR-Spektroskopie die Inkorporierung des Clusters von Apd1 *in vivo* untersucht werden. Falls dieser von CIA-Faktoren abhängig wäre, sollte bei Regulation der verwendeten Gal-Stämme eine Abnahme des Apd1-spezifischen ESR-Signals zu verzeichnen sein.

Durch Sequenzvergleich des Apd1/Aim32 einzigartigen Clusterbindemotifs, konnte von Prof. Dr. A. J. Pierik ein weiteres bisher unbekanntes Ligandenmuster eines Proteins aus dem thermophilen Bakterium *Thermomonospora curvata* aufgedeckt werden. In Proteindatenbanken wird es aufgrund von Algorithmen ebenso wie Aim32/Apd1 der „Sucrase/ferredoxin like“-Proteinfamilie zugeordnet. Bei genauer Betrachtung des Sequenzvergleichs fällt überraschenderweise auf, dass das Histidin H259, welches in Apd1 Clusterligand ist, durch einen Aspartat-Rest ersetzt wird. Anhand von spektroskopischen Untersuchungen nach Proteinisolierung aus *E. coli* sollten die Clusterkoordination und die Eigenschaften wie pK_S -Wert und das Redoxpotential untersucht werden.

Abschließend wurden ergänzende Arbeiten zur „Dissertation Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung“ von Dr. Carina Greth durchgeführt. Es sollte eine geeignete Methode zum Nachweis der Interaktion des C-terminalen Tryptophans mit dem CIA-Targeting-Komplex erforscht werden, dies stellte aber kein Hauptthema dieser Arbeit dar.

2. Materialien

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In diesem Teil der Arbeit werden alle verwendeten Geräte und Materialien, sowie deren Herkunft benannt.

| Gerät/Material | Bezeichnung bzw. Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| Agarosegelelektrophorese-System | Biostep® HU10 |
| Anaerobes Zelt | Coy Laboratories |
| Autoklav | Systemec V65 |
| Biofreezer | Sanyo, Vip |
| Blotting-Papier | Roth, 1 mm GE Healthcare, 0,4 mm |
| Chromatographie System | GE Healthcare, Äkta Start |
| Dounce Homogenisator Größe S und L | Sartorius |
| Einwegimpfösen | Greiner Bio-One |
| Elektrophoresezubehör | Digitalkamera: Canon IXUS 132 |
| ESR und Zubehör | Bruker Elexsys E580 Electron Paramagnetic Resonance Console, Bruker Pulsed Microwave Bridge E580-1010, Bruker Netzteil ER 082 (155/45), Bruker 4122SHQE-W1/1017 Cavity, Bruker ER 167FDS-Q Fingerdewar, QSIL Quarzglasröhrchen Ilmasil PN Ø 3,7 mm x 0,5 mm Wandstärke, Acrylglas / Plexiglas Rundstab 1 m x 5 mm, Gummischlauch Ø 3 mm x 2 mm Wandstärke |
| French Press | SLM Instruments, SLM Aminco FA-078, FA-073 |
| Geldokumentationssystem | Vilber Lourmat, Fusion SL |
| Glasperlen (0.75-1.0 mm Durchmesser) | Roth |
| Gummiwischer | Deutsch & Neumann |
| Inkubatoren | Thermo Scientific, Heratherm IMC 18 Thermo Scientific, Heratherm IGS 100 |
| Kanülen | Braun 100 Sterican Gr. 1 Ø 0,90 x 40 mm |

| | |
|------------------------------------|--|
| Konzentratoren | Sartorius, Vivaspin 6, 20.000 und Vivacon 500 10.000 MWCO PES |
| Kühlgefrierkombination | Beko K6330-HC |
| Küvetten | Sarstedt Einweg-Küvetten Polystyrol; Brand UV-Küvetten halbmicro; Eppendorf, 50 µl Kuvette |
| Laborboy | Rudolf Grauer AG Swiss Boy 110 |
| Magnetrührer | Janke & Kunkel IKA-Werk, KMO 2 electronic |
| Mikrotiterplatte | TPP, 96 Well |
| Mikrowelle | Privileg M401 |
| Nitrozellulose Membran | GE Healthcare, 0,45 µm |
| PD10-Säulen | GE Healthcare |
| Petrischalen | Sarstedt Petrischalen 92 x 16 mm |
| pH-Meter | WTW pH 521 Mettler Toledo, InLab®Easy-Elektrode Mettler Toledo, InLab®Micro-Elektrode Mettler Toledo, InLab®Redox Micro-Elektrode |
| Pipetten | Eppendorf, Research Plus 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl 5 ml, 8-Kanal 50 µl; Integra BioSciences, PipetBoy comfort |
| Pipettenspitzen | Greiner, Bio-One 10 µl; Sarstedt 200 µl, 1000 µl |
| Pipettierroboter (Kristallisation) | Douglas Instruments, OryxNano |
| Reaktionsgefäße | Sarstedt 1,5 ml; Greiner Bio-One 2,0 ml |
| Rollschüttler | NEO LAB, D6050 |
| Serologische Pipetten | Greiner Bio-one 5 ml, 10 ml |
| SDS-PAGE-System | Bio Rad, Mini Protean II™, |
| Schüttelinkubatoren | Infors HT, Multitron Pro Thermo Scientific, MaxQ4000 |
| Spannungsquelle | VWR Power Source 300V BioRad, PowerPAC 300 |
| Spülmaschine | Miele, Mielabor Automatic G7733 |
| Spritzen | Braun, Omnifix® 60 ml |
| Sterilbank | Heraeus Instruments, LaminAir HB 2448 |
| Sterilfilter | Sarstedt, 0,2 µm VWR 0,2 µm |
| Thermocycler | Hybaid, Limited PCR Sprint Thermal Cycler |

 Materialien

| | |
|--------------------------------------|---|
| Thermomixer | Bio-Rad, T100 Thermal Cycler Eppendorf, Thermomixer comfort CellMedia, Thermomixer pro |
| Trockenschrank | Heraeus, T 5050 |
| Ultrazentrifuge | Beckman Optima™, LE 80K (Rotoren: Ti70, SW 60 Ti) |
| UV/Vis-Spektrophotometer | Thermo Scientific, Genesys 10UV scanning, Eppendorf, Bio Photometer plus Shimadzu, UV-1900 UV-VIS |
| Vortexer | Heidolph, Reax 1 D; Janke & Kunkel IKA-Labor-technik VF2, Phoenix Instrument, RS-VA 10 |
| Waagen | Feinwaage Mettler Toledo, Excellence Sartorius, L610 D |
| Verschlussfolie | Parafilm M |
| Wasserdestillationsapparatur | Wisag, Destamat Bi 18E |
| Wippschüttler | IKA, Rocker 3D digital |
| Zentrifugationsröhrchen Typ „Falcon“ | Sarstedt, 50 ml; Greiner Bio-One 15 ml |
| Zentrifugen | Beckman Coulter, Avanti J-26S XP (Rotoren: JLA-8.1000, JA 25-50) Beckman, J2-21 (Rotoren: JA-10, JA-20) Eppendorf, 5810 R (Rotor: 4-4-62) Eppendorf, 5430 R (Rotor: F 35-6-30) VWR, Galaxy 16 DH Mikrozentrifuge VWR, Micro Star 17 Mikrozentrifuge Sigma, 1-16 Mikrozentrifuge; |
| Zentrifugenbehälter | Beckman Coulter: 1 l, 26,3 ml, 2,3 ml Nalgene: 500 ml, 250 ml, 50 ml |

2.2 Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Softwares sind in nachstehender Tabelle aufgelistet:

| Software | Anwendung | Hersteller |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| Chromas | DNA-Sequenz-Analyse | Technelysium (online) |
| Clustal Omega | DNA-Sequenz-Vergleich | EMBL-EBI |

Materialien

| | | |
|---------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| ExpASy | Gen → Protein Translation | SIB Swiss Institute of Bioinformatics |
| LabSolutions UV/Vis | UV/Vis-Spektrophotometer | Shimadzu |
| Unicorn | Chromatographiesystem | GE Healthcare |
| VisionCapt | Geldokumentationssystem | Vilber Lourmat |
| VISIONlite | UV/Vis-Spektrophotometer | Thermo Fischer Scientific |
| Xepr | ESR-Spektrometer | Bruker |

2.3 Chemikalien

Im Folgenden werden alle verwendeten Chemikalien benannt und es wird auf deren Herkunft hingewiesen.

| Chemikalie | Hersteller |
|---|----------------|
| 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon | Sigma Aldrich |
| Aceton | VWR Chemicals |
| Acrylamid Rotiphorese Gel 30 | Roth |
| Adeninsulfat | Sigma |
| Agar-Agar | Roth |
| Agarose | Biozym |
| Ammoniumacetat | Riedel de Haën |
| Ammoniumeisen(II)-Sulfat (Mohrsches Salz) | Riedel de Haën |
| Ammoniumeisen(III)-Citrat | Sigma Aldrich |
| Ammoniumpersulfat | Sigma |
| Ammoniumsulfat | Merck |
| Ampicillin | AppliChem |
| Ascorbinsäure | Sigma |
| Benzylviologen | Sigma Aldrich |
| Bradford-Reagenz | AppliChem |
| Bromphenolblau | Fluka |
| Calciumchlorid | Roth |
| Coomassie Brilliant blue G250 | Roth |
| <i>p</i> -Coumarsäure | Sigma Aldrich |
| CAPS | Roth |
| CHES | Roth |

Materialien

| | |
|--|---|
| Cysteinhydrochlorid-Monohydrat, L | Sigma Aldrich |
| Cytochrom c aus Rinderherz | Sigma-Aldrich |
| Desthiobiotin | IBA |
| dNTPs | New England Biolabs |
| Digitonin | Roth |
| DMSO (zur Analyse) | AppliChem |
| DOC | Serva |
| DTT | AppliChem |
| DMPD | Fluka |
| EDTA | AppliChem |
| ⁵⁷ Eisen (Pulver) | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Schünemann |
| Ethanol | Roth |
| Eisen(III)-Chlorid | Sigma Aldrich |
| Essigsäure | Roth |
| Feren (3-(2-Pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-Triazine-5',5''-disulfonylsäure (Dinatrium-Salz)) | Sigma Aldrich |
| Formiergas (Arcal F5, 5% H ₂ /95% N ₂) | Air Liquid |
| Galaktose | Roth |
| Gallacetophenon | Sigma Aldrich |
| Gallobenzophenon | Sigma Aldrich |
| Gallussäure | Sigma Aldrich |
| GelRed | Biotium |
| Gel Loading Dye Purple | New England Biolabs |
| Glukose- Monohydrat | Roth |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | AppliChem |
| HABA | Aldrich |
| Hefeextrakt | Roth |
| HEPES | AppliChem |
| Hexamincobalt(III)-Chlorid | Fluka |
| L-Histidin | Amersham |
| Imidazol | AppliChem |
| Indigokarmin | Sigma Aldrich |

| | |
|-------------------------------------|-------------------|
| Instant Blue (SDS-PAGE-Färbelösung) | Expedeon |
| 3-Isopropylmalat (threo-Form) | Sigma Aldrich |
| IPTG | Roth |
| Kaliumacetat | AppliChem |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kaliumcyanid | Sigma |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat | Merck |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck |
| Kaliumhydroxid | J.T.Baker |
| Kanamycin | AppliChem |
| Kupfersulfat-Pentahydrat | AppliChem |
| Lachssperma-DNA | Life Technologies |
| LB-Medium | Roth |
| Leucin | Sigma |
| Lithiumacetat-Dihydrat | Fluka |
| Lithiumdisulfid | Aldrich |
| Luminol | Sigma Aldrich |
| Magermilchpulver | AppliChem |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Merck |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Merck |
| Mangan(II)-Chlorid | Fluka |
| Methylenblau | Merck |
| Methylviologen | Sigma Aldrich |
| β -Mercaptoethanol | Merck |
| MES | Serva |
| Natriumanthrachinon-2-sulfonat | Sigma Aldrich |
| Natriumascorbat | Roth |
| Di-Natriumcarbonat | Merck |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat | Merck |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdithionit | Sigma Aldrich |
| Natriumhydroxid | J. T. Baker |
| Natriummalonat-Monohydrat | Sigma |
| Natriumnitrit | Merck |

Materialien

| | |
|---|------------------|
| Natriumsuccinat-Hexahydrat | Sigma |
| <i>N, N, N', N'</i> -Tetramethyl-p-phenylendiamin | Sigma Aldrich |
| Neutralrot | Sigma Aldrich |
| Nourseothricin | Werner BioAgents |
| PIPES | Roth |
| PEG 4000 | Roth |
| Pepton | Roth |
| pH-Eichlösungen | AppliChem |
| PMSF | Sigma Aldrich |
| Phenazinethosulfat | Sigma Aldrich |
| Phenosafranin | Sigma Aldrich |
| Pyrogallol | Sigma Aldrich |
| Resorufin | Sigma Aldrich |
| RotiBlue | Roth |
| Rubidiumchlorid | Aldrich |
| Safranin T | Sigma Aldrich |
| Salzsäure | Sigma Aldrich |
| Schwefelsäure | Fluka |
| SDS | Roth |
| Sorbitol | Roth |
| TAPS | Roth |
| TEMED | AppliChem |
| TCA | Sigma Aldrich |
| Tetracyclin | AppliChem |
| TRIS | AppliChem |
| Triton X-100 | Serva |
| Trypton | AppliChem |
| L-Tryptophan | Sigma |
| TWEEN 20 | Sigma Aldrich |
| Uracil | Sigma |
| Yeast-nitrogen-base | Formedium |
| Zinkacetat-Dihydrat | Sigma Aldrich |
| Wasserstoffperoxid | AppliChem |

2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Metabion bezogen und lagen entsalzt und lyophilisiert vor. Ab einer Länge von > 50 Basen wurden sie HPLC-gereinigt bestellt. Die Primer wurden gemäß Herstellerangaben in dem entsprechenden Volumen autoklaviertem H₂O_{dd} gelöst, um eine 100 µM Lösung zu erhalten. Als Gebrauchslösung wurden 1:10 Verdünnungen der Stammlösung verwendet.

Die in Tabelle 2-1 genannten Oligonukleotide zur Durchführung des Austausches eines Gens mittels homologer Rekombination und wurden nach der Methode von Janke *et al.* entworfen. Sie zeichnen sich durch ihr 20 Basen langes 3'-Ende aus, das zu jenem Fragment komplementär ist, das mittels PCR amplifiziert und im Anschluss inseriert werden soll. Die 5'-Seite hat eine Länge von 50 Basen und ist komplementär zu dem genomischen Bereich, der deletiert oder ersetzt werden soll (Janke *et al.*, 2004). Die 50 Basen flankieren somit den zu ändernden Bereich.

Tabelle 2-1: Primer zur Herstellung der $\Delta sod2$, W303 HIS3⁺ und HIS3_BY4742 Stämme

| Name | Sequenz (5'→3') | PCR-Template |
|----------------|-------------------------|-----------------------------|
| Delta_Sod2_for | AAA GGA ACG AAA CCC | pYM15_6HA_His |
| | TGA TTG ATA ACT ATA CCT | |
| | CCT AAA AAC GTA CCA AGT | |
| | GGA ACG ATC ATT CAA | |
| | GAG ATC C | |
| Delta_Sod2_rev | CTT TCT TTC TTC AGA TCT | pYM15_6HA_His |
| | TGC CAG CAT CGA ATC TTC | |
| | TGG ATG CTT CTT TCC ATC | |
| | GAT GAA TTC GAG CTC G | |
| | GGT TTC TGG ACC ATA TGA | |
| His3_179for | TAC ATG CTC TGG CCA AGC | gDNA W303 |
| | ATT CCG GCT GG | |
| His3_179rev | CCT TTT TAC TCC ACG CAC | gDNA W303 |
| | GGC CCC TAG GGC CTC TTT | |
| His3_for | AAA AGC TTG ACC GAG AG | gDNA W303 HIS3 ⁺ |
| | TGG TAA CTA GTA TGA CAG | |
| His3_rev | AGC AGA AAG CCC TAG | gDNA W303 HIS3 ⁺ |
| | ATG GTA GGA TCC TAC ATA | |
| | AGA ACA CCT TTG GTG | |

Zur Überprüfung der homologen Rekombination werden spezifische Primer aus Tabelle 2-2 verwendet.

Tabelle 2-2: Primer zur Überprüfung der homologen Rekombination

| Name | Sequenz (5'→3') |
|------------------|-----------------------------|
| Delta_Sod2_chck1 | CAA GCT AGC TAC AGC GAT TGC |
| Delta_Sod2_chck2 | CCT GGT GGT GAG TTA ATC TGG |

Zur klassischen Klonierung verwendete Primer sind in Tabelle 2-3 gelistet. Die Gestaltung wurde in der Regel nach folgendem Prinzip durchgeführt: ATGGTA–Restriktionsschnittstelle–20-25 Nukleotide zur Hybridisierung des Primers an die Ziel-DNA. Die Restriktionsschnittstelle ist hervorgehoben.

Tabelle 2-3: Oligonukleotide zur klassischen Klonierung

| Name | Sequenz (5'→3') | zur Klonierung von |
|-----------------------|---|--|
| Aim32_NP_SacI | ATG GTA GAG CTC CTT TAG ACC CGG GG TAT G | 426 _{NP} Aim32_myc |
| Aim32_Term_BamHI | ATG GTA GGA TCC ATT CAT CGA TAT GCC ACC TCT G | 426 _{NP} Aim32_myc, 426 _{TDH} Aim32_myc |
| Apd1_NP_SacI | ATG GTA GAG CTC CTG CTG GGC TTG TAA TCA TTG | 426 _{NP} Apd1_myc, |
| Apd1_Term_BamHI | ATG GTA GGA TCC CCA GCT TTG ATA TTT CTT AAT ACA GC | 426 _{NP} Apd1_myc, 426 _{TDH} Apd1_myc |
| Apd1_SpeI | ATG GTA ACT AGT ATG GCT TTT TTG AAT ATT TTC AAG C | 426 _{TDH} Apd1_myc, 426 _{TDH} 3HA_Apd1 |
| Aim32_SpeI | ATG GTA ACT AGT ATG CTA CGT ATA ACT GTC AAA AC | 426 _{TDH} Aim32_myc |
| Apd1_NcoI | ATG GTA CCA TGG CTT TTT TGA ATA TTT TCA AGC | pETDuet1_NcoI_ScerApd1 |
| Apd1_Sall | ATG GTA GTC GAC TAC CAG CTT TGA TAT TTC TTA ATA C | pETDuet1_NcoI_ScerApd1, 426 _{TDH} 3HA_Apd1 |
| Apd1_Thecur_NcoI_for | ATG GTA CCA TGG GCC GTA CCA GCC ATT GTG | pETDuet1_NcoI_TcurApd1 |
| Apd1_Thecur_Sall_rev | ATG GTA GTC GAC TTA AAC CAG GGC TGC ACG ATT | pETDuet1_NcoI_TcurApd1, pETDuet1_BamHI_TcurApd1 |
| Apd1_Thecur_BamHI_for | ATG GTA GGA TCC GAT GAG CCG TAC CAG CCA TT | pETDuet1_BamHI_TcurApd1 |
| Tcur_Apd1_SacII_for | ATG GTA CCG CGG TCA TGA GCC GTA CCA GCC ATT | IBA102_TcurApd1 |
| Tcur_Apd1_BamHI_ref | ATG TGA GGA TCC TTA AAC CAG GGC TGC ACG ATT | IBA102_TcurApd1 |

Materialien

| | | |
|--------------------|---|---------------------------------------|
| Aim32_Scer_Ndel | ATG GTA CAT ATG CTA CGT ATA ACT GTC AAA AC | pMal_Aim32 |
| Aim32_Scer_Sall | ATG GTA GTC GAC TTA ATT CAT CGA TAT GCC ACC TCT G | pMal_Aim32, pET28aTS_TS_KpnI_Aim32 |
| Apd1_Scer_Ndel | ATG GTA CAT ATG GCT TTT TTG AAT ATT TTC AAG C | pMal_Apd1 |
| Apd1_Scer_Sall | ATG GTA GTC GAC TTA CCA GCT TTG ATA TTT CTT AAT AC | pMal_Apd1 |
| Scer_Aim32_KpnI | ATG GTA GGT ACC ATG CTA CGT ATA ACT GTC AAA AC | pET28aTS_TS_KpnI_Aim32 |
| TC_Apd1_SpeI_for | ATG GTA ACT AGT ATG AGC CGT ACC AGC CAT TGT G | 426FBA, 426FBALeu1CT |
| TC_Apd1_XhoI_1_rev | ATG GTA CTC GAG TTA AAC CAG GGC TGC ACG ATT C | 426FBA |
| TC_Apd1_XhoI_2_rev | ATG GTA CTC GAG AAC CAG GGC TGC ACG ATT CAG | 426FBALeu1CT |

Wurde eine Klonierung mit Hilfe des NEBuilder Hifi DNA Assembly Kits durchgeführt, gestaltete sich das Design der Primer nach einem anderen Schema. Tabelle 2-4 beinhaltet Primer, die nach Vorgabe der Herstellerfirma abgeleitet wurden. 25 Nukleotide am 3'-Ende dienen zur Hybridisierung mit dem DNA-Template zur Amplifikation und 25 Nukleotide am 5'-Ende waren identisch mit der Sequenz des verwendeten Vektors an der Stelle wo das Gen eingefügt werden soll. Zur Überprüfung des Erfolges der Klonierung wurden Restriktionsschnittstellen zwischen Gen- und Vektorsequenz eingebaut.

Tabelle 2-4: Primer zur Klonierung mit dem NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit.

| Name | Sequenz (5'→3') | zur Klonierung von |
|----------------------|--|-----------------------|
| pET28a_KpnI_Apd1_for | AAA CTT GTA TTT CCA GGG CGG TAC CAT GGC TTT TTT GAA TAT TTT CAA GC | pET28aTS_TS_KpnI_Apd1 |
| pET28a_KpnI_Apd1_rev | GAG TGC GGC CGC AAG CTT GTC GAC TTA CCA GCT TTG ATA TTT CTT AAT AC | pET28aTS_TS_KpnI_Apd1 |

Zur ortsspezifischen Mutagenese verwendete Primer sind in Tabelle 2-5 aufgelistet. Diese Oligonukleotide sind nach Zheng *et al.* designt. Sie bestehen aus einem ca. 20 Basen langen komplementären Bereich, der die gewünschte Mutation in der Mitte

Materialien

beinhaltet, sowie einem ca. 10 Basen langen Überhang an der 3'-Seite, der die Hybridisierung mit dem Template gewährleistet (Zheng *et al.*, 2004).

Tabelle 2-5: Oligonukleotide zur Mutagenese.

| Name | Sequenz (5'→3') |
|---|---|
| Zur Mutagenese von pET28a_TS_TEV | |
| 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 Mutagenese von pMAL_c5X | |
| pMAL_c5X_TEV_for | CAA CGA GAA TCT GTA CTT CCA AGG CAT TTC ACA TAT GTC C |
| pMAL_c5X_TEV_rev | AAT GCC TTG GAA GTA CAG ATT CTC GTT GTT ATT GTT ATT G |
| Zur Mutagenese von IBA102_TcAAH | |
| IBA_TS_TcApd1_f | AAG AGA ACC TGT ACT TTC AAG GGA GCC GTA CCA GCC ATT G |
| IBA_TS_TcApd1_r | CTC CCT TGA AAG TAC AGG TTC TCT TTT TCG AAC TGC GGG |
| Zur Mutagenese von 426 _{FBA} His ₆ _TS_Apd1 | |
| FBA_TS_His ₈ _Apd_f | CATCACCATCACCCAACGACCGAAAACTTG |
| FBA_TS_His ₈ _Apd_r | TCGTTGGGTGATGGTGATGATGATGATGATGG |
| Zur Mutagenese von Apd1 | |
| H66A_for | AGC TGA AAC TCC TTT GTT GAA CTC TTC TAA AAC |
| H66A_rev | CAA CAA AGG AGT TTC AGC TTC GAT CTT TAG |
| H80A_for | AAT TGC CTT CGT TGT CCC CAC CTC TCA AAT CG |
| H80A_rev | TGG GGA CAA CGA AGG CAA TTT TTG GCG TTT TAG |
| H92A_for | AGG CTG ATG CCT GCC TCG AGG ACC CAA AGT CAG |
| H92A_rev | CTC GAG GCA GGC ATC AGC CTG CCA ATC GAT TTG |
| H209A_for | GTT CAG CTA CTA CGA GGG ATA AAC GAT GC |
| H209A_rev | CCT CGT AGT AGC TGA ACA TAT AAA TAC AAA TGC |
| H234A_for | TAC AGG AAG CTG GGC TGT ATA GGG ACA ATT CGG |
| H234A_rev | ATA CAG CCC AGC TTC CTG TAA TTT ACT GTC |
| H255C_for | TGT TAA TTG TGT TGG TGG TCA CAA ATT TGC TGC |
| H255C_rev | CAC CAA CAC AAT TAA CAA ATG CAA TTT TGA CAC |
| H259C_for | ATG TTG GTG GTT GCA AAT TTG CTG CAA ATG TTC |
| H259C_rev | AAA TTT GCA ACC ACC AAC ATG ATT AAC AAA TGA |
| H292A_for | GTC GAA GCT CTG ATT GTT CCT GAA GAA CCA ACG |
| H292A_rev | GGA ACA ATC AGA GCT TCG ACA ATA GAA GGA AC |
| HH255_9CC_for | AAT TGT GTT GGT TGC AAA TTT CGT GCA GCA AAT GTT |
| HH255_9CC_rev | GCA ACC ACC AAC ACA ATT AAC AAA TGC AAT TTT GAC |

Materialien

| | |
|------------------|--|
| HH255_9AA_for | AAT GCT GTT GGT GGT GCC AAA TTT GCT GCA AAT GTT C |
| HH255_9AA_for | GGC ACC ACC AAC AGC ATT AAC AAA TGC AAT TTT GAC AC |
| C33A_for | CGA TTA AGA TAG CCA AAA GTG ACG ATG CTG C |
| C33A_rev | TTT TGG CTA TCT TAA TCG ATT GAG AAA TTT CC |
| C44A_for | AAC ATA GCG CCT CTG GTG ATT GCA AAA CAG |
| C44A_rev | CAC CAG AGG CGC TAT GTT CGT TAG CAG CAT CG |
| C48A_for | GTG ATG CCA AAA CAG AAA TTG AAG AAG GAG AGC |
| C48A_rev | AAT TTC TGT TTT GGC ATC ACC AGA GCA GCT ATG |
| C95A_for | GAT GCC GCC CTC GAG GAC CCA AAG TCA GTA CAG |
| C95A_rev | GGG TCC TCG AGG GCG GCA TCA TGC TGC CAA TCG |
| C110A_for | CAG TGG GCT GAT AAG AAT TCA GCT AAA TTT TCC |
| C110A_rev | GAA TTC TTA TCA GCC CAC TGG GAA ATT TTA TAC |
| C128A_for | CAA GAC ACT AAA CGC TGC AGT TTC ATC TTT ACC |
| C128A_rev | ACT GCA GCG TTT AGT GTC TTG CCT GTG CCC ACG |
| C309A_for | AAA GTT CGC GCT ATT AAG AAA TAT CAA AGC TGG |
| C309A_rev | TTC TTA ATA GCG CGA ACT TTT TCG GGA AAC GGC |
| CC44_8AA_for | GCG CCT CTG GTG ATG CCA AAA CAG AAA TTG AAG |
| CC44_8AA_rev | GGC ATC ACC AGA GGC GCT ATG TTC GTT AGC AGC |
| CC207_16AA_for * | AAA CGA GCC GGC ATT ACG GCA CCC TAT TTA AAG |
| CC207_16AA_rev* | CGT AAT GCC GGC TCG TTT ATC CCT CGT AGT ATG |
| S208A_for | ATA TGT GCA CAT ACT ACG AGG GAT AAA CGA TGC |
| S208A_rev | CTC GTA GTA TGT GCA CAT ATA AAT ACA AAT GC |
| NT_D1_for | AAG CTG ACT AGT GTT GGC CAG CAA AAT ACA ATC |
| NT_D3_rev | TGG CCA ACA CTA GTC AGC TTT GAT ATT TCT TAA |
| NT_D3_for_new | AAG AAA TAT TGA CTA GTG TAA AGG TTG GCC AGC |
| NT_D3_rev_new | TAC ACT AGT CAA TAT TTC TTA ATA CAG CGA AC |
| NT_D6_for new | GTA TTT AGA GCT CTC AAA GCT GGT AAA GGT TGG |
| NT_D6_rev new | CTT TGA GAG CTC TAA ATA CAG CGA ACT TTT TCG |
| NT_W136A_for | GCG CGT GAC TAG TGG CCA GCA AAA TAC AAT C |
| NT_W316A_rev | GCT GGC CAC TAG TCA CGC GCT TTG ATA TTTC |
| Cyc1_D1_for | CTG ATA GTC GAC CTC GAG TCA TGT AAT TAG |
| Cyc1_D1_rev | GAC TCG AGG TCG ACT ATC AGC TTT GAT ATT TC |
| Cyc1_D4_for | ATA GTA AAG CTG GTA GTC GAC CTC GAG TCA TG |
| Cyc1_D4_rev | TCG ACT ACC AGC TTT ACT ATT TCT TAA TAC |

Materialien

Zur Mutagenese von Aim32

| | |
|----------------|---|
| C38A_for | ATC AAA CAA ACG CTT ATT GCC AAG AAA TAA ACG |
| C38A_rev | GCA ATA AGC GTT TGT TTG ATC ATT TTG AGC ACG |
| C40A_for | CAA ACA AAC TGT TAT GCC CAA GAA ATA AAC GC |
| C40A_rev | TGG GCA TAA CAG TTT GTT TGA TCA TTT TGA GC |
| C213A_for | ACT TAG TCG CTG GGC ATT ATA AGA GAG ATG C |
| C213A_rev | AAT GCC CAG CGA CTA AGT TCC AAT CTC TTA G |
| C222A_for | GAG ATG CTA AGG CTG GAG AAA TGG GAC CCG AC |
| C222A_rev | TTC TCC AGC CTT AGC ATC TCT CTT ATA ATG CCC |
| C291A_for | GAA GCT GTT AGC TGA AAA CTT GGA AAA CGG |
| C291A_rev | TTT TCA GCT AAC AGC TTC AAG TTG TGT GGG |
| H62A_for | ATC CTG CTA TCA AGC TTC CTC ATA GAA CGC CC |
| H62A_rev | GGA AGC TTG ATA GCA GGA TCT AAT GGA TCA G |
| H90A_for | ATG CTA ATT TGG ATA CTA ATA CAA ATC GGC C |
| H90A_rev | ATT AGT ATC CAA ATT AGC ATT CCA TGC TAC C |
| H215A_for | GGG GCT TAT AAG AGA GAT GCT AAG TGT GG |
| H215A_rev | CAT CTC TCT TAT AAG CCC CAC AGA CTA AG |
| H249A_for | CTT AAT TTC TGC TAT TGG GGG TCA TAT TTT TGC |
| H249A_rev | CCC AAT AGC AGA AAT TAA GGC TAG ATT ATT CTC |
| H253A_for | TAT TGG GGG TGC TAT TTT TGC TGG TAA TGT C |
| H253A_rev | AAA AAT AGC ACC CCC AAT ATG AGA AAT TAA GG |
| H249C_for | CTT AAT TTC TTG CAT TGG GGG TCA TAT TTT TGC |
| H249C_rev | CCC AAT GCA AGA AAT TAA GGC TAG ATT ATT CTC |
| H253C_for | TAT TGG GGG TTG CAT TTT TGC TGG TAA TGT C |
| H253C_rev | AAA AAT GCA ACC CCC AAT ATG AGA AAT TAA GG |
| HH249_53CC_for | CTT GCA TTG GGG GTT GCA TTT TTG CTG G |
| HH249_53CC_rev | TGC AAC CCC CAA TGC AAG AAA TTA AGG C |
| M1A_for | AAA GCG CTA CGT ATA ACT GTC AAA ACT TTG CAG |
| M1A_rev | ACA GTT ATA CGT AGC GCT TTA TTT TTT GTG TCA G |
| M1A_T5M_for ** | TAT AAT GGT CAA AAC TTT GCA GCA GCG GGC ATC |
| M1A_T5M_rev ** | GCA AAG TTT TGA CCA TTA TAC GTA GCG CTT TAT |
| M1A_A13M_for** | ATG TCC TTC CAT CAT AGC TTC AAA CAT ATT AGC |
| M1A_A13M_rev** | GCT ATG ATG GAA GGA CAT CCG CTG CTG C |
| M1A_I22M_for** | CAT ATG AGC GTT CCT GAT CTT CAT ACC CGT GC |

M1A_I22M_rev** AGA TCA GGA ACG CTC ATA TGT TTG AAG CTA TG

Zur Mutagenese von *TcAAH*

| | |
|-------------------|---|
| C7A_for | TGC TGA TCA TTG TGT TGG TAG CCA TAC CGG |
| C7A_rev | TAC CAA CAC AAT GAT CAG CAT GGC TGG TAC G |
| C10A_for | TGC TGT TGG TAG CCA TAC CGG TGA ACG TAG C |
| C10A_rev | CGG TAT GGC TAC CAA CAG CAT GAT CAC AAT GG |
| C20A_for | CGC TCT GGC AAC CGC CAC CGC AAC CGC ACG TAG |
| C20A_rev | CGG TGG CGG TTG CCA GAG CGC TAC GTT CAC C |
| C146A_for | GGT TGC TAC ACA TGG TAA ACG TAA TGC ATG TTG |
| C146A_rev | GTT TAC CAT GTG TAG CAA CCA GCA GCA GCG G |
| C154A_for | CAG CTT GTG CAC GTT ATG GTG CTC CGC TGG CAC |
| C154A_rev | ACC ATA ACG TGC ACA AGC TGC ATT ACG TTT ACC |
| C155A_for | GTG CTG CAC GTT ATG GTG CTC CGC TGG CAC GC |
| C155A_rev | AGC ACC ATA ACG TGC AGC ACA TGC ATT ACG |
| C191A_for | GGC TCT GCC GCA TGG TCT GTA TTA TGG CGA TC |
| C191A_rev | ACA GAC CAT GCG GCA GAG CCA CCA GAT TTG C |
| C287A_for | ATG CTG AAC CGG GTT GTC AAG AAA ATG TTC G |
| C287A_rev | TTG ACA ACC CGG TTC AGC ATC ATG CAC CGG |
| C291A_for | TGC TCA AGA AAA TGT TCG TAG CTA TGT TGT TCG |
| C291A_rev | TAC GAA CAT TTT CTT GAG CAC CCG GTT CAC |
| H179A_for | CAG CTG TTG GTG GTG ATC GTT ATG CAG CAA ATC |
| H179A_rev | ACG ATC ACC ACC AAC AGC TGT GGT TTC CCA AAC |
| H179C_for | CAT GTG TTG GTG GTG ATC GTT ATG CAG CAA ATC |
| H179C_rev | ACG ATC ACC ACC AAC ACA TGT GGT TTC CCA AAC |
| D183A_for | GTG CTC GTT ATG CAG CAA ATC TGG TGT GTC TGC |
| D183A_rev | ATT TGC TGC ATA ACG AGC ACC ACC AAC ATG TG |
| D183H_for | GTC ATC GTT ATG CAG CAA ATC TGG TGT GTC TGC |
| D183H_rev | ATT TGC TGC ATA ACG ATG ACC ACC AAC ATG TG |
| D183C_for | GTT GTC GTT ATG CAG CAA ATC TGG TGT GTC TGC |
| D183C_rev | ATT TGC TGC ATA ACG ACA ACC ACC AAC ATG TG |
| D183E_for | GTGAACGTTATGCAGCAAATCTGGTGTGTCTGC |
| D183E_rev | ATT TGC TGC ATA ACG TTC ACC ACC AAC ATG TG |
| D183H H179A_for # | CAG CTG TTG GTG GTC ATC GTT ATG CAG CAA ATC |
| D183H H179A_rev # | ACG ATG ACC ACC AAC AGC TGT GGT TTC CCA AAC C |

*Ausgangsplasmid muss die Mutation C207A enthalten.

**Ausgangsplasmid muss die Mutation M1A enthalten.

Ausgangsplasmid muss die Mutation D183H enthalten.

Zur Überprüfung der Klonierungen oder Mutagenesen wurden die in Tabelle 2-6 gelisteten Primer für die DNA-Sequenzierung verwendet.

Tabelle 2-6: Sequenzierprimer.

| Name | Sequenz (5' → 3') |
|----------------|--------------------------------|
| pET up1 | ATG CGT CCG GCG TAG A |
| pET down1 | GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA |
| T7_for | TAA TAC GAC TCA CTA TAG G |
| T7_rev | TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG |
| IBA102_for | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG |
| IBA102_rev | TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG |
| pRS4xx_SacI | GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG |
| Cyc-50_rev | GGA CCT AGA CTT CAG GTT G |
| 426TDH3_new | GTA GGT ATT GAT TGT AAT TCT G |
| pRS4xx_SeqTerm | CAC GAC GTT GTA AAA CGA CG |
| FBAprom_seq-50 | GTT ATT GTT CTT CCT TGC G |
| FBAterm_seq | CTT CAG AAG AAA AGA GCC GAC |
| Apd1_-201 | CCA CTC TTG GCG CTG ATG ATA TC |
| Apd1_seq | GTG ACG ATG CTG CTA ACG |
| Apd1_seq_rev | GGC GTT TTA GAA GAG TTC AA |
| Apd1_term | GCA AAA GGG ATC CTG TAT TTC |
| Aim32_-106 | CCT TTT TCG TGC ATG CGG GTG |
| Aim32_seq | TTG CCA AGA AAT AAA CGC AAG GC |
| Aim32_seq_rev | CAC CCG GTG ATA ACA GCA AAA C |
| Aim32_term | GTT CTG ACT TCG TTG ATT GTT TG |
| TcAAH_seq | GGT GTT CGT GCA GAA GTT GC |
| TcAAH_seq_rev | TGC CAG CGG AGC ACC ATA AC |
| M13_for | GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG G |
| Gal_seq | CTG CAT AAC CAC TTT AAC |

2.5 Synthetische Gene

In dieser Arbeit wurde ein synthetisches Gen (*TcAHH*), bezogen von Thermo Fisher, aus dem Organismus *T. curvata* verwendet. Es handelt sich um ein doppelsträngiges, lineares

DNA-Fragment, das Kodon-optimiert zur Expression in *E. coli* bestellt wurde. Zur Amplifikation mittels PCR wurde es als Template nach den Herstellerangaben vorbereitet. Die Sequenz des Gens kann dem Anhang entnommen werden.

2.6 Plasmide

Tabelle 2-7 gibt eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide wieder. Zur Expression in Hefe wurden Vektoren der Serie pRS4xx (im Folgenden 4xx) verwendet. Die 41x-Plasmide sind zentromerisch und liegen nur mit einer Kopie in der Zelle vor. Die 42x-Plasmide leiten sich vom 2 μ m-Plasmid ab, sind hochkopiezahlpasmide und liegen mit einer Anzahl von 10-30 Kopien in der Zelle vor (Mumberg *et al.*, 1995). Die Expression der Gene auf Plasmiden in Hefe unterlag vorwiegend der Kontrolle des natürlichen Promotors (NP). Hierfür wurde vor das zu untersuchende Gen ca. 500 Basen der vorhergehenden gDNA miteingeführt. Des Weiteren wurden neben dem typischen Hefepromotoren *TDH3* (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und *MET25* (O-Acetyl-homoserin-/ O-Acetylserin-Sulfhydrylase) auch der in unserem Arbeitskreis etablierte *FBA1*-Promotor (Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase) zur Anwendung gebracht (Bechtel, 2015). Als auxotropher Marker diente in allen Fällen *URA3* (Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase). Zur Selektion in *E. coli* wurden die Resistenzgene gegen die Antibiotika Ampicillin (Amp), Kanamycin (Kan) oder Tetracyclin (Tet) genutzt. Um den Fe/S-Cluster Einbau während der heterologen Genexpression in *E. coli* zu unterstützen, wurde mit dem Zusatzplasmid pRK-ISC gearbeitet.

Tabelle 2-7: Verwendete Ausgangs- und leer Plasmide.

| Name | Beschreibung | Promotor | Marker | Quelle |
|---------------------------|--|--------------|--|----------------------------------|
| p416_MET25 | ohne Insert | <i>MET25</i> | <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> | Mumberg <i>et al.</i> , 1995 |
| 426_TDH | ohne Insert | <i>TDH3</i> | <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> | Mumberg <i>et al.</i> , 1995 |
| 426_FBA | ohne Insert | <i>FBA1</i> | <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> | Bechtel, 2015 |
| 426 _{FBA} Leu1CT | ohne Insert, mit C-terminaler Verlängerung um 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus | <i>FBA1</i> | <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> | Bechtel, 2015 |
| pYM15 | zur Amplifikation der HIS3MX6-Kassette | | <i>Amp^R</i> , <i>HIS3MX6</i> | Janke <i>et al.</i> , 2004 |
| pRK-ISC | ein Plasmid, das auf pRK415 basiert. Es enthält Sequenzen, die für | <i>T7</i> | <i>Tet^R</i> | Nakamura <i>et al.</i> , 1999 |

Materialien

| Name | Beschreibung | Promotor | Marker | Quelle |
|---|--|-------------|--|---|
| pETDuet-1 | Komponenten der ISC-Maschinerie kodieren <i>E. coli</i> -Expressionsplasmid; His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | Novagen |
| IBA102 | <i>E. coli</i> -Expressionsplasmid; Twin-Strep-Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | IBA-lifesciences |
| pET28aTS_TEV | <i>E. coli</i> -Expressionsplasmid; Twin-Strep-Tag | <i>T7</i> | <i>Kan</i> ^R | B. Martins (Humboldt-Universität zu Berlin) |
| pET28aTS_TEV_KpnI | <i>E. coli</i> -Expressionsplasmid; Twin-Strep-Tag | <i>T7</i> | <i>Kan</i> ^R | diese Arbeit |
| pMAL_c5X | <i>E. coli</i> -Expressionsplasmid; MBP-Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | New England Biolabs Inc. |
| pMAL_c5X_TEV | <i>E. coli</i> -Expressionsplasmid; MBP-Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} His ₆ TS_Apd1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler His ₆ -Tag und TEV-Spaltstelle | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |

In Tabelle 2-8 sind alle Plasmide gelistet, die zur Expression in Hefe genutzt wurden.

Tabelle 2-8: Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae*.

| Name | Beschreibung | Promotor | Marker | Quelle |
|------------------------------|----------------------------------|-------------|--|--------------|
| 416 _{NP} Apd1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1 | <i>APD1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Blinn, 2014 |
| 416 _{NP} Apd1 C33A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C33A | <i>APD1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 C44A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C44A | <i>APD1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 C48A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C48A | <i>APD1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 C95A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C95A | <i>APD1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 C110A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C110A | <i>APD1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 C128A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C128A | <i>APD1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |

Materialien

| | | | |
|----------------------------------|--|--|--------------|
| 416 _{NP} Apd1 C207A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 C207A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Blinn, 2014 |
| 416 _{NP} Apd1 C216A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 C216A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Blinn, 2014 |
| 416 _{NP} Apd1 C309A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 C309A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 H66A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, H66A APD1 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 H80A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, H80A APD1 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 H92A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, H92A APD1 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 H209A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 H207A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 H255A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 H255A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Blinn, 2014 |
| 416 _{NP} Apd1 H259A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 H259A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Blinn, 2014 |
| 416 _{NP} Apd1 H292A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 H292A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 H255C | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 H255C | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 H259C | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 H259C | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 HH255_9AA | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 HH255_9AA | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 HH255_9CC | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 HH255_9CC | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 S208A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 S208A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 Δ1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 C-terminal um 1 AS gekürzt | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 Δ3 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 C-terminal um 3 AS gekürzt | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 Δ6 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 C-terminal um 6 AS gekürzt | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Apd1 W316A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, APD1 W316A | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} Apd1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, FBA1 N-terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |

Materialien

| | | | | |
|--------------------------------|---|--------------|--|--------------|
| 426 _{FBA} Apd1 Δ1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle, Δ1 | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Greth, 2018 |
| 426 _{FBA} Apd1 Δ3 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle, Δ3 | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Greth, 2018 |
| 426 _{FBA} Apd1 Δ4 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle, Δ4 | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} Apd1 Δ5 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle, Δ5 | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} Apd1 Δ6 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle, Δ6 | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Greth, 2018 |
| 426 _{FBA} Apd1 Δ7 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-Terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle, Δ7 | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} Apd1 W316A | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler His ₈ -Tag und TEV-Spaltstelle, W316A | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} Apd1_myc | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C-terminaler Myc-Tag | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{TDH} Apd1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, C-terminaler Myc-Tag | <i>TDH3</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{TDH} Apd1 3HA | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminaler HA-Tag | <i>TDH3</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{TDH} Apd1 3HA Δ1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, Δ1, N-terminaler HA-Tag | <i>TDH3</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{TDH} Apd1 3HA Δ4 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, Δ4, N-terminaler HA-Tag | <i>TDH3</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{TDH} Apd1 3HA Δ7 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, Δ7, N-terminaler HA-Tag | <i>TDH3</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 | <i>S. cerevisiae</i> Aim32 | <i>AIM32</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | Blinn, 2014 |
| 416 _{NP} Aim32 C38A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C38A | <i>AIM32</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 C40A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C40A | <i>AIM32</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 C123A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C123A | <i>AIM32</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 C222A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C222A | <i>AIM32</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |

Materialien

| | | | | |
|---------------------------------------|--|-------|--|--------------|
| 416 _{NP} Aim32 C222A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C222A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 C291A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C291A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H62A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H62A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H62A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H62A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H90A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H215A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H215A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H215A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H249A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H294A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H253A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H253A | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H249C | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H294C | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 H253C | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, H253C | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 416 _{NP} Aim32 HH249_53CC | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, HH249_53CC | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{NP} Aim32 | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C-terminaler Myc-Tag | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{NP} Aim32 M1A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, M1A, C-terminaler Myc-Tag | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{NP} Aim32 M1A T5M | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, M1A T5M, C-terminaler Myc-Tag | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{NP} Aim32 M1A A13M | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, M1A A13M, C-terminaler Myc-Tag | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{NP} Aim32 M1A I22M | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, M1A I22M, C-terminaler Myc-Tag | AIM32 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{TDH} Aim32 | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C-terminaler Myc-Tag | TDH3 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{Met25} Aim32 | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, C-terminaler Myc-Tag | Met25 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} TCAAH | <i>T. curvata</i> Apd1 | FBA1 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} TCAAH_Leu1CT | <i>T. curvata</i> Apd, mit C- terminaler Verlängerung um 30 AS | FBA1 | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |

Materialien

| des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus | | | | |
|--|---|-------------|--|--------------|
| 426 _{FBA} TCAAH D183H | <i>T. curvata</i> Apd1, D183H | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} TCAAH D183A | <i>T. curvata</i> Apd1, D183A | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} TCAAH D183H C146A | <i>T. curvata</i> Apd1, D183H, C146A | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} TCAAH D183H C154A | <i>T. curvata</i> Apd1, D183H, C154A | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} TCAAH D183H C155A | <i>T. curvata</i> Apd1, D183H, C155A | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |
| 426 _{FBA} TCAAH D183H H179A | <i>T. curvata</i> Apd1, D183H, H179A | <i>FBA1</i> | <i>Amp</i> ^R , <i>URA3</i> | diese Arbeit |

Die zur heterologen Genexpression in *E. coli* verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2-9 aufgelistet. In dieser Arbeit wurde die Geninduktion durch den T7lac-Promotor eingeleitet, der durch die T7-RNA-Polymerase aktiviert wird. Im Folgenden wird für pETDuet-1 die Abkürzung pD1 verwendet.

Tabelle 2-9: Plasmide zur Expression in *E. coli*.

| Name | Beschreibung | Promotor | Marker | Quelle |
|-------------------------|---|-----------|-------------------------|--------------------|
| pD1_NcoI_Apd1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1 | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |
| pET28A_TS_TS_KpnI_Apd1 | <i>S. cerevisiae</i> Apd1, Twin-Strep-Tag, TEV-Spaltstelle | <i>T7</i> | <i>Kan</i> ^R | diese Arbeit |
| pET28A_TS_TS_KpnI_Aim32 | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, Twin-Strep-Tag, TEV-Spaltstelle | <i>T7</i> | <i>Kan</i> ^R | diese Arbeit |
| pD1_Aim32 | <i>S. cerevisiae</i> Aim32, His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | Stegmaier, 2017 |
| pD1_Aim32 C213A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32 C213A, His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |
| pD1_Aim32 C222A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32 C222A, His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |
| pD1_Aim32 H249A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32 H249A, His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |
| pD1_Aim32 H253A | <i>S. cerevisiae</i> Aim32 C253A, His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |
| pD1_Aim32 HH249_53CC | <i>S. cerevisiae</i> Aim32 HH249_53CC, His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |
| pD1_BamHI_TCAAH | <i>T. curvata</i> AAH, His ₆ -Tag | <i>T7</i> | <i>Amp</i> ^R | diese Arbeit |

Materialien

| | | | | |
|------------------------|---|----|------------------|--------------|
| pD1_BamHI_TcAAH C146A | <i>T. curvata</i> AAH C146, His ₆ -Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_BamHI_TcAAH1 C154A | <i>T. curvata</i> AAH C154A, His ₆ -Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_BamHI_TcAAH C155A | <i>T. curvata</i> AAH C155A His ₆ -Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_BamHI_TcAAH H179A | <i>T. curvata</i> AAH H179A, His ₆ -Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_BamHI_TcAAH D183A | <i>T. curvata</i> AAH D183A, His ₆ -Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_BamHI_TcAAH D183H | <i>T. curvata</i> AAH D183H, His ₆ -Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| IBA102_TcAAH | <i>T. curvata</i> AAH, Twin-Strep-Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| IBA102_TcAAH C146A | <i>T. curvata</i> AAH C146A Twin-Strep-Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| IBA102_TcAAH C154A | <i>T. curvata</i> AAH C154A Twin-Strep-Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| IBA102_TcAAH C155A | <i>T. curvata</i> AAH C155A Twin-Strep-Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| IBA102_TcAAH H179A | <i>T. curvata</i> AAH H179A Twin-Strep-Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| IBA102_TcAAH D183A | <i>T. curvata</i> AAH D183A Twin-Strep-Tag | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 | <i>T. curvata</i> AAH | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C7A | <i>T. curvata</i> AAH C7A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C10A | <i>T. curvata</i> AAH C10A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C20A | <i>T. curvata</i> AAH C20A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C146A | <i>T. curvata</i> AAH C146A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C154A | <i>T. curvata</i> AAH, C154A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C155A | <i>T. curvata</i> AAH C155A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 H179A | <i>T. curvata</i> AAH H179A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 D183A | <i>T. curvata</i> AAH D183A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C191A | <i>T. curvata</i> AAH C191A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C287A | <i>T. curvata</i> AAH C287A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 C291A | <i>T. curvata</i> AAH C291A | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 H179C | <i>T. curvata</i> AAH H179C | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 D183H | <i>T. curvata</i> AAH D183H | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |
| pD1_Ncol_TcApd1 D183C | <i>T. curvata</i> AAH D183C | T7 | Amp ^R | diese Arbeit |

pD1_NcoI_TcApd1 D183G *T. curvata* AAH D183G T7 *Amp^R* diese Arbeit

2.7 Puffer und Lösungen

Alle im Zuge dieser Arbeit angesetzten Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit H₂O_{dd} angesetzt und der pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt.

2.8 Bakterien- und Hefestämme

2.8.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2-10 aufgelistet. *E. coli* NEB5- α wurde zur Klonierung, Mutagenese und Vervielfältigung von Plasmiden eingesetzt. Für den cDNA-Screen (s. Kap. 4.4) wurde *E. coli* NEB 10- β verwendet, da sich diese Zellen durch eine höhere Transformationseffizienz großer Plasmide auszeichnen. Heterologe Genexpression wurde in *E. coli* BL21 durchgeführt. Diese Zellen tragen das Gen T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors und sind fähig Plasmide mit T7-Promotor durch Zugabe von IPTG zu induzieren.

Tabelle 2-10: *E. coli* Stämme.

| Stamm | Genotyp |
|----------------|--|
| NEB5- α | <i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) <i>U169 phoA glnV44 ϕ80</i> Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15 gyrA96 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> |
| NEB10- β | Δ (<i>ara-leu</i>) <i>7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-ϕ80dlacZ</i> Δ <i>M15 recA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> |
| BL21(DE) | <i>fhuA2[lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> <i>λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int:::(lacI::PlacUV5::T7 Gen 1) i21 Δin5</i> |

2.8.2 Hefestämme

Die verwendeten Hefestämme sind Tabelle 2-11 zu entnehmen. Als Wildtyp (WT) diente in dieser Arbeit W303-1-A. Alle verwendeten oder konstruierten Hefestämme wurden mittels homologer Rekombination einer über PCR-amplifizierten Genkassette angefertigt. Die Deletionsstämme Δ *apd1*, Δ *aim32* und Δ *leu1* verfügen über eine Genkassette, die die Information für die Nourseothricin-*N*-acetyl-Transferase aus *Streptomyces noursei* enthält und sind somit gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin (Nat) resistent. Zur Herstellung der Doppeldeletionsmutanten Δ *aim32* Δ *sod2* und Δ *apd1* Δ *sod2* wurde das Gen *SOD2* durch homologe Rekombination einer *HIS3*-Kassette in den Einzeldelentionsmutanten ausgetauscht. Die *HIS3*-Stämme

wurden mit Hilfe homologer Rekombination eines kleinen DNA-Abschnitts, der den Frameshift des *his3-11,15* Allels zur Histidin- Prototrophie zurückführt, angefertigt.

Tabelle 2-11: *S. cerevisiae* Stämme in W303-Hintergrund .

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|---|--|--------------------------|
| W303-1-A | <i>MATa leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1 can1-100 ade2-1 ura3-1</i> | Thomas & Rothstein, 1989 |
| Δ <i>apd1</i> | W303-1-A <i>apd1</i> :: <i>natNT2</i> | Blinn, 2014 |
| Δ <i>aim32</i> | W303-1-A <i>aim32</i> :: <i>natNT2</i> | Blinn, 2014 |
| Δ <i>leu1</i> | W303-1-A <i>leu1</i> :: <i>natNT2</i> | Ebert, 2014 |
| W303 <i>HIS3</i> ⁺ | W303-1-A <i>his3</i> :: <i>HIS3</i> | diese Arbeit |
| Δ <i>apd1 HIS3</i> ⁺ | W303-1-A <i>his3</i> :: <i>HIS3</i> , <i>apd1</i> :: <i>natNT2</i> | diese Arbeit |
| Δ <i>aim32 HIS3</i> ⁺ | W303-1-A <i>his3</i> :: <i>HIS3</i> , <i>aim32</i> :: <i>natNT2</i> | diese Arbeit |
| Δ <i>sod2</i> | W303-1-A <i>sod2</i> :: <i>HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| Δ <i>aim32\Delta</i> <i>sod2</i> | W303-1-A <i>sod2</i> :: <i>HIS3MX6</i> , <i>aim32</i> :: <i>natNT2</i> | diese Arbeit |
| Δ <i>apd1\Delta</i> <i>sod2</i> | W303-1-A <i>sod2</i> :: <i>HIS3MX6</i> , <i>apd1</i> :: <i>natNT2</i> | diese Arbeit |
| Gal_ <i>CFD1</i> | W303-1A p <i>CFD1</i> :: <i>HIS3-pGAL1-10</i> | Balk <i>et al.</i> 2005b |
| Gal_ <i>NAR1</i> | W303-1A p <i>NAR1</i> : : <i>HIS3-pGAL1-10</i> | Balk <i>et al.</i> 2004 |
| Gal_ <i>CIA1</i> | W303-1A p <i>CIA1</i> :: <i>HIS3-pGAL1-10</i> | Balk <i>et al.</i> 2005b |
| GalL_ <i>CIA2</i> | W303-1A p <i>CIA2</i> :: <i>HIS3MX6-pGALL</i> | Greth, 2018 |
| Gal_ <i>CFD1 \Delta</i> <i>leu1</i> | Gal_ <i>CFD1</i> , <i>leu1</i> :: <i>natNT2</i> | Greth, 2018 |
| Gal_ <i>NAR1 \Delta</i> <i>leu1</i> | Gal_ <i>NAR1</i> , <i>leu1</i> :: <i>natNT2</i> | Greth, 2018 |
| Gal_ <i>CIA1 \Delta</i> <i>leu1</i> | Gal_ <i>CIA1</i> , <i>leu1</i> :: <i>natNT2</i> | Greth, 2018 |
| GalL_ <i>CIA2 \Delta</i> <i>leu1</i> | GalL_ <i>CIA2</i> , <i>leu1</i> :: <i>natNT2</i> | Greth, 2018 |
| GalL_ <i>MET18 \Delta</i> <i>leu1</i> | GalL_ <i>MET18</i> , <i>leu1</i> : : <i>HIS3MX6</i> | Greth, 2018 |

Des Weiteren wurden die in Tabelle 2-12 genannten Stämme verwendet:

Tabelle 2-12: Weitere *S. cerevisiae*-Stämme in BY4742-Hintergrund.

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|--|---|---|
| BY4742 | <i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> | Winston <i>et al.</i> , 1995; Brachmann <i>et al.</i> , 1998 |
| BY Δ aim32 | BY4742 <i>aim32</i> :: <i>KanMX4</i> | Brachmann <i>et al.</i> , 1998 |
| BY Δ apd1 | BY4742 <i>apd1</i> :: <i>KanMX4</i> | Brachmann <i>et al.</i> , 1998 |
| BY Δ cyc2 | BY4742 <i>cyc2</i> :: <i>KanMX4</i> | Brachmann <i>et al.</i> , 1998 |
| BY Δ cyt2 | BY4742 <i>cyt2</i> :: <i>KanMX4</i> | Brachmann <i>et al.</i> , 1998 |
| BY Δ cyc2/ Δ aim32 | BY Δ cyc2, <i>aim32</i> :: <i>natNT2</i> | diese Arbeit |
| BY Δ cyt2/ Δ aim32 | BY Δ cyt2, <i>aim32</i> :: <i>natNT2</i> | diese Arbeit |
| BY4742 <i>HIS3</i> ⁺ | BY4742, <i>his3</i> :: <i>HIS3</i> | diese Arbeit |
| BY Δ aim32 <i>HIS3</i> ⁺ | BY Δ aim32, <i>his3</i> :: <i>HIS3</i> | diese Arbeit |
| BY Δ apd1 <i>HIS3</i> ⁺ | BY Δ apd1, <i>his3</i> :: <i>HIS3</i> | diese Arbeit |

2.9 Antikörper

Als Primärantikörper für die Immundetektion wurden Seren von mit Protein-immunisierten Kaninchen verwendet, die von Prof. Johannes Hermann (Fachbereich Biologie Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau (RPTU)) und Prof. Roland Lill (Zytobiologie, Philipps Universität Marburg) zur Verfügung gestellt wurden und sind in Tabelle 2-13 aufgeführt. Die Seren von α -Apd1, α -Aim32 und α -Leu1 wurden im Tierhaus der RPTU nach Immunisierung der Tiere mit dem jeweiligen rekombinanten Protein isoliert.

Tabelle 2-13: Antikörper

| Antikörper | Verwendete Verdünnung | Quelle |
|-----------------|-----------------------|------------------|
| α -Apd1 | 1:1000 | Blinn, 2014 |
| α -Aim32 | 1:1000 | Blinn, 2014 |
| α -Leu1 | 1:1000 | Greth, 2018 |
| α -Mia40 | 1:10000 | Prof. J. Hermann |
| α -Ilv5 | 1:5000 | Prof. J. Hermann |
| α -Sod1 | 1:1000 | Prof. J. Hermann |
| α -Oxa1 | 1:500 | Prof. J. Hermann |
| α -Porin | 1:2000 | Prof. R. Lill |

Materialien

| | | |
|--------------------------|--------|--------------------------|
| α -Cia1 | 1:1000 | Prof. R. Lill |
| α -Cia2 | 1:1000 | Prof. R. Lill |
| α -Met18 | 1:1000 | Prof. R. Lill |
| α -Nar1 | 1:500 | Prof. R. Lill |
| α -Cfd1 | 1:1000 | Prof. R. Lill |
| Goat anti-rabbit IgG-HRP | 1:5000 | Santa Cruz Biotechnology |

2.10 Weitere Materialien

In dieser Arbeit wurden folgende Kits und Komplettsysteme verwendet:

NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit.

Klonierungen.

NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)

Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*.

NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel)

Reinigung von PCR-Produkten aus dem Reaktionsansatz sowie Elution und Reinigung von DNA aus Agarosegelen.

Trans-Blot Turbo RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit (Bio-Rad)

Das Kit mit Membran, Blottingpapier und -puffer wurde zum Proteintransfer mit dem Trans-Blot-Turbo Transfersystem verwendet.

Enzyme und Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sowie die zugehörigen Puffer wurden von der Firma New England Biolabs Inc. bezogen.

Zudem wurden folgende Enzyme und Proteine verwendet:

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma Aldrich |
| DNase I | AppliChem |
| RNase A | AppliChem |
| T4 Ligase | New England Biolabs Inc. |
| Zymolyase 20T | Nacalai Tesque Inc. |
| Proteinase K | Sigma Aldrich |
| Lysozym | Roth |

Größenstandards

Die verwendeten Größenstandards sind im Folgenden gelistet:

| | |
|---|--------------------------|
| 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb) | New England Biolabs Inc. |
| Protein Marker III (6,5-212 kDa) | AppliChem |
| Blue Protein Standard, Broad Range (11-190 kDa) | New England Biolabs Inc. |

Säulenmaterialien und gepackte Säulen

| Säulenmaterial | Hersteller |
|--------------------------------------|-------------------|
| Ni-NTA Agarose | Cube Biotech |
| Strep-Tactin Superflow high capacity | IBA-Lifesciences |
| Sephadex G-25 M PD10 Columns | Cytiva |
| HiTrap Heparin HP 5 ml | Cytiva |
| HiPrep™ 26/60 Sephacryl® S-200 HR | Cytiva |

Kristallisationsscreens (Humboldt-Universität zu Berlin, AG Prof. Dobbek)

| Screen | Hersteller |
|---|----------------------|
| JCSG- <i>plus</i> ™ HT-96 | Molecular Dimensions |
| <i>ProPlex</i> HT-96 | Molecular Dimensions |
| PACT <i>premier</i> ™ HT 96 | Molecular Dimensions |
| The Stura Footprint Screen™ + MacroSol™ HT-96 | Molecular Dimensions |
| Morpheus® | Molecular Dimensions |
| MemGold™ | Molecular Dimensions |
| MemGold™ 2 | Molecular Dimensions |
| Wizard Cryo | Molecular Dimensions |
| Structure Screen 1 + 2 HT-96 | Molecular Dimensions |
| Pi-minimal | Jena Bioscience |
| PEG/Ion HT™-HR2-139 | Hampton Research |
| SaltRx HT™ HR2-136 | Hampton Research |

3. Methoden

3.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten mit lebenden Organismen erfolgten unter Berücksichtigung der Sicherheitsstufe S1 der Verordnung des Gentechnikgesetzes. Mikrobiologische Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Materialien und Lösungen sterilisiert bzw. autoklaviert. Arbeitsflächen und ähnliches wurden mit 70 % Ethanol (EtOH) desinfiziert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden vor Benutzung sterilfiltriert (0,22 µm) und in ein steriles Gefäß überführt. Kontaminierte Medien, Lösungen und Materialien wurden nach Gebrauch ordnungsgemäß mittels Autoklavierens unschädlich gemacht.

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

| LB-Medium | |
|-----------------|--------|
| LB-Medium | 25 g/l |
| LB-Agar-Platten | |
| LB-Medium | 25 g/l |
| Agar | 15 g/l |

Die Kultivierung der verwendeten *E. coli*-Stämme (BL21, DH5-α und NEB10-β) in LB-Medium erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 rpm (*revolutions per minute*). Zur Selektion wurde je nach verwendetem Plasmid ein Antibiotikum aus Tabelle 3-1 verwendet. Zur Kultivierung auf Festmedium wurden LB-Agar-Platten, ebenfalls mit entsprechenden Antibiotika versetzt, verwendet.

Tabelle 3-1: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika.

| Antibiotikum | Lösungs- mittel | Konzentra- tion | Endkonzentra- tion Festmedium | Endkonzentration Flüssigmedium |
|--------------|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Ampicillin | H ₂ O _{dd} | 100 mg/ml | 100 µg/ml | 100 µg/ml |
| Kanamycin | H ₂ O _{dd} | 30 mg/ml | 30 µg/ml | 30 µg/ml |
| Tetracyclin | 70 % EtOH | 10 mg/ml | 5 µg/ml | 10 µg/ml |

3.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefezellen werden entweder in Vollmedium (YP-Medium) oder in Minimalmedium (SC-Medium) in einem Schüttelinkubator bei 30 °C und 150 rpm kultiviert. In beiden Fällen musste noch eine Kohlenstoffquelle zugefügt werden. Bei den durchgeführten Experimenten diente 2 % Glukose (w/v) oder 2 % Galaktose (w/v) als Kohlenstoffquelle.

In einigen Fällen wurde Glycerin mit einer Endkonzentration im Medium von 3 % (v/v) eingesetzt. Alle für die Medien benötigten Substanzen wurden in H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert.

| 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 |
| Marker-Mix | 20 ml/l |

Um eine Karamellisierung zu vermeiden, wurden die Zuckerlösungen und Glycerin vom restlichen Medium getrennt autoklaviert und vor Gebrauch mit diesem vermischt. Wurde eine Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Festmedium durchgeführt, so wird dem Medium 20 g/l Agar zugefügt. Die Wahl des verwendeten Mediums variierte je nach Experiment. Wurde bei der Durchführung des Experiments eine Marker-Selektion benötigt, so war das Medium der Wahl SC-Medium. Hier wurde je nach Auxotrophie der verwendeten Hefezellen und der verwendeten Plasmide der geeignete Selektionsmarker zugesetzt.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung des Marker-Mix für das Minimalmedium

| Marker | Menge für 150 ml Marker-Mix |
|---------------|------------------------------------|
| Adeninsulfat | 600 mg |
| L-Histidin | 200 mg |
| L-Leucin | 450 mg |
| L-Tryptophan | 300 mg |
| Uracil | 150 mg |

3.1.3 Glycerinkultur von *S. cerevisiae*

Zur Langzeitlagerung der in dieser Arbeit konstruierten Hefestämmen wurden Glycerinstocks gefertigt. Hierzu werden 1,2 ml einer YP-Übernachtskultur mit 400 µl sterilem Glycerin (70 % v/v) vermischt, vorsichtig invertiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

3.1.4 Messung der optischen Dichte

Um das Wachstum von *S. cerevisiae*- und *E. coli*-Kulturen zu kontrollieren, wurde die Messung der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) herangezogen, denn bei dieser Wellenlänge hängt die Extinktion/Streuung von der Anzahl der Zellen in der Kultur ab. Da ab einer $OD_{600} > 0,5$ die OD unterschätzt wird, wurde ab dieser die Kulturen 1:10 mit H_2O_{dd} verdünnt. Für die Messung wurde ein UV/Vis-Spektrometer (Thermo Scientific, Genesys 10UV scanning) verwendet. Als Blindwert diente LB-Medium resp. H_2O_{dd} im Falle einer verdünnten Kultur.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um DNA zu vervielfältigen. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Das Prinzip der PCR beruht auf der Fähigkeit der DNA-Polymerase mit Hilfe passender Oligonukleotide (Primer) das DNA-Fragment der Wahl zu amplifizieren. Neben Primern und Polymerase werden zudem noch als Bausteine für die Amplifizierung Desoxyribonukleotide (dNTP) und Ausgangs-DNA als Vorlage (Template) benötigt.

Eine klassische PCR besteht aus drei Schritten, welche sich zyklisch wiederholen (Mühlhardt, 2013). Bei dieser Reaktion werden die Produkte des vorherigen Zyklus als Ausgangsstoffe für den folgenden verwendet (Kettenreaktion):

Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen getrennt. Im nächsten Schritt, der Primerhybridisierung, lagern sich die Primer an die komplementären Abschnitte der DNA-Einzelstränge an. Die Temperatur dieser Phase orientiert sich an der Schmelztemperatur der Primer. Die gewählte Temperatur sollte 5°C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur liegen. Während der Elongation, dem finalen Schritt, verlängert die Polymerase die angelagerten Oligonukleotide vom 3'-Ende her. Auf diese Weise entsteht erneut ein Doppelstrang.

Alle präparativen PCRs zur Amplifizierung von Gen-Abschnitten für Klonierungen dieser Arbeit wurden mit Phusion-Polymerase (New England Biolabs, NEB), sowie den zugehörigen Puffern durchgeführt. Sie besitzt eine $5' \rightarrow 3'$ Polymeraseaktivität und weist laut Hersteller eine siebenfach geringere Fehlerrate als die Taq-Polymerase (NEB, 2019) auf. Wurde eine PCR zur Überprüfung einer homologen Rekombination oder Klonierung durchgeführt, wurde mit der Taq-Polymerase gearbeitet. Tabelle 3-3 zeigt das Pipettierschema eines $50\ \mu\text{l}$ PCR-Ansatzes für die verwendeten Polymerasen.

Tabelle 3-3: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes.

| | Phusion-Polymerase | Taq-Polymerase |
|---|---------------------------|-----------------------|
| Template DNA | 1–3 µl | 1–3 µl |
| 10 µM Vorwärtsprimer | 2,5 µl | 2,5 µl |
| 10 µM Rückwärtsprimer | 2,5 µl | 2,5 µl |
| Phusion Puffer HF (5fach) | 10 µl | — |
| Thermopol (10fach) | — | 5 µl |
| dNTPs | 1 µl | 1 µl |
| DMSO optional | 2,5 µl | 2,5 µl |
| Phusion-Polymerase | 0,5 µl | — |
| Taq-Polymerase | — | 0,5 µl |
| Steriles H ₂ O _{dd} | Ad 50 µl | Ad 50 µl |

Zur Amplifizierung mittels Phusion-Polymerase wurde das Programm aus Tabelle 3-4 verwendet. Diente synthetische DNA (1 ng) oder Plasmid-DNA (5-10 ng) als Template, betrug die initiale Denaturierungsdauer 3 min. Bei Verwendung genomischer DNA (1 µl, 1:10 verd.) erhöhte sich die Dauer auf 5 min. Die Elongationsdauer wurde der Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst. Die dazugehörige Annealing-Temperatur betrug 55–60 °C für die Phusion- resp. 50–58 °C für die Taq-Polymerase.

Tabelle 3-4: Programm zur Amplifikation mittels Phusion-Polymerase.

| | | | |
|-----------|-------|--------------|----------------|
| 1 Zyklus | 98 °C | 3-5 min | |
| | 98 °C | 10 sec | Denaturierung |
| 35 Zyklen | X °C | 30 sec | Hybridisierung |
| | 72 °C | 15–30 sec/kb | Elongation |
| 1 Zyklus | 72 °C | 10 min | |

Das Programm zur Amplifikation mittels Taq Polymerase ist in Tabelle 3-5 dargestellt.

Tabelle 3-5: Programm zur Amplifikation mittels Taq-Polymerase.

| | | | |
|-----------|-------|----------|----------------|
| 1 Zyklus | 95 °C | 5 min | |
| | 95 °C | 30 sec | Denaturierung |
| 35 Zyklen | X °C | 30 sec | Hybridisierung |
| | 68 °C | 1 min/kb | Elongation |
| 1 Zyklus | 68 °C | 10 min | |

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

| TAE-Puffer (50 x) | |
|------------------------------------|-------------|
| Tris | 2 M |
| EDTA | 0,1 M |
| Eisessig | 5,7 % (v/v) |
| Mit Essigsäure auf pH 8 einstellen | |

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, stellt die Agarosegelelektrophorese die Methode der Wahl dar. Hierbei wird DNA, welche mit einem Farbstoff versetzt, der bei Bindung an DNA nach Anregung durch UV-Licht fluoresziert, auf ein Agarosegel geladen. Durch Anlegen einer Spannung trennen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente beim Durchlaufen des Gels Richtung Anode auf. Größere DNA-Moleküle werden bei diesem Verfahren stärker retardiert als kleinere. Für die Elektrophorese wurden 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle bis zur Homogenität erhitzt und zu einem Gel gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Die Elektrophorese für ein analytisches Gel wurde bei 100 V ca. 40 min durchgeführt. Das Gesamtvolumen einer analytischen Probe betrug 10 µl: 1-5 µl DNA, 1,7 µl Loading Dye und 1 µl Gel Red (1:1000 verd.). Aufgefüllt wurde mit H₂O_{dd}. Bei einem präparativen Gel werden die Mengen entsprechend dem DNA-Volumen angepasst. Die Dauer der Elektrophorese verkürzte sich auf 20 min. Als Größenstandard diente ²log DNA-ladder (0,1–10 kb). Durch ihn kann nicht nur die Größe des DNA-Moleküls, sondern auch durch Intensitätsvergleich des Fluoreszenzfarbstoffs die Menge an DNA in der Probe abgeschätzt werden.

3.2.3 Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen und Agarosegelen wurde das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Dabei wurde einschließlich des zusätzlichen Waschschruttes nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Eluiert wurde mit 15 µl und im Falle der Aufreinigung bei der Mutagenese mit 30 µl Puffer. Vorher wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme spalten DNA an definierten Schnittstellen. Bei einem Verdau werden in fast allen Fällen Fragmente mit einem 5'-Phosphat und einem 3'-OH-Ende generiert. Dabei können die Enden entweder glatt (*blunt ends*) sein, oder sie stehen über (*sticky ends*). Die Länge des Überhangs beträgt 2 oder 4 Basen (Mühlhardt, 2013). Alle im Zuge dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs Inc. bezogen. Die Menge zu spaltender DNA betrug dabei 0,5–1,5 µg. Pro Doppelverdau

wurden je 1,5 µl Enzym verwendet. Wird nur ein Probeverdau durchgeführt, verringert sich die Menge an Enzym auf 1 µl. Nach der Zugabe des zu den Enzymen kompatiblen Puffers wurde der Reaktionsansatz mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend, je nach Größe der abgetrennten Enden, entweder mittels PCR Clean-up für Einzelfragmente oder präparativer Agarosegelelektrophorese für mehrere Fragmente aufgereinigt.

3.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Ligation ist es möglich zwei DNA-Fragmente unter der Bildung einer Phosphodiesterbindung zu verknüpfen. Dies ermöglicht das Enzym DNA-Ligase. Somit kann im Zuge einer Klonierung ein Genabschnitt in einen *E. coli* oder *S. cerevisiae* Expressionsvektor, sofern der DNA-Abschnitt und der Vektor mittels Restriktionsverdau vorbereitet wurden, eingebaut werden.

Für alle Ligationen, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, wurde DNA-Ligase T4 sowie der Ligasepuffer von New England Biolabs Inc. verwendet.

Ligiert wurde in einem 10 µl Reaktionsansatz 30–120 min bei 23 °C. Dabei betrug die Menge des eingesetzten Vektors immer 100 ng. Die optimale Menge des benötigten Inserts ist von dessen Größe und von jener des verwendeten Vektors abhängig und errechnet sich mittels folgender Formel:

$$\text{ng Insert} = \frac{100 \text{ ng Vektor} \cdot \text{Größe des Inserts in kb}}{\text{Größe des Vektors in kb}} \cdot 3$$

Die benötigten Volumina für den Ansatz wurden via analytischer Agarosegelelektrophorese abgeschätzt. Zu jenen wird 0,5 µl Ligase und 1 µl Ligasepuffer gegeben. Aufgefüllt auf 10 µl wird mit H₂O_{dd}.

Wurde mit Hilfe des NEBuilders eine Klonierung durchgeführt, wurde entsprechend der Herstellerangaben gearbeitet.

3.2.6 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen wurden entweder ca. 5 ng intakte Plasmid-DNA, 10 µl Ligationsmix oder bei der Mutagenese der komplette 30 µl-Ansatz gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Je nach Experiment wurden entweder DH5-α-, NEB10-β- oder BL21-Zellen verwendet. Mittels eines 90-sekündigen Hitzeschocks von 42 °C wurde das Eindringen der DNA in die Zelle erleichtert. Nach 2 min auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 40 min bei 850 rpm und 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde für 5 min bei 2400 x g (VWR Micro Star 17) zentrifugiert und 950 µl Medium verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert und mit einem

Drigalski-Spatel auf eine LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika plattiert. Inkubiert wurde ca. 16 h bei 37 °C.

3.2.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Damit *E. coli*-Zellen in der Lage sind Plasmid-DNA in sich aufzunehmen, müssen sie „kompetent“ gemacht werden. Allen in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Zellen wurde Kompetenz mittels der Rubidiumchloridmethode verliehen. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stammes in 15 ml SOB-Medium bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 500 ml Großkultur mit 5 ml der Übernachtskultur inokuliert, mit 36 ml NaCl (5 M) versetzt und bei 30 °C inkubiert, bis $OD_{600} = 0,5$ erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C, 4000 rpm für 15 min zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig auf Eis mit gekühltem TFB resuspendiert und im Anschluss 15 min auf Eis inkubiert. Unter Schwenken wurde zu der Zellsuspension 1,75 ml DMSO getropft und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die so vorbereiteten Zellen wurden zu 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellaliquots erfolgte bei -80 °C.

SOB-Medium

| | |
|---|--------|
| Trypton | 20 g/l |
| Hefeextrakt | 5 g/l |
| NaCl | 10 mM |
| pH = 7,0 | |
| ad 1 l H ₂ O _{dd} | |
| Nach dem Autoklavieren werden noch 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ und 10 mM MgSO ₄ hinzugefügt. | |

MES-Lösung

| | |
|------------------|-----|
| MES-Lösung | 1 M |
| pH = 6,2 mit KOH | |
| sterilfiltriert | |

TFB

| | |
|---|--------|
| MES | 10 mM |
| Rubidiumchlorid | 100 mM |
| Mangan(II)-chlorid | 45 mM |
| Calciumchlorid | 10 mM |
| Hexamincobalt(III)-chlorid | 3 mM |
| ad 50 ml H ₂ O _{dd} | |
| sterilfiltriert | |

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

Plasmid-DNA wurde mittels des Kits NucleoSpin® Plasmid von Machery-Nagel isoliert. Bei der Durchführung wurde in dieser Arbeit weitgehend die Anleitung des Herstellers befolgt, abweichend war die Puffermenge bei Elution, die bei *E. coli* Expressionsvektoren lediglich 30 µl betrug. Die Konzentration der isolierten DNA wurde durch Fluoreszenz-Intensitätsvergleich mit dem Größenstandard nach Agarosegelelektrophorese oder photometrisch mit dem Biophotometer bestimmt. Jedes in dieser Arbeit klonierte oder mutagenisierte Plasmid wurde mittels Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft. Die Sequenzierung wurde von der Firma SEQ-IT GmbH & Co. KG in Kaiserslautern durchgeführt. Hierfür wurde die DNA zu 100 ng/µl in 5 µl in einem Reaktionsgefäß verdünnt, mit 1 µl passendem Sequenzierprimer versetzt und dem Sequenzierservice überlassen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Chromas und Clustal Omega.

3.2.9 Gezielte Mutagenese

Die gezielte Mutagenese ermöglicht eine spezifische Veränderung der Basensequenz der DNA. Auf diese Weise können einzelne, aber auch mehrere Nukleotide geändert, deletiert aber auch inseriert werden (Zheng *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde die gezielte Mutagenese vor allem angewandt, um putative Clusterliganden von Aim32, Apd1 und TcAAH zu mutieren. Eine weitere Anwendung fand sich in der Kürzung der Proteine Aim32 (N-terminal) und Apd1 (C-terminal) über Mutation des Start ATG's resp. Insertion eines Stopp-Kodons. Als Template diente ein Plasmid, das das zu mutierende Gen enthielt. Diese Methode basiert auf zwei aufeinander folgenden PCR's. Tabelle 3-6 gibt das Pipettierschema wieder. Es wurden neben den Ansätzen A und B, die Primer enthielten, auch ein Ansatz C ohne Primer als Kontrolle, zur Überprüfung der Effizienz des *DpnI*-Verdau, mitgeführt.

Tabelle 3-6: Pipettierschema für den PCR-Ansatz der Mutagenese.

| Ansatz | A | B | C |
|---|--------------|--------------|--------------|
| H ₂ O _{dd} (autoklaviert) | 35 µl | 35 µl | 37,5 µl |
| HF-Puffer | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| Forward Primer | 2,5 µl | - | - |
| Reverse Primer | - | 2,5 µl | - |
| Plasmid (10-fach verd.) | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| dNTP | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Phusion Polymerase | 0,5 µl | 0,5 µl | 0,5 µl |
| ΣPCR-Ansatz | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

In der ersten PCR wurden zunächst zwei Einzelstränge durch komplementäre Primer, die die Mutation enthielten, nach folgendem Programm amplifiziert:

Tabelle 3-7: Programm der ersten PCR für die Mutagenese.

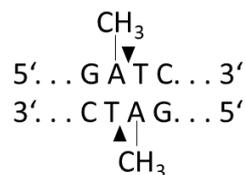
| | | |
|----------|----------|--------------|
| 1 Zyklus | 98 °C | 30 sec |
| 8 Zyklen | 98 °C | 15 sec |
| | 55-60 °C | 30 sec |
| 1 Zyklus | 72 °C | 3 min 30 sec |

Anschließend wurden 25 µl Ansatz A und 25 µl von Ansatz B gemischt und 0,5 µl Polymerase zugefügt, um aus den zwei Einzelsträngen Doppelstränge in einer zweiten PCR zu bilden.

Tabelle 3-8: Programm der zweiten PCR für die Mutagenese.

| | | |
|-----------|----------|--------------|
| 1 Zyklus | 98 °C | 30 sec |
| | 98 °C | 15 sec |
| 18 Zyklen | 55-60 °C | 30 sec |
| | 72 °C | 3 min 30 sec |
| 1 Zyklus | 72 °C | 10 min |

Um nicht mutierte Template-DNA zu entfernen, erfolgte im Anschluss ein Restriktionsverdau mit 2 µl *DpnI* bei 37 °C für 1 h. *DpnI* schneidet spezifisch methylierte DNA und somit nur das in *E. coli in vivo* erzeugte und somit methylierte Template und nicht das unmethylierte PCR-Produkt (Abb. 3-1).

**Abbildung 3-1: Schnittstelle von *DpnI*.**

Im Anschluss erfolgte die *DpnI*-Inaktivierung (80°C, 20 min) und Aufreinigung der DNA (Kap. 3.2.3) und die Transformation in *E. coli* (Kap. 3.2.6). Nach erfolgreicher Transformation konnte das mutierte Plasmid isoliert werden (Kap. 3.2.8). Im Anschluss der DNA-Isolation erfolgte die Charakterisierung des Plasmids falls möglich mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese, da in manchen Fällen eine stille Mutation, die eine Restriktionsschnittstelle enthielt, eingebracht wurde. Ansonsten erfolgte die Analyse nur durch Sequenzierung und vorherige photometrische Konzentrationsbestimmung.

3.2.10 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur schnellen Überprüfung einer Klonierung oder homologen Rekombination, ohne vorherige Isolation der DNA, angewendet. Auf diese Weise war es möglich eine hohe Anzahl von Klonen in kurzer Zeit auf das gewünschte Gen zu untersuchen. Zur Analyse wurden eine kleine Menge *E. coli*- oder Hefezellen mittels einer Pipettenspitze in 36 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ suspendiert und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Die freigesetzte DNA kann als Template in der PCR (Tab. 3-9 und 3-5) fungieren. Mittels passender Primer bei der PCR, kann der analysierte Klon durch Agarosegelelektrophorese auf seine Richtigkeit überprüft werden.

Tabelle 3-9: Pipettierschema der Kolonie-PCR.

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| 36 μl | Zellsuspension |
| 2,5 μl | 10 μM Vorwärtsprimer |
| 2,5 μl | 10 μM Rückwärtsprimer |
| 5 μl | Thermopol (10fach) |
| 1 μl | dNTPs |
| 2,5 μl | Dimethylsulfoxid (DMSO) optional |
| 0,5 μl | Taq-Polymerase |
| 50 μl | Σ PCR-Ansatz |

3.2.11 Transformation von *S. cerevisiae* und homologe Rekombination

S. cerevisiae muss ebenso wie *E. coli* auf die Transformation von extrazellulärer DNA vorbereitet werden. Die Kompetenz der Zellen wurde durch die Methode nach Ito *et al.* gewährleistet (Ito *et al.*, 1983). In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um DNA-Abschnitte in das Genom zu integrieren oder Plasmide einzuführen.

| Lithiumacetat-Lösung | |
|------------------------------|------------|
| Lithiumacetat-Dihydrat | 100 mM |
| Tris-HCl (pH = 7,5) | 10 mM |
| EDTA (pH = 8,0) | 1 mM |
| sterilfiltriert | |
| PEG-Lösung | |
| Polyethylenglykol (PEG) 4000 | 40 % (w/v) |
| in Lithiumacetatpuffer | |
| sterilfiltriert | |

Zu Beginn der Transformation wurden vormittags 50 ml YP-Medium mit geeigneter Kohlenstoffquelle mit einer Vorkultur des entsprechenden Hefestammes inokuliert,

sodass eine OD_{600} von 0,2–0,3 (Genesys 10UV scanning) eingestellt wurde. Eine Inkubation im Schüttelinkubator wurde so lange bei 30 °C und 150 rpm durchgeführt, bis die OD_{600} zwischen 0,8 und 1,2 betrug. Die Zellen wurden bei 3500 rpm und RT für 5 min (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R, Rotor A-4-62) geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml H_2O_{dd} gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml Lithiumacetatpuffer resuspendiert und nach Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert (7000 rpm, 2 min, Sigma 1-16). Anschließend wurde das Pellet erneut in 0,8–1,2 ml Lithiumacetatpuffer, entsprechend der OD_{600} der Kultur, aufgenommen. Die so vorbereiteten Zellen wurden zu 100 μ l aliquotiert. Zu den Zellen wurden 2,5 μ l Lachssperma-DNA (10 mg/ml in H_2O_{dd}), welche im Vorfeld 5 min bei 95 °C denaturiert wurde, 5 μ g DNA für die homologe Rekombination oder für die Transformation von Plasmiden 1,5 μ l 1:10 verdünnte DNA (0,8–1,2 μ g), sowie 700 μ l PEG-Lösung pipettiert. Nach kurzem Mischen erfolgte die Inkubation der Transformationsansätze bei 30 °C und 550 rpm für 30 min. Der Hitzeschock wurde unter Schütteln (550 rpm) bei 42 °C für 15 min (Plasmidtransformation) oder 45 min (homologe Rekombination) durchgeführt. Im Falle der homologen Rekombination kam nach dem Hitzeschock eine Erholungsphase, in der die Zellen nach Zentrifugation in 1 ml YP-Medium aufgenommen und 3 h bei 30 °C und 550 rpm inkubiert wurden. Die Zellen wurden nach erfolgter Transformation pelletiert (2300 g, 3 min Sigma 1-16) und zweimal in 1 ml H_2O_{dd} gewaschen, zentrifugiert und in 200 μ l H_2O_{dd} resuspendiert und auf geeigneten Agarplatten (Voll- oder Minimalmedium) mit entsprechenden Selektionsdruck ausgestrichen. Nach 2-4 Tagen bei 30 °C konnten die Platten dem Brutschrank entnommen und einzelne Kolonien auf eine frische Platte überimpft werden.

3.2.12 gDNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

| Sorbitolpuffer | |
|--|-------------|
| Sorbitol | 0,9 M |
| EDTA (pH = 8,0) | 0,1 M |
| 10 mM KP_i (pH = 7,4; Vorbereitet durch 4:1 Mischung von 1 M K_2HPO_4 und 1 M KH_2PO_4) | |
| Kaliumacetatlösung | |
| Kaliumacetat | 5 M |
| ETS | |
| EDTA (pH = 8,0) | 280 mM |
| Tris (pH = 8,0) | 220 mM |
| SDS | 2,2 % (w/v) |

Methoden

TE-Puffer

| | |
|-----------------|-------|
| Tris (pH = 8,0) | 10 mM |
| EDTA (pH = 8,0) | 1 mM |

Nachdem eine 10 ml Vorkultur des Hefestammes bei 3500 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R, Rotor A-4-62) und RT für 3 min abzentrifugiert wurde, wurde das Pellet in 5 ml H₂O_{dd} gewaschen und erneut für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 900 µl Sorbitolpuffer resuspendiert und die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 100 µl Zymolyase 20 T (2 mg/ml) und 1 µl β-Mercaptoethanol wurde das Gemisch für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor für 30 sec bei 3000 rpm (ab jetzt immer VWR Micro Star 17) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 400 µl TE-Puffer aufgenommen und nachdem 30 µl ETS hinzugefügt und invertiert wurde, erfolgte für 30 min eine Inkubation bei 60 °C. Nach Zugabe von 80 µl Kaliumacetatlösung wurde das Gemisch für 1 h auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurde bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein steriles 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml kaltem, unvergälltem Ethanol (100 %) versetzt. Nach Invertieren und erneuter Zentrifugation (s. o.) wurde der Überstand verworfen und die gefällte DNA mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen. Nach Zentrifugation wie zuvor wurde die DNA im offenen Reaktionsgefäß für 1 h in der Sterilbank getrocknet. Das Lösen der DNA erfolgte über 2 Tage bei 4 °C in TE-Puffer. Die in der Lösung enthaltene RNA wurde mittels einer durch Hitze DNase-inaktiven RNase entfernt, indem die Probe, nachdem sich die DNA im TE-Puffer gelöst hat, mit 4 µl RNase (1 mg/ml) versetzt und bei 37 °C für 2 h inkubiert wurde.

3.2.13 Zellextraktpräparation von *S. cerevisiae*

Um die in Hefezellen exprimierten Proteine näher untersuchen zu können, ist es notwendig, diese von den Zelltrümmern, welche nach dem Aufschluss der Zellen entstehen, zu trennen. Die Zellextrakte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind durch den Aufschluss mit Glasperlen (Pierik *et al.*, 2009) erhalten worden.

TNETG-Puffer

| | |
|-----------------|-------------|
| Tris (pH = 7,4) | 10 mM |
| EDTA | 2,5 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Glycerin | 10 % (v/v) |
| Triton X-100 | 0,5 % (v/v) |

Für die Zellextraktpräparation wurden je 0,5 g Zellen benötigt. Dafür wurden eine 100 ml-Kultur mit gerade dem Volumen einer Vorkultur inokuliert, dass diese eine OD₆₀₀ von 0,1 erreichte. Nach Kultivierung über Nacht wurden die Zellen bei 3500 rpm und RT

für 3 min geerntet (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R, Rotor A-4-62), in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen und nach erneuter Zentrifugation wurde das Nassgewicht der Zellen bestimmt. Nach Resuspendieren des Zellpellets in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, wurde in ein 15 ml-Falcon so viel der Zellsuspension überführt, dass nach einem letzten Zentrifugationsschritt Zellen 0,5 g Zellen vorlagen. Nach erneuter Zentrifugation war es möglich die Zellen direkt aufzuschließen oder in flüssigem Stickstoff schockzufrieren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ zu lagern.

Für den Aufschluss wurden 0,5 g Zellen in 500 μl eisgekühltem TNETG-Puffer resuspendiert. Die Mischung wurde mit 10 μl PMSF (200 mM, in unvergälltem EtOH) und mit einer im Eppendorf-Reaktionsgefäß abgemessenen Portion Glasperlen (1 ml) versetzt. Im Anschluss erfolgte der Aufschluss durch 1-minütiges vortexen des Falcons auf dem Kopf mit anschließender Kühlung auf Eis für 1 min. Dieser Vorgang wiederholte sich für jedes Aliquot dreimal. Um das Zelllysat von Zelltrümmern, Glasperlen und nicht aufgeschlossenen Zellen zu trennen, wurde 5 min bei 3500 rpm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R, Rotor A-4-62) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut für 10 min bei 13000 rpm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ (VWR Galaxy 16DH) zentrifugiert.

Die Konzentration des Gesamtproteins des Aliquots wurde mittels Micro-Biuret-Assay (Kap. 3.3.2) ermittelt.

3.2.14 TCA-Präzipitation

Die Trichloressigsäure-(TCA)-Präzipitation stellt in dieser Arbeit die Methode der Wahl da, um die verwendeten Proteinproben vor Durchführung eines Western Blots, falls nötig, aufzukonzentrieren und Verunreinigungen zu entfernen. Durch Zugabe von TCA werden die Proteine aus der Lösung gefällt und können so nach Zentrifugation in einem gewählten Volumen wieder gelöst werden.

Zur Fällung wurde eine definierte Proteinmenge mit jenem Volumen TCA (50 % (w/v)) und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gemischt, dass die TCA-Konzentration 25 % betrug. Die Proben wurden durch invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Präzipitate wurden mittels 10-minütiger Zentrifugation (VWR Micro Star 17 R) bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 12000 g pelletiert und zwei Mal mit je 500 μl Aceton durch vortexen gewaschen. Zwischen den Waschsritten wird, wie zuvor, für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden nach der Trocknung (ca. 30 min, RT) in der gewünschten Menge 1 x Probenpuffer aufgenommen und für 5-10 min bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ denaturiert. Bis zur SDS-PAGE wurden die Proben bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2.15 Präparation von Mitochondrien aus Hefe

Für Lokalisationsstudien wurden in dieser Arbeit Mitochondrien nach Diekert *et al.*, (2001) isoliert.

| Tris-SO₄-Puffer | |
|--|----------------|
| Tris (pH = 9,4, mit H ₂ SO ₄ titriert) | 100 mM |
| DTT (frisch) | 10 mM |
| Sorbitolpuffer | |
| Sorbitol | 1,2 M |
| KPi (pH = 7,4) | 20 mM |
| 2 x Breaking-Puffer (BB) | |
| Sorbitol | 1,2M |
| HEPES (pH = 7,4, mit KOH titriert) | 40 mM |
| PMSF | 1 mM |
| SH-Puffer | |
| Sorbitol | 0,6 M |
| HEPES (pH = 7,4, mit KOH titriert) | 20 mM |
| PMSF | 200 mM in EtOH |

Um eine gute Ausbildung der Mitochondrien zu gewährleisten, wurde Galaktose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Um eine ausreichende Menge an Zellen (ca. 10 g) zur Isolierung zur Verfügung zu haben, wurden zwei aufeinanderfolgende Vorkulturen herangezogen. Als Startkultur diente eine 20 ml Kleinkultur. Am nächsten Tag wurde daraus eine 150 ml Kultur mit OD₆₀₀ = 0,1 (Genesys 10UV scanning) inokuliert. Zur Isolation von Mitochondrien wurden Hefezellen in einem 2 l-Maßstab mit einer Start OD₆₀₀ von 0,05 über Nacht bis zur OD₆₀₀ = 1–1,5 kultiviert. Der folgende Ablauf beschreibt die Puffermengen für eine Isolation von Mitochondrien aus 10 g nassen Hefezellen, welche aus einer 2 l-Kultur mit obiger OD₆₀₀ erhalten werden können.

Die Hefezellen wurden am nächsten Morgen geerntet (6000 g, 7 min, 4 °C, Avanti J-26S XP, Rotor JLA-8.1000). Das erhaltene Zellpellet wurde nun in 200 ml H₂O_{dd} aufgenommen und erneut nach obigen Bedingungen pelletiert. Nachdem das Nassgewicht der Zellen bestimmt wurde, wurde das Pellet in Tris-SO₄-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation (30 °C, 30 min, 150 rpm) wurde erneut pelletiert (1600 g, 10 min, RT, Beckman Model J2-21 Rotor JA-20). Nach einem Waschschrift mit Sorbitolpuffer (40 ml) und erneuter Zentrifugation (7 min bei RT und 1600 g; Eppendorf 5810 R, Rotor A-4-62) wurden die Hefezellen an diesem Punkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

Zur Bildung von Spheroplasten wurde Zymolyase 20T (4 mg/g Zellen) zu den aufgetauten und in Sorbitolpuffer (40 ml) resuspendierten Hefezellen gegeben. Nach Inkubation (30 °C, 1 h) unter Schütteln (150 rpm), wurden die Zellen erneut pelletiert (1600 g,

10 min, 2 °C, Beckman Model J2-21, Rotor JA-20). Von nun an wurde auf Eis und mit vorgekühlten Puffern gearbeitet. Die Spheroplasten wurden vorsichtig mit einem Gummiwischer in Sorbitolpuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und im Anschluss vorsichtig in 30 ml 2 x BB aufgenommen. Das Gesamtvolumen wurde in einem Messzylinder mit H₂O_{dd}, welches mit 1 mM PMSF versetzt war, auf 60 ml eingestellt. Der Aufschluss erfolgte mittels Dounce Homogenisierung. Hierzu erfolgten 20 Streiche mit einem Pistel der Größe L und drei mit einem der Größe S. Eine 500 µl Probe dieses Gemisches diente als Gesamtzellextrakt (Total, T) für spätere Experimente. Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert (2000 g, 5 min, 2 °C, Beckman Model J2-21, Rotor JA-25.50), der Überstand danach in ein neues Gefäß überführt und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die Separation der löslichen Bestandteile der Suspension und der Mitochondrien erfolgte durch eine Zentrifugation bei höherer Geschwindigkeit (12000 g, 5 min, 2 °C, Beckman Model J2-21, Rotor JA-25.50). Der Überstand stellt die cytosolische Fraktion (*Post mitochondrial supernatant*, PMS) dar. Zur weiteren Reinigung wurde das Mitochondrien-haltige Pellet vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 1 ml SH-Puffer aufgenommen. Das Gesamtvolumen wurde zur Zentrifugation auf ca. 30 ml erhöht. Zunächst wurde bei niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert (2000 g, 5 min, 2 °C, Beckman Model J2-21, Rotor JA-25.50). Nach Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit (12000 g, 5 min, 2 °C, Beckman Model J2-21, Rotor JA-25.50) pelletiert. Sie wurden vorsichtig in 500 µl SH-Puffer aufgenommen, aliquotiert und zur Lagerung bei -80 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bestimmungen der Proteinkonzentration wurden mittels Bradford-Assay durchgeführt. Zur weiteren Analyse mittels Western-Blot und anschließender Immundetektion wurden 100 µg jeder Fraktion mit TCA gemäß Kapitel 3.2.14 präzipitiert. Die Präzipitate wurden in 45 µl 1 x Probenpuffer (Menge für zwei SDS-Gele) resuspendiert.

3.2.16 Natriumcarbonat-Extraktion

Die Extraktion mittels Na₂CO₃ ist eine Methode zur Lokalisierung von mitochondrialen Proteinen in den Subkompartimenten der Mitochondrien. Die Behandlung mit hoher Salz- und Alkalikonzentration wird zur Bestimmung der Proteine der mitochondrialen Membranen genutzt (Kim *et al.*, 2015).

Mitochondrien wurden nach Kapitel 3.2.15 isoliert. 100 µg Mitochondrien wurden mit 200 µl 0,1 M Na₂CO₃ und 2 mM PMSF 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 30000 rpm (Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor SW 60 Ti) und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig entnommen, das Pellet mit 0,1 M Na₂CO₃ gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Zur weiteren Analyse mittels Western Blot wurden die so erhaltenen Fraktionen weiter vorbereitet: Der erste Überstand wird mittels TCA-Fällung (s. Kap 3.2.14) aufkonzentriert und danach wie das

Pellet in 45 μ l 1x Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die weitere Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot.

3.2.17 Schwellen von Mitochondrien

Eine weitere Methode zur Subfraktionierung von Mitochondrien stellt das hypotonische Schwellen mit anschließender Proteinase Behandlung der Mitochondrien dar. Durch die Inkubation der Mitochondrien in hypotonischem Puffer bilden sich Mitoplasten, Mitochondrien, denen die äußere Membran fehlt. Durch den Vergleich der Markerproteine in den unterschiedlich behandelten Proben mit dem Protein von Interesse, lassen sich Rückschlüsse auf dessen Lokalisierung innerhalb der Mitochondrien ziehen.

| SH-Puffer | |
|------------------------------------|-------|
| Sorbitol | 0,6 M |
| HEPES (pH = 7,4, mit KOH titriert) | 20 mM |

Zur Vorbereitung des Assays wurden Mitochondrien im 5-fachen Volumen eiskaltem SH-Puffer vorsichtig resuspendiert und bei 12000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (VWR Micro Star 17). Der Überstand wurde verworfen und die Mitochondrien in SH-Puffer zu einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml aufgenommen und die Proben gemäß Tabelle 3-10 gemischt. Nach 30 min auf Eis wurden die Proben mit 2 mM PMSF versetzt und 10 min zentrifugiert (12000 g, 4 °C, VWR Micro Star 17). Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und verworfen. Das Pellet wurde in 45 μ l 1x Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

Tabelle 3-10: Pipettierschema hypotonisches Schwellen von Mitochondrien nach Boldough & Pon, 2007. Menge für zwei SDS-PAGE-Gele.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Mitochondrien (10 mg/ml) | 10 μ l |
| SH-Puffer | 90 μ l | 90 μ l | | | 90 μ l | 90 μ l |
| HEPES-KOH (20 mM, pH 7,4) | | | 90 μ l | 90 μ l | | |
| Triton X-100 (10 % v/v) | | | | | 2 μ l | 2 μ l |
| Proteinase K (10 mg/ml) | | 2 μ l | | 2 μ l | | 2 μ l |

3.2.18 Digitonin Behandlung von Mitochondrien

Digitonin öffnet bei geringer Konzentration die äußere mitochondriale Membran. Erhöht man aber sukzessive die Konzentration, wird auch die innere Membran lysiert. Diese Tatsache unterscheidet diese Behandlung vom hypotonischen Schwellen.

Methoden

| SH-Puffer | |
|------------------------------------|-------|
| Sorbitol | 0,6 M |
| HEPES (pH = 7,4, mit KOH titriert) | 20 mM |

Um für alle Experimente gleiche Ausgangsbedingungen zu generieren, wurden die Mitochondrien (s. Kap 3.2.15) im Vorfeld im 5-fachen Volumen SH-Puffer verdünnt und nach erfolgter Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4 °C (VWR Micro Star 17) zu 10 mg/ml (Proteinkonzentration) mit SH-Puffer eingestellt. Die einzelnen Proben wurden analog Tabelle 3-11 vorbereitet und für 3 min auf Eis inkubiert, um die Membranen zu öffnen. Im Folgenden wurden die Proben 2–9 mit 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und weitere 30 min auf Eis, zum Verdau der Proteine, inkubiert. Nach Zugabe von PMSF (2 mM Endkonzentration, in EtOH) wurden alle Proben bei 20000 g für 10 min bei 4 °C (VWR Micro Star 17) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und verworfen. Das Pellet wurde in 45 µl 1 x Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

Tabelle 3-11: Pipettierschema Digitonin-Behandlung. Menge für zwei SDS-PAGE-Gele.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| SH-Puffer | 88,0 µl | 88,0 µl | 87,0 µl | 86,5 µl | 86,0 µl | 85,5 µl | 85,0 µl | 84,5 µl | 84,0 µl |
| 2 % Digitonin | - | - | 1,0 µl | 1,5 µl | 2,0 µl | 2,5 µl | 3,0 µl | 3,5 µl | 4,0 µl |
| Mitochondrien (10 mg/ml) | 12,0 µl |

3.2.19 Tüpfeltest

In dieser Arbeit wurde der Tüpfeltest zur Darstellung phänotypischer Wachstumsdefizite der zu untersuchenden Hefestämme unter verschiedenen Wachstumsbedingungen verwendet. Eine in geeignetem Medium kultivierte Übernachtskultur, der zuvor mit einem Plasmid transformierten Stämme wurde gewaschen, wieder in H₂O_{dd} resuspendiert und entweder direkt im Tüpfeltest eingesetzt oder unter regulierenden Bedingungen, z. B. durch die Wahl der Kohlenstoffquelle bei Gal-Stämmen, weiter kultiviert. In diesem Fall wurden die Zellen nach 16 h bei 3500 rpm und RT für 3 min geerntet (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R, Rotor A-4-62), in H₂O_{dd} gewaschen und auf OD₆₀₀ = 0,5 (Genesys 10UV scanning) mit sterilem H₂O_{dd} verdünnt. In einer sterilen 96-Well-Platte wurden vier serielle Verdünnungen der Hefezellen angefertigt. Hierfür wurde in die Spalten zwei bis fünf je 90 µl H₂O_{dd} vorgelegt. In Spalte eins wurden 100 µl der Zellsuspension pipettiert und von da an von Spalte zu Spalte verdünnt (s. Abb. 3-2). Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden die einzelnen Reihen auf eine Agarplatte mit oder ohne regulierende Substanz/Kohlenstoffquelle aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2–3 Tage. Die Ergebnisse wurden mittels Photographie dokumentiert.

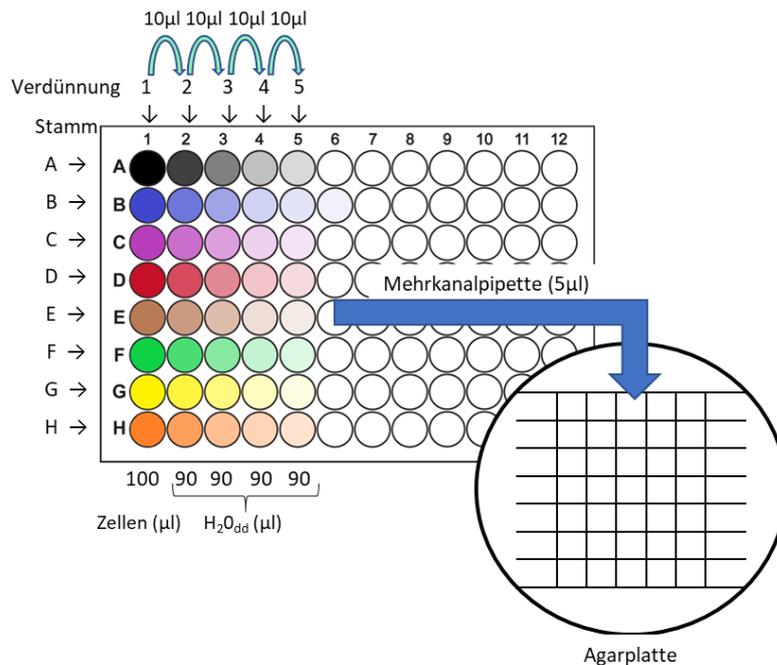


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung Tüpfeltest. In einer sterilen 96-Wellplatte wurden die zu untersuchenden Stämme seriell 1:10 verdünnt und mittels einer Mehrkanalpipette auf eine Agarplatte mit der niedrigsten Verdünnung rechts beginnend von rechts nach links aufgetragen.

3.3 Qualitative und quantitative Analysemethoden

3.3.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde im Zuge dieser Arbeit als Analysemethode für gereinigte Fe/S-Proteine eingesetzt, da Fe/S-Cluster in diesem Messbereich ein charakteristisches Absorptionsspektrum aufweisen. Zur Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums wurden die gereinigten Proteine (s. 3.4.3) entweder pur oder bis zu 1:50 in entsprechenden Puffer verdünnt, je nach Konzentration der Probe, in eine UV-Küvette gefüllt. Das Absorptionsspektrum wurde zwischen einer Wellenlänge von 250-600 nm aufgezeichnet. Als Blank wurde immer der Puffer verwendet, indem die Proteine vorlagen.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-Biuret-Assay

Die Proteinbestimmung mittels Micro-Biuret-Assay basiert auf der Eigenschaft von Proteinen mit Cu^{2+} -Ionen blaue bis tiefviolette Komplexe im alkalischen Milieu zu formen. Der Komplex bildet sich zwischen Cu^{2+} und vier Stickstoffatomen der Peptidbindungen. Die Methode wurde erstmals 1953 publiziert (Goa, 1953).

| | |
|---------------------|-----------|
| BSA-Standard | 2 mg/ml |
| DOC-Lösung | 1,5 mg/ml |

Methoden

| | |
|---------------------------------|----------|
| TCA-Lösung | 0,7 g/ml |
| NaOH-Lösung | 30 g/l |
| Micro-Biuret-Reagenz | |
| Trinatriumcitrat-Dihydrat | 0,59 M |
| Na ₂ CO ₃ | 0,94 M |
| CuSO ₄ | 70 mM |

Im ersten Schritt wurde eine Konzentrationsreihe des BSA-Standards und des zu analysierenden Proteins pipettiert. Die Konzentration der BSA-Lösung wurde mittels Messung der Absorption bei 280 nm und Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten eingestellt.

Tabelle 3-12: Pipettierschema der Verdünnungsreihe des Micro-Biuret-Assay.

| Protein (µl) | BSA-Standard (2 mg/ml) | | | | | | | Proteinprobe | | |
|-------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|-----|-----|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | 10 | 20 | 30 |
| H ₂ O _{dd} (µl) | 1000 | 950 | 900 | 850 | 800 | 750 | 700 | 990 | 980 | 970 |

Zu den verschiedenen Verdünnungen wurden je 100 µl DOC-Lösung pipettiert. Nach Mischen durch Invertieren wurde für 5 min bei RT inkubiert. Zu diesem Gemisch wurden je 100 µl TCA-Lösung gegeben. Nach Invertieren wurde für 10 min bei 13000 g (VWR Micro Star 17) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entnommen und das Proteinpräzipitat in je 950 µl NaOH-Lösung durch Vortexen gelöst. Nach Zugabe von je 50 µl Micro-Biuret-Reagenz wurde 15 min in der Dunkelheit inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei 545 nm gegen H₂O_{dd} gemessen.

Um aus den gemessenen Absorptionen die Proteinkonzentration ermitteln zu können, musste zunächst die Kalibriergerade des BSA-Standards ermittelt werden. Nach Berechnung der Menge an BSA je Probe konnte diese gegen die gemessene Absorption aufgetragen werden und durch eine Trendlinie wurde eine Geradengleichung ermittelt. Die Proteinkonzentration in mg/ml kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$c_{Protein} \left(\frac{mg}{ml} \right) = f \times \left(10^3 \times \frac{A_{Protein} - b}{a \times V_{Protein}} \right)$$

Mit f : Verdünnungsfaktor

$A_{Protein}$: Absorption der Proteinprobe bei 545 nm

a : Steigung der Trendlinie

b : Ordinatenabschnitt

$V_{Protein}$: Pipettiertes Volumen der Proteinprobe in µl

Aus den ermittelten Proteinkonzentrationen wurde das arithmetische Mittel gebildet.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Ein weiteres Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen stellt die Methode nach Bradford dar (Bradford, 1976). Ein großer Vorteil dieses Tests ist seine hohe Empfindlichkeit. Somit wurde in dieser Arbeit die Konzentration von Proben mit niedrigem Proteingehalt oder Volumen durch diese Methode bestimmt.

Tabelle 3-13: Pipettierschema der Verdünnungsreihe des Bradford-Assay.

| Protein (μl) | BSA-Standard (0,1 mg/ml) | | | | | | | | Proteinprobe | | |
|--|--------------------------|----|----|----|----|----|-----|------|--------------|------|--|
| | 0 | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (μl) | 100 | 90 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 | 99,0 | 97,5 | 95,0 | |

Jede Verdünnung der Tabelle 3-13 wurde mit 900 μl Bradford-Reagenz versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei 595 nm gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gemessen. Die Kalkulation der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methodik des Micro-Biuret-Assay.

3.3.4 Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts

Zur Analyse von Fe/S-Clustern in gereinigten Proteinen ist es vonnöten die Menge an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel der Probe zu erfassen. Mit den folgenden Methoden ist es möglich, den Gehalt an Eisen und Schwefel, nicht jedoch Schwefel der schwefelhaltigen Aminosäuren, zu bestimmen.

Bestimmung des Eisengehaltes

In der Bestimmung nach Lovenberg *et al.* (1963) wird ausschließlich der Gehalt von nicht-Häm-Eisen, sondern nur jener des Fe/S-Clusters, detektiert. Die Methode beruht auf der Eigenschaft des Eisens nach Freisetzung aus dem Protein im Oxidationszustand Fe^{2+} einen farbigen Komplex mit dem Chelator Feren zu bilden. Die Konzentration des blauen Komplexes kann bei 593 nm photometrisch bestimmt werden. Die ermittelten Eisengehalte dieses Assays sind wie beim Micro-Biuret-Assay keine absoluten Werte, sondern sind auf einen Eisenstandard bezogen. Als Eisenstandard wurde in dieser Arbeit Mohrsches Salz (0,2 mM) verwendet.

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Mohrsches Salz | 0,19–2,1 mM |
| HCl-Lösung | 1 % (v/v) |
| Ammoniumacetatlösung | 7,5 % (w/v) |
| Ascorbinsäurelösung | 4 % (w/v) |
| SDS-Lösung | 2,5 % (w/v) |
| Ferenlösung | 1,5 % (w/v) |

Im ersten Schritt wird eine Konzentrationsreihe des Eisenstandards und des zu analysierenden Proteins analog Tabelle 3-14 pipettiert.

Tabelle 3-14: Pipettierschema der Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Eisengehaltes.

| | Eisenstandard (0,2 mM) | | | | | | | Proteinprobe | | |
|--|------------------------|----|----|----|----|----|-----|--------------|----|----|
| Reagenz (μl) | 0 | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 10 | 20 | 30 |
| H ₂ O _{dd} (μl) | 100 | 90 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 | 90 | 80 | 70 |

Nach Zugabe je von 100 μl HCl-Lösung wurde gemischt und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Reaktionsgefäße, wurden je 500 μl Ammoniumacetatlösung hinzugefügt, durch Vortexen vermischt und je 100 μl frisch angesetzte Ascorbinsäurelösung dazu pipettiert. Im Anschluss wurde gevortext, je 100 μl SDS- und Ferenlösung zugefügt und 7 min bei 13000 rpm (VWR Micro Star 17) zentrifugiert, um mögliche Präzipitate zu pelletieren. Der Überstand wurde vorsichtig in eine Küvette überführt und die Absorption bei 593 nm gegen H₂O vermessen. Auch hier wurden zur Bildung des arithmetischen Mittels die gemessenen Eisenkonzentrationen der drei Proteinproben verwendet.

Der Gehalt an Eisen c_{Fe} kann mittels folgender Formel ermittelt werden, nachdem die Steigung und der Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden ermittelt wurde:

$$c_{Fe} (\mu\text{M}) = 10^3 \times \frac{A_{Protein} - b}{a \times V_{Protein}}$$

Mit $A_{Protein}$: Absorption der Proteinprobe bei 593 nm

a : Steigung der Ausgleichsgeraden

b : Ordinatenabschnitt

$V_{Protein}$: Pipettiertes Volumen der Proteinprobe in μl

Um nun Aussagen über die Stöchiometrie des Clusters treffen zu können, muss bekannt sein, wieviel Eisen pro Proteinmolekül gebunden ist. Dies kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Anzahl Eisen pro Protein} = \frac{c_{Fe} (\mu\text{M})}{c_{Protein} (\mu\text{M})}$$

Mit: $c_{Fe} (\mu\text{M})$: Konzentration an Eisen in $\mu\text{mol/l}$

$c_{Protein} (\mu\text{M})$: Proteinkonzentration in $\mu\text{mol/l}$

Bestimmung des säurelabilen Schwefelgehaltes

Zur Bestimmung des säurelabilen Schwefelgehaltes einer Proteinprobe wurde in dieser Arbeit die Methode nach Fogo & Popowsky, 1949 angewendet. Hier wird nicht der Gesamt-schwefelgehalt des Proteins, der auch den Schwefel der Aminosäuren Methionin und Cystein inkludieren würde, ermittelt, sondern nur jener im Fe/S-Cluster enthaltene. Hierfür wurde er zunächst durch die Zugabe von Zinkacetat und Natriumhydroxid als S^{2-} -Ionen aus dem Protein gelöst und anschließend zu Schwefelwasserstoff umgewandelt. Jener kann unter sauren und oxidativen Bedingungen mit zwei DMPD-Molekülen zu dem Farbstoff Methylenblau umgesetzt werden. Die photometrische Quantifizierung des Farbstoffs erfolgt bei 670 nm. Als S^{2-} -Standard wurde mit Lithiumsulfid gearbeitet.

| | |
|--------------------------------------|---|
| Lithiumsulfid in NaOH (10 mM) | 20 mM |
| Zinkacetatstammlösung | 10 % (w/v) wird vor Gebrauch 1:10 verdünnt. |
| NaOH-Lösung | 7 % (w/v) |
| DMPD-Lösung in 5 M HCl | 0,1 % (w/v) |
| FeCl₃-Lösung | 10 mM |

Als Standard wurde Lithiumsulfid in 10 mM NaOH gelöst, sodass eine 20 mM Lösung entstand. Jene wurde vor Gebrauch nochmals 1:10 verdünnt. Von dieser Lösung, sowie von den Proteinproben, wurde eine Verdünnungsreihe nach Tabelle 3-15 erstellt.

Tabelle 3-15: Pipettierschema der Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Sulfidgehalts

| | Sulfidstandard (2 mM) | | | | | | Proteinprobe | | |
|-------------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|-----|-----|
| Reagenz (µl) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 10 | 20 | 30 |
| H ₂ O _{dd} (µl) | 200 | 195 | 190 | 185 | 180 | 175 | 190 | 180 | 170 |

Nach Zugabe von je 600 µl 1:10 verdünnter Zinkacetatstammlösung und je 50 µl NaOH-Lösung wurden die Verdünnungen durch Invertieren gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Das gebildete weiße Präzipitat wurde anschließend durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 s (VWR Micro Star 17) pelletiert. Durch langsames Hinzufügen von je 150 µl DMPD-Lösung und gleichzeitiges Rühren mit der Pipettenspitze während der Zugabe, wurde das Präzipitat wieder in Lösung gebracht. Das Reaktionsgefäß wurde direkt nach der Zugabe von je 150 µl FeCl₃-Lösung verschlossen, 30 s lang gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Um die Beeinflussung der Absorptionsmessung durch Schwebstoffe zu vermeiden, wurden die Proben vor der Messung zentrifugiert (13000 rpm, 7 min, VWR Micro Star 17). Die Absorption wurde bei 670 nm gegen H₂O_{dd} gemessen.

Der Gehalt an Sulfid in der Probe kann mittels folgender Formel ermittelt werden, nachdem die Absorptionen des Standards gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen wurden und die einzelnen Punkte durch eine Trendlinie verbunden wurden. Zur Ermittlung des Gehalts der Proben werden die Steigung und der Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden benötigt.

$$c_{S^{2-}} (\mu M) = 10^3 \times \frac{A_{Protein} - b}{a \times V_{Protein}}$$

Mit $A_{Protein}$: Absorption der Proteinprobe bei 670 nm

a : Steigung der Trendlinie

b : Ordinatenabschnitt

$V_{Protein}$: Pipettiertes Volumen der Proteinprobe in μl

Um nun Aussagen über die Stöchiometrie des Clusters treffen zu können muss bekannt sein wieviel Sulfid pro Proteinmolekül gebunden ist. Dies kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Anzahl Sulfid pro Protein} = \frac{c_{S^{2-}} (\mu M)}{c_{Protein} (\mu M)}$$

Mit: $c_{S^{2-}} (\mu M)$: Konzentration an Sulfid in $\mu mol/l$

$c_{Protein} (\mu M)$: Proteinkonzentration in $\mu mol/l$

3.3.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur qualitativen Analyse von Proteinen. Eine Variante stellt die diskontinuierliche SDS-PAGE dar. Hierbei unterscheiden sich Sammel- und Trenngel anhand ihrer Porengröße und ihres pH-Wertes. Zunächst wandern die Proteine durch das weitmaschigere, neutrale Sammelgel, bevor sie sich im basischen Trenngel durch die engeren Poren auftrennen. An der Front von Sammel- zu Trenngel konzentrieren sich die Proteine aufgrund des pH-Gradienten (Schägger & Jagow, 1987). Um die Proben auf die SDS-PAGE vorzubereiten, wurden sie mit Probenpuffer erhitzt und somit denaturiert. Das im Puffer enthaltene SDS lagert sich an die Seitenketten der Proteine an, so dass sie eine gleichmäßige negative Ladungsverteilung aufweisen. Durch Reduktionsmittel wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) werden Disulfidbrücken gespalten. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im angelegten elektrischen Feld ist somit von ihrer molekularen Größe abhängig (Laemmli, 1970).

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Acrylamid-/Polyacrylamidlösung | Rotiphorese Gel 30 (37.5:1) |
| APS-(Ammoniumpersulfat)-Lösung | 10 % (w/v) |

Methoden

| Trenngelpuffer | |
|---------------------------------------|--------------|
| Tris, pH 8,8 | 1,5 M |
| SDS | 13,9 mM |
| Sammelgelpuffer | |
| Tris, pH 6,8 | 0,5 M |
| SDS | 0,4 % |
| Probenpuffer (2x) | |
| Tris | 0,12 M |
| Glycerin | 20 % |
| SDS | 4 % (w/v) |
| pH = 6,8 | |
| DTT | 200 mM |
| Bromphenolblau | 0,02 % (w/v) |
| Elektrophoresepuffer (1x) | |
| Tris | 25 mM |
| SDS | 0,1 % |
| Glycin | 0,19 M |
| pH ≈ 8,3 | |
| Coomassie-Färbelösung | |
| Ethanol (vergällt) | 45 % (v/v) |
| Essigsäure | 10 % (v/v) |
| Coomassie Brilliant blue G250 | 0,25 % (w/v) |
| Coomassie-Entfärbelösung | |
| Ethanol (vergällt) | 30 % (v/v) |
| Essigsäure | 10 % (v/v) |
| Coomassie-Konservierungslösung | |
| Ethanol (vergällt) | 20 % (v/v) |
| Glycerin | 5 % (v/v) |

Tabelle 3-16: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel; Mengenangabe für 2 Gele.

| | Trenngel (12 %) | Sammelgel (4,5 %) |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------|
| H ₂ O _{dd} | 5,25 ml | 3,00 ml |
| Trenngelpuffer | 3,75 ml | - |
| Sammelgelpuffer | - | 1,25 ml |
| Acrylamidlösung | 6,00 ml | 0,75 ml |
| TEMED | 30 µl | 10 µl |
| APS-Lösung | 75 µl | 30 µl |

Zum Anfertigen des Gels wurde zunächst das Trenngel gemischt, gegossen und mit Ethanol überschichtet, um eine glatte obere Kante zu gewährleisten. Nach erfolgter

Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, die Gelkante mit H_2O_{dd} gespült und vorsichtig mit einem Filterpapier getrocknet. Danach wurde das Sammelgel darüber geschichtet. Beim Gießen der Gele wurde darauf geachtet, dass nach Insertion des Kammes 1 cm Sammelgel zwischen dem unterem Taschenende und dem Trenngel vorhanden war.

Die spezialisierten Probenvorbereitungen für die SDS-PAGE sind, abhängig von der Art der Probe, Kapitel 3.2.14 und 3.2.16–18 zu entnehmen. Typischerweise wurden die Proteinproben jedoch vor der Auftragung 1:2 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Um das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine abschätzen zu können, wurde ein Proteinmarker, mit unterschiedlichen Proteinen bekannter Massen, mitgeführt. Wurde das Gel weiter für einen Western Blot verwendet, wurde ein schon vorgefärbter Proteinmarker verwendet: Die Elektrophorese erfolgte bei 75 V, bis die blau gefärbte Lauffront das Trenngel erreichte, und im Anschluss bei 100 V. Nach erfolgter Elektrophorese ist es möglich, durch Färbung die einzelnen Proteinbanden sichtbar zu machen. In dieser Arbeit wurde zum einen Instant Blue verwendet. Gefärbt wurde 20-30 min auf einem Wippschüttler, bis die Banden gut sichtbar waren. Entfärbt wurde durch mehrmaliges Waschen des Gels mit H_2O_{dd} . Zum anderen wurde mit einer selbst hergestellten Coomassie-Färbelösung gearbeitet. Hierfür wurde das Gel auf einem Wippschüttler so lange in der Färbelösung inkubiert, bis es eine tief blaue Färbung angenommen hatte. Entfärbt wurde mittels Coomassie-Entfärbelösung. Bis zur Aufnahme des Fotos wurden die Gele in Coomassie-Konservierungslösung gelagert. Fotografiert wurde mit einem Geldokumentationssystem.

3.3.6 Western Blot und Immundetektion

Western Blot mit anschließender Immundetektion stellt in dieser Arbeit die Methode der Wahl zum spezifischen Nachweis von Proteinen in bestimmten Fraktionen dar. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 3.3.5 durchgeführt. Um Proteine durch Antikörper detektieren zu können, müssen die ersteren vom Gel der SDS-PAGE auf eine Membran, die für alle Blots dieser Arbeit aus Nitrocellulose besteht, übertragen werden. Es wurde ein Semi-Dry Blot durchgeführt. Das Milieu, welches die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran gewährleistet, wurde durch feuchte Filterpapiere bereitgestellt. Auf Grund ihrer negativen Ladung wandern die Proteine bei Stromfluss Richtung Anode und bleiben dabei durch hydrophobe Wechselwirkung an der Membran haften. Der eingesetzte Primärantikörper kann nun an dem auf der Membran haftenden Protein binden. Am ersten Antikörper bindet ein passender Sekundärantikörper, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Bildung von O_2 und 3-Aminophthalat im angeregten (Triplet-)Zustand aus H_2O_2 und 3-Aminophthalhydrazid (Luminol). Geht 3-Aminophthalat in den (Singulett-) Grundzustand über, wird die freiwerdende Energie in Form von Photonen abgegeben.

Methoden

| Blot-Puffer | |
|--|--------------|
| EtOH (mit Butanol vergällt) | 20 % (v/v) |
| SDS | 0,02 % (w/v) |
| Tris | 20 mM |
| Glycin | 150 mM |
| TBS (20 x) | |
| NaCl | 2,6 M |
| Tris | 0,4 mM |
| pH = 7,4 | |
| TBS-TWEEN | |
| TBS (20 x) | 5 % (v/v) |
| TWEEN 20 | 1,1 % (v/v) |
| Ponceau-S-Lösung | |
| Ponceau S | 3 mM |
| Methanol | 10 mM |
| Essigsäure | 17 mM |
| Blockierlösung | |
| Magermilchpulver in TBS-TWEEN | 5 % (w/v) |
| p-Cumarsäure | |
| p-Cumarsäure in DMSO | 1,1 mg/ml |
| Luminol | |
| Luminol in 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,6 | 0,25 mg/ml |

Die Probenvorbereitung ist den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen oder es wurden 20-50 µg Protein, bestimmt durch die Micro-Biuret- oder Bradford-Methode, auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

Vor der Durchführung wurden die Membran und das SDS-PAGE-Gel mindestens 10 min in Blot-Puffer äquilibriert. Auch die Saugpapiere (für Trans-Blot Turbo: je Schicht 2 x 1 mm und 1 x 0,4 mm) wurden schon vorher getränkt. Wurde das Puffersystem von Biorad verwendet, wurde das SDS-Gel vor dem Blot nicht in Blot-Puffer gelegt, sondern direkt nach der Elektrophorese auf die Membran gelegt.

Die konventionelle Semi-Dry-Apparatur wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf die Anodenplatte wurden vier getränkte Filterpapiere gelegt. Darauf folgten die Membran und das Gel, gefolgt von vier weiteren Filterpapieren. Die obere Kathodenplatte wurde durch ein Gewicht beschwert. Geblottet wurde bei konstanter Spannung mit 45 mA je Gel für 70 min. Wurde mit dem Trans-Blot-Turbo gearbeitet, wurden die Filterpapiere so gewählt, dass eine Schicht eine Dicke von 2,4 mm aufwies. Geblottet wurde für 30 min unter Verwendung des Trans-Blot-Turbo (Biorad) bei konstanten 25 V, wobei die Stromstärke bis zu 1 A angepasst wurde. Wenn kein vorgefärbter Marker benutzt wurde, wurde das Gel wenige Minuten mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, um die Banden des Markers sichtbar zu machen. Entfärbt wurde durch mehrmaliges Waschen mit

TBS-TWEEN. Um die Membran auf die Immundetektion vorzubereiten und um unspezifische Bindestellen der Membran abzusättigen, wurde über Nacht die Membran mit Blockierlösung bei 4 °C auf einem Wipp- oder Rollschüttler inkubiert. Sollten auf einer Membran mehrere Proteine gleichzeitig nachgewiesen werden, wurde nun anhand der Markerbanden die Membran durchgeschnitten. Wenn die Zielproteine zu nah beieinander lagen, wurden sie nacheinander detektiert. Um die Proteine durch Chemolumineszenz detektieren zu können, wurden die Membranen mit den Antikörperseren behandelt. Im ersten Schritt richtete sich dieses gegen das Zielprotein. Hierfür wird die Membran in 5-10 ml Primärantikörperserum (Verdünnung siehe Tabelle 2-13) für 2 h bei RT auf einem Wipp- oder Rollschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran fünfmal für 5 min mit ca. 10 ml TBS-TWEEN gewaschen. Die Inkubation des Zweitantikörpers (10 ml, Verdünnung siehe Tabelle 2-13) erfolgte für 1-2 h bei RT unter Schütteln. Im Anschluss wird fünfmal mit TBS-TWEEN für 5 min auf einem Wippschüttler gewaschen.

Zur Detektion der Chemolumineszenz wurden 100 µl *p*-Cumarsäure zu 900 µl Luminol gegeben. Direkt vor der Entwicklung wurden 2,5 µl H₂O₂ (30 %) dazugegeben und die Membran für 1 min in der Dunkelheit inkubiert. Alternativ wurde die ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) von Biorad verwendet. Nach Mischen von Lösung 1 und 2 (je 400 µl pro komplette Membran, bei Fragmenten wurde die Menge entsprechend angepasst) wurde die Membran 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Belichtungszeit betrug 10 s–60 min, je nach emittierter Lichtintensität. Die Detektion erfolgte mit dem Fusion SL von Vilber Lourmat.

3.3.7 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Die ESR-Spektroskopie eignet sich zur Identifizierung des Typs des Fe/S-Clusters in Proteinen, da sich je nach Art des Clusters der Spinzustand des Eisens unterscheidet. Sie stellte in dieser Arbeit neben der klassischen Protein UV/Vis-Spektroskopie die Methode der Wahl dar, um den Einbau eines Fe/S-Clusters in einem Protein nachzuweisen. Die in dieser Arbeit untersuchten [2Fe-2S]²⁺-Cluster bestehen im oxidierten Zustand aus zwei high-spin Fe³⁺ mit je einem anti-parallel gekoppeltem Spin von $S = 5/2$, somit ergibt sich insgesamt $S = 0$ und die Probe ist ESR-inaktiv. Durch Reduktion mit Natriumdithionit kann ein reduzierter Cluster erhalten werden, indem ein Eisen nun die Oxidationsstufe 2+ erhält. Hierfür wurde die Proteinprobe (100 µl) im anaeroben Zelt mit 200 µl anaerobisiertem Puffer versetzt und mit Natriumdithionit (Endkonzentration 2 mM) versetzt. Das Gemisch wurde in ein ESR-Röhrchen überführt und nach einer Inkubationszeit von 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur Messung der Proben ebenfalls in flüssigem Stickstoff.

Die Vermessung der Aim32- und TcAHH-Probe erfolgte üblicherweise bei 77 K mit einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und einer Modulationsamplitude von 1,5 mT. Die Mikrowellenleistung betrug 6,4-12,7 mW und die Mikrowellenfrequenz 9,43 GHz.

Die ESR-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit verwendet um den Einbau des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 in Hefezellen zu verfolgen. Da der Clustergehalt dieser Proben nahe am Detektionslimit der ESR-Spektroskopie liegt, wurden hier die Parameter entsprechend angepasst. Die Mikrowellenleistung betrug 20 mW und es wurden mehr Spektren pro Probe gemessen und addiert.

Die Proben der Redox Titration (Kap. 3.3.11) wurden ebenfalls mittels ESR-Spektroskopie vermessen.

3.3.8 Bildung eines Nitrosyl-Komplexes zum Nachweis eines mononukleären Fe-Zentrums

Apd1 aus *S. cerevisiae* und auch das Homolog aus *T. curvata* verfügen über verschiedene Reste in der N-terminalen Domäne, die nach unseren Untersuchungen, nicht für die Koordination eines Fe/S-Clusters genutzt werden. Diese Aminosäuren stellen potenzielle Liganden eines mononukleären Nicht-Häm-Eisen-Zentrums dar. Bindet dieses Eisen-Zentrum Stickstoffmonoxid (NO) zeigen sich im ESR-Spektrum im Niedrigfeld-Bereich bei niedriger Temperatur (4 K) charakteristische Signale bei $g \approx 4$, die dem Nitrosyl-Komplex zugeschrieben werden (Twilfer *et al.*, 1985; Wolfe *et al.*, 2001). Im oxidierten Zustand ist es nicht möglich ein NO-Radikal zu binden, somit muss das high-spin Eisen reduziert vorliegen.

| | |
|---|----------|
| Natriumdithionit in 1 M Tris, pH = 8,0 | 22 mg/ml |
| Natriumascorbat in 1 M Tris, pH = 8,0 | 4,2 M |
| Natriumnitrit in 1 M Tris, pH = 8,0 | 10,8 M |

In dieser Arbeit wurde versucht der Protein-Nitrosyl-Komplex nach Bill *et al.*, 1985 zu erzeugen. Zu 240 μ l Protein-Lösung wurden im anaeroben Zelt nacheinander 30 μ l Natriumdithionit, 30 μ l Natriumascorbat und 20 μ l Natriumnitrit hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde das Gemisch in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in selbigem bis zur Messung gelagert.

Die Messung wurde bei 4 K von Dipl. Chem. Dominique Bechtel in unserem Arbeitskreis durchgeführt.

3.3.9 pK_s-Wert-Bestimmung von Histidin-Liganden in [2Fe-2S]-Proteinen

Die Bestimmung des pK_s-Wertes erfolgte in dieser Arbeit auf Basis einer UV/Vis-spektroskopischen Methode. Die zu untersuchenden Proteine wurden hierfür in Puffern mit pH-Werten von 5,5-11 in 0,5 Schritten so verdünnt, dass die Absorption bei 450 nm zwischen 0,1 und 0,3 lag. Der tatsächliche pH-Wert der Proteinlösung wurde nach der Messung der UV/Vis-Spektren mit einer pH-Mikroelektrode bestimmt. Zur

Auswertung der Spektren wurde die Differenz der Absorption bei 445 nm und 465 resp. 475 nm gegen den gemessenen pH-Wert aufgetragen. Zur Ermittlung des pK_S -Wertes wurde je nach zu untersuchendem Protein die Henderson-Hasselbalch-Gleichung oder eine Summe aus zwei Henderson-Hasselbalch-Gleichungen zur Anwendung gebracht (Konkle *et al.*, 2009). Es wurde mit der Excel-Solver-Funktion und der Methode der kleinsten Quadrate gefittet. Zur Einstellung des pH-Wertes in der Proteinlösung wurde mit einem in unserem Arbeitskreis etablierten Puffersystem, basierend auf den Good's Puffern, (Good *et al.*, 1966), gearbeitet (Bechtel, unveröffentlicht). Diese Puffer zeichnen sich durch ihre Kompatibilität mit biologischen Molekülen aus.

| pH-Puffer | |
|----------------------|--------|
| MES | 100 mM |
| PIPES | 100 mM |
| HEPES | 100 mM |
| TAPS | 100 mM |
| CHES | 100 mM |
| CAPS | 100 mM |
| pH = 5,5–11 mit NaOH | |

3.3.10 Probenvorbereitung für Mößbauerspektroskopie

Ein großer Vorteil der ^{57}Fe -Mößbauerspektroskopie gegenüber der ESR-Spektroskopie ist die Tatsache, dass alle Mößbauer-aktiven Spezies in einer Probe detektiert werden können, unabhängig vom Oxidations- oder Spinzustand. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Proteinprobe mit ^{57}Fe angereichert werden muss, was sehr kostenintensiv ist. Des Weiteren muss die Probe sehr konzentriert vorliegen ($>0,5$ mM). Dieses Eisenisotop hat aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung nur einen Anteil von 2,2 % am Gesamteisen und muss somit durch eine ^{57}Fe -Lösung, die dem *E. coli* Nährmedium zugefügt wird, angereichert werden. Nach Aufzucht, Ernte, Reinigung und Aufkonzentration auf 250-400 μl des zu untersuchenden Proteins wird es in ein Mößbauer Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Vermessung der Proben wurde von Dr. Christina Müller, Dipl. Biophys. Jonathan Oltmanns und Dipl. Biophys. Lukas Knauer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Schünemann im Fachbereich Physik durchgeführt.

Herstellung einer ^{57}Fe -Citrat-Lösung

Im ersten Schritt wurden in einem 20 ml Glasgefäß 33,5 mg ^{57}Fe -Pulver in 1 ml HCl (8 M) über Nacht unter Rühren gelöst. Um den Verlust von Flüssigkeit durch Verdunstung zu vermeiden, wurde das Gefäß mit Parafilm, der einige kleine Löcher zur Entweichung des Wasserstoffs aufweist, verschlossen. Im Anschluss wird die Lösung mit 4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und 200 mg Trinatriumcitrat-Dihydrat versetzt. Der pH-Wert der Eisenlösung wird im letzten Schritt auf 5-6 mit Ammoniak (25 % (w/v)) eingestellt.

Um eine definierte Konzentration von 100 μM ^{57}Fe dem Medium zusetzen zu können, wurde der Eisengehalt gemäß Kapitel 3.3.4 bestimmt.

3.3.11 Redoxtitration

Die Chemikalien für den Mediatormix wurden nach der Abwaage außerhalb des anaeroben Zelttes im Zelt in anaerobisiertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst und das Gemisch im Anschluss unter Lichtausschluss gelagert. Die Konzentration der einzelnen Mediatoren lag bei 160 μM in der Stammlösung und bei 40 μM während der Redoxtitration.

Tabelle 3-17: Chemikalien des Mediatormix

| Chemikalie | Redoxpotential (vs. SHE) bei pH 7 |
|---|--|
| <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl-p-phenylendiamin | +276 mV |
| Phenazinethosulfat | +55 mV |
| Methylenblau | +11 mV |
| Resorufin | -51 mV |
| Indigokarmin | -125 mV |
| 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon | -152 mV |
| Natriumanthrachinon-2-sulfonat | -225 mV |
| Phenosafranin | -252 mV |
| Safranin T | -289 mV |
| Neutralrot | -329 mV |
| Benzylviologen | -358 mV |
| Methylviologen | -449 mV |

Zur Ermittlung der elektrochemischen Potentiale der zu untersuchenden Protein-gebundenen [2Fe-2S]-Cluster stellte in dieser Arbeit die Redoxtitration mit anschließender Messung der Proben mittels ESR-Spektroskopie die Methode der Wahl dar. Hierfür wurde im anaeroben Zelt ein Gemisch aus 1,25 ml Mediatormix, 3,25 ml 200 mM Puffer (Tab. 3-18) und 500 μl des Proteins (10-16 mg/ml) erstellt und 30 min unter Rühren inkubiert. Durch Zugaben einer variablen Menge frischer Natriumdithionitlösung (2 mM oder 20 mM) wurde das Potential des Gemisches schrittweise angepasst. Das jeweilige Potential wurde mit einer Redoxelektrode (Silber/Silberchlorid; +207 mV vs. SHE) gemessen. An 10 Punkten wurde eine Probe von 300 μl entnommen, dabei wurde darauf geachtet, dass sich das Potential vor der Probennahme stabilisierte und über einem Zeitraum von 5 min nicht mehr als ± 2 mV schwankte. Die in ESR-Röhrchen überführte Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung auch in diesem gelagert. Nach der Messung der Proben erfolgte die Auswertung durch die Auftragung der normierten g_y Amplitude gegen das gemessene Potential. Gefittet wurde mit der Nernst-Gleichung ($n=1$, $T=298$ K).

Wie bei der Ermittlung des pK_S -Wertes wurde hier die Methode der kleinsten Quadrate angewandt und mit der Excel-Solver Funktion gelöst.

Tabelle 3-18: Verwendete Puffer in der Redox Titration.

| Puffer | pH |
|----------------|----|
| MOPS (200 mM) | 6 |
| HEPES (200 mM) | 8 |
| CAPS (200 mM) | 10 |

3.3.12 Kristallisation von Proteinen

Die Struktur eines Proteins kann zur Aufklärung seiner Funktion führen. Die Methode der Wahl zur Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen von Apd1 aus *S. cerevisiae* und dem Homolog aus *T. curvata* stellte die Röntgenstrukturanalyse dar. Für dieses Verfahren werden Einkristalle des zu untersuchenden Proteins benötigt, die bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Die Größe und Qualität der Kristalle sind von entscheidender Bedeutung für den Erfolg des Experimentes. Ausschlaggebend ist jedoch die Homogenität zur hochauflösenden Strukturanalyse (Martins, persönliche Mitteilung). Optimale Bedingungen zur Kristallisation von Proteinen sind von Fall zu Fall unterschiedlich und lassen sich nur empirisch ermitteln. Der Prozess der Kristallisation gliedert sich in zwei Phasen: die Keimbildung und das Keimwachstum. Für beide Vorgänge benötigt man das richtige Verhältnis von Protein zu Fällungsmittel. Ist die Konzentration zu niedrig gewählt findet kein Kristallisationsprozess statt, ist sie zu hoch kommt es zur Präzipitation des Proteins. Als Fällungsmittel eignet sich prinzipiell jede Substanz, die die Löslichkeit des Proteins beeinflusst. Fällungsmittel sind Salze, organische Lösemittel und lang- und kurzkettige organische Polymere (McPherson *et al.*, 2013). Eine Haupttechnik der Kristallisation stellt die Dampfphasendiffusion dar. Hier wird ein Tropfen, der aus einem Protein-Fällungsmittel Gemisch besteht, ohne physischen Kontakt zu einem Reservoir aus purem Fällungsmittel in einer Kammer versiegelt. Wasserdampf diffundiert über die Zeit aus dem Tropf und so erhöht sich langsam und schonend die Konzentration des Fällungsmittels (Dessau *et al.*, 2011), was im Idealfall in der Initiation der Nukleation mit anschließendem Kristallwachstum resultiert. In dieser Arbeit wurde die Methode des „*sitting drop*“ (s. Abb. 3-3 B) angewandt. Hierbei sitzt der Tropf in einer Vertiefung.

Zur Aufreinigung verwendete Tags können den Kristallisationsprozess inhibieren. Die zu analysierenden Proteine wurden daher mittels Ionenaustauschchromatographie ohne Tag und anschließender Gelpermeationschromatographie isoliert und aufgereinigt. Der Zellaufschluss, die Proteinaufreinigung, sowie der Kristallisationsprozess erfolgten unter anaeroben Bedingungen.

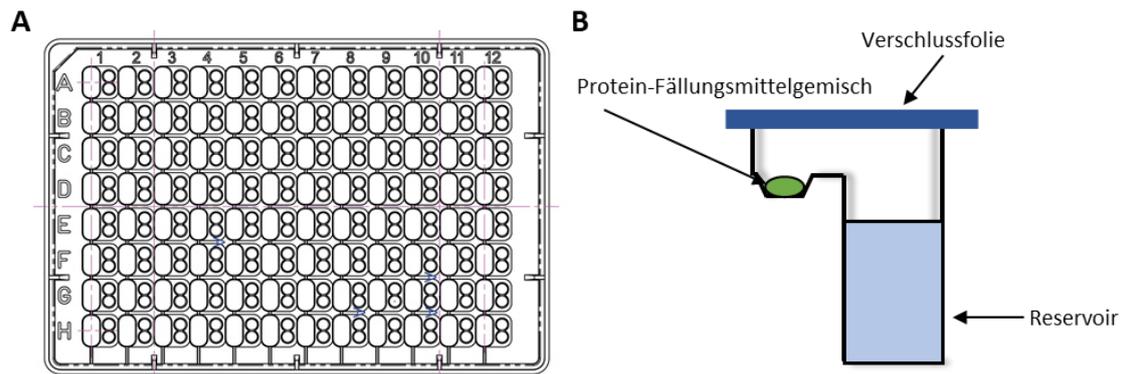


Abbildung 3-3: 96-Wellplatte des Kristallisationscreenings. A: 96-Wellplatte mit je zwei Wells pro Reservoir (Quelle: www2.mrc-lmb.cam.ac.uk). B: Querschnitt eines Reservoir- und Proben-Wells, eigene Darstellung, modifiziert nach (Armour *et al.*, 2013).

Da die Kristallisationsbedingungen sich von Protein zu Protein unterscheiden und nur empirisch ermittelt werden können, wurden zu Beginn kommerziell erhältliche Screenings durchgeführt. Das Screening erfolgte im 96-Well-Maßstab mit 80 μl Reservoir-Lösung und einem Tropfvolumen von 0,6 μl mit gleichen Teilen Protein und Fällungsmittel mit Hilfe eines Pipettierroboters. Die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte nach Verschluss der Platten bei 18°C unter Ausschluss von Luftsauerstoff im anaeroben Zelt. Wurden Kristalle unter verschiedenen Bedingungen erhalten, wurden diese unter Variation einzelner Faktoren weiter optimiert. Die Durchführung der Optimierungsscreens erfolgte manuell nach der „sitting drop“ Methode im 48-Well-Maßstab mit einer Reservoirgröße von 150 μl und einem Tropfvolumen von 4 μl aus gleichen Teilen Protein- und Reservoirlösung. Nach Verschluss der Platten wurden sie wie zuvor inkubiert.

3.3.13 Leu1-spezifische Aktivitätsmessung

Das Enzym Isopropylmalat-Isomerase (IPMI), in *S. cerevisiae* kodiert durch *LEU1*, katalysiert den zweiten Schritt der Leucinbiosynthese: die Reaktion von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmaleat (Hsu & Schimmel, 1984). Durch die Bildung des Intermediates Isopropylmaleat lässt sich die Reaktion UV-spektroskopisch verfolgen. Durch die Ausbildung der Doppelbindung ergibt eine Absorption im UV-Bereich, die bei 235 nm verfolgt werden kann. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt dabei auf der Bildung von 2-Isopropylmalat (Pierik *et al.*, 2009). Somit wird aus 3-Isopropylmalat 2-Isopropylmalat gebildet.

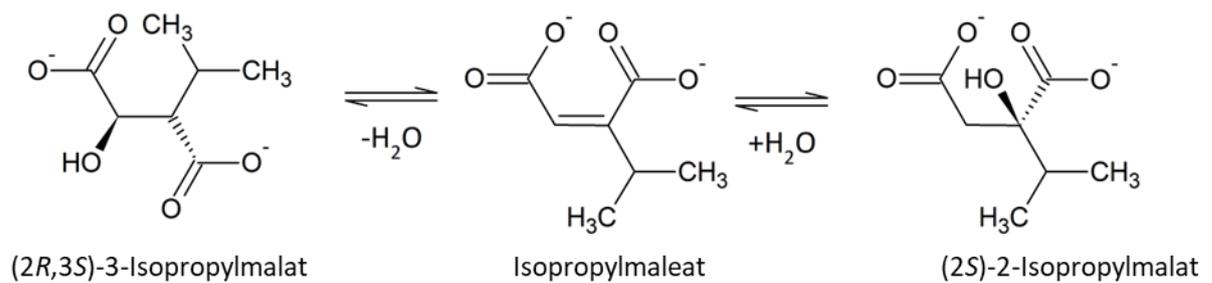


Abbildung 3-4: Die Umsetzung von 3-Isopropylmalat zu 2-Isopropylmalat durch das Enzym IPM.

| Leu1-Puffer | |
|--|--------|
| Tris pH = 7,4 | 20 mM |
| NaCl | 50 mM |
| sterilfiltrieren | |
| 3-Isopropylmalat-Stammlösung (10 x) | 100 mM |

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Leu1 wurde zunächst Gesamtzellextrakt mittels Glasperlenaufschluss (Kap. 3.2.13) hergestellt. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Zur Messung der Aktivität wurden in einer UV-Küvette 970 μl Leu1-Puffer und 20 μl 3-Isopropylmalat (10 mM) vorgelegt. Nach Zugabe von 3 μl Zellextrakt wurde durch invertieren gemischt und die Reaktion über 2 min durch Messung der Absorption bei 235 nm verfolgt. Die spezifische Aktivität U wurde mittels folgender Formel berechnet.

$$U = \frac{\Delta E / \text{min}}{\varepsilon \cdot V \cdot c}$$

Mit $\Delta E / \text{min}$: Änderung der Absorption pro Minute

ε : Extinktionskoeffizient von Isopropylmaleat bei 235 nm ($4,53 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V : Volumen der Reaktion in ml

c : Proteingehalt der Messlösung. Angegeben in mg

3.3.14 Succinat-Dehydrogenase Aktivitätsmessung

Um einen möglichen Effekt der Deletion von *AIM32* auf die Succinat-Dehydrogenase-(SDH)-Aktivität in den Mitochondrien zu identifizieren, wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt. SDH ist Komplex II der mitochondrialen Atmungskette und oxidiert dort Succinat zu Fumarat (Lemire & Oyedotun, 2002). Der Komplex besteht aus den Untereinheiten SDH1-4, wobei SDH 2 ein Fe/S-Protein darstellt. Die durch die Oxidation gewonnenen Elektronen werden über Coenzym Q in der inneren Membran zu Komplex III transportiert, welcher Cytochrom *c* reduziert (Abb. 3-5). Die Weitergabe der Elektronen an Komplex IV wird während der Aktivitätsmessung durch die Zugabe von Cyanid unterdrückt. Fortschreitende Reduktion von Cytochrom *c* ist durch einen Wechsel der Färbung von braun-orange zu pink zu beobachten und kann bei 550 nm detektiert

werden. Zur Messung der Hintergrundaktivität wurde eine Referenzmessung mit Zugabe von Malonat, welches die SDH inhibiert, durchgeführt.

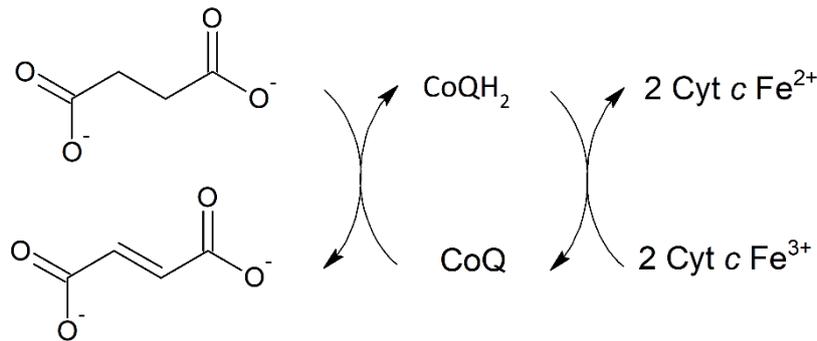


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Reduktion von Cytochrom c durch SDH.

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

Die Messung der SDH-Aktivität wurde mit zuvor isolierten Mitochondrien durchgeführt. In einer Küvette wurden 920 μl Puffer A + KCN mit 12 μl Succinat und 50 μl Cytochrom c vorgelegt. Nach Zugabe von 25 μg Protein wurde durch invertieren gemischt und die Änderung der Extinktion über 2 min bei 550 nm verfolgt. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurden in einer neuen Küvette Zusätze wie oben vorgelegt jedoch mit zusätzlich 12 μl Malonat. Die Messung der Aktivität erfolgte wie oben beschrieben. Für die Auswertung wurde die Extinktionsänderung der Messung um die Extinktionsänderung der Referenzmessung korrigiert. Diese wurde mit der Formel aus Kapitel 3.3.13 mit dem $\Delta\epsilon$ (Cytochrom c bei 550 nm) = $20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pierik *et al.*, 2009) durchgeführt.

3.4 Proteinexpression und Reinigung aus *E. coli*

3.4.1 Heterologe Proteinexpression

Heterologe Genexpression bezeichnet den Vorgang der Expression eines Gens in einem fremden Organismus. In vorliegender Arbeit wurden Gene aus dem Organismus *S. cerevisiae* oder *T. curvata* in *E. coli* exprimiert und anschließend die Proteine mittels verschiedener Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie-Schritten isoliert.

Hierzu wurden die Gene von Interesse in verschiedene *E. coli* Expressionsvektoren kloniert und anschließend in *E. coli* BL21 mit pRK-ISC-Plasmid transformiert nach Ausplattieren auf einer geeigneten Agarplatte für 16 h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Vorkultur (50–100 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika) mit 3-5 Klonen inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Genexpression erfolgte nun am nächsten Tag in einem 2 l-Maßstab in einem 5 l-Erlenmeyerkolben. Zugegeben wurden 2 % Vorkultur, die entsprechenden Antibiotika sowie Ammoniumeisen(III)citrat (0,38 mM Endkonzentration) und L-Cystein Hydrochlorid (1 mM Endkonzentration). Bei der Kultivierung einer Kultur für die Mößbauerspektroskopie wurde anstatt Ammoniumeisen(III)citrat dem Medium eine ⁵⁷Fe-Lösung (100 µM Endkonzentration) zugesetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ = 0,45– 0,55 (Genesys 10UV scanning) erreicht wurde. Danach wurde die Temperatur auf 18 °C im Falle der Proteine aus *S. cerevisiae* und 30 °C für das Protein aus *T. curvata* verringert. Die Genexpression wurden mit Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert, da alle verwendeten Expressionsplasmide einen T7 lac Promotor aufweisen, und über Nacht fortgesetzt. Zur Verfolgung der Effizienz der Expression wurden während des Zellwachstums und der anschließenden Aufreinigung zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für eine SDS-PAGE entnommen.

3.4.2 Ernte und Aufschluss von *E. coli*

| Lysepuffer | |
|-------------------|--------|
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 300 mM |
| Imidazol | 10 mM |
| pH = 9 | |
| Sterilfiltrieren | |
| Puffer W | |
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 300 mM |
| pH = 9 | |
| Sterilfiltrieren | |
| Puffer A | |
| Tris | 20 mM |
| pH = 9 | |
| Sterilfiltrieren | |

Nach Überexpression über Nacht wurden die *E. coli*-Zellen geerntet (6000 g, 10 min, 4 °C, Avanti J-26S XP, Rotor JLA-8.1000), in Puffer, entsprechend der Aufreinigungsmethode, resuspendiert und zentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 4°C Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor A-4-62). Sollten die Proteine anaerob gereinigt werden, erfolgte das Resuspendieren und der zweite Zentrifugationsschritt bereits im anaeroben Zelt

(4000 rpm, 20 min, 4 °C Eppendorf Zentrifuge 5430 R, Rotor F 35-6-30). Aus einer 2 l-Kultur konnten so zwischen 4 g und 12 g Zellen gewonnen werden. Die Zellen wurden entweder direkt aufgeschossen oder nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -20 °C gelagert.

3.4.2.1 Aufschluss unter aeroben Bedingungen

Der Zellaufschluss wurde mit der French Press durchgeführt. Das Zellpellet wurde erneut im entsprechenden Puffer (25-40 ml Endvolumen) resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNase I sowie einer PMSF-Lösung (in EtOH, 1 mM Endkonzentration) versetzt. Um eventuell verbliebene Zellklumpen zu suspensieren, wurde die Suspension durch eine Kanüle (0,9 mm) gedrückt. Die so vorbereiteten Zellen wurden in einer auf 4°C vorgekühlten 50 ml Zelle der French Press unter einem Druck von 1000 psi geöffnet. Durch Ultrazentrifugation (30000 rpm 70 min, 4°C, Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor Type Ti70) wurden die unlöslichen Zelltrümmer von den löslichen Proteinen, die sich nun im Überstand befanden, getrennt. Das erhaltene Lysat wurde nun weiter aufgereinigt.

3.4.2.2 Aufschluss unter anaeroben Bedingungen

Der Zellaufschluss wurde hier unter Ausschluss von Luftsauerstoff im anaeroben Zelt durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 25 ml des entsprechenden Puffers aufgenommen und mit einer Spatelspitze DNase I und Lysozym versetzt. Nach 20 min Inkubationszeit wurde eine PMSF-Lösung (s.o.) hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall-Homogenisator. Die Zellen, die sich zur Kühlung auf Eis befanden, wurden 2 x 20 s sonifiziert mit einer Pause von 30 s. Anschließend erfolgte 5 min ein Wechsel aus 1 s Impuls und 1 s Pause. Das weitere Vorgehen ab der Ultrazentrifugation entspricht dem Aufschluss unter aeroben Bedingungen.

3.4.3 Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

| Lysepuffer | |
|--------------------|--------|
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 300 mM |
| Imidazol | 10 mM |
| pH = 9 | |
| Sterilfiltrieren | |
| Waschpuffer | |
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 300 mM |
| Imidazol | 20 mM |
| pH = 9 | |
| sterilfiltrieren | |

Methoden

| Elutionspuffer | |
|-------------------|--------|
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 300 mM |
| Imidazol | 250 mM |
| pH = 9 | |
| sterilfiltrieren | |
| Entsalzungspuffer | |
| Tris, pH = 9 | 20 mM |
| NaCl | 150 mM |
| sterilfiltrieren | |

Eine schnelle und einfache Art Proteine aufzureinigen stellt die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie dar. Diese Methode basiert auf der Wechselwirkung zwischen Metallionen, die an einer Matrix haften und spezifischen Seitenketten der Proteine (Bornhorst *et al.*, 2000). Eine Variante ist die Ni-NTA Affinitätschromatographie. Das Protein von Interesse ist entweder N- oder C-terminal mit einem Polyhistidin-Tag (His₆ oder His₈) fusioniert. Der fusionierte Tag bindet an immobilisierte Ni-Ionen, die durch z. B. Nitrilotriessigsäure (NTA) an Agarose oder Resin gebunden sind.

Für die Reinigung eines Proteins aus einer 2 l-Kultur wurde eine leere PD10-Säule etwa 1,5 cm hoch mit Ni-NTA-Agarose befüllt. Die Säule befand sich während der Reinigung bei RT. Alle Puffer wurden vor Befüllung in die Säule auf Eis vorgekühlt. Vor Nutzung wurde das Säulenmaterial mit 50 ml Lysepuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Packung in Lysat (s. 3.4.3) resuspendiert und in ein Falcon überführt. Die Mischung wurde zur besseren Bindung des Proteins an die Ni-NTA-Agarose 1 h bei 4 °C auf einem Wippschüttler inkubiert. Die Suspension wurde daraufhin wieder in die leere Säule gefüllt. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wird das abgesetzte Säulenmaterial im Anschluss mit 50 ml Waschpuffer gewaschen. Das His-getagte Protein wird schließlich mit Elutionspuffer von der Ni-NTA-Agarose eluiert. Die hohe Konzentration an Imidazol im Elutionspuffer kann zur Präzipitation des Proteins und Verlust des Fe/S-Zentrums führen. Um dies zu vermeiden, muss direkt im Anschluss eine Umpufferung vorgenommen werden. Eine PD10-Säule, welche zuvor mit 30 ml Entsalzungspuffer äquilibriert wurde, wurde mit maximal 2,5 ml Eluat beladen und mit Entsalzungspuffer weiter gespült. Die Fraktion, die das Protein enthält, wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Falls nötig wurde das Proteineluat vorher aufkonzentriert.

3.4.4 Aufreinigung mittels Strep Tactin®-Affinitätschromatographie

| Puffer W | |
|------------------------------|------------|
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 300 mM |
| pH = 9 | |
| Puffer E | |
| Desthiobiotin in Puffer W | 1,35 mg/ml |
| Puffer R | |
| HABA in Puffer W | 100 mM |

Das Prinzip der Aufreinigung mittels Strep-Tags beruht auf der Bindung von Biotin zu Streptavidin. Der Strep-tag II ist eine acht Aminosäuren lange Peptidsequenz (WSHPQFEK), die eine hohe Bindeaffinität zu dem Material Strep-Tactin, ein Streptavidin-Derivat aufweist (Schmidt *et al.*, 2007). Eine Verbesserung dieses Systems stellt der Twin-Strep-Tag, da hier zwei Strep-Tag II-Motive durch einen Linker (WSHPQFEK-(GGGS)₂SGGSA-WSHPQFEK) fusioniert sind (Schmidt *et al.*, 2013).

Ein Säulenvolumen von ca. 2 ml Strep-Tactin Material wurde zur Aufreinigung des Proteins aus einer 2 l-Kultur verwendet. Vor Verwendung wurde das Säulenmaterial mit 50 ml Puffer W äquilibriert. Alle Puffer waren während der Aufreinigung eiskühlt, die Chromatographie fand hingegen bei RT statt. Das Säulenmaterial wurde in dem, aus dem Zellaufschluss gewonnenen, Lysat resuspendiert und zur besseren Bindung des zu isolierenden Proteins 30 min auf einem Rollschüttler bei 4°C inkubiert. Nach Überführung der Suspension in eine leere PD10-Säule erfolgt die Waschung der Packung mit 50 ml Puffer W. Das gebundene Protein wird im Anschluss mit 10-15 ml Puffer E vom Strep-Tactin eluiert. Falls nötig wurde das Proteineluat im Anschluss aufkonzentriert.

Zur Regeneration des Säulenmaterials wird es im Anschluss an die Aufreinigung mit Puffer R so lange gespült, bis es eine tiefrote Farbe annimmt. HABA entfernt hierbei das Desthiobiotin aus der Bindetasche des Säulenmaterials und wird im Anschluss durch Waschen mit Puffer W (pH 10,5) wieder entfernt. Zum Erhalt der Langlebigkeit des Materials wird im Anschluss mit Puffer W (pH 8) gewaschen.

3.4.5 Aufreinigung mittels Heparinchromatographie

| Puffer A | |
|------------------|-------|
| Tris | 20 mM |
| pH = 9 | |
| Sterilfiltrieren | |
| Puffer B | |
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 1 M |
| pH = 9 | |
| sterilfiltrieren | |

Die Heparinchromatographie trennt Proteine aufgrund ihrer nativen Ladung auf. Dies ermöglicht es das Protein von Interesse ohne Verwendung eines Tags zu isolieren. Die Proteine binden dabei je nach Aminosäurezusammensetzung unterschiedlich stark an das geladene Säulenmaterial. Durch Erhöhung der Ionenstärke werden gebundene Proteine nach und nach von dem Säulenmaterial eluiert.

Heparin kann nicht nur als Säulenmaterial für die Affinitäts- sondern auch als Ionenaustauscher eingesetzt werden (Xiong *et al.*, 2008). Es enthält eine hohe Anzahl an anionischen Sulfatgruppen, welche die Wirkung als Ionenaustauscher erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Heparin-Säule als Ionenaustauscher gearbeitet. Im Gegensatz zu anderen Arten der Ionenaustauschchromatographie kann hier mit einem kleinen Packungsvolumen (5 ml im Vergleich zu ca. 30 ml) gearbeitet werden.

Die Isolierung erfolgte bei RT unter Zuhilfenahme einer Äkta Start. Neben der Messung der Absorption bei 280 nm im Gerät, wurde durch Anschluss einer Durchflussküvette in einem zusätzlichen Photometer die Absorption bei 450 nm zur als Maß für den Fe/S-Clustergehalt gemessen. Das Protein wurde mittels Fraktionssammler (2 ml pro Fraktion) aufgefangen.

Vor Gebrauch wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und das aus Kap. 3.4.2.1/2 erhaltene Lysat filtriert (0,22 µm), um eine Verstopfung der Säule durch kleine Partikel zu vermeiden. Die Auftragung erfolgte mit 2 ml/min. Danach wurde die Säule mit 15 Säulenvolumen, zum Herauswaschen nicht-gebundener Proteine, mit Puffer A gespült (3 ml/min). Die Elution (2 ml/min) der gebundenen Proteine erfolgte durch einen Gradienten 0–100 % Puffer B in fünf Säulenvolumen. Durch den steigenden NaCl-Gehalt im Puffergemisch werden die gebundenen Proteine nach und nach eluiert. Die rötlich gefärbten Fraktionen wurden vereint und wenn nötig zu 6–8 ml aufkonzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur weiteren Aufreinigung wurde bei Bedarf eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt.

3.4.6 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie wurde bei RT mittels einer Äkta Start und der Säule HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR durchgeführt und diente der weiteren Aufreinigung der durch Ionenaustauschchromatographie isolierten Proteine. Zu Beginn wurde die Säule im 1,5-fachen Eigenvolumen mit einer Puffermischung aus 90 % A und 10 % B äquilibriert. Nach Auftragung der Protein-Lösung auf die Säule (5–10 ml) wurde die Chromatographie durchgängig mit obiger Puffermischung betrieben, im folgenden Puffer A/B genannt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden automatisch anhand der Absorption bei 280 nm gesammelt. Durch Anschluss einer Durchflussküvette wurde die Absorption bei 450 nm als Maß des Fe/S-Clustergehaltes zusätzlich gemessen. Die Fe/S-Protein-haltigen Fraktionen wurden anhand ihrer Färbung vereinigt und mit einer Membran mit geeigneter Ausschlussgröße konzentriert.

3.4.7 Konzentrierung von Proteinen

Für Experimente wie die Mößbauerspektroskopie oder durch Chromatographiemethoden, die das Protein in einem relativ großen Volumen isolieren, ist es von Nöten, die Proteinkonzentration von Präparaten zu erhöhen. Die Konzentration der Proteine beruht auf der Ausschlussgröße des gewählten Konzentrators. Wässrige Lösungsmittel und niedermolekulare Verbindungen wie Puffer passieren die Membran und die größeren Proteine werden zurückgehalten. Während der Zentrifugation wurde das Konzentrat zwischendurch gemischt, um eine zu hohe Proteinkonzentration an der Membranoberfläche zu vermeiden. In dieser Arbeit wurden Konzentratoren mit der Ausschlussgröße 10 kDa verwendet. Die Proben wurden so lange mit gelegentlichem Mischen bei 4 °C zentrifugiert, bis sie das gewünschte Volumen erreichten.

4. Ergebnisse

4.1 Die Suche nach einem Phänotyp für $\Delta aim32$ und $\Delta apd1$

Die Gene *AIM32* und *APD1* des Organismus *S. cerevisiae* sind unter Standardlaborbedingungen nicht essenziell (Blinn, 2014). Durch Variation der Wachstumsbedingungen, z. B. Zugabe von an-/organischen Verbindungen oder Erhöhung der Temperatur, ist es möglich Bedingungen zu finden unter denen solche Gene essenziell werden. Ein Phänotyp kann der erste Schritt bei der Suche nach der Funktion unbekannter Proteine sein und stellt somit ein hohes Ziel dieser Arbeit da.

4.1.1 Einfluss der Deletion auf die Funktion mitochondrialer und cytosolischer Enzyme

Die Deletion des Gens *AIM32* resp. *APD1* zeigt auf SC-Gal- oder SC-Glu-Medium keinen Wachstumsunterschied zum Laborstamm W303-1A (WT). Die Deletionsstämme unterscheiden sich im Vergleich zu WT weder in ihrer Verdopplungszeit (ca. 2 h in Minimalmedium) noch nach 20 h Wachstum in ihrer End-OD₆₀₀ (ca. OD₆₀₀ = 2 in Minimalmedium) (Blinn, 2014). Viele Aspekte der Biogenese von Fe/S-Proteinen im Cytosol und in den Mitochondrien sind heute aufgeklärt und verstanden. Jedoch gibt es vor allem bei der Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine noch einige Schritte, die nicht vollkommen geklärt sind. An der Biogenese von Fe/S Proteinen sind zum Teil auch Fe/S-Proteine selbst, wie Cfd1, Nbp35, Dre2 und Nar1 im Cytosol oder Yah1, Isu1 und Isa1 in den Mitochondrien, beteiligt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Deletion der Zielgene auf das cytosolische [4Fe-4S]-Protein IPMI (Leu1) und das mitochondriale [4Fe-4S]-Protein SDH mittels spezifischer Enzymaktivitätsmessung ermittelt. Wenn die Proteine Aim32 oder Apd1 an der Reifung von mitochondrialen oder cytosolischen Proteinen beteiligt sind, sollte sich dies in einer Verringerung der Aktivität der beiden Targetproteine widerspiegeln. Die Aktivitätsmessung von Leu1 wurde in Hefegesamtzellextrakt und die SDH-Aktivität mit (geplatzen) Mitochondrien bestimmt. Anhand von bioinformatischen Vorhersagemodellen wird für Aim32 eine Lokalisation in den Mitochondrien und für Apd1 im Cytosol vermutet. Da ein Teil der mitochondrialen ISC-Maschinerie auch für die Reifung cytosolischer Proteine essenziell ist, wurde der Einfluss der Deletion von *AIM32* und *APD1* auf die Aktivität von Leu1 untersucht. Abbildung 4-1 zeigt auf der linken Seite die spezifische Aktivität von Leu1 des WT-, $\Delta aim32$ - und des $\Delta apd1$ -Stammes. Mit $0,18 \pm 0,02$ für den WT und $0,19 \pm 0,01$ U/mg resp. $0,19 \pm 0,02$ U/mg für $\Delta aim32$ resp. $\Delta apd1$ zeigte sich kein Unterschied zwischen WT und Deletionsstämmen. Die spezifischen Aktivitätsmessungen für SDH wurde nur mit Mitochondrien des WT und $\Delta aim32$ durchgeführt. Nach erfolgter Isolation der Mitochondrien ergab sich für WT eine spezifische Aktivität von $0,49 \pm 0,20$ U/mg und für $\Delta aim32$ $0,51 \pm 0,07$ U/mg. Auch in der Aktivitätsmessung dieses mitochondrialen Enzyms

zeigt sich kein Unterschied zwischen WT und Deletionsstamm. Die Deletion von *APD1* hat somit keinen Einfluss auf die Reifung eines cytosolischen und die von *AIM32* nicht jene eines mitochondrialen Fe/S-Proteins.

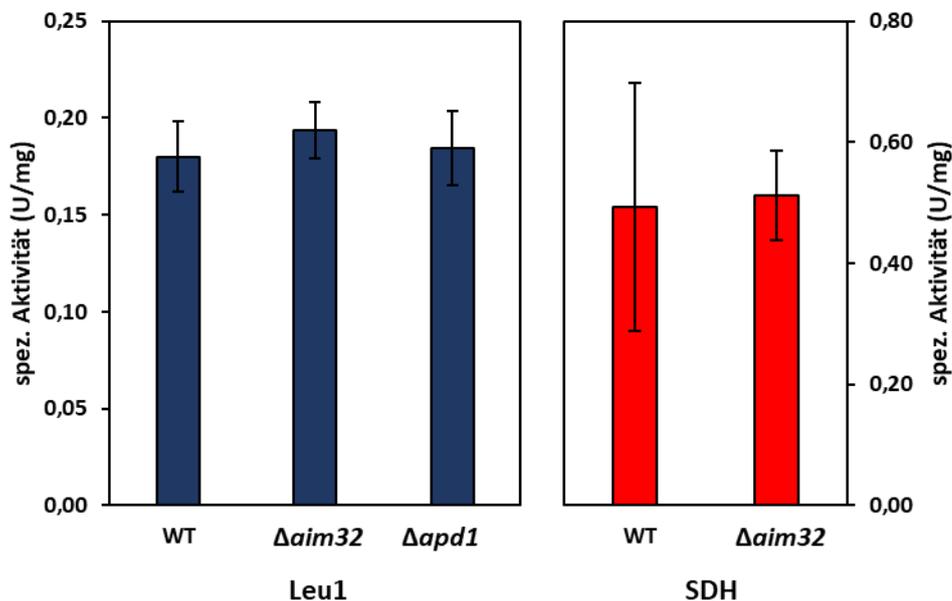


Abbildung 4-1: Spezifische Aktivitätsmessung für Leu1 und SDH. Die Enzymaktivität für Leu1 wurde von Gesamtzellextraktproben gemessen. Die Enzymaktivität für SDH wurde von isolierten und geplatzten Mitochondrien bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n = 2 resp. 3 für WT).

4.1.2 Einfluss von Kupferionen auf den Deletionsstamm $\Delta apd1$

In der Literatur finden sich mehrere Belege für die Sensitivität von $\Delta apd1$ -Zellen gegen Kupferionen (Entian *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2008), die aber je nach Quelle stark variiert. Andere Studien belegen hingegen aber eine extreme Resistenz von *S. cerevisiae* gegenüber Kupferionen (Foster *et al.*, 2014). Bereits im Zuge meiner Diplomarbeit (Blinn, 2014) wurde der Effekt von CuSO_4 auf das Wachstum im Deletionsstamm untersucht. Es konnte auch mit der höchsten in der Literatur beschriebenen Kupferionen-Konzentration (10 mM, Jin *et al.*, 2008) kein Wachstumsphänotyp von $\Delta apd1$ im Vergleich zu WT festgestellt werden. Blackman *et al.* zeigten, dass Elesclomol, ein Krebsmedikament, zusammen mit Kupferionen inhibierend auf das Wachstum von Hefezellen wirkt (Blackman *et al.* 2012). Im Folgenden wurde nun das Wachstumsverhalten von WT in Gegenwart von Elesclomol und CuSO_4 untersucht. Nach Vorwachstum in SC-Glu-Medium über Nacht wurden 20 ml-Kulturen mit $\text{OD}_{600} = 0,1$ inokuliert und mit 10, 5 und 2,5 μM CuSO_4 sowie Elesclomol in unterschiedlicher Konzentration versetzt. Eine unbehandelte, eine nur mit CuSO_4 versetzte und eine mit der höchsten verwendeten Elesclomol-Konzentration versetzte Kontrolle wurden mitgeführt. Nach 20 h Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum anhand der OD_{600} -Werte ermittelt.

Abbildung 4-2 zeigt das Wachstum von Zellen in Gegenwart von Elesclomol und CuSO_4 im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen. Das Wachstum von WT unter Zugabe von nur CuSO_4 resp. Elesclomol unterscheidet sich unwesentlich von jenem unbehandelter WT-Zellen. Die Zugabe beider Substanzen resultiert in einem starken Wachstumsphänotyp von WT. Bereits bei einer Elesclomol-Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ ist ein starker Wachstumsphänotyp zu beobachten, die Zellen erreichten bei Inkubation über 20 h nur eine OD_{600} von maximal 0,5. Dieser starke, letale Effekt konnte bei einer 2-fach resp. 4-fach geringeren Elesclomol-Konzentration nicht gemindert werden (nicht gezeigt). Da bereits Mengen von Elesclomol im nanomolaren Bereich in Verbindung mit mikromolaren Konzentrationen Kupferionen zu einer starken Letalität führten, wurde dieser experimentale Ansatz nicht weiterverfolgt. Es wurden Bedingungen gesucht, unter jenen WT-Zellen im Wachstum nicht beeinträchtigt werden und nur die Deletionsstämme einen Wachstumsphänotyp aufweisen.

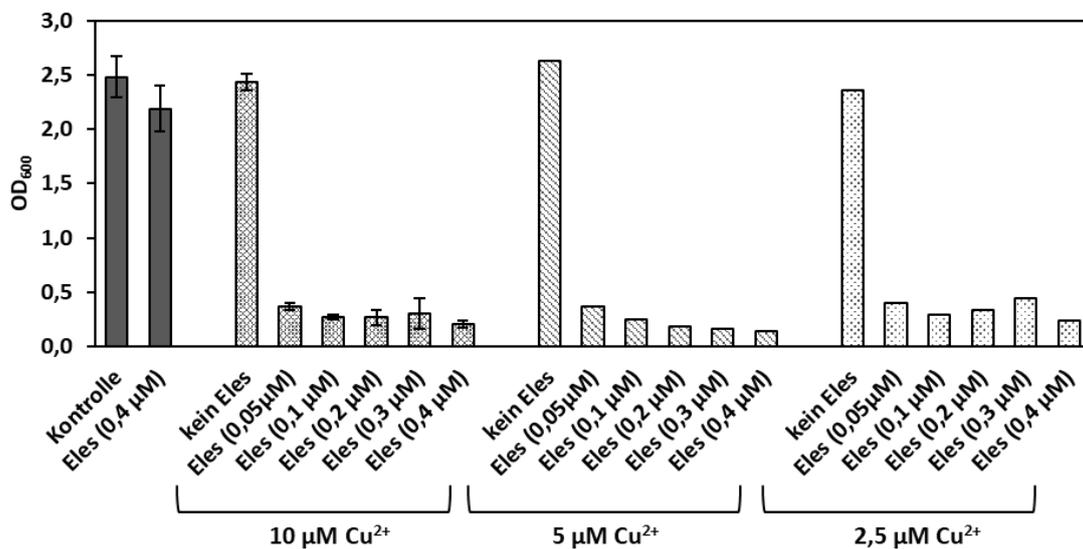


Abbildung 4-2: Wachstum von W303-Hefezellen in Gegenwart verschiedener Cu^{2+} -Ionenkonzentration (10, 5 und $2,5 \mu\text{M}$) und verschiedener Elesclomol-(Eles)- Konzentrationen. Nach Vorkultivierung über Nacht wurden die Zellen in glukosehaltigem SC-Medium verdünnt und CuSO_4 sowie Elesclomol hinzugegeben. Nach 20 h Inkubation wurde der End- OD_{600} -Wert ermittelt ($n = 2$ für $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 , sonst einmalige Messungen).

Pearce und Sherman veröffentlichten 1999 Ergebnisse über den Effekt verschiedener Metallionen auf Histidin-auxotrophe Stämme von *S. cerevisiae*. So zeigten jene Stämme in Vollmedium eine höhere Sensitivität gegenüber Cu^{2+} -Ionen als Stämme, die in der Lage waren, Histidin zu synthetisieren. Wird jedoch dem Medium Histidin zugegeben, wird dieser Effekt rückgängig gemacht (Pearce & Sherman, 1999). Da Histidin im Überschuss im Wachstumsmedium vorhanden ist, ist es möglich, dass es Großteil der Cu^{2+} -Ionen von Histidin komplexiert wird und so nicht mehr toxisch auf die Zelle wirkt.

W303-1A ist durch das *his3-11,15* Allel ein Histidin auxotropher Stamm, somit muss dem Minimalmedium Histidin ($1,3 \text{ mM}$) zugegeben werden. An Nukleotid-Position 208 und 319 des *HIS3*-Genes in W303 ist je ein Guanin deletiert, was jeweils in einem *Frameshift*

resultiert und so zur Translation eines nicht mehr funktionalen Proteins führt. Um den Effekt der Bindung von Cu^{2+} -Ionen an Histidin zu umgehen, wurde das *HIS3*-Gen von WT und der Deletionsmutanten Δaim32 und Δapd1 mittels homologer Rekombination „repariert“. Es wurden Primer abgeleitet, die mittels PCR und chromosomaler DNA von W303-1A, eine Kasette amplifizieren, die Guanine an Position 208 und 319 inserieren. Die Kasette wies einen Überlapp von 28 Basen am 5'- und 3' vor den eingeführten Mutationen (Position 208 und 319) des *HIS3*-Gens auf, sodass eine Einführung mittels homologer Rekombination möglich war.

Im Normalfall wird die korrekte Position der eingeführten Kasette im Genom mittels PCR der chromosomalen DNA überprüft, da sich die geänderte DNA-Sequenz in der Länge von der ursprünglichen unterscheidet und somit auf dem Agarosegel visualisiert werden kann. Da hier jedoch nur eine subtile Veränderung von zwei zusätzlichen Basen vorgenommen wurde, war der Nachweis mittels Agarosegelelektrophorese nicht möglich. Abbildung 4-3 zeigt das Wachstum von W303 und W303 *HIS3*⁺ im Vergleich auf SC-Glu-Agarplatten mit und ohne Histidin im Medium. Während ein Wachstum von W303 auf Platten ohne Histidin nicht möglich war, kann W303 *HIS3*⁺ ohne Histidin im Medium wachsen, was die korrekte Insertion der Kasette belegt.

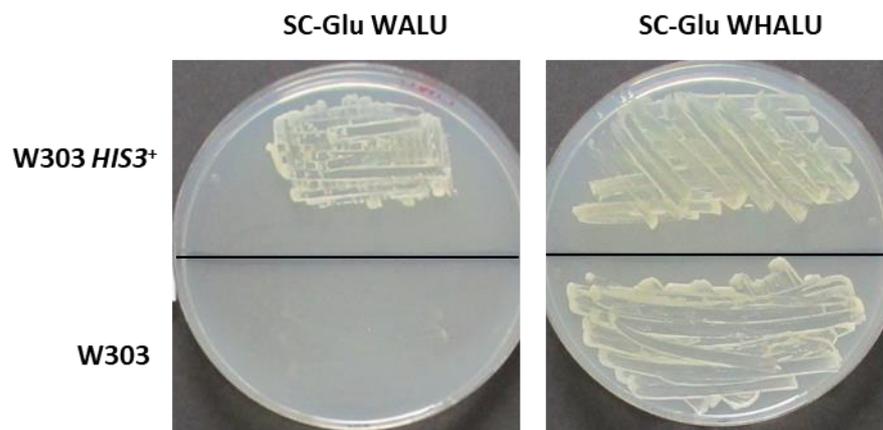


Abbildung 4-3: Aufhebung der Histidin Auxotrophie von W303. Links: W303 *HIS3*⁺ und W303 auf einer glukose-haltigen SC-Agarplatte ohne Histidin im Marker-Mix. Rechts: W303 *HIS3*⁺ und W303 auf einer glukose-haltigen SC-Agarplatte mit Histidin im Marker-Mix.

In vorherigen Versuchen (Blinn, 2014) konnte der EC_{50} -Wert von CuSO_4 auf 4 mM festgelegt werden. Diese Konzentration gibt jene Konzentration an Cu-Ionen wieder, die zu einer Inhibierung des Wachstums um die Hälfte führte. Es wurden WT-Zellen vorkultiviert und in einem 20 ml Kolben mit $\text{OD}_{600} = 0,1$ inokuliert. Nach Zugabe der jeweiligen CuSO_4 -Menge wurden die Kulturen für 20 h bei 30 °C kultiviert. Abbildung 4-4 belegt, dass der EC_{50} -Wert von CuSO_4 für den *HIS3*⁺-WT-Stamm ohne Histidin im Medium, nun ca. 4-fach auf 1-1,25 mM gesunken ist.

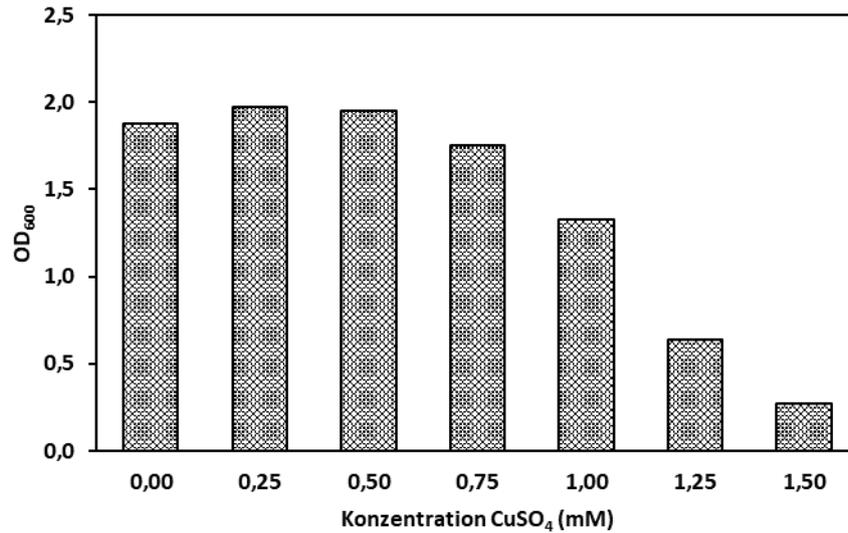


Abbildung 4-4: Wachstum *HIS3*⁺WT-Zellen in Gegenwart von variablen CuSO₄-Konzentrationen. Inkubiert wurde in glukosehaltigem SC-Medium mit geeignetem Marker Mix ohne Histidin. Nach 20 h Inkubation wurde der End-OD₆₀₀-Wert ermittelt.

Jedoch bot dieser experimentelle Ansatz durch die immer noch sehr hohe Cu-Resistenz nicht die geeignete Grundlage für weiterführende Experimente mit *Δapd1*.

4.2 Chemogenetische Screens

Zur Phänotypisierung der Deletionsstämme *Δaim32* und *Δapd1* wurde im Folgenden eine chemogenomische Datenbank namens HIPHOP der Giaever und Nislow Laboratorien der Universität von Toronto (Lee *et al.*, 2014) zur Anwendung gebracht. Auf der Website (chemogenomics.pharmacy.ubc.ca) finden sich Ergebnisse zu Screens nach Zugabe 3356 unterschiedlichen Chemikalien. Die Ergebnisse sind unterteilt in eine HIP- (*haploinsufficiency profiling*) und HOP- (*homozygous profiling*) Kategorie. Es wird der *Fitness defect score* (FD) für jeden der 1095 heterozygoten resp. 4810 homozygoten Deletionsstämme angegeben. Dieser Wert (¹⁰log des Wachstumsverhältnisses) ist ein Maß für das Wachstum des Deletionsstammes in der Gegenwart einer chemischen Verbindung im Vergleich zu dem unbehandelten Stamm. Ein positiver Wert steht für eine Wachstumsbeeinträchtigung eines Deletionsstammes in Anwesenheit einer Substanz, ein Wert von 0 bedeutet das Wachstum des Stammes ist unbeeinflusst von der Verbindung. Ein negativer Wert würde somit ein besseres Wachstum des Deletionsstammes in der Gegenwart einer Substanz repräsentieren.

Lee *et al.* nutzten für die 3356 individuellen Screens Pools der 1095 heterozygoten resp. 4810 homozygoten Deletionsstämme. Die jeweiligen Pools wurden nach Vorwachstum mit der zu testeten Verbindung versetzt und weiter kultiviert. Nach fünf Verdopplungen des homozygoten Pools resp. 20 Verdopplungen des heterozygoten Pools, wurden die Zellen automatisch geerntet und die beiden Pools vereint. Nach Lyse der Zellen und Extraktion der genomischen DNA wurden spezifische molekulare Tags mittels PCR

amplifiziert. Bei jeder experimentellen Gruppe wurden neben den mit der Chemikalie behandelten Zellen mehrere Kontrollen mitgeführt. Der oben beschriebene FD wird vom Verhältnis des Tag-Signales der behandelten Proben und dem Signal der Kontrollproben abgeleitet.

4.2.1 Chemogenomischer Screen für *Apd1*

Abbildung 4-5 zeigt die Ergebnisse von Lee *et al.* für den $\Delta apd1$ Stamm. Auf der Y-Achse ist der FD aufgetragen. Mit einem Wert von 22,4 ist der Hit für den Redoxpotentiator 2,3,4-Trihydroxybenzophenon (Gallobenzophenon) am signifikantesten. Der nächsthöhere Wert resultiert durch 2,3,4-Trihydroxy-4'-ethoxybenzophenon, ebenfalls ein Redoxpotentiator. Der Screen für Gallobenzophenon wurde mit einer Konzentration von 83,6 μM , der für 2,3,4-Trihydroxy-4'-ethoxybenzophenon bei 70 μM durchgeführt.

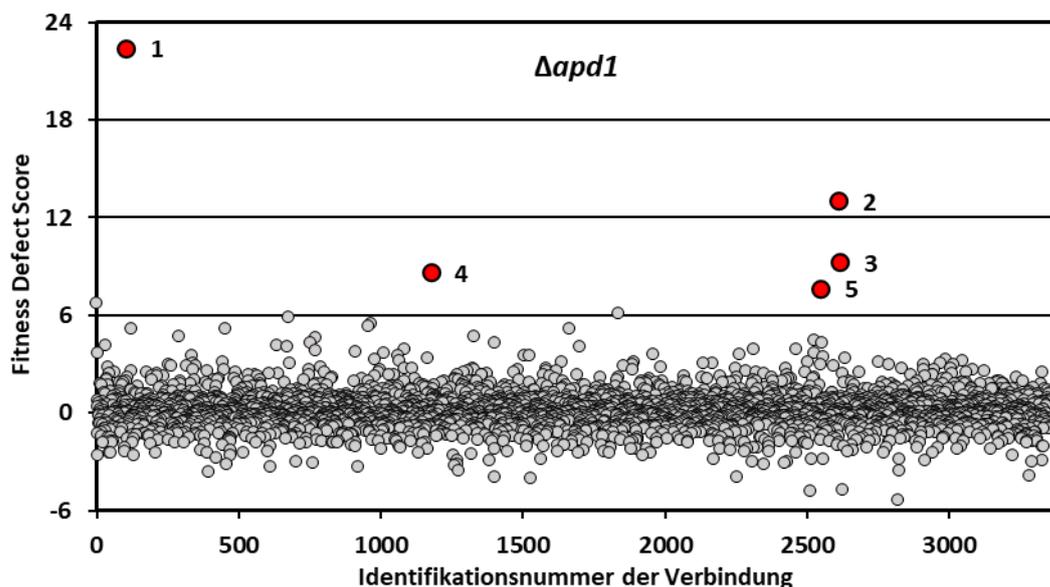


Abbildung 4-5: Effekt von 3356 Substanzen auf das Wachstum des $\Delta apd1$ -Stammes. Die Daten wurden von der Homepage (<https://www.ggcnlab.com/hip-hop>) heruntergeladen und verarbeitet. **1:** Gallobenzophenon, **2:** 2,3,4-Trihydroxy-4'-ethoxybenzophenon, **3:** Purpurogallin-4-Carbonsäure, **4:** 2-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-1-(2,3,4-trihydroxyphenyl)ethanon, **5:** (3-Ethoxyphenyl)-(2,3,4-trihydroxyphenyl)methanon.

Als Kontrollen des Effekts der Deletion von *APD1* resp. *AIM32* wurde, im Rahmen dieser Arbeit, in die jeweiligen Stämme ein Plasmid mit einer Kopie des Gens unter der Kontrolle des natürlichen Promotors resp. ein Leerplasmid transformiert. Als natürlicher Promotor wird in dieser Arbeit ein Abschnitt von ca. 500 Basen vor dem Zielgen definiert. Damit wurden die Hochdurchsatz-Daten von Lee *et al.* mit einem spezifischen Experiment verglichen. Für diese Arbeit wurden wachstumshemmende Bedingungen für den $\Delta apd1$ -Stamm gesucht, die durch Expression einer Plasmidkopie komplementiert werden können. Nach Vorwachsen in Flüssigmedium, wurden die Zellen auf Agarplatten mit unterschiedlich hoher Gallobenzophenon-Konzentration getüpfelt. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Agarplatte. Abbildung 4-6 **A** zeigt, dass bereits 25 μM Gallobenzophenon bei $\Delta apd1$ zu einer starken Wachstumshemmung führten. WT

und $\Delta aim32$ wuchsen bis zu einer Konzentration von 50 μM Gallobenzophenon in der Agarplatte nahezu ohne Wachstumsphänotyp. Eine Plasmidkopie von *APD1*, aber nicht von *AIM32*, war in der Lage den Wachstumsphänotyp zu komplementieren. Interessanterweise ist auch WT mit transformiertem Leerplasmid bei einer Konzentration von 100 μM Gallobenzophenon nicht mehr lebensfähig, aber sehr wohl $\Delta apd1$ und $\Delta aim32$ mit einer Plasmidkopie von *APD1* unter der Kontrolle des natürlichen Promotors. Möglicherweise ist die zelluläre Apd1-Konzentration bei Expression von einem 416_{NP}-Plasmids höher als unter physiologischen Bedingungen. Zur Überprüfung wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem 20 μg Gesamtzellextrakt von WT und $\Delta apd1$ transformiert mit 416_{NP}APD1 aufgetragen wurden. Die Apd1-Bande in Abbildung 4-6 **B** wies in der Spur des Zellextraktes von $\Delta apd1$ mit der Plasmidkopie von *APD1* eine höhere Intensität auf als in jener des WT.

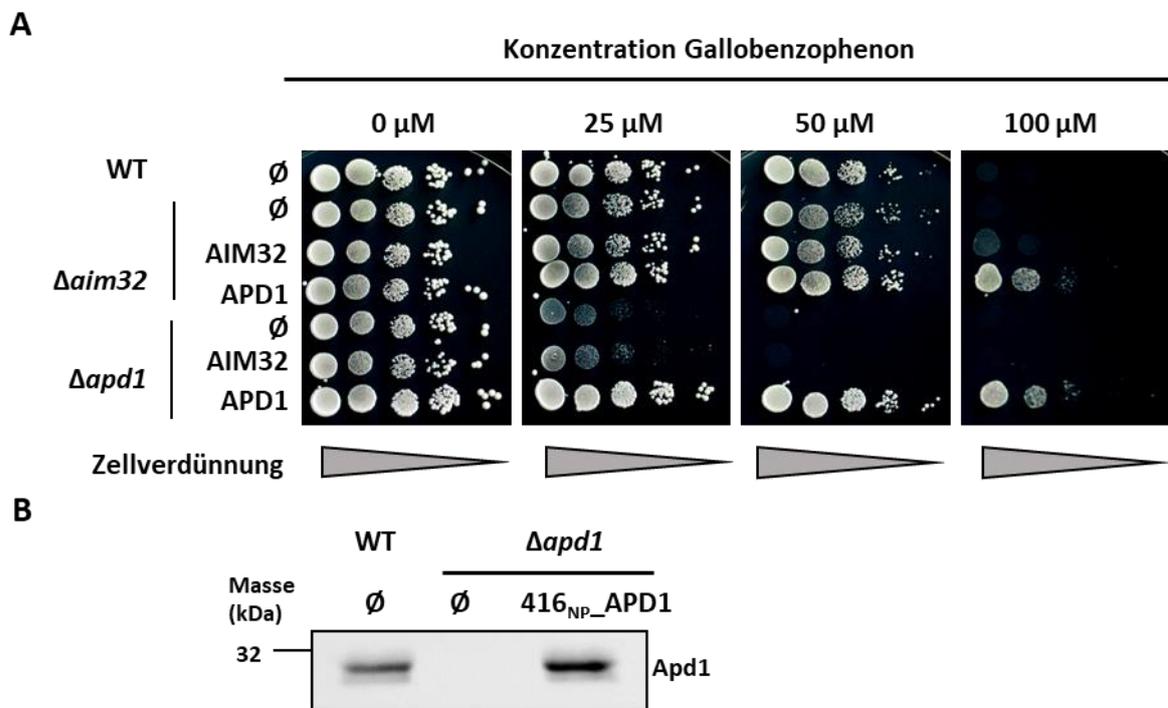


Abbildung 4-6: Tüpfeltest von WT, $\Delta apd1$ und $\Delta aim32$ in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Gallobenzophenon. A WT oder die Deletionsstämme wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, die die Gene für *APD1* resp. *AIM32* enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Gallobenzophenon, in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert. **B** Immunoblot. Aufgetragen wurden 20 μg Gesamtproteinkonzentration des Zellextraktes von WT resp. $\Delta apd1$ transformiert mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Apd1. Mittels Western-Blot und Immundetektion wurde das Protein von Interesse mit spezifischen Antikörpern detektiert.

4.2.2 Chemogenomischer Screen für Aim32

Mit Hilfe der von Lee *et al.* veröffentlichten Daten wurde ebenfalls nach einer Substanz, die einen Wachstumsphänotyp für $\Delta aim32$ verursacht, gesucht. Abbildung 4-8 zeigt, die

FD Scores von $\Delta aim32$ inkubiert mit verschiedenen Chemikalien. Im Vergleich zu jenen Werten des $\Delta apd1$ -Screens sind weniger Verbindungen gefunden worden die starke Wachstumsänderungen erzeugten und ebenfalls keine so hohe Inhibierung des Wachstums wie bei $\Delta apd1$ durch 86 μM Gallobenzophenon verzeichnet. Die höchste Wachstumsinhibition wird durch ein fluoriertes Methansulfonamid-Derivat (**1** in Abb. 4-7), welches nicht kommerziell erhältlich war, erreicht. Die zweithöchste Wachstumsinhibition wird durch das Indolalkaloid Harmalin (**2** in Abb. 4-7), mit einer Konzentration von 0,73 μM , verursacht.

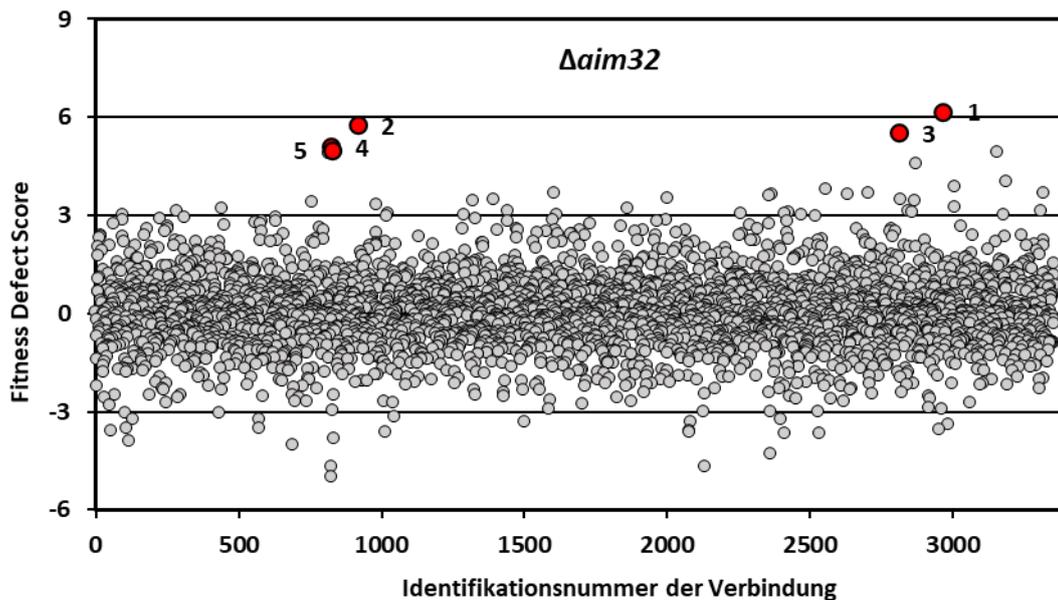


Abbildung 4-7: Effekt von 3356 Substanzen auf das Wachstum des $\Delta aim32$ -Stammes. Die Daten wurden von der Homepage (<https://www.ggcnlab.com/hip-hop>) heruntergeladen und verarbeitet. **1:** *N*-(3,4-Difluorphenyl)-1-(4-methylphenyl)methansulfonamid, **2:** Harmalin, **3:** *N*-[1-(2-Methylphenyl)benzimidazol-5-yl]thiophen-2-carboxamid, **4:** *N*-[4-(1-Adamantyl)-1,3-thiazol-2-yl]-1-(4-octoxyphenyl)methanimin, **5:** Ethyl 2-[2-[[2-(4-bromophenoxy)acetyl]amino]-1,3-thiazol-4-yl]acetat.

Zur Analyse des Effektes dieser Chemikalie auf den Deletionsstamm $\Delta aim32$, wurde ein Leerplasmid sowie ein Plasmid mit einer Kopie des Gens unter der Kontrolle des natürlichen Promotors transformiert. Eine WT-Kontrolle mit transformiertem Leerplasmid wurde mitgeführt. Nach Vorwachsen wurden die Hefezellen auf Agarplatten mit unterschiedlich hoher Harmalin-Konzentration sowie einer Platte ohne diese Substanz aufgetragen. Die im High-Throughput Screen erzeugte synthetische Letalität von Harmalin konnte durch dieses spezifische Experiment nicht reproduziert werden. Es wurde von Beginn an mit einer über sechsmal höhere Konzentration der Chemikalie, als im HIPHOP-Screen, gearbeitet, die bis auf das 250-fache erhöht wurde, jedoch konnte keine Differenzierung des Wachstumsverhaltens von $\Delta aim32$ im Vergleich zu WT festgestellt werden. Abbildung 4-8 verdeutlicht den geringen Wachstumseffekt von Harmalin auf die in diesem Screen verwendeten Stämme. Die anderen Chemikalien der Hits des Screens (**3:** *N*-[1-(2-Methylphenyl)benzimidazol-5-yl]thiophen-2-carboxamid, **4:** *N*-[4-(1-Adamantyl)-1,3-thiazol-2-yl]-1-(4-octoxyphenyl)methanimin, **5:**

Ethyl 2-[2-[[2-(4-bromophenoxy)-acetyl]amino]-1,3-thiazol-4-yl]acetat) für den $\Delta aim32$ -Stamm standen für Experimente nicht zur Verfügung, da sie nicht kommerziell erhältlich waren.

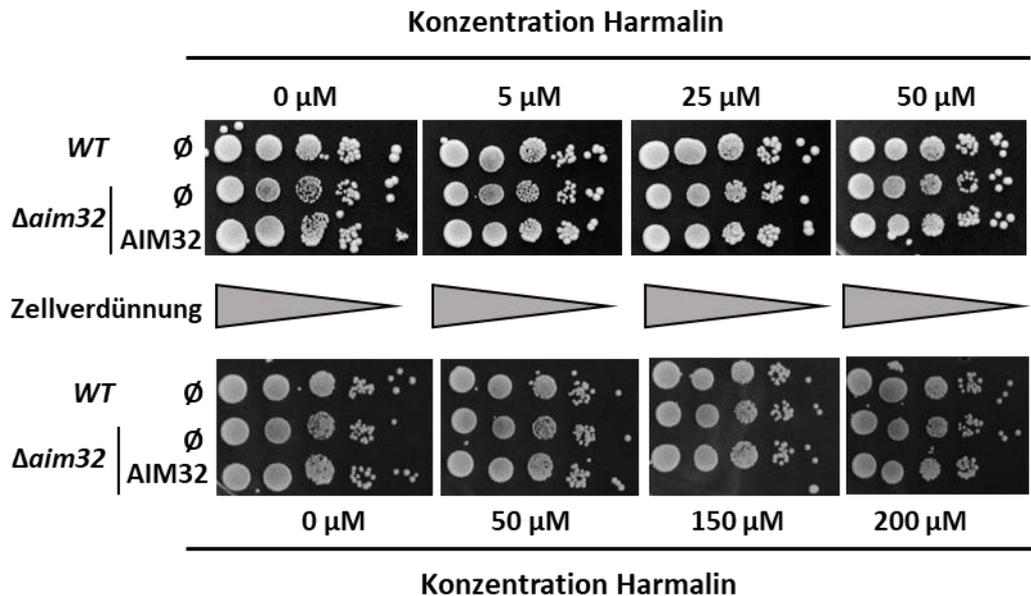


Abbildung 4-8: Tüpfeltest von WT und $\Delta aim32$ in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Harmalin. WT oder der Deletionsstamm wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmid, das das Gen für *AIM32* enthielt, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Harmalin, in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Dennoch konnte durch Nutzung der chemogenomischen Datenbank von Lee *et al.* Wachstumsbedingungen für den $\Delta aim32$ -Stamm gefunden werden, die zu einer synthetischen Letalität führten, die aber durch eine Plasmidkopie des Gens wieder aufgehoben werden kann. Ein möglicher Ansatz solche Wachstumsbedingungen für den $\Delta aim32$ -Stamm zu generieren konnte aus einer Studie über das Malariamedikament Primaquin von Lalève *et al.* abgeleitet werden. Aus den publizierten Daten geht hervor, dass $\Delta sod2$ -Hefezellen, welche eine Sensitivität gegenüber dieser Substanz besitzen, durch die Überexpression zweier Gene, *AIM32* resp. *MCR1*, geschützt werden (Lalève *et al.*, 2016). Wenn *Aim32* in einer intermolekularen Beziehung zu *Sod2* steht, wäre es möglich, durch Deletion beider Gene eine synthetische Letalität zu erzeugen. Im Zuge dessen wurde das Gen *SOD2* aus WT und $\Delta aim32$ mittels Insertion einer Genkassette aus dem Genom deletiert. Da $\Delta aim32$ bereits einen heterologen Marker, die *Nat*-Kassette, trägt, musste zur Generierung des Doppeldeletionsstammes ein auxotropher Marker herangezogen werden. Die Wahl fiel auf die Insertion der *HIS3MX6*-Kassette (Janke *et al.*, 2004), die dem *HIS5*-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe*, welches fähig ist einen *HIS3*-auxotrophen *S. cerevisiae*-Stamm zu komplementieren, entspricht. Diese Kassette besteht aus drei verschiedenen Genabschnitten und wurde mittels PCR aus dem Plasmid pYM15 amplifiziert. An der 5'-Seite befindet sich der Promotor unter dessen Kontrolle

Ergebnisse

die Expression des darauffolgenden *HIS5*-Gens steht und an der 3'-Seite schließt sie durch den Terminator ab. Zur Insertion wurden Primer, die 50 bp komplementär mit dem auszutauschenden Genabschnitt sind, verwendet (vgl. Abb. 4-9 A, rote Markierung).

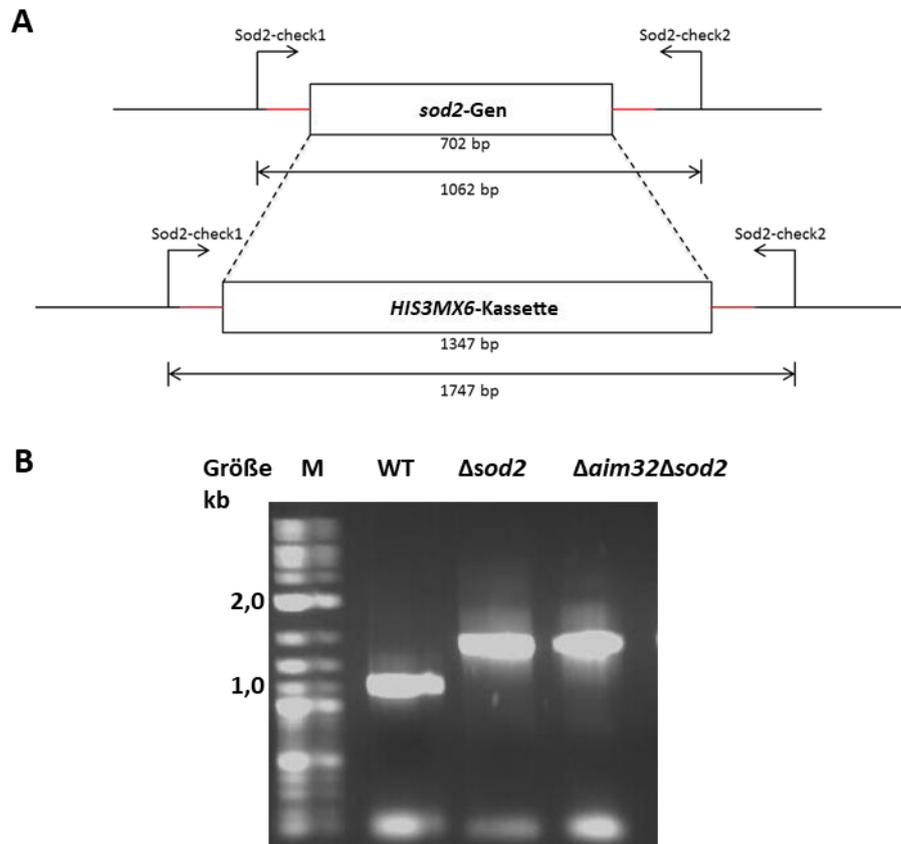


Abbildung 4-9: Deletion von *SOD2* aus der genomischen DNA von WT und $\Delta aim32$. **A** Schema der chromosomalen DNA vor und nach der Insertion der Kassette. **B** Agarosegelelektrophorese der mit chromosomaler DNA amplifizierten PCR-Fragmente zur Verifizierung der Deletionsstämme.

Die Überprüfung der korrekten Insertion der Kassette innerhalb der genomischen DNA erfolgte nach chromosomaler DNA-Präparation und PCR mit Primern, die vor und nach dem Zielgen platziert sind. Abbildung 4-9 A zeigt eine schematische Darstellung des Austausches der beiden DNA-Fragmente. Das PCR-Produkt des WT sollte 1062 bp lang sein und jenes des $\Delta sod2$ -Stammes 1747 bp. Der erfolgte Austausch der DNA-Fragmente kann so durch Agarosegelelektrophorese visualisiert werden. Das analytische Agarosegel in Abbildung 4-9 B zeigt den Größenunterschied der amplifizierten Genabschnitte in WT und den $\Delta sod2$ -Stämmen. Zur Etablierung des neuen Deletionsstammes $\Delta sod2$ und der Doppeldeletionsmutante $\Delta aim32\Delta sod2$ wurde nun das Wachstumsverhalten unter Standardlaborbedingungen überprüft. Als ersten Schritt wurde eine Wachstumskurve über 9 h erstellt, die das Wachstumsverhalten der neuen Deletionsmutanten mit jenem von WT und $\Delta aim32$ vergleicht. Zur Kultivierung im 50 ml-Maßstab wurden Hefezellen

über Nacht in SC-Glu-Medium herangezogen und am nächsten Morgen zu $OD_{600} = 0,1$ in frischem Medium verdünnt.

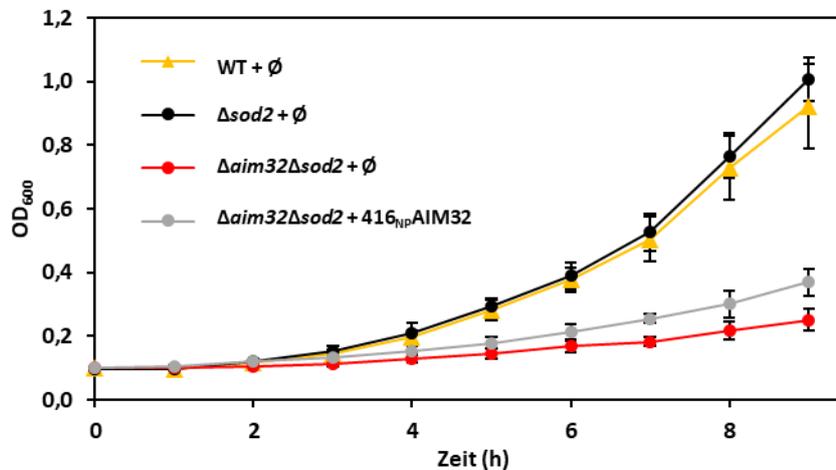


Abbildung 4-10: Wachstumskurve von WT, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$. WT, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid resp einem Plasmid, das eine Kopie des Gens *AIM32* unter der Kontrolle des endogenen Promotors trägt, transformiert. Nach Vorkultivierung über Nacht wurden die verwendeten Stämme zu $OD_{600} = 0,1$ verdünnt. Die Hefezellen wurden in glukosehaltigem SC-Medium kultiviert. Das Wachstum wurde über 9 h mittels stündlicher OD_{600} -Messung verfolgt ($n = 3$).

Nach der Vorkultivierung über Nacht waren alle Nährstoffe verbraucht. WT und $\Delta sod2$ befinden sich bis zu drei Stunden nach Inokulation in der *Lag*-Phase (Latenz Phase). Nach Anpassung im Medium findet der Übergang in die *Log*-Phase (Exponentielle Phase) statt. Die Verdopplungszeit bleibt in dieser Phase über mehrere Generationen konstant. Innerhalb dieser Phasen wurde stündlich das Wachstum der Zellen anhand ihrer OD_{600} bestimmt. Der Verlauf der Kurve in Abbildung 4-10 macht deutlich, dass die Deletion von *SOD2* keinen erheblichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten im Vergleich zum WT hatte. Die gleichzeitige Deletion von *AIM32* und *SOD2* resultierte jedoch in einem starken Wachstumsphänotyp, der durch die Transformation einer Plasmid-getragenen Kopie von *AIM32* nur unvollständig komplementiert werden kann.

Tabelle 4-1: Verdopplungszeiten der verschiedenen Stämme ($n = 3$).

| Stamm + Plasmid | Verdopplungszeit (h) |
|---|----------------------|
| WT + ∅ | $2,22 \pm 0,11$ |
| $\Delta sod2$ + ∅ | $2,18 \pm 0,09$ |
| $\Delta aim32\Delta sod2$ + ∅ | $5,46 \pm 0,28$ |
| $\Delta aim32\Delta sod2$ + 416 _{NP} AIM32 | $4,17 \pm 0,18$ |

Ergebnisse

Dieser Effekt verdeutlicht sich, wenn die Daten der Wachstumsmessung zur Berechnung der Verdopplungszeit (Tabelle 4-1) herangezogen werden. $\Delta aim32\Delta sod2$ mit transformierten Leerplasmid benötigt ca. 2,5-mal mehr Zeit sich zu verdoppeln als WT-Zellen. Dieser Effekt kann nicht durch eine Plasmid-getragene Kopie von *AIM32* vollständig komplementiert werden. Hier ist die Verdopplungszeit fast doppelt so lange im Vergleich zu WT.

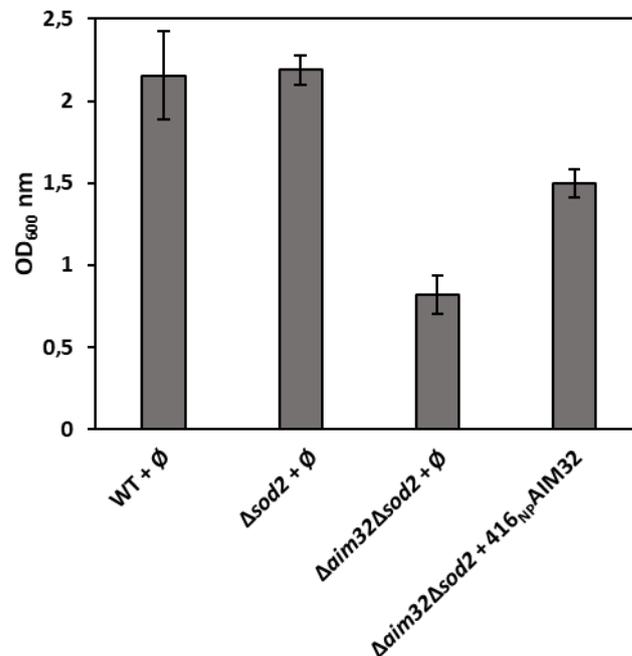


Abbildung 4-11: End-OD₆₀₀: von WT, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$. Nach der Prozedur beschrieben unter Abb. 4-10 beschrieben, wurden die Zellen für 15 h weiter kultiviert und der End-OD₆₀₀ gemessen (n = 3).

Dies wird auch aus den End-OD₆₀₀-Werten aus Abbildung 4-11 ersichtlich. WT und $\Delta sod2$ wachsen bis zu einer OD₆₀₀ von über 2, wohingegen $\Delta aim32\Delta sod2$ mit Leerplasmid nur einen Wert von 0,8 erreicht. Durch Komplementierung des Stammes mit einer Plasmidkopie von *AIM32* kann eine End-OD₆₀₀ auf 1,5 beobachtet werden. Die Zelldichte des Stammes hat sich im Vergleich zum Leerplasmid verbessert, ist aber immer noch um 30% geringer als bei WT- oder $\Delta sod2$ -Zellen. Zur weiteren Charakterisierung der *SOD2*-Deletionsstämme wurde ihre Lebensfähigkeit auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Es wurden Glukose als fermentative und Galaktose und Glycerin als nicht-fermentative Kohlenstoffquelle gewählt. Ethanol wurde nicht in die Wahl der Kohlenstoffquelle miteinbezogen, da in der Literatur eine Sensitivität von $\Delta sod2$ für Wachstum auf Ethanol gezeigt wurde (Costa *et al.*, 1993). Für weitere Experimente wurden Bedingungen benötigt, die einen Phänotyp durch die Deletion von *AIM32* verursachen.

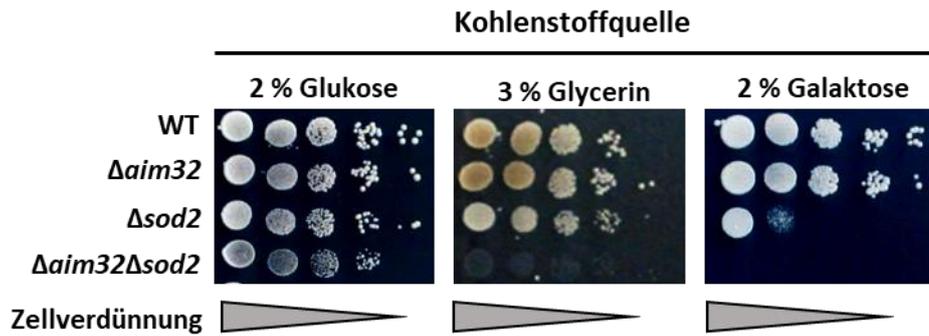
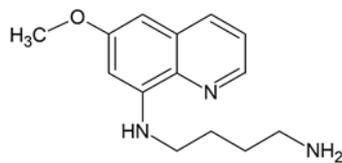


Abbildung 4-12: Tüpfeltest auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Nach Vorwachstum in flüssigem glukosehaltigem SC-Medium wurden am nächsten Tag WT, $\Delta aim32$, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$ auf SC-Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen in einer seriellen 1:10 Verdünnung, aufgetragen. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

WT- und $\Delta aim32$ -Zellen waren fähig Glukose, Glycerin und Galaktose zu verstoffwechseln. Der $\Delta sod2$ -Stamm war in der Lage auf Glukose und Glycerin zu wachsen, jedoch zeigte sich auf SC-Galaktose-Platten ein signifikantes Wachstumsdefizit. Die Doppeldeletionsmutante zeigte bereits auf der SC-Glukose-Agarplatte ein leichtes Wachstums-defizit gegenüber WT-Zellen und ist nicht lebensfähig auf SC-Galaktose- oder SC-Glycerin-Medium. Aus diesem Grund konnte kein Tüpfeltest nach den Bedingungen von Lalève *et al.* durchgeführt werden. Es wurde aufgrund der Inviabilität von $\Delta aim32\Delta sod2$ auf SC-Platten mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle mit Glukose als Kohlenstoffquelle gearbeitet.



Konzentration Primaquin

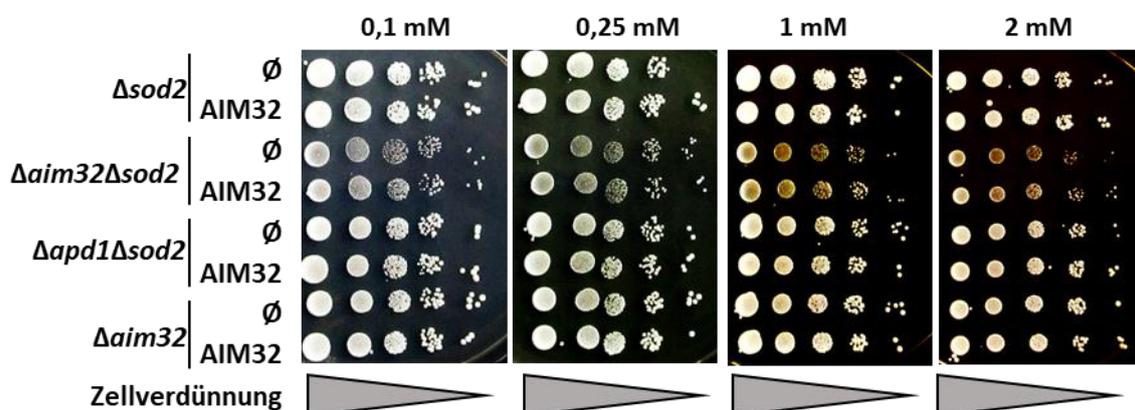


Abbildung 4-13: Tüpfeltest auf SC-Glukose-Platten mit unterschiedlicher Primaquin Konzentration. $\Delta aim32$, $\Delta sod2$, $\Delta aim32\Delta sod2$ und $\Delta apd1\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmid, welches das Gen für Aim32 enthielt, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Primaquin, in den angegebenen

Ergebnisse

Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert. Oben links ist die Strukturformel von Primaquin dargestellt.

Abbildung 4-13 zeigt das Wachstumsverhalten der verschiedenen Stämme unter dem Einfluss von 0,1–2 mM Primaquin. Unter den gewählten Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle konnte für keinen der ausgewählten Stämme ein signifikantes Wachstumsdefizit festgestellt werden. Der bei Lalève *et al.* beschriebene Effekt des Medikamentes auf $\Delta sod2$ könnte somit auch auf die verwendete Kohlenstoffquelle zurückzuführen sein. Für weitere Experimente ist ein *AIM32*-defizienter Stamm von Nöten, daher wurde mit diesem Konzept nicht weitergearbeitet.

Da mit dem Redoxpotentiator Gallobenzophenon ein signifikanter Phänotyp für den Stamm $\Delta apd1$ erzielt wurde, wurde auch der Einfluss auf $\Delta aim32\Delta sod2$ untersucht.

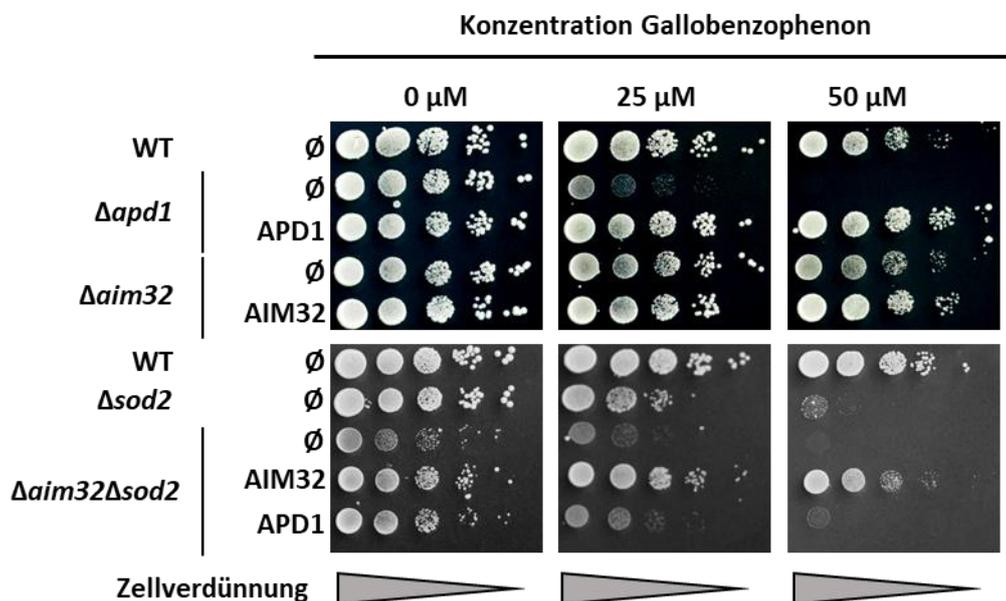


Abbildung 4-14: Tüpfeltest von $\Delta aim32\Delta sod2$ mit Gallobenzophenon. WT, $\Delta apd1$, $\Delta aim32$, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Aim32 resp. Apd1 enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Gallobenzophenon in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

In Abbildung 4-14 zeigen WT, $\Delta apd1$ und $\Delta aim32$ transformiert mit einem Leerplasmid oder einer Plasmidkopie von *AIM32* resp. *APD1* das schon bekannte Wachstumsverhalten auf einer glukosehaltigen SC-Agarplatte mit Gallobenzophenon (vgl. Abb. 4-6). WT und $\Delta aim32$ sind bis zu einer Konzentration von 50 μ M in der Agarplatte lebensfähig, nicht aber $\Delta apd1$. Diese Letalität konnte durch Transformation eines Plasmides mit einer Kopie des Gens gerettet werden. Wurde *SOD2* aus dem Genom deletiert, führte dies zu einem ähnlichen Phänotyp. Die Doppeldeletionsmutante $\Delta aim32\Delta sod2$ zeigte wie $\Delta apd1$ ab einer Gallobenzophenon Konzentration von 25 μ M einen starken Wachstumsphänotyp, der bei 50 μ M Gallobenzophenon in kompletter Letalität der Zellen resultierte. Jene konnte nur durch eine Kopie von *AIM32*, nicht aber von *APD1* komplementiert werden.

Somit wären die Bedingungen für weitere Screens mit dem $\Delta aim32\Delta sod2$ -Stamm gefunden, jedoch zeigt auch $\Delta sod2$ einen Phänotyp. Dieser lässt die abschließende Beurteilung, ob die Wachstumsinhibition durch die Deletion von *SOD2* oder *AIM32* verursacht wird, nicht zu. Eine weitere potenzielle Substanz wurde in Pyrogallol gefunden. Die Struktur der Chemikalie hat den Phenolring mit Gallobenzophenon gemeinsam und stand im Chemikalienbestand des Labors zur Verfügung.

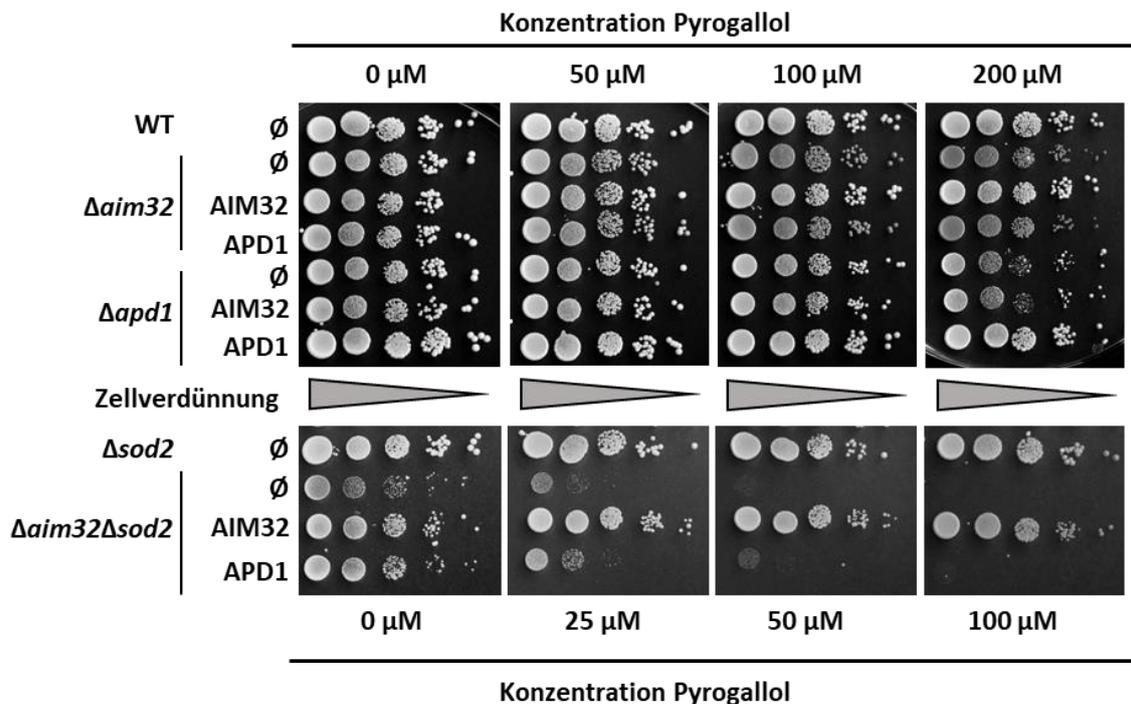


Abbildung 4-15: Tüpfeltest $\Delta aim32\Delta sod2$ auf SD-Agarplatten mit und ohne Pyrogallol. WT, $\Delta apd1$, $\Delta aim32$, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Aim32 resp. Apd1 enthielten, transformiert. Serielle 10-fache Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Pyrogallol in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Nach Vorkultivierung über Nacht wurden WT, $\Delta aim32$, $\Delta apd1$, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$, transformiert mit 416-Plasmiden mit einer Kopie von *APD1* resp. *AIM32* oder ohne Gen auf SC-Glu-Agarplatten mit variabler Pyrogallol Konzentration getüpfelt. In Abbildung 4-15 ist das Wachstumsverhalten der Stämme auf Festmedium dargestellt. WT, $\Delta aim32$ und $\Delta apd1$ waren fähig auf Agarplatten mit Konzentration von 100 μM Pyrogallol ohne Inhibition zu wachsen. Bei einer Konzentration von 200 μM zeigte sich ein schwacher Wachstumsphänotyp bei $\Delta aim32$ und $\Delta apd1$, der jedoch durch eine Plasmidkopie des Deletierten Gens komplementiert werden konnte. Das Wachstum der Einzeldelentionsmutante $\Delta sod2$ zeigte unter Einfluss von Pyrogallol, im Gegensatz zu Gallobenzophenon, keine Beeinträchtigung. Die Doppeldelentionsmutante $\Delta aim32\Delta sod2$ zeigte zwar schon auf der Kontrollplatte eine leichte Wachstumsinhibition, welche aber bei steigender Pyrogallol-Konzentration weiter zunahm. Mit transformiertem Leerplasmid war bei 25 μM nur noch ein minimales Wachstum feststellbar und 50 μM

führen zum Zelltod. Durch Transformation eines Plasmids mit einer Kopie von *AIM32* konnte der Wachstumsphänotyp auf Festmedium vollständig komplementiert werden.

Somit konnten in diesem Teil der Arbeit Bedingungen generiert werden, unter denen die bei Standardlaborbedingungen nicht essenziellen Gene *AIM32* und *APD1* zur Viabilität von *S. cerevisiae* von Nöten sind.

4.3 Identifizierung der Fe/S-Clusterliganden *in vivo*

Aim32 und *Apd1* aus *S. cerevisiae* sind potenzielle Fe/S-Proteine. Bioinformatische Studien zeigten die Similarität der C-terminalen Domäne der beiden Proteine zu TLF's. *Apd1* besitzt insgesamt neun Cysteine, von denen drei in der C-terminalen TLF-artigen Domäne lokalisiert sind. Das Protein *Aim32* verfügt über fünf Cystein-Reste, wobei sich auch hier drei in der C-terminalen Domäne befinden. Im Sequenzvergleich sticht hervor, dass die Cysteine von *Apd1* an Position 207 und 216 und jene von *Aim32* an Position 213 und 222 den Cysteinen von *A. aeolicus* TLF an Position 10 und 23 entsprechen (Abb. 4-16).

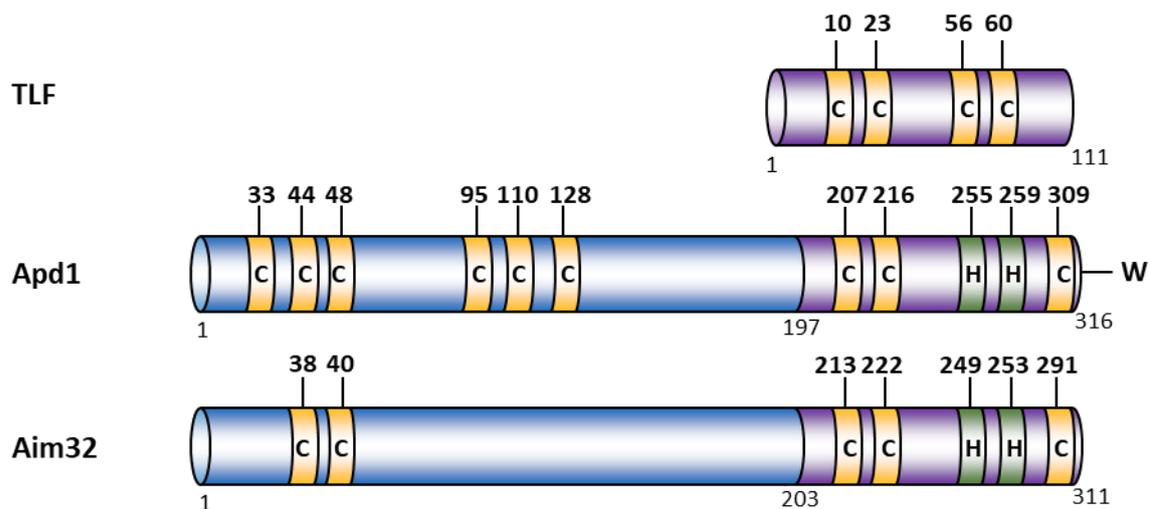


Abbildung 4-16: Schematischer Sequenzvergleich des TLF (*A. aeolicus*) mit *Aim32* und *Apd1*. Hervorgehoben sind die Clusterliganden des TLF sowie die potenziellen Liganden in *Aim32* und *Apd1*.

Die beiden anderen Fe/S-Cluster koordinierenden Cysteine 56 und 60 in *A. aeolicus* TLF entsprechen aber in *Aim32* resp. *Apd1* überraschenderweise Histidin-Resten. Durch heterologe Genexpression in *E. coli* konnte in beiden Proteinen ein [2Fe-2S]-Cluster nachgewiesen werden (Stegmaier, 2017). Die spektroskopische Untersuchung von *Apd1*-Varianten, in denen die Histidine 255 und 259 zu Cysteinen mutiert sind, konnten jene als Liganden des Fe/S-Clusters *in vitro* identifizieren (Stegmaier *et al.*, 2019). Die Identifizierung *in vivo* und die Analyse der Liganden des [2Fe-2S]-Clusters von *Aim32* sind bisher noch nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen gewesen und werden in dieser Arbeit vorgenommen. Die Wirkungsweise von Fe/S-Proteinen steht oft im direkten Zusammenhang mit dem Fe/S-Cluster. Durch die Phänotypisierungsexperimente

beschrieben in Kapitel 4.2 konnten Bedingungen gefunden werden, die den Nachweis der potenziellen Liganden des [2Fe-2S]-Clusters der beiden Proteine *in vivo* ermöglichte.

4.3.1 Apd1

In der Dissertation von Frau Dr. Kathrin Stegmaier wurden mittels spektroskopischer Untersuchungen von rekombinanten Apd1-Varianten die Histidine 255 und 259 als Liganden des [2Fe-2S]-Clusters identifiziert. Tang *et al.* veröffentlichten Studien, in denen die N-terminalen Cysteine an Position 44 und 48 als weitere potenzielle Liganden des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 aufzeigen. Gegen diese These spricht allerdings das UV/Vis-Spektrum dieser Apd1-Variante, das die typischen Maxima eines [2Fe-2S]-Clusters aufweist und sich im Vergleich zum WT Spektrum nicht verändert hat (Tang *et al.* 2015). Zur Identifizierung der Cysteinliganden *in vivo* wurden im Zuge dieser Arbeit Varianten von *APD1* auf einem 416-Plasmid angefertigt, bei denen alle Cystein-Reste und zwei Histidin-Reste als potenziell Fe/S-Cluster koordinierende Aminosäuren mutiert wurden. Nach Transformation der Plasmide in $\Delta apd1$ konnte die Funktionalität der Mutanten mittels Überprüfung der Viabilität der Hefezellen unter Apd1-essenziellen Bedingungen festgestellt werden.

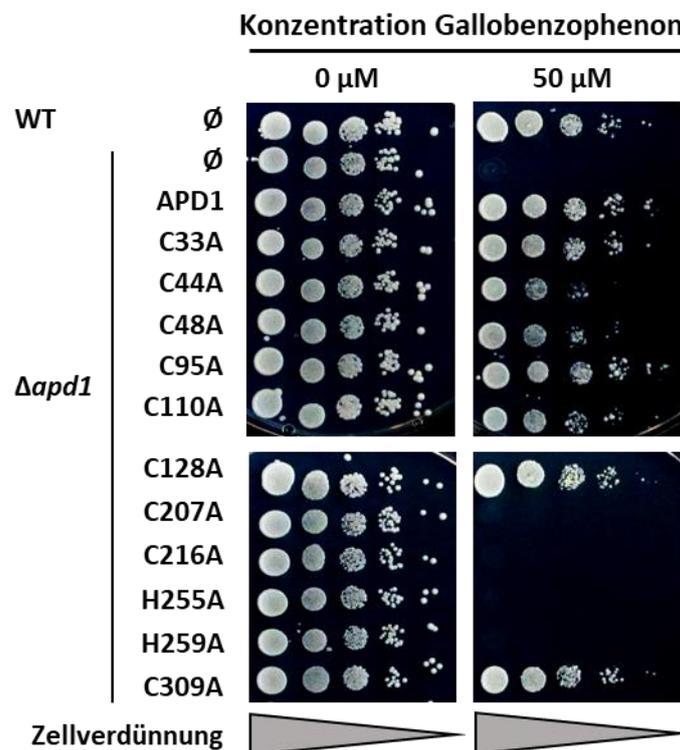


Abbildung 4-17: Tüpfeltest zur Identifizierung der Clusterliganden in Apd1. WT und $\Delta apd1$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Gallobenzophenon in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Die Deletion von *APD1* resultierte in einer Letalität der Zellen auf SC-Glu-Agarplatten mit 50 μM Gallobenzophenon, die aber durch eine Plasmid-Kopie des Gens, wie bereits unter 4.2.1 gezeigt, komplementiert werden konnte. Zur Identifikation der Clusterliganden wurden die neun Cysteine des Proteins und die Histidine an Position 255 und 259 jeweils zu Alanin mutiert. Wurde eine Aminosäure mutiert, die keine Rolle an der Bindung des Fe/S-Clusters übernimmt, änderte sich das Wachstumsverhalten der Zellen auf glukosehaltigen SC-Agarplatten mit 50 μM Gallobenzophenon gegenüber der Kontrollplatte nicht. Wurden die Cysteine 207 oder 216 sowie die Histidine 255 und 259 zu Alaninen mutiert, resultierte dies in einem Phänotyp, der der Deletion des Gens gleicht. Die Cysteine an Position 33, 95, 110 und 128 im N-terminalen Bereich hatten keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum von Apd1 in diesem Screen (Abb. 4-17). Wurden die von Tang *et al.* publizierten, potenziellen Clusterliganden C44 und C48 zu Alanin mutiert, resultierte dies zwar einem leichten Wachstumsphänotyp, aber nicht in gleicher Stärke wie die Deletion der C-terminalen Cysteine an Position 207 und 216. Im Anschluss wurden, neben den von Frau Dr. Kathrin Stegmaier identifizierten Histidinen, auch noch Varianten jener Histidine gefertigt, die im Sequenzvergleich von Aim32 und Apd1 konserviert sind. In Apd1 sind dies die Histidine an Position 66, 92 und 209. Die Mutation der Histidine 66 und 92 zu Alanin hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von Δapd1 auf SC-Glu-Agarplatten mit 50 μM Gallobenzophenon. Die Mutation H209A hingegen führte einer Inviabilität von Δapd1 unter diesen Bedingungen. Dieser Effekt könnte eine indirekte Folge einer Strukturänderung im Bereich der koordinierenden Cysteine an Position 207 und 216 sein (Abbildung 4-18).

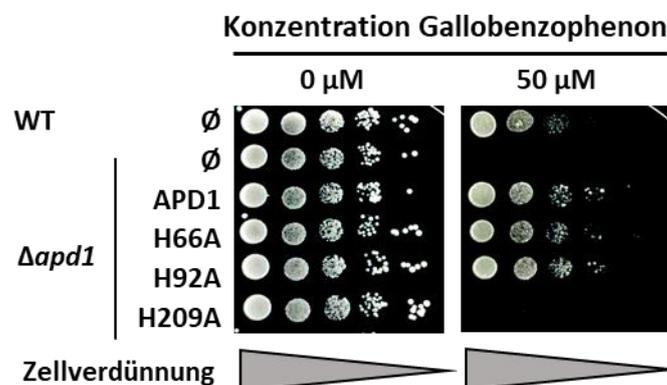


Abbildung 4-18: Tüpfeltest für Mutanten der konservierten Histidin-Reste in Apd1. Vorgehensweise siehe vorherige Abbildung.

4.3.2 Aim32

Zur Identifizierung der Clusterliganden von Aim32 *in vivo* wurden die Kodons für die potenziell ligierenden Aminosäuren auf Plasmiden zu Alanin-Kodons mittels gezielter Mutagenesen umgewandelt und nach Transformation des Plasmids auf ihre Funktion überprüft. Hierbei wurde jedes Cystein und die Histidine 249 und 253 auf einem 416-Plasmid, auf dem Aim32 unter der Kontrolle des endogenen Promotors kodiert ist,

mutiert. Nach Transformation in $\Delta aim32\Delta sod2$ resp. die Kontrollen WT und $\Delta sod2$ zeigt Abbildung 4-19 das Ergebnis des Tüpfeltestes unter Aim32-essenziellen Bedingungen, nach Vorkultivierung in flüssigem, glukosehaltigem SC-Medium. WT und $\Delta sod2$ zeigten keine Wachstumsinhibierung auf Agarplatten mit 100 μM Pyrogallol. Die Doppeldeletionsmutante $\Delta aim32\Delta sod2$ hingegen war unter diesen Bedingungen nicht lebensfähig. Diese synthetische Letalität konnte jedoch durch eine Plasmid-getragene Kopie des Gens komplementiert werden. Wird nun ein Clusterligand zu Alanin mutiert, sollte dies erneut in einer synthetischen Letalität des Doppeldeletionsstammes resultieren. Die Mutation an Position 38, 40 resp. 291 hatte keinen oder nur geringen Einfluss auf das Wachstum von $\Delta aim32\Delta sod2$. Wurden hingegen die Cysteine 213 und 222 oder die Histidine 249 und 253 zu Alaninen mutiert, resultierte dies im gleichen Phänotyp, als wäre ein Plasmid ohne AIM32-Genkopie transformiert worden. Die Cysteine an Position 207 und 216 sowie die Histidine an Position 249 und 253 scheinen somit essenziell für die Funktionalität des Proteins zu sein und können als potenzielle Clusterliganden angenommen werden.

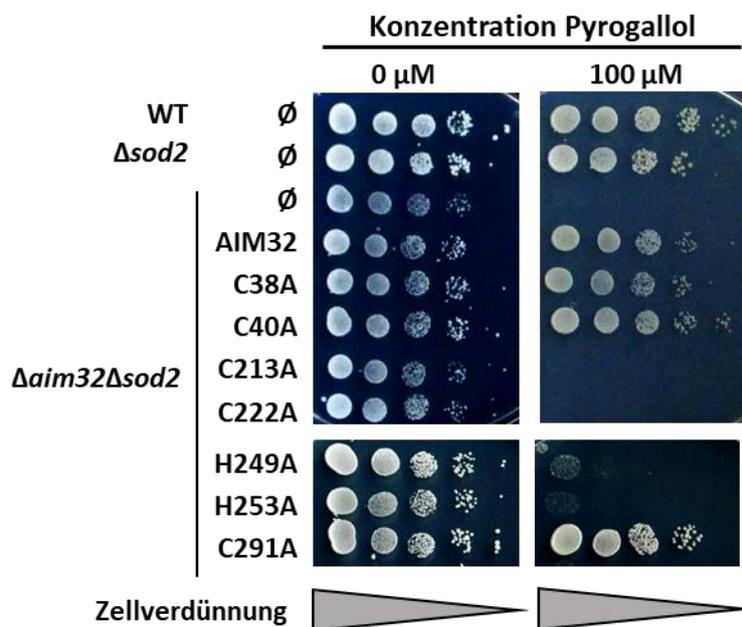


Abbildung 4-19: Tüpfeltest zur Identifizierung der Clusterliganden von Aim32. WT, $\Delta sod2$ und $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Aim32 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Pyrogallol in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Zusätzlich zu den Histidinen an Position 249 und 253 im Protein wurden auch Alanin-Varianten der restlichen Histidine gefertigt, die im Sequenzvergleich von Aim32 und Apd1 konserviert sind. In der Aminosäuresequenz von Aim32 sind dies die Histidine an Position 62, 90 und 215. Auf SC-Glu-Agarplatten mit 100 μM Pyrogallol war weder das Histidin an Position 62 noch 90 essenziell für das Wachstum, sind also nicht an der Koordination des [2Fe-2S]-Clusters beteiligt. Die Mutation H215A verursachte einen

Wachstumsphänotyp, der aber wie bei H209A bei Apd1 auf eine Strukturänderung der Clusterbindedomäne in der Nähe der Cysteine 213 und C222A zurückzuführen sein könnte (Abb. 4-20). Dieses Ergebnis bekräftigt die Rolle der Histidine 249 und 253 an der Clusterbindung.

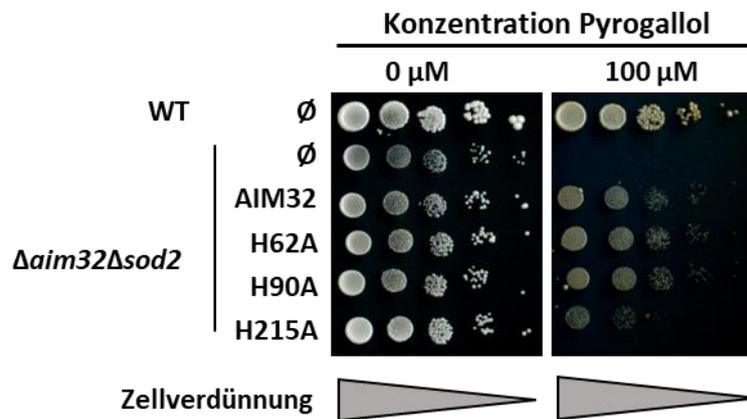


Abbildung 4-20: Tüpfeltest für Mutanten der konservierten Histidin-Reste in Aim32. Vorgehensweise siehe vorherige Abbildung.

4.3.3 Substitution der Histidin-Liganden zu Cysteinen *in vivo*

Die Substitution der Histidin-Liganden zu Cysteinen in Aim32 und Apd1 resultiert in einer Änderung der spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften der rekombinant aus *E. coli* gereinigten Proteine, da durch die Mutation eines Histidins zu Cystein MitoNEET- und durch die Mutation beider Histidine in Cysteine Ferredoxin-artige Cluster generiert werden (Kap. 4.7 und Stegmaier *et al.*, 2019). Durch Expression dieser Mutanten in *S. cerevisiae* sollte die Bildung und Funktion dieser MitoNEET- und Ferredoxin-artigen Cluster bei Apd1 *in vivo* nachgewiesen werden. Auf einem 416-Plasmid unter der Kontrolle des natürlichen Promotors wurden die Histidine 255 und 259 von Apd1 entweder einzeln oder zusammen zu Cysteinen mutiert. Nach Transformation in $\Delta apd1$ und Vorkultivierung in SC-Glu-Medium wurden die Zellen auf Agarplatten mit und ohne 50 μM Gallobenzophenon getüpfelt. Das Wachstum auf der Platte wurde nach 2 Tagen verglichen. $\Delta apd1$ mit transformierter WT-Kopie von Apd1 zeigte keinen Wachstumsphänotyp in Gegenwart von 50 μM Gallobenzophenon im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Zellen mit transformierten Leerplasmid oder einer Alanin-Mutante sind hingegen unter diesen Bedingungen nicht lebensfähig. Dies gilt jedoch auch für die Cystein-Mutanten (Abb. 4-21). Durch die Zugabe von 50 μM Gallobenzophenon werden Apd1-essenzielle Bedingungen geschaffen und nur Zellen mit einem funktionsfähigem Apd1 können überleben.

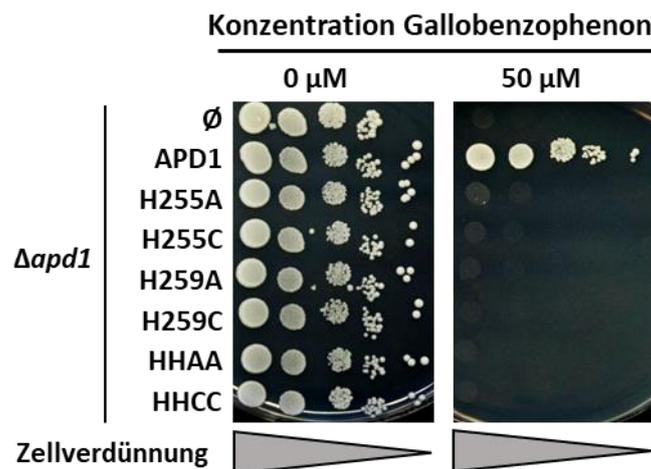


Abbildung 4-21: Tüpfeltest für Histidin zu Cystein-Varianten von Apd1. WT und $\Delta apd1$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in glukose-haltigem SC-Medium wurden auf SC-Agarplatten mit Glukose und Gallobenzophenon in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Für die Letalität der Zellen mit transformierten Cystein-Mutanten ergeben sich zwei potenzielle Erklärungen. Zum einem wirkt sich der Austausch eines Liganden auf das Redoxpotential aus. Somit kann der Cluster von Apd1 möglicherweise nicht mehr reduziert werden und der Elektronentransport, welcher einer der häufigsten Aufgaben von Fe/S-Proteinen darstellt, wäre unterbrochen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der Cluster *in vivo* in Hefe, im Gegensatz zur heterologen Expression in *E. coli*, labil ist oder nicht eingebaut wird, das Protein also in seiner Apoform vorliegt und somit seine Funktionalität verliert. Zur Überprüfung welche der Hypothesen vorliegt, muss der Einbau des [2Fe-2S]-Clusters in $\Delta apd1$ überprüft werden. In unserem Arbeitskreis wurde eine Methode etabliert, Fe/S-Cluster *in vivo* mittels ESR-Spektroskopie nachzuweisen (siehe Kap. 4.6). In WT-Zellen ist es nicht möglich das Apd1 ESR-Signal zu detektieren, da die Kopiezahl von Apd1 mit ca. 3000 Molekülen pro Zelle (Breker *et al.*, 2013) unter dem Detektionsminimum des Spektrometers liegt. Zur Überexpression von APD1 und dessen Varianten in Hefe wurden aus diesem Grund Konstrukte gefertigt, die die Expression eines Gens unter die Kontrolle des starken *FBA1*-Promotors stellen. *FBA1* ist das Gen der Fruktose-Bisphosphat Aldolase und das dadurch kodierte Fba1 liegt mit fast 100000 Kopien pro Zelle weit über dem Expressionsniveau von Apd1. Zwischen Promotor und Gen wurde ein His₈-Tag mit anschließender TEV-Protease-Schnittsequenz eingefügt. Nach Transformation in $\Delta apd1$ wurden Zellen zur Zellextraktpräparation herangezogen. Nach Lyse der Zellen mittels Glasperlen wurde der pH-Wert des Zellextraktes (pH \approx 7) der drei Varianten und des WT mittels vorsichtiger Zugabe von NaOH auf pH 8,3–8,5 eingestellt, da Natriumdithionit unter diesen Bedingungen am effektivsten reduziert (Mayhew, 1978) und die Cystein-Einzelmutanten ein niedriges Redoxpotential von ca. -400 mV bei pH 8,5 aufweisen. Das Potential der Doppelmutante liegt mit -525 mV

deutlich tiefer (Stegmaier *et al.* 2019). Die bei 77 K gemessenen Spektren sind in Abbildung 4-22 **A** dargestellt. Die Variante H255C und die Doppelmutante zeigten nur ein schwaches ESR-Signal. Dies könnte durch unzureichende Reduktion mit Natriumdithionit oder einen fehlenden [2Fe-2S]-Cluster erklärt werden. Die H259C-Mutante zeigt hingegen ein Signal, das im Bereich des magnetischen Feldes von 350-360 mT jenem der aus *E. coli* gereinigten Variante (Stegmaier, 2017) ähnelt. Die Expression aller Varianten wurde mittels Western Blot und Immundetektion von Apd1 bestätigt (Abb. 4-22 **B**).

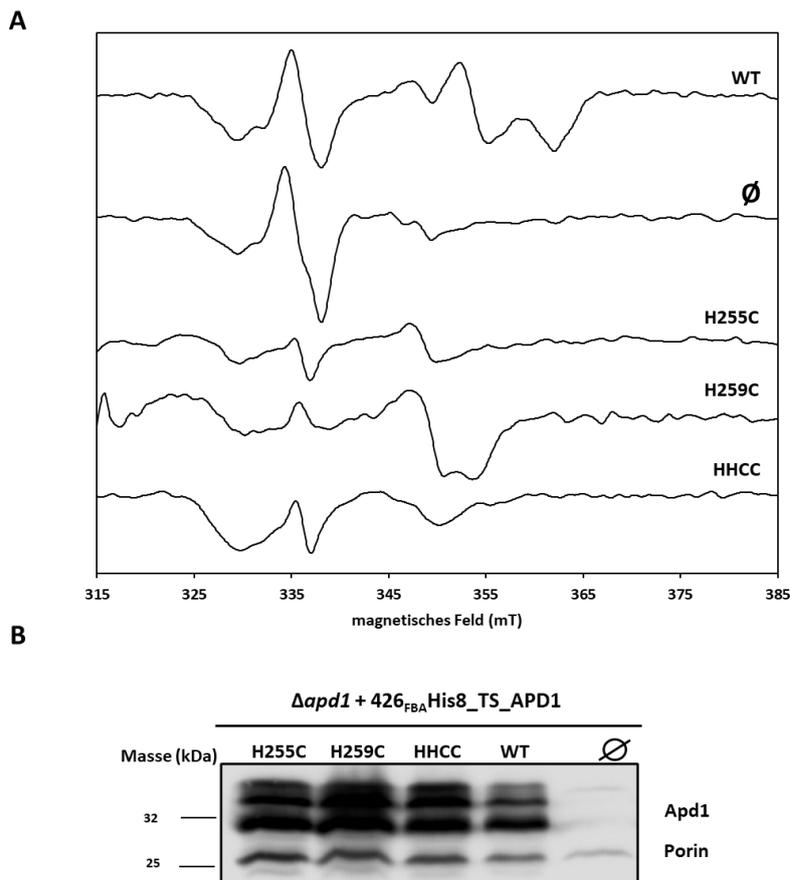


Abbildung 4-22: Überexpression von Apd1 und Varianten in *S. cerevisiae*. **A** $\Delta apd1$ wurde mit einem Leerplasmid oder 426_{FBA}-Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Nach 40 h Kultivierung wurde eine Gesamtzellextraktpräparation mit 0,5 g Zellen durchgeführt. Die Zellextrakte (pH \approx 7) wurden vorsichtig mit NaOH (10 μ l, 1 M) auf pH 8,3-8,5 eingestellt. Die Proben wurden unter anaeroben Bedingungen mit 2 mM Natriumdithionit reduziert und in ein ESR-Röhrchen überführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung in diesem gelagert. **B Nachweis der Expression von Apd1 mittels Immundetektion:** Es wurden je 25 μ g Gesamtzellextrakt analysiert.

Die g -Werte in Tabelle 4-2 verdeutlichen diese Tatsache für die H259-Mutante. Vergleicht man die g_y - und g_z -Werte der Zellextraktprobe mit jenen aus rekombinantem Apd1, so waren diese nahezu identisch. Der g_x -Wertes konnte nicht zum Vergleich herangezogen werden, da in den Zellextraktproben in diesem Bereich ein starkes Radikalsignal detektiert wurde.

Tabelle 4-2: g -Werte der H259C-Variante *in vivo*.

| | <i>In vivo</i> H259C | Recombinant H259C (Stegmaier, 2017) |
|-------|----------------------|-------------------------------------|
| g_y | 1,929 | 1,928 |
| g_z | 1,904 | 1,904 |

In diesem Teil konnte somit gezeigt werden, dass die Substitution der ligierenden Histidine in Apd1 durch Cysteine in einem Verlust der Funktion *in vivo* resultiert. Zumindest für die H259C Variante konnte durch die ESR-Spektroskopie gezeigt werden, dass ein [2Fe-2S]-Cluster inkorporiert wird.

Werden die Histidin-Liganden von Aim32 zu Cysteinen mutiert, resultiert dies in einer Letalität der Zellen in der Gegenwart von 100 μ M Pyrogallol, die der Deletion gleicht (Abb. 4-23). Somit kann, wie im Falle von Apd1 vermutet werden, dass die Mutation in einer Änderung des Redoxverhaltens oder in einer fehlenden Insertion des Clusters resultiert.

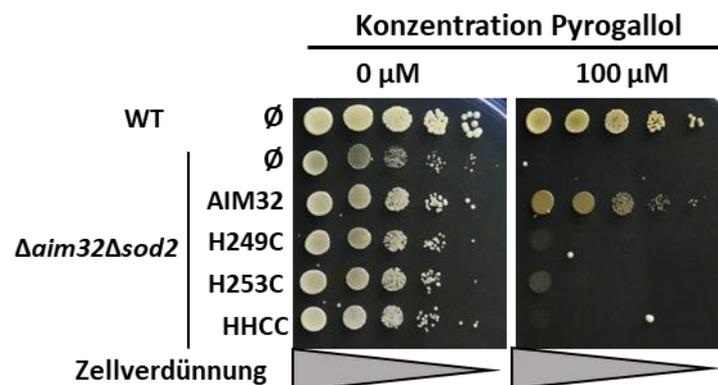


Abbildung 4-23: Tüpfeltest der Histidin zu Cystein-Varianten von Aim32. WT und $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Aim32 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten und Pyrogallol in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Eine Überprüfung des Clustereinbaus dieser Cystein-Varianten in Hefezellen wurde nicht mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Bei der Transformation des Plasmids 426_{TDH}Aim32 wurden weniger und auch kleinere Transformanten erhalten. Auch konnte die Transformation dieses hoch-Kopiezahlplasmids die Sensitivität gegenüber Pyrogallol nicht rückgängig machen (Abb. 4-24). Möglicherweise ist die Überexpression von Aim32 letal für die Hefezellen.

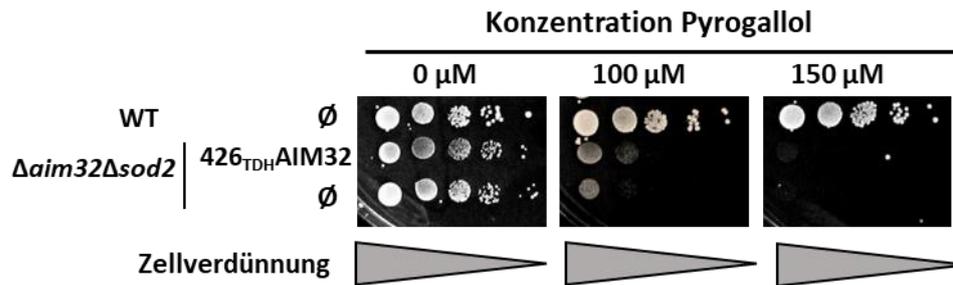


Abbildung 4-24: Überexpression von Aim32 in *S. cerevisiae*. WT und $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 426_{TDH}AIM32 transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten und Pyrogallol in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

4.4 High-Copy-Suppressor Screen

Bis heute ist die Funktion der Gene *AIM32* und *APD1* aus dem Organismus *S. cerevisiae* unbekannt. Um jene zu erschließen, wurde in dieser Arbeit ein „High copy Suppressor Screen“ durchgeführt. Bei dieser Anwendung wird in eine Mutante, die unter bestimmten Bedingungen nicht lebensfähig ist, z.B. eine „High-copy“ Plasmid Bibliothek transformiert. Durch Selektion unter diesen restriktiven Bedingungen enthalten alle überlebenden Zellen Plasmide, die eine WT-Kopie des Gens oder aber ein fremdes Gen, dass durch die Überexpression den Phänotyp rettet, tragen (Forsburg *et al.*, 2001).

Für diese Arbeit wurde eine cDNA-Bibliothek verwendet, die unter Regulation des *GAL1*-Promotors in einem zentromeren Plasmid mit *URA3*-Marker steht (Liu *et al.*, 1992). Zu Beginn wurde die Bibliothek in *E. coli* amplifiziert. Nach DNA-Maxi-Präparation wurde die Integrität des Eluats mittels eines Screens auf das *HIS3*-Gen überprüft. In der Original-Veröffentlichung wurde das *HIS3*-Gen innerhalb von 60000 Transformanten 5-mal wiedergefunden. Zur Reproduktion dieses Experimentes wurden 2 μg Plasmid DNA in 2 ml kompetente Hefezellen transformiert und auf 20 SC-Gal-WAL Platten ausgestrichen. Eine zusätzliche Platte mit WHAL-Marker diente als Zählplatte. In diesem Ansatz wurden 31000 ± 2000 Transformanten gezählt, wobei acht das *HIS3*-Gen enthielten. Die cDNA-Bibliothek gilt als geeignet für das Screening, wenn bei 5 μg transformierter DNA 50000 Transformanten erreicht werden (Antony Bretscher Labor, persönliche Mitteilung). Die amplifizierte cDNA-Bibliothek damit kann für einen „Suppressor-Screen“ verwendet werden.

4.4.1 High-Copy-Suppressor Screen Apd1

Um einen High-copy-Suppressor für die Deletion von *APD1* zu identifizieren, war es nötig unter restriktiven Bedingungen zu selektieren. *APD1* ist unter Standardlaborbedingungen kein essenzielles Gen. In Gegenwart von 50 μM Gallobenzophenon zeigte sich im Tüpfeltest die Letalität des $\Delta apd1$ Stammes und eine

Plasmidkopie des Gens komplementierte den Phänotyp (Kap. 4.2.1). Da ein Tüpfeltest jedoch erst nach Transformation der Plasmid-DNA und Vorkultivierung der Hefezellen durchgeführt wird, wurde im Vorfeld überprüft, ob eine Plasmidkopie von *Apd1* die synthetische Letalität auch schon während des Transformationsprozesses komplementieren kann. Hierfür wurde in den $\Delta apd1$ -Stamm ein Leerplasmid sowie ein 416-Plasmid transformiert, auf dem das Gen *APD1* unter der Kontrolle des natürlichen Promotors kodiert ist. Ausgestrichen wurde auf SC-Gal-WHAL-Agarplatten mit und ohne 50 μ M Gallobenzophenon, um die Bedingungen des cDNA-Screens widerzuspiegeln. Abbildung 4-25 zeigt das Koloniewachstum nach 3 Tagen bei 30 °C. Der Stamm mit transformierten Leerplasmid war unter dem Einfluss von 50 μ M Gallobenzophenon nicht lebensfähig, wohingegen die Zellen mit Plasmid-kodierter Kopie des Gens auf Agarplatten mit Gallobenzophenon eine ähnliche Koloniebildung aufwiesen wie auf der Kontrollplatte ohne Gallobenzophenon.

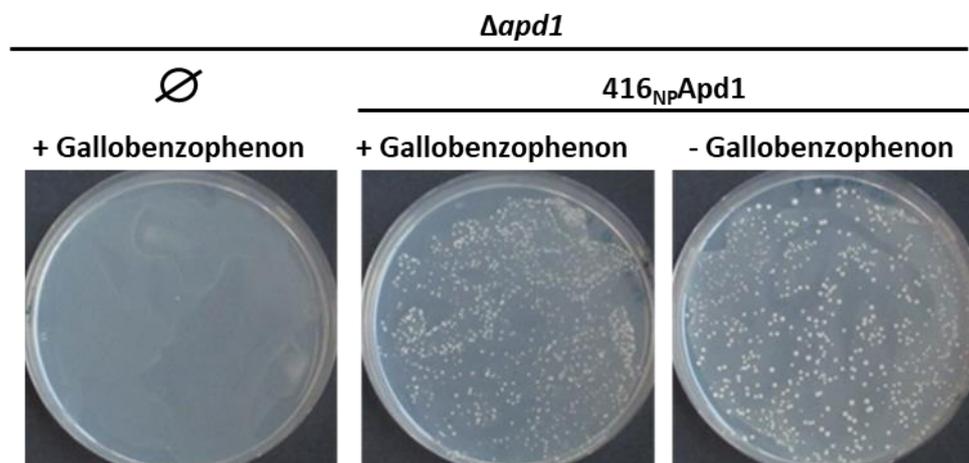


Abbildung 4-25: Überprüfung der Bedingungen für den cDNA-Screen von $\Delta apd1$. Transformiert wurde das Gen *APD1* auf einem 416-Plasmid unter der Kontrolle des natürlichen Promotors sowie ein Leerplasmid in den $\Delta apd1$ -Stamm auf SC-Gal-Agarplatten mit und ohne Gallobenzophenon.

Für den cDNA-Screen wurde eine Hefetransformation von $\Delta apd1$ in „großem“ Maßstab durchgeführt. Da für einen aussagekräftigen Screen 5 μ g DNA transformiert und die Zellen auf 50 Gallobenzophenon-Platten und eine Zählplatte ohne Gallobenzophenon ausplattiert werden sollen, wurde der Ansatz für eine Transformation auf 51 hochgerechnet. Im Unterschied zu einer normalen Hefetransformation erfolgte der Hitzeschock (42 °C) und das anschließende Vorwachsen der Zellen (30 °C) in einem 20 ml-Kolben im Schüttelinkubator. Nach Transformation erfolgte die Inkubation für 3 Tage bei 30 °C. Auf der Zählplatte bildeten sich in dieser Zeit >1000 Kolonien aus, was für eine erfolgreiche Transformation der cDNA-Bibliothek spricht. Auf den 50 Gallobenzophenon-Agarplatten wuchsen insgesamt 90 Kolonien. Um falsch-positive Ergebnisse zu minimieren und um die Zellausbeute für weitere molekular-biologische Untersuchungen zu erhöhen, wurden die einzelnen Kolonien auf Gallobenzophenon-Agarplatten mit Galaktose als Kohlenstoffquelle ausgestrichen. Da die Zellen auf jenen Platten ständigem

Selektionsstress ausgesetzt wären, wurde die Klone nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen auf SC-Glu-Agarplatten übertragen. Zur Überprüfung, ob das transformierte Plasmid eine Kopie von *APD1* oder einem fremden Gen enthält, wurde eine PCR durchgeführt. Dafür wurde zunächst, nach Kultivierung einer 20 ml Übernachtskultur, DNA aus den Hefezellen isoliert. Die Zellen wurden mittels Zymolyase lysiert und die freigesetzte DNA im Anschluss über eine Silica-Säule aufgereinigt. Die für die PCR verwendeten Primer waren *APD1*-(forward Primer) und Vektor-(reverse Primer) spezifisch. Das analytische Agarosegel nach erfolgter PCR gab Aufschluss über das kodierte Gen. War eine Bande zu detektieren konnte auf eine *APD1*-Kopie geschlossen werden. War keine Bande zu beobachten, war dies auf ein Gen, welches nicht *APD1* entsprach oder auf eine nicht funktionierende PCR zurückzuführen. Von den 90 überlebenden Transformanten wurden insgesamt 60 mittels PCR überprüft. In Abbildung 4-26 ist als Beispiel das analytische Agarosegel der Überprüfung der PCR der Klone 11-20 dargestellt. Da in den Spuren von Klon 17 und 19 keine Bande zu erkennen war, war es möglich, dass ein anderes Gen als möglicher Suppressor im Plasmid vorlag.

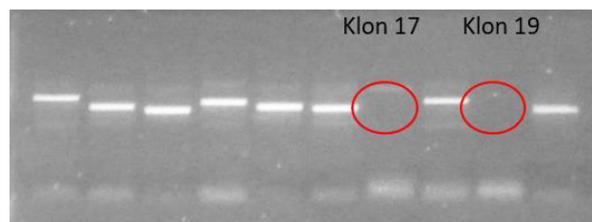


Abbildung 4-26: Analytisches Agarosegel der PCR des cDNA-Screens. Aufgetragen wurden 10 µl PCR-Produkt.

Die isolierte DNA war rein genug um in superkompetente NEB10-β Zellen transformiert zu werden. Nach erfolgter Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* wurde das codierende Gen auf dem Plasmid mittels Sequenzierung identifiziert. Die Isolation der DNA aus Klon 17 kodiert für *CDC19* (Pyruvatkinase) und Klon 19 für *HSC82* (cytosolisches Chaperon der Hsp90 Familie). Zur Überprüfung, ob es sich bei den Plasmiden wirklich um Suppressoren handelt, wurden sie abermals in $\Delta apd1$ transformiert und auf SC-Gal-Agarplatten mit und ohne Gallobenzophenon ausgestrichen (Abb. 4-27).

Als Positivkontrolle diente Klon 25, ein Plasmid, das durch Sequenzierung bestätigt, für *APD1* kodiert. Nach 3 Tagen Inkubationszeit war auf den Gallobenzophenon-Agarplatten nur bei Klon 25 Koloniewachstum zu erkennen. Bei den möglichen Suppressor-Kandidaten, in Abbildung 4-27 sind beispielhaft Klon 17 und Klon 19 dargestellt, waren keine Kolonien ausgebildet. Somit handelt es sich möglicherweise bei den Zellen, die die Selektion mit Gallobenzophenon überlebten, um Zellen, deren gDNA während des Screens so mutierte, dass diese Mutation $\Delta apd1$ eine Resistenz gegenüber Gallobenzophenon verlieh. Da die Identifikation solcher Mutationen sehr schwierig ist, wurden diese Ansätze nicht weiterverfolgt.

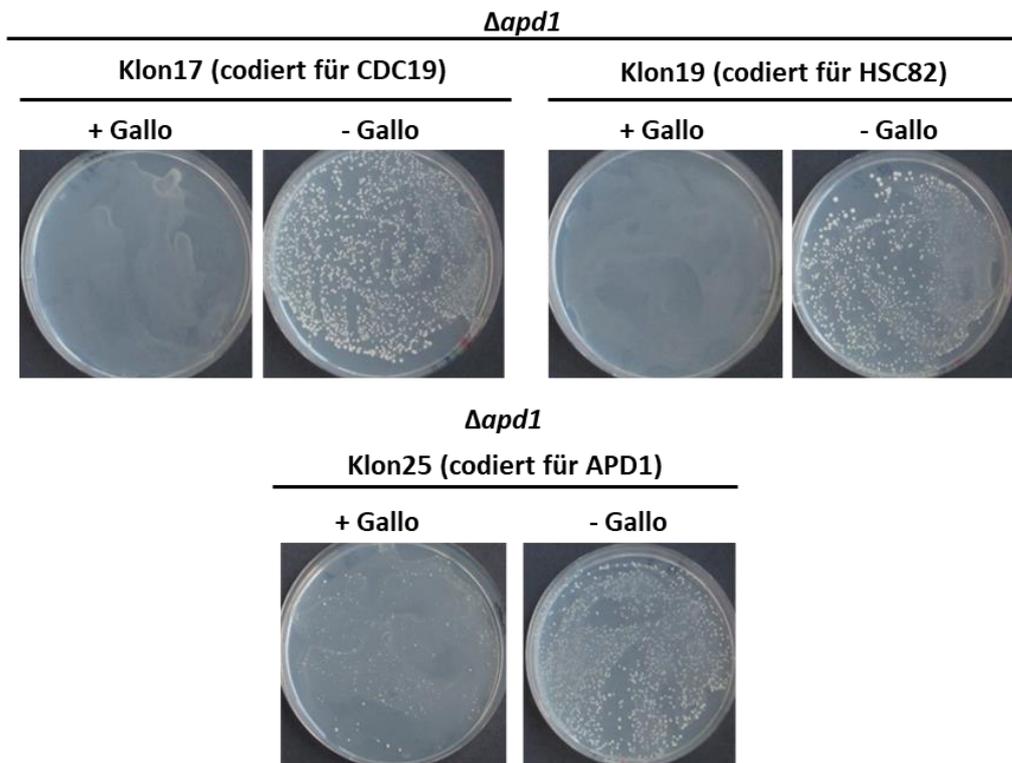


Abbildung 4-27: Transformation der Klone 17, 19 und 25 des cDNA-Screens auf Platten mit und ohne Gallobenzophenon. Inkubiert wurde 3 Tage bei 30 °C.

4.4.2 High-Copy-Suppressor-Screen für Aim32

Anschließend sollte der cDNA-Screen auf den Stamm $\Delta aim32\Delta sod2$ angewendet werden. Aus Abbildung 4-12 (Kap. 4.2.2) ist jedoch ersichtlich, dass diese Doppeldeletionsmutante auf Galaktose als Kohlenstoffquelle nicht überleben kann. Es konnte kein Wachstum der Zellen im Tüpfeltest beobachtet werden.

Da aber die Zugabe von Galaktose im Medium unvermeidbar ist, um die Genexpression zu induzieren, wurde mithilfe des Klons 25 des Apd1-cDNA-Screens ein Verhältnis von Glukose zu Galaktose ermittelt, bei der die Genexpression noch induziert ist. Es wurden dafür $\Delta apd1$ -Zellen, transformiert mit Klon 25 des cDNA-Screens, unter Apd1-essenziellen Bedingungen, d. h. Zugabe von 100 μ M Gallobenzophenon, in einer SC-Flüssigkultur mit unterschiedlichem Verhältnis von Glukose zu Galaktose kultiviert. Anhand von Abbildung 4-28 **A** ist ersichtlich, dass ein Verhältnis von 1:1 Glukose zu Galaktose ausreicht, um den *GAL1*-Promotor zu aktivieren. Im Folgenden wurden $\Delta aim32\Delta sod2$ Zellen auf ihr Wachstum in unterschiedlicher Galaktose-Glukose-Zusammensetzung untersucht. Auch hier ist nach Abbildung 4-28 **B** zu erkennen, dass je gleiche Teile Galaktose und Glukose zur Kultivierung genügten. Der End-OD₆₀₀ war zwar um ca. 30 % verringert, aber auch bei einer Erhöhung der Glukose Konzentration auf 90 % ergab sich kein besseres Wachstum.

Ergebnisse

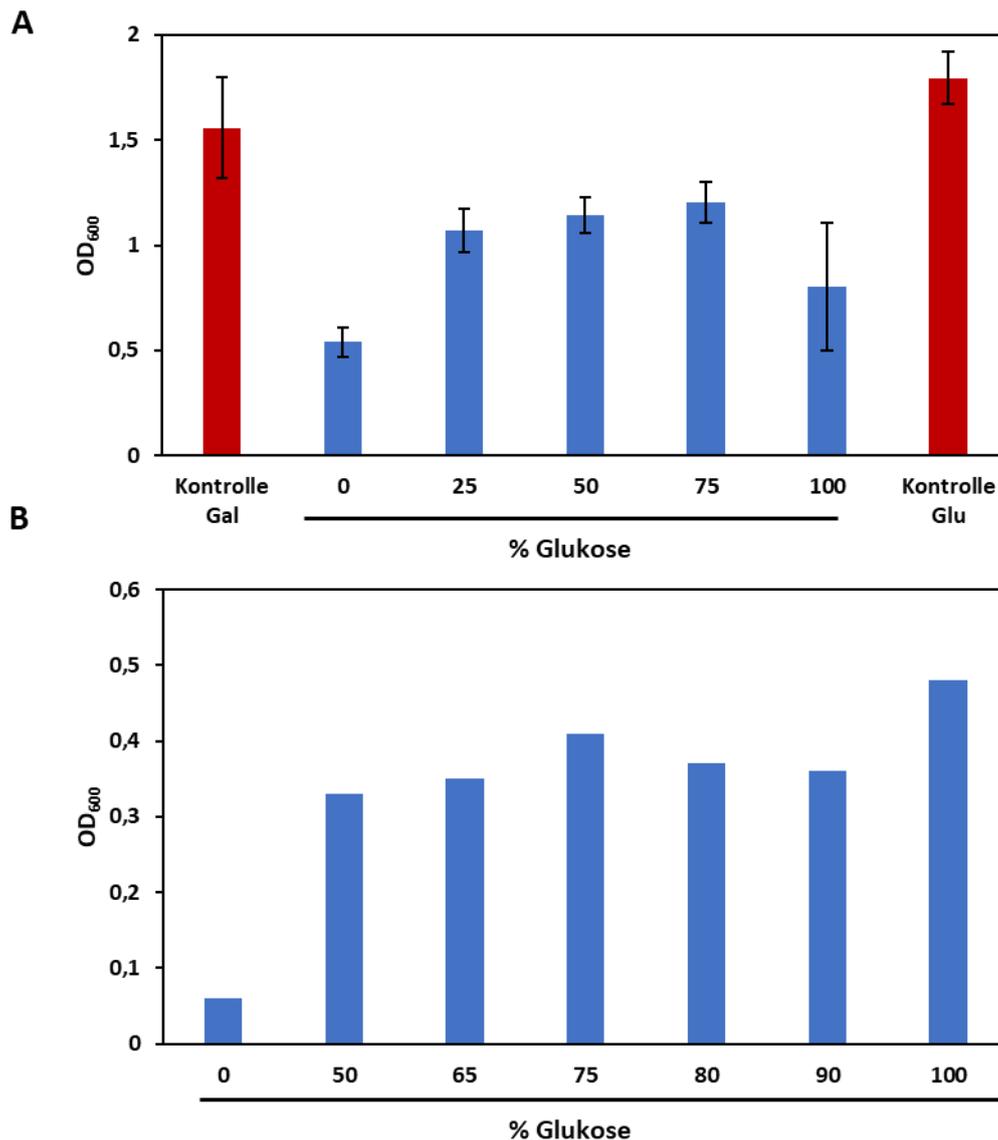


Abbildung 4-28: Vorexperimente für den cDNA-Screen mit $\Delta aim32\Delta sod2$. Gemessen wurde die OD₆₀₀ nach 22 h Inkubation bei 30 °C. **A** Wachstum von $\Delta apd1$ transformiert mit Klon25 in Gegenwart von 100 μ M Gallobenzophenon und verschiedenen Gal/Glu Verhältnissen. Rot: Kontrollen ohne Zugabe von 100 μ M Gallobenzophenon. Blau: Variationen des Gal/Glu-Verhältnisses bei Zugabe von 100 μ M Gallobenzophenon. **B** Wachstum von $\Delta aim32\Delta sod2$ in 0-100 % Glu (entspricht 20 g/l Glukose) resp 100-0 % Gal (entspricht 20 g/l Galaktose).

Der cDNA-Screen wurde analog Kapitel 4.4.1 durchgeführt. Jedoch wurde hier mit 100 μ M Pyrogallol-haltigen Agarplatten gearbeitet und das Verhältnis von Galaktose zu Glukose betrug 1:1. Nach drei-tägiger Inkubationszeit bei 30 °C konnten ca. 800 Transformanten auf der Kontrollplatte beobachtet werden. 52 Transformanten waren in der Lage die synthetische Letalität der Doppeldeletionsmutante auf den 50 Pyrogallol-haltigen Platten zu kompensieren. Zur Vermeidung falsch-positiver Klone wurden die Suppressor Kandidaten auf Pyrogallol-haltige SC-Gal-Agarplatten überstrichen. Danach wurden sie auf SC-Glu-Agarplatten übertragen. Nach Isolierung der Plasmid DNA, wurde mittels PCR überprüft, ob die Kompensation auf einer

transformierten Kopie von *AIM32* oder einem unbekanntem Gen beruht. Durch einen *AIM32*-spezifischen und einen Vektor spezifischen Primer wurde dies verifiziert. Von den 52 Kandidaten waren, anhand der Banden in den PCRs, 28 kein *AIM32*-haltiges Plasmid. Zur weiteren Identifikation mittels Sequenzierung sollte nun die Plasmid-DNA dieser Klone in superkompetente NEB10 β -Zellen transformiert werden. Dies war, wahrscheinlich verursacht durch geringe Plasmid-DNA Konzentration, trotz mehrerer Versuche und Variation der Transformationsbedingungen nicht möglich.

4.5 Lokalisierung von Aim32 und Apd1

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bioinformatisch untersucht, ob die Proteine Aim32 oder Apd1 aus *S. cerevisiae* über N-terminale Targetingsequenzen verfügen, die einen Transport in die Mitochondrien veranlassen würden. Diese Vorhersagemodelle berechnen anhand der Proteinsequenz einen Mitoprot Score (Claros, 1995; Savojardo *et al.*, 2020), der die Wahrscheinlichkeit einer Lokalisation in den Mitochondrien ausdrückt. Für Apd1 liegt der Mitoprot Score bei 0,00641. Dieser niedrige Wert deutet auf ein cytosolisches Protein hin. Der für Aim32 liegt bei 0,9793, ein hoher Wert, der auf eine Lokalisierung innerhalb der Mitochondrien hinweist. Zur Verifizierung dieser Vorhersagen wurden verschiedene Fraktionierungen von *AIM32* und *APD1* exprimierenden Hefezellen durchgeführt. Da beide Proteine nur in geringer Anzahl in der Zelle vorkommen, war es nicht möglich die Lokalisierung in WT-Zellen durchzuführen. Es wurde daher mit den Deletionsstämmen, in die ein 2 μ -Plasmid mit einer Kopie des Gens transformiert wurde, gearbeitet. Um die Proteinkonzentration dennoch auf einem moderaten und im Falle von Aim32 nicht toxischen Level zu halten, wurde unter der Kontrolle des natürlichen Promotors exprimiert. Zur Untersuchung der Lokalisation der Proteine wurde eine Mitochondrienpräparation (Kap. 3.2.15), bei der die cytosolische Fraktion, als PMS, ebenso wie die Mitochondrien aufgefangen wurde, durchgeführt. Abbildung 4-28 zeigt die Immundetektion mittels Western Blot der verschiedenen Fraktionen. Als Marker für die verschiedenen Kompartimente dienten dabei Mia40, ein mitochondriales Protein des Intermembranraums, Ilv5, ein mitochondriales Matrix-Protein, Leu1, ein cytosolisches Protein und Sod1, ein Protein, das im Cytosol als auch in den Mitochondrien lokalisiert ist. Die Marker-Proteine konnten entsprechend den Erwartungen in den jeweiligen Fraktionen detektiert werden. Mia40, welches in der SDS-PAGE ungleich seiner molekularen Masse detektiert wird (persönliche Mitteilung, Dr. Katja Hansen), nämlich bei 58 kDa anstatt 44 kDa, und Ilv5 waren in der mitochondrialen Fraktion angereichert. Leu1 war hauptsächlich in der cytosolischen Fraktion zu detektieren wohingegen Sod1 sowohl in der mitochondrialen als auch in der cytosolischen Fraktion angetroffen wurde. Diese Analyse spricht für eine gelungene Fraktionierung der Hefezellen. Apd1 war bei einem Molekulargewicht von etwas über 32 kDa in der Fraktion PMS zu detektieren und ist somit ein cytosolisches Protein (Abb. 4-29 A). Aim32 war in den Mitochondrien angereichert (Abb. 4-29 B) und konnte bei einem Molekulargewicht von etwas unter 32 kDa detektiert werden.

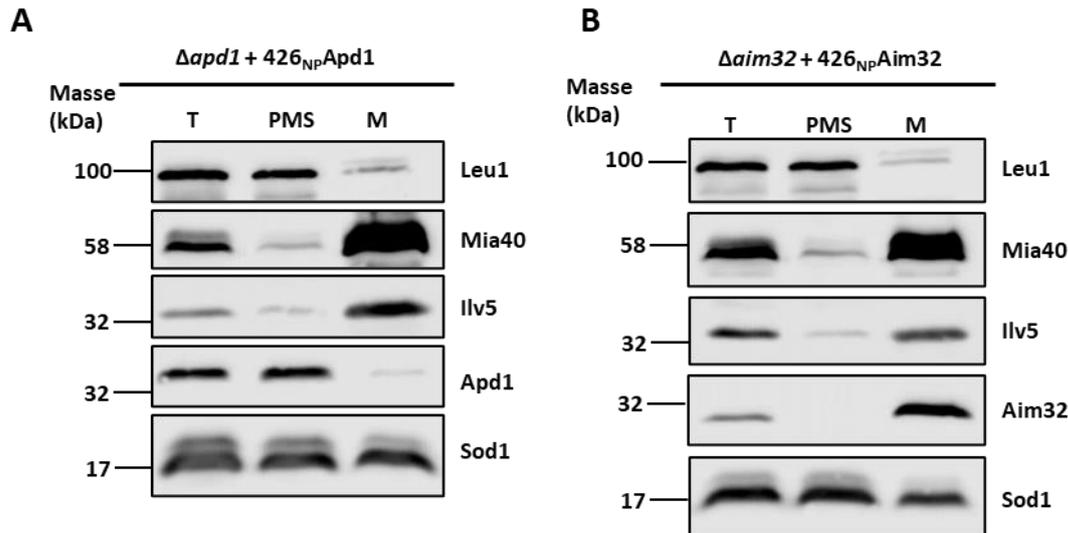


Abbildung 4-29 Lokalisierung von Aim32 und Apd1 in *S. cerevisiae*. $426_{NP}APD1$ (A) und $426_{NP}AIM32$ (B) wurden in $\Delta apd1$ resp. $\Delta aim32$ transformiert. Die Zellen wurden mittels Mitochondrienpräparation fraktioniert und 50 μ g jeder Fraktion (T: Total, Zellextrakt; PMS: post-mitochondrialer Überstand; M: mitochondriale Fraktion) mit TCA (25 % Endkonzentration) 10 min auf Eis präzipitiert. Nach 2-maligem Waschen in Aceton wurden die Pellets in 1 x Probenpuffer resuspendiert und eine SDS-PAGE wurde durchgeführt. Mittels anschließenden Western-Blot und Immundetektion wurden die Proteine von Interesse mit spezifischen Antikörpern detektiert.

4.5.1 Sublokalisierung von Aim32

Zur genaueren Lokalisierung von Aim32 innerhalb der Mitochondrien wurden verschiedene Sublokalisierungsexperimente durchgeführt. Alle hier beschriebenen Experimente wurden mit Mitochondrien von $\Delta aim32$ -Zellen, transformiert mit dem Plasmid $426_{NP}AIM32$, durchgeführt. Zur Überprüfung, ob Aim32 ein membrangebundenes oder ein lösliches mitochondriales Protein ist, wurde eine Carbonat-Extraktion durchgeführt. Hierbei wurden Mitochondrien mit Natriumcarbonat (0,1 M) behandelt (Boldogh & Pon, 2007). Nach Ultrazentrifugation wurden der Extrakt, welcher die lösliche Proteinfraction enthält und die im Pellet enthaltene Membranfraction mittels Immundetektion weiter untersucht. Mia40 und Oxa1, beides integrale Membranproteine, wurden in der Pellet-Fraction detektiert. Sod1, ein Protein des Intermembranraums, war in der Extrakt-Fraction lokalisiert (Abb. 4-30 A). Aim32 war ebenfalls in dieser Fraction zu detektieren, was darauf hinweist, dass es entweder mit der Membranoberfläche assoziiert oder als lösliches Protein innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden im nächsten Schritt Mitochondrien mittels hypotonischen Schwellens subfraktioniert. Durch das Schwellen wird spezifisch die äußere mitochondriale Membran geöffnet und es werden Mitoplasten generiert. Durch die Zugabe von Proteinase K zu den verschiedenen Fractionen und Vergleich der Proteinbanden nach Western-Blot und Immundetektion können Rückschlüsse auf die spezifische Lokalisierung innerhalb der Mitochondrien gezogen werden. Abbildung 4-30 B zeigt die Lokalisation verschiedener Marker-Proteine, wenn Mitochondrien resp. Mitoplasten mit Proteinase K behandelt

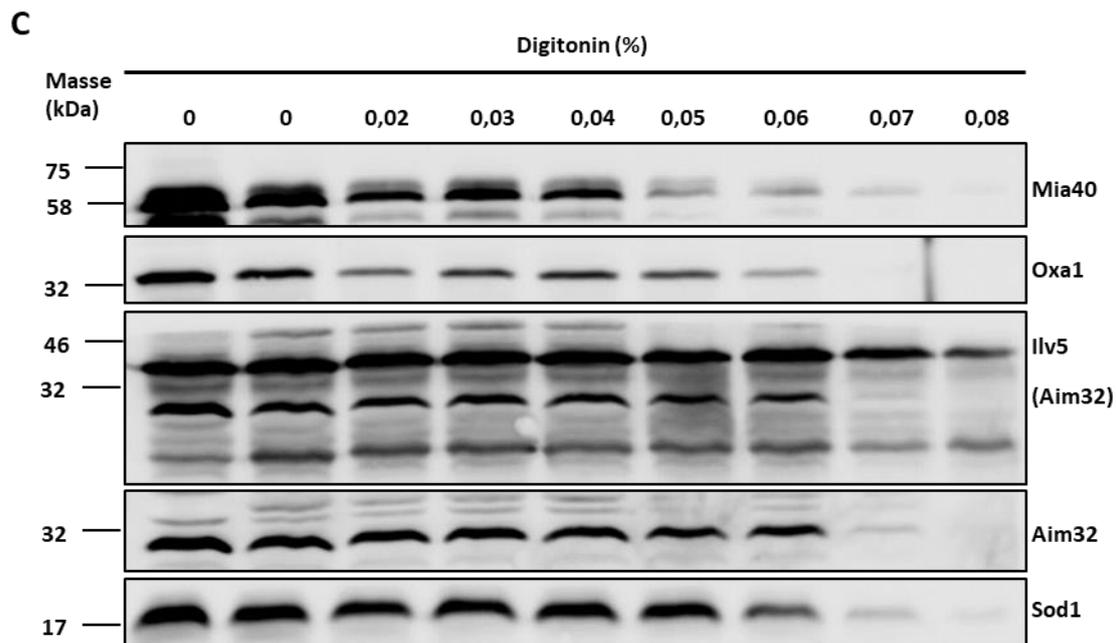


Abbildung 4-30: Sublokalisierung von Aim32. 426_{NP}Aim32 wurde in $\Delta aim32$ transformiert. Die Zellen wurden mittels Mitochondrienpräparation fraktioniert. **A** Carbonat-Extraktion. Mitochondrien (100 μ g Gesamtproteinkonzentration) wurden mit 0,1 M Na₂CO₃ und 2 mM PMSF inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation abgenommen und das Pellet mit 0,1 M Na₂CO₃ gewaschen. Total repräsentiert die Mitochondrien vor Behandlung, Extr (Extrakt) den Überstand nach Zentrifugation und Memb (Membran) die Pellet-Fraktion. **B** Subfraktionierung mittels hypotonischem Schwellen. Mitochondrien (50 μ g Gesamtproteinkonzentration) wurden mit oder ohne Proteinase K resp Triton X-100 unter isoosmotischen oder hypotonischen Bedingungen inkubiert. **C** Subfraktionierung mittels Digitonin-Behandlung. Mitochondrien (50 μ g Gesamtproteinkonzentration) wurden mit unterschiedlicher Digitonin-Konzentration und darauffolgend mit Proteinase K behandelt. Der Verdau wurde mittels Zugabe von 2 mM PMSF gestoppt. Spur 1 ist ohne Proteinase K Zugabe und diente als Kontrolle. Der Aim32 Blot wurde im Anschluss zur Immundetektion von Ilv 5 genutzt.

4.5.2 N-terminale Kürzung von Aim32

Das mitochondriale Protein Aim32 besitzt einen hohen Mitoprot Score, was auf ein mitochondriales Protein hindeutet, und wurde in vorhergehenden Experimenten als mitochondriales Matrix-Protein identifiziert. Als solches könnte es über eine N-terminale Targetingsequenz verfügen, die nach der Translation des Proteins im Cytosol den Transport in die Mitochondrien auslöst. Je nach Vorhersagemodell variiert die Länge dieser Aminosäurekette. Zur Identifizierung dieser Sequenz in Aim32 wurde das Startmethionin in 426_{NP}Aim32 zu Alanin mutiert. In einem zweiten Mutageneseschritt wurde dann wieder ein Startmethionin an einer anderen Stelle der Aminosäuresequenz eingeführt. Es wurden Threonin an Position fünf, Alanin an Position 13 und Isoleucin an Position 22 jeweils in ein Methionin umgewandelt. Die so kreierte Plasmide wurden in $\Delta aim32$ -Zellen transformiert und auf ihre Funktionalität überprüft. Wenn die gekürzte Version von Aim32 nicht in die Mitochondrien transportiert wird und im Cytosol verbleibt, wird das Protein $\Delta aim32$ -Zellen keine Resistenz gegen Pyrogallol verleihen.

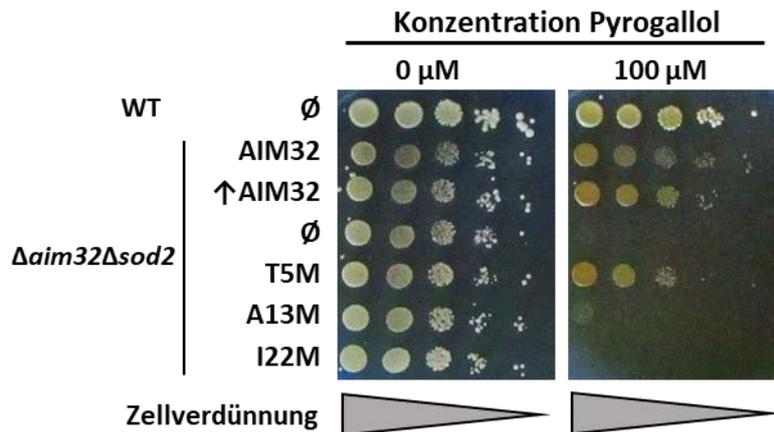


Abbildung 4-31: Tüpfeltest der gekürzten Varianten von Aim32. In WT bzw. $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden die Plasmide 416_{NP}AIM32 (AIM32), 426_{NP}AIM32 (\uparrow AIM32) sowie die in 426_{NP}AIM32 gekürzten Varianten T5M, A13M und I22M transformiert. Nach Vorwachstum in SC-Glu-Medium mit geeignetem Marker wurde eine serielle Verdünnung (jeweils 1:10) auf Agarplatten mit angegebener Konzentration von Pyrogallol getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Abbildung 4-31 zeigt einen Tüpfeltest in Gegenwart von 100 μ M Pyrogallol mit den verschiedenen N-terminal gekürzten Varianten von Aim32. WT-Zellen konnten in Gegenwart von 100 μ M Pyrogallol überleben, wohingegen die Deletion von AIM32 und SOD2 zu synthetischer Letalität unter diesen Bedingungen führte. Jene konnte durch eine Plasmidkopie von AIM32, sowohl auf einem 416_{NP}- als auch einem 426_{NP}-Plasmid unter der Kontrolle des natürlichen Promotors, kompensiert werden. Bei einer Kürzung des Proteins um fünf Aminosäuren war ein leicht vermindertes Wachstum im Tüpfeltest zu beobachten. Der Wachstumsdefekt verstärkte sich um ein Vielfaches bei der Kürzung um 13 Aminosäuren und bei der um 22 Aminosäuren gekürzten Variante war kein Wachstum mehr zu beobachten.

In meiner Diplomarbeit (Blinn, 2014) wurde versucht das Gen AIM32 in einer N-terminal gekürzten Version in *E. coli* zu exprimieren, da vermutet wurde, dass dort die N-terminale Targetingsequenz nicht abgespalten werden kann, was zu einer Aggregation des Proteins führen kann. Das Protein konnte in dieser gekürzten Variante nur in sehr geringer Ausbeute isoliert werden. Die Fragestellung, ob der Effekt der N-terminalen Kürzung auf das Wachstum in Gegenwart von Pyrogallol durch eine resultierende Lokalisierung im Cytosol oder durch eine Instabilität des gekürzten Proteins verursacht wurde, muss so noch im Folgenden geklärt werden. Es wurden Mitochondrien von $\Delta aim32$ -Zellen, transformiert mit den gekürzten drei Varianten resp. WT-Aim32, isoliert (Kap. 3.2.15). Nach TCA-Präzipitation wurden die drei Fraktionen Gesamtzellextrakt (Total), PMS und Mitochondrien (Mito) mittels Western Blot und anschließender Immundetektion der Marker-Proteine Leu1 und Ilv5 sowie Aim32 untersucht. Abbildung 4-32 zeigt die erfolgreiche Trennung der mitochondrialen und cytosolischen Fraktion, da sich die Marker-Proteine in ihren jeweiligen Kompartimenten anreicherten. Im Falle des WT-Proteins konnte ebenfalls eine Anreicherung in den Mitochondrien festgestellt werden.

Dies gilt aber auch für die N-terminal gekürzten Varianten. Dies lässt schlussfolgern, dass das Protein trotz Kürzung der Targetingsequenz weiterhin in die Mitochondrien transportiert wird, hier jedoch aber nicht mehr gegen die Sensitivität von Pyrogallol wirken kann. Dies kann dadurch erklärt werden, dass geringere Mengen des gekürzten Aim32-Proteins in die Mitochondrien importiert werden (Abb. 4-32)

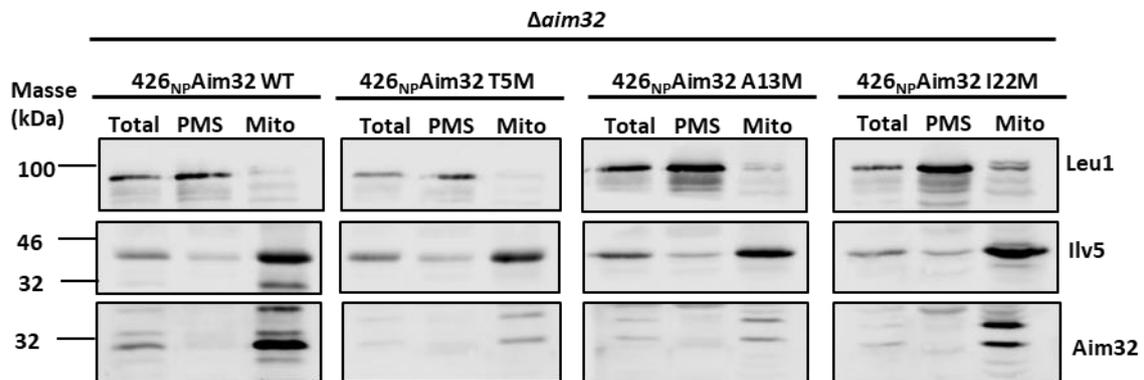


Abbildung 4-32: Lokalisierung der gekürzten Varianten von Aim32 in *Δaim32*. Das Plasmid 426_{NP}Aim32 sowie die in 426_{NP}Aim32 gekürzten Varianten T5M, A13M und I22M wurden in *Δaim32* transformiert. Nach erfolgter Zellkultivierung in SC-Gal Medium mit geeignetem Marker wurden Mitochondrien isoliert. Nach TCA-Präzipitation (25 % Endkonzentration) der einzelnen Fraktionen (100 µg pro Fraktion) wurden die Proteine mittels Immunoblot detektiert.

4.6 Assemblierung des [2Fe-2S]-Clusters in Apd1 via CIA-Maschinerie

Bis heute ist nicht geklärt wie der Einbau des [2Fe-2S]-Clusters in cytosolische Proteine von statten geht. Für [4Fe-4S]-Proteine erfolgt die Übertragung des Clusters über den CIA-Targeting-Komplex der späten CIA-Maschinerie. Dies ist für mehrere Proteine in Hefe und Mensch belegt (Stehling *et al.*, 2012, Stehling *et al.*, 2013, Vashisht *et al.*, 2015, Paul & Lill, 2015). Ein cytosolisches [4Fe-4S]-Protein aus *S. cerevisiae*, dessen Clusterinsertion CIA-Maschinerie-abhängig ist, ist Leu1. Es konnte zudem mittels enzymspezifischer Aktivitätsmessungen und ⁵⁵Fe-Einbau eine C-terminale Tryptophan-abhängige Inkorporierung des Clusters dieses Proteins belegt werden (Greth, 2018). Das cytosolische [2Fe-2S]-Protein Apd1 aus *S. cerevisiae* verfügt ebenso über ein C-terminales Tryptophan und könnte durch diese Signalsequenz, analog zu Leu1, mit dem CIA-Targeting-Komplex interagieren. Es wurde in diesem Teil der Arbeit versucht den Fe/S-Clustereinbau in Apd1 ESR-spektroskopisch zu verfolgen und eine Beteiligung ausgewählter CIA-Faktoren nachzuweisen.

4.6.1 Isolierung von Apd1 aus Hefe

Wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben ist es in WT-Zellen ist es nicht möglich ein Apd1 ESR-Signal zu detektieren, da die Kopiezahl von Apd1 mit ca. 3000 Molekülen pro Zelle (Breker *et al.*, 2013) unter dem Detektionsminimum des Spektrometers liegt. Aus diesem Grund wurde hier wieder mit dem Plasmid 426_{FBA}Apd1 gearbeitet. Zur Isolierung des Proteins aus WT-Zellen wurde nach erfolgter Transformation des Plasmides und zweimaliger Vorkultivierung, in steigendem Volumen SC-Glu-Medium, 10 g Zellen aus einer 2 l-Kultur gewonnen. Die Zellen wurden zu 0,5 g aliquotiert und mittels Glasperlenaufschluss (3.2.13) nach Zugabe von Proteaseinhibitor-tabletten lysiert. Nach erfolgter Ultrazentrifugation wurde das gewonnene Lysat mit Ni-NTA-Agarose (1 ml) für 1 h inkubiert. Die Isolierung erfolgte analog der klassischen Aufreinigung eines Proteins mittels His-Tag, beschrieben in Kapitel 3.4.4, mit dem Unterschied, dass alle verwendeten Puffer 2 mM PMSF enthielten. Das Eluat wurde am Ende der Isolierung in 0,5 ml-Portionen aufgefangen. Abbildung 4-33 **A** zeigt den Gehalt an Apd1 während den einzelnen Aufreinigungsschritten durch Immundetektion. Die Konzentration des Proteins vor (vUZ) und nach (nUZ) dem einstündigen Ultrazentrifugationsschritt war nahezu konstant, was für die Stabilität des Proteins und die Wirkung des Proteaseinhibitors sprach. Auffällig war hingegen die intensive Apd1-Bande in der Durchlauf-Fraktion (D) beim Beladen der Suspension in die Leersäule. Die Bindung des getagten Proteins an das Säulenmaterial kam so nur mäßig zustande. Das Eluat der Säule wurde in 0,5 ml Schritten aufgefangen und einzeln analysiert. Vor der Probenvorbereitung für den Western-Blot sollte die Gesamtproteinkonzentration bestimmt werden. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels Micro-Biuret-Assay war für die Eluatfraktionen F2-F4 durch die zu niedrige Proteinkonzentration nicht möglich, weshalb für diese Proben die Proteinbestimmung nach Bradford herangezogen wurde. Nur in der zweiten Eluatfraktion (F2, 1,45 mg/ml Gesamtproteinkonzentration) war eine schwache Apd1-Bande im Western-Blot nachweisbar. Die einzelnen Eluatfraktionen F2–F4 wurden ESR-spektroskopisch weiter untersucht. Nach erfolgter Reduktion unter anaerober Bedingung mit 2 mM Natriumdithionit konnte in der Probe F2 ein [2Fe-2S]-Clustersignal detektiert werden (Abb. 4-33 **B**).

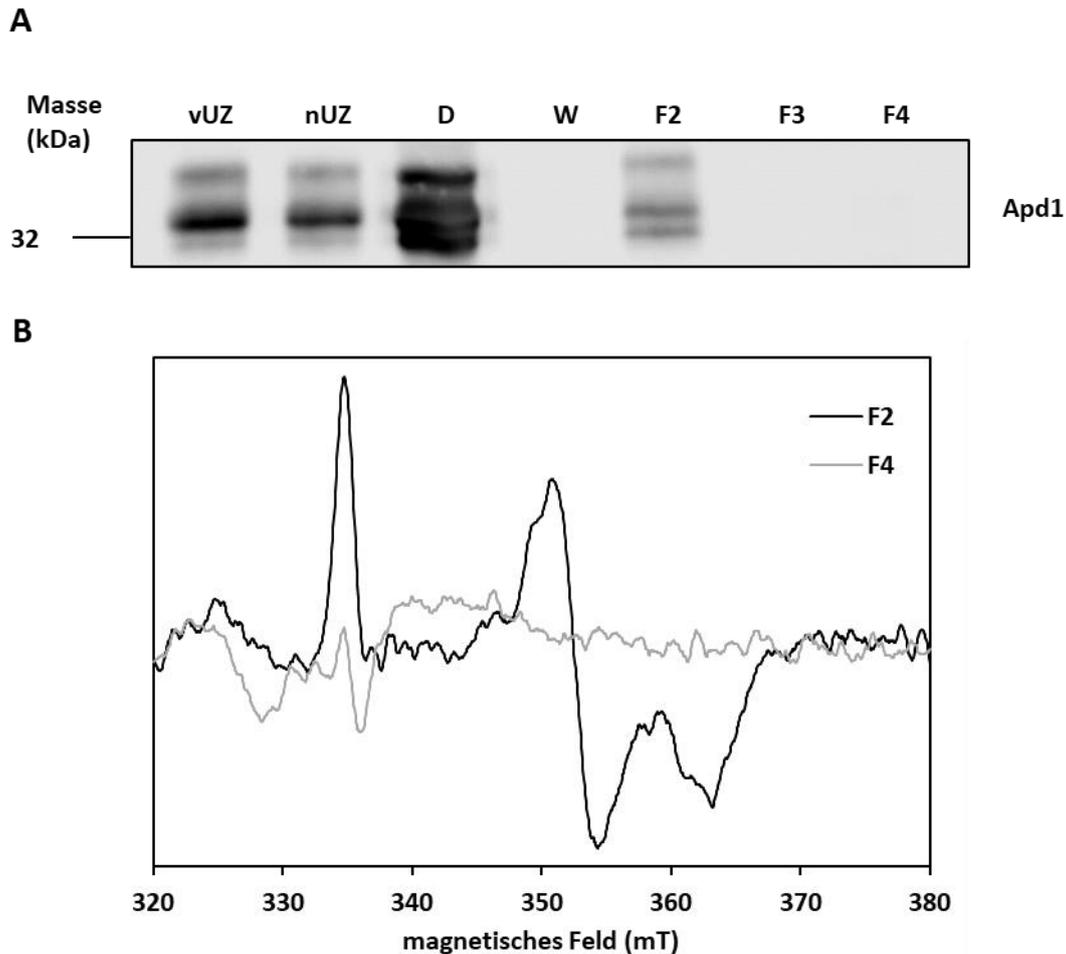


Abbildung 4-33: Isolierung von His₈-Apd1 aus Hefe. 10 g *APD1* überexprimierende Zellen wurden zu 0,5 g aliquotiert und mittels Glasperlen aufgeschlossen. Das durch Ultrazentrifugation erhaltene Lysat wurde mit Ni-NTA-Agarose 1 h inkubiert und nach Überführung der Suspension in eine Leersäule konnte Apd1 isoliert werden. **A** Immundetektion von Apd1. Analyse des Apd1-Gehaltes der einzelnen Fraktion während der Aufreinigung. UZ: Probe des Lysats vor der Ultrazentrifugation, nUZ: nach der Ultrazentrifugation, D: Durchlauf, W: Waschfraktion, F2-F4: Eluatfraktionen 2-4. Es wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. **B** ESR-Spektrum von F2 und F4 nach Reduktion mit 2 mM Natriumdithionit. ESR-Bedingungen siehe Kap. 3.3.7.

Apd1 konnte somit erfolgreich aus Hefe isoliert und mittels Western Blot und ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Jedoch macht die geringe Proteinausbeute aus einer großen Menge Zellmasse diese Art der Untersuchung nicht praktikabel. Anhand von Abbildung 4-33 **A** ist ersichtlich, dass ein Großteil des Proteins nicht an das Säulenmaterial band und sich im Durchlauf befand, was die geringe Proteinausbeute begründet. Eine weitere Begründung könnte der Abbau des N-terminalen His-Tags des Proteins durch Proteasen im Zelllysat sein. Zwar wurde mit effektiven Proteaseinhibitor-Tabletten und PMSF in allen verwendeten Puffern gearbeitet, doch wurden für die Isolation ca. vier Stunden benötigt und ein Abbau des Zielproteins ist damit nicht auszuschließen. Um die Zeit der Probenvorbereitung zu minimieren, wurde folgend eine ESR-Probe direkt aus Zellextrakt eines Glasperlenaufschlusses von 0,5 g Zellen gefertigt. Nach Ernte und Aufschluss der Hefezellen gemäß Kapitel 3.2.13 wurden je 300 µl

Zellextrakt im anaeroben Zelt für 5 min anaerobisiert. Nach Zugabe von 2 mM Natriumdithionit (Endkonzentration) wurde für weitere 5 min inkubiert und die Probe nach Überführung in ein ESR-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

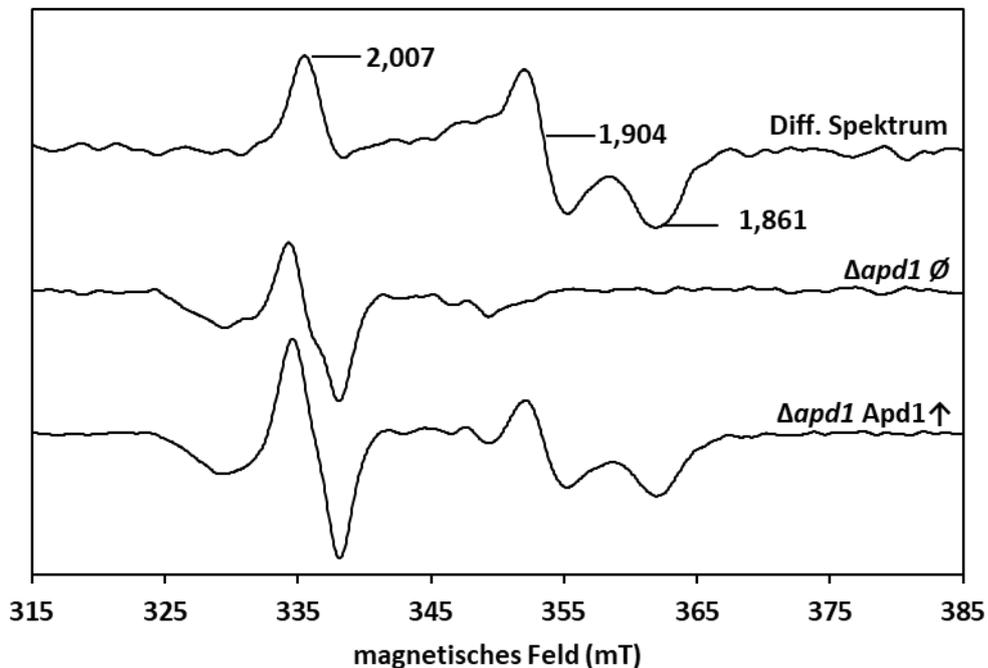


Abbildung 4-34: ESR-spektroskopischer Nachweis von Apd1 im Zellextrakt. Dargestellt von unten nach oben: Zellextrakt von $\Delta apd1$ mit überexprimiertem Apd1 (Apd1 \uparrow), Zellextrakt von $\Delta apd1$ mit Leerplasmid (\emptyset), Differenzspektrum von Apd1 \uparrow und \emptyset nach Reduktion mit 2 mM Natriumdithionit. ESR-Bedingungen siehe Kap. 3.3.7. Die Zellextrakte lagen in TNETG-Puffer vor. Die einzelnen Spektren wurden bei 77 K aufgenommen und auf das jeweilige Peakmaximum normalisiert. Die Mikrowellenleistung lag bei 20 mW, die Frequenz bei 9,43 GHz und die Modulationsamplitude bei 1,5 mT.

In $\Delta apd1$ wurde ein schwaches EPR-Signal bei $g = 1,94$ und ein stärkeres Radikalsignal bei $g = 2,0$ detektiert. Wurde Apd1 in $\Delta apd1$ überexprimiert, war ein deutliches ESR-Signal des $[2Fe-2S]^{2+}$ -Clusters bei 77 K detektierbar, das im Zellextrakt des Deletionsstammes nicht nachweisbar war (Abb. 4-34). Vergleicht man die g -Werte des Differenzspektrums (Apd1_ZE) mit jenem von rekombinant aus *E. coli* gereinigtem Protein (Apd1_P) ist ersichtlich, dass die drei g -Werte nahezu identisch waren (Tabelle 4-3). Somit können diese Signale eindeutig Apd1 zugeordnet werden.

Tabelle 4-3: g -Werte für Dithionit reduziertes gereinigtes Apd1 aus *E. coli* und Apd1 exprimiert in *S. cerevisiae*.

| | g_x | g_y | g_z |
|----------------|-------|-------|-------|
| Apd1_P | 2,008 | 1,904 | 1,861 |
| Apd1_ZE | 2,007 | 1,904 | 1,861 |

Auf diese Weise ist es möglich den Einbau des $[2Fe-2S]$ -Clusters von Apd1 anhand der ESR-Spektroskopie mit dem Einsatz einer moderater Zellmasse zu untersuchen. Da 0,5 g

Portionen an Hefezellen für eine Probe für die ESR-Spektroskopie ausreichen, konnte eine simultane Kultivierung und Untersuchung mehrerer Proben gleichzeitig erfolgen.

4.6.2 Untersuchung des Clustereinbaus in Apd1 mittels ESR-Spektroskopie

Im folgenden Abschnitt soll auf den Zusammenhang zwischen einzelnen Komponenten der CIA-Maschinerie und dem Clustereinbau von Apd1 eingegangen werden. Ist dieser Einbau CIA-Maschinerie-spezifisch, so sollte bei Depletion einzelner CIA-Faktoren eine Abnahme des ESR-Signals von Apd1 erfolgen. Untersucht wurde der Einfluss der Depletion von Cfd1 als Komponente der frühen CIA-Maschinerie, Cia1 als Teil der späten CIA-Maschinerie und Nar1 als Vermittler zwischen den beiden.

Einfluss der Kohlenstoffquelle auf den Einbau des [2Fe-2S]-Clusters in Apd1

Da die Inkorporierung des Clusters über CIA-Stämme, die unter der Kontrolle des Gal1-10-Promotors stehen, nachverfolgt werden sollte, wurde zunächst der Einfluss der Kohlenstoffquelle auf den Einbau des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 in WT-Zellen untersucht. Hierfür wurden W303-Zellen mit transformiertem Apd1-Plasmid unter der Kontrolle des *FBA1*-Promotors resp. ein Leerplasmid in 100 ml SC-Glu - resp. SC-Gal-Medium herangezogen. Die Anfertigung der ESR-Proben erfolgte wie unten beschrieben.

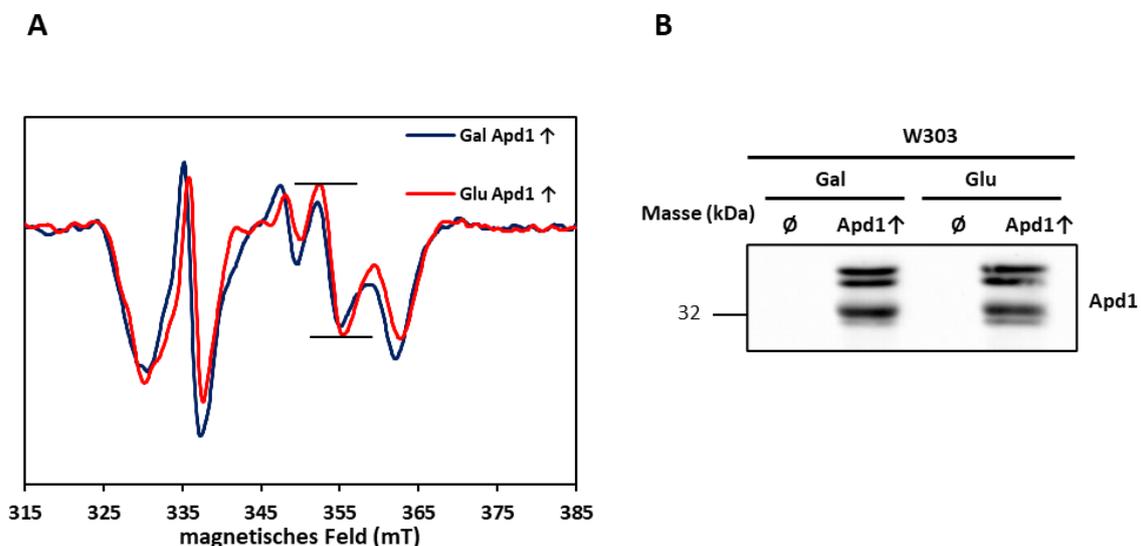


Abbildung 4-35: Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Inkorporierung des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 in W303-Zellen. **A** ESR-Spektren des Gesamtzellextraktes von WT-Zellen. Blau: Gesamtzellextrakt von in galaktosehaltigem Medium gewachsenen Zellen. Rot: Gesamtzellextrakt von in glukosehaltigem Medium gewachsenen Zellen. Aufgeschossen wurden je 0,5 g Hefezellen. Es wurden 300 µl Zellextrakt unter anaeroben Bedingungen nach Zugabe von 2 mM Natriumdithionit für 5 min inkubiert. Die einzelnen Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die Mikrowellenleistung lag bei 20 mW, die Frequenz bei 9,43 GHz und die Modulationsamplitude bei 1,5 mT. **B** Nachweis der Expression von Apd1 mittels Immundetektion. Es wurden je 20 µg Gesamtzellextrakt analysiert.

Zur besseren Vergleichbarkeit der ESR-Proben untereinander wurden die gemessenen Spektren auf die Gesamtproteinkonzentration des jeweiligen Zellextraktes normalisiert. Abbildung 4-35 **A** zeigt durch den Vergleich der Intensitäten der beiden ESR-Spektren, dass die Wahl der Kohlenstoffquelle an sich keinen Einfluss auf den Einbau des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 oder den Anteil von Apd1 am Gesamtzellextrakt (Abb. 4-35 **B**) hat. Zur Quantitativen Auswertung wurde die Amplitude des g_Y -Wertes herangezogen. Da in diesem Bereich nur ein Apd1-spezifisches Signal zu detektieren ist, wurde darauf verzichtet für die Analyse der Daten ein Differenzspektrum von \emptyset und Apd1 \uparrow zu bilden. Für die an zwei unterschiedlichen Tagen angefertigten Messreihen war eine hohe Varianz ersichtlich. Die g_Y -Amplitude der Reihe 1 wies eine Intensität von 0,0726 auf, wohingegen jene von Reihe 2 nur eine von 0,0337 besaß (Abb. 4-36, blau). Für die in Glukose kultivierten Zellen wurde eine vergleichbare Variabilität beobachtet (Abb. 4-36, rot). Trotz unterschiedlicher Amplituden bleibt das relative Gal/Glu-Signalverhältnis in einer Reihe konstant. Zusammengefasst ist in W303 ist kein Effekt der Kohlenstoffquelle Galaktose oder Glukose auf das ESR-Signal von Apd1 zu verzeichnen.

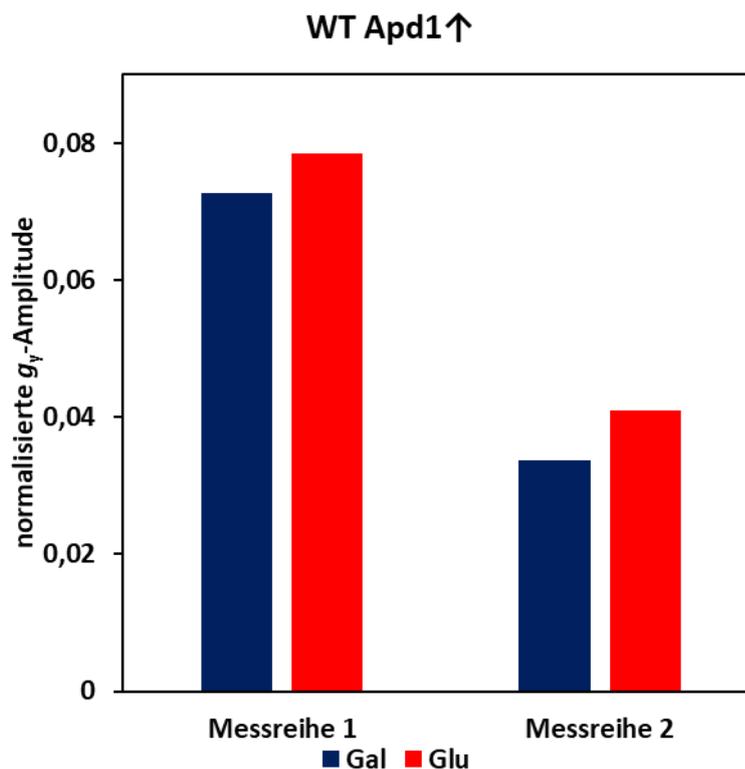


Abbildung 4-36: Intensitäten der gemessenen g_Y -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in WT. Grafische Darstellung der auf den Proteingehalt des Gesamtzellextraktes normalisierten g_Y -Amplituden.

Um den jeweiligen Faktor der CIA-Maschinerie regulieren zu können, wurde mit Stämmen gearbeitet, die die Expression des Gens unter Kontrolle des Gal1-10-Promotors stellen. Somit wird, unter Verwendung von Glukose während der Zellkultivierung, die Expression Gens unterdrückt. Die Regulation erfolgte je nach CIA-Faktor für 40-64 h. Als Maß für die erfolgreiche Depletion der CIA-Maschinerie-Komponenten diente in dieser Arbeit die Aktivität des [4Fe-4S]-Proteins Leu1.

Einfluss von Cfd1 auf den [2Fe-2S]-Clustereinbau von Apd1

Cfd1 bildet mit Nbp35 einen heterotetrameren Komplex und ist Teil der frühen CIA-Maschinerie. Zur Identifizierung der Rolle von Cfd1 auf die Inkorporierung des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 wurde im Folgenden dieser CIA-Faktor über verschiedene Zeiträume herunterreguliert und der Gehalt an Holo-Apd1 über die ESR-Spektroskopie verfolgt. Hierfür wurde in den Stamm Gal1-10_CFD1 das Plasmid 426_{FBA}His₈_TS_APD1 resp. ein Leerplasmid transformiert. Die Zellen wurden im Folgenden über verschiedene Zeiträume (40 oder 64 h) in galaktose- oder glukosehaltigem Medium kultiviert. Nach der Ernte der Zellen und erfolgtem Aufschluss mittels Glasperlen nach Kapitel 3.2.13 erfolgte die Präparation der ESR-Proben und Leu1-Aktivitätsmessung. Bei effizienter Depletion des CIA-Faktors Cfd1 durch Wachstum in Glukose, resultierte dies in einem verminderten Einbau an Fe/S-Cluster in Targetproteine. Als Kontrolle des Expressionslevels von Cfd1 wurde die spezifische Aktivität von Leu1 bestimmt. Durch die Aktivitätsmessung einer Leerplasmid-Kontrolle sollte der Einfluss der Überexpression von Apd1 auf die Hefezellen überwacht werden. Die hier dargestellten Aktivitäten stellen den Mittelwert über vier Messreihen hinweg dar.

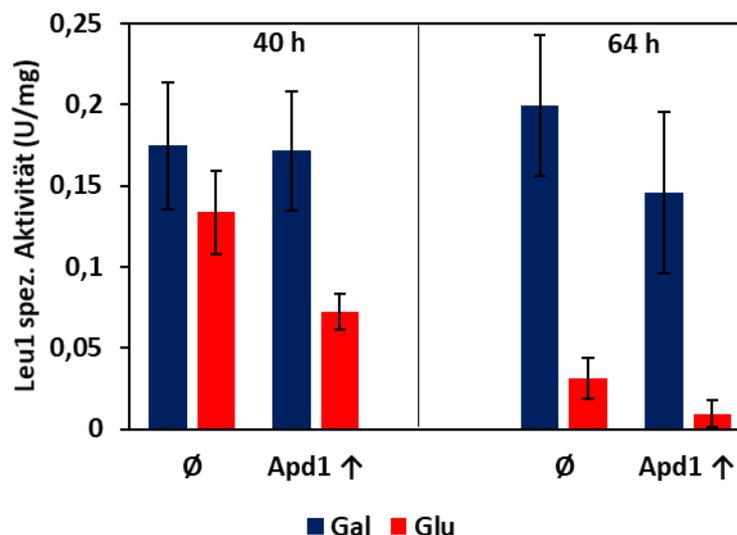


Abbildung 4-37: Spezifische Aktivität von Leu1 in Gal_CFD1-Hefezellen nach 40 resp. 64 h Kultivierung in SC-Glukose oder -Galaktose. (n = 4 für 40 h resp. 6 für 64 h).

Nach 40-stündiger Kultivierung in glukosehaltigem Medium ist ein Aktivitätsverlust zu beobachten. Die Leu1-spezifische Aktivität in Apd1 über-exprimierenden Zellen sank um 57 % wohingegen die Kontrolle mit Leerplasmid nur um 24 % sank. Nach 64 h in Glukose konnte nur noch eine Restaktivität von 16 resp. 6 % detektiert werden (Abb. 4-37). Die Aktivität von Leu1 steht im direkten Zusammenhang mit der Inkorporierung ihres [4Fe-4S]-Clusters und verringert sich über die Zeit in der der CIA-Maschinerie-Faktor Cfd1 herunterreguliert wird. Sollte der Einbau des [2Fe-2S]-Clusters ebenso von diesem Faktor abhängen, sollte sich dies in ESR-Spektren des Zellextraktes Apd1 über-exprimierender Zellen bemerkbar machen.

In Abbildung 4-38 **A** sind ESR-Spektren einer Messreihe übereinander gelagert dargestellt. Je länger eine Regulation in Glukose erfolgte, desto schwächer wurde das Apd1-ESR-Signal. Der Nachweis von Apd1 im Zellextrakt wurde mittels Western Blot bestätigt. Erst ab einer Depletionszeit von 64 h war ein signifikant schwächeres Apd1-Signal zu detektieren. Cfd1 war im Zellextrakt bereits nach 24 h nicht mehr mittels Western Blot nachweisbar (Abb. 4-38 **B**).

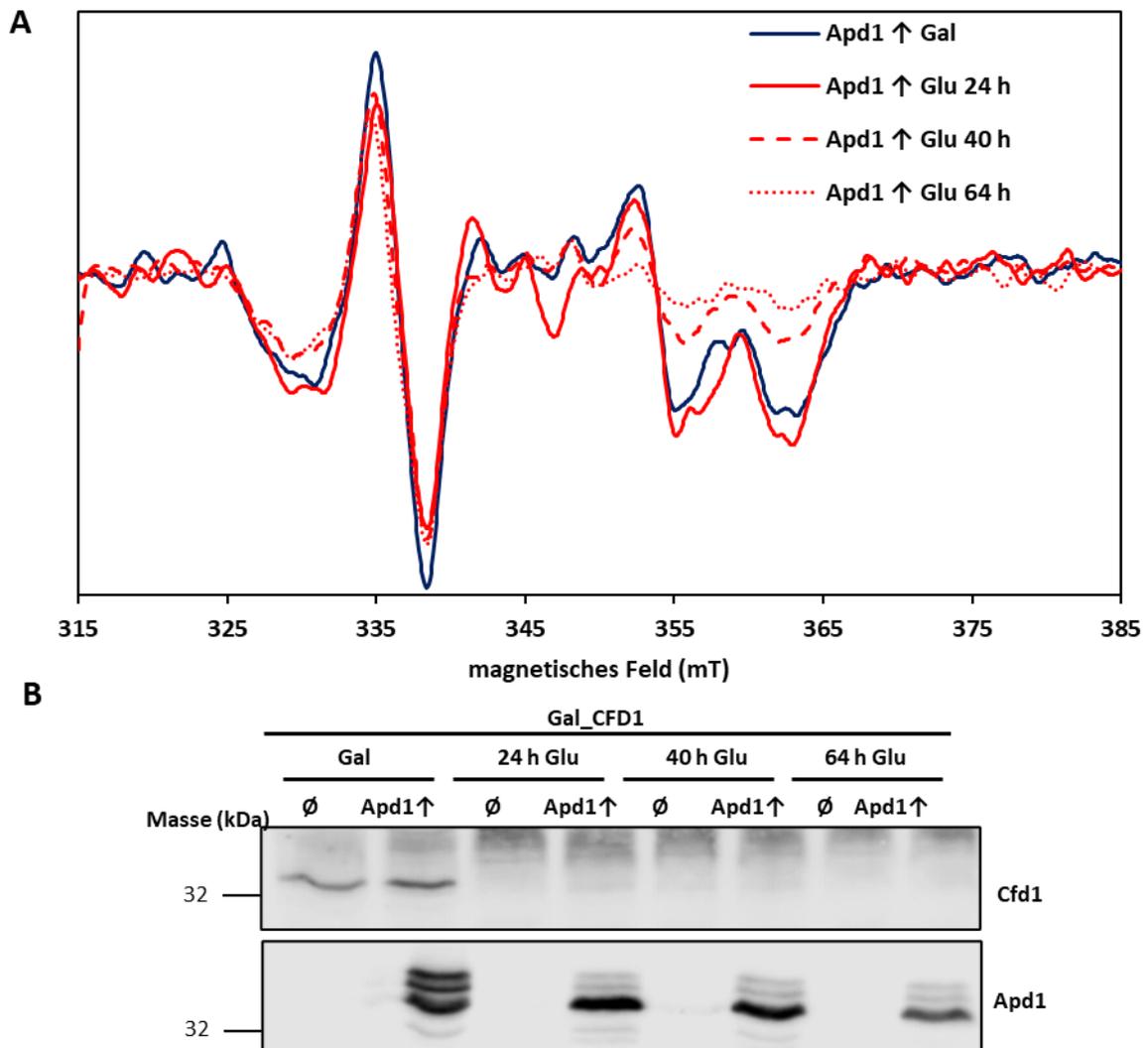


Abbildung 4-38: ESR-Signal und Western-Blot für Apd1 überexprimierende Gal_CFD1-Hefezellen. **A** ESR-Spektren von Apd1 im Zellextrakt von Gal1-10_CFD1-Hefezellen nach 24, 40 und 64 h Regulation in glukosehaltigem Medium. Die dargestellten Spektren sind die Summe aus zwei Scans und es wurde eine Baseline-Korrektur mit anschließender Glättung vorgenommen. Die einzelnen Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die Mikrowellenleistung lag bei 20 mW, die Frequenz bei 9,43 GHz und die Modulationsamplitude bei 1,5 mT. Die Intensität wurde um den Gesamtproteingehalt, der mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt wurde, korrigiert. **B** Nachweis der Expression von Apd1 mittels Immundetektion. Es wurden je 50 µg Gesamtzellextrakt analysiert.

In Abbildung 4-39 sind die um den Gesamtproteingehalt normalisierten Intensitäten der g_{γ} -Amplituden grafisch dargestellt. Die große Varianz der Messwerte, auf die im

vorherigen Kapitel bereits eingegangen wurde, wiederholt sich hier wieder. Zur besseren Übersicht wurde auf die Bildung eines Mittelwertes verzichtet und die einzelnen Messergebnisse nebeneinander dargestellt.

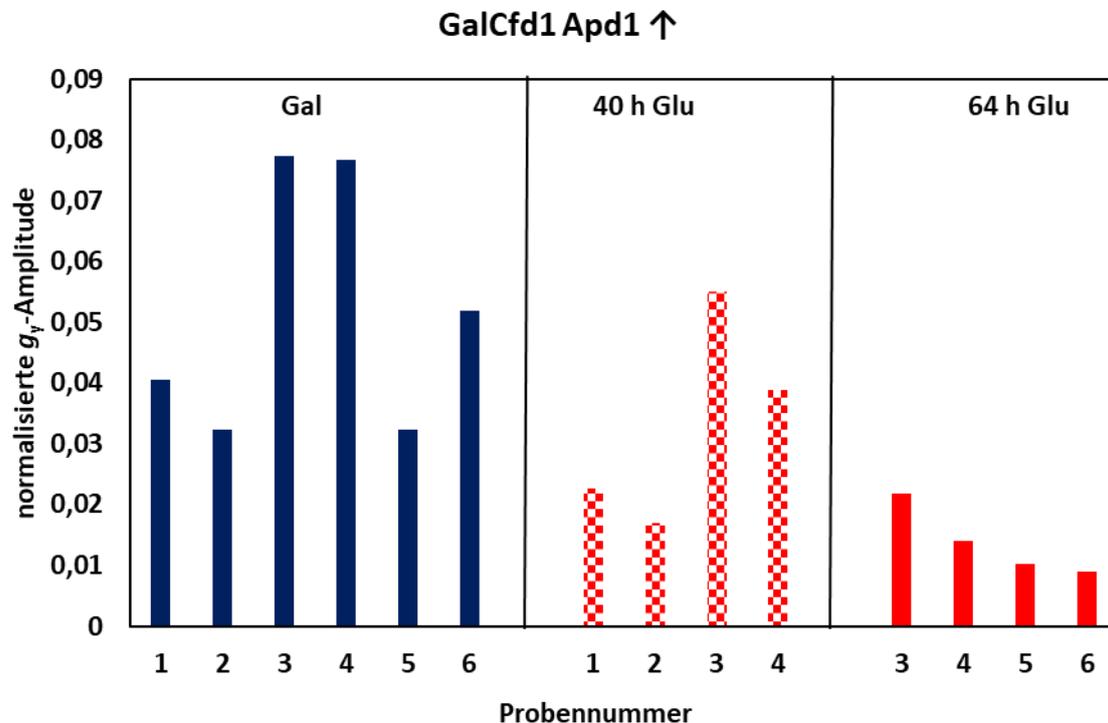


Abbildung 4-39: Intensitäten der gemessenen g_y -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in Gal_CFD1. Grafische Darstellung der normalisierten g_y -Amplituden. Die Intensität der g_y -Amplitude wurde auf den Proteingehalt des Gesamtzellextraktes normalisiert. Proben mit identischer Probennummer stammen aus einer Messreihe.

Einfluss von Nar1 auf den [2Fe-2S]-Clustereinbau von Apd1

Nar1 gilt als Bindeglied zwischen dem Scaffold-Komplex und dem eigentlichen CIA-Targeting-Komplex. Zur Überprüfung des Einflusses von Nar1 auf die Inkorporierung des Clusters von Apd1 wurde dieser CIA-Faktor im Gal_NAR1-Hefestamm durch Wachstum in Glukose depletiert. Es wurde auch hier mit dem unten beschriebenen Plasmid gearbeitet. Die Kultivierung erfolgte über 20 resp. 40 h in glukose- oder galaktosehaltigem Medium. Aus Abbildung 4-40 ist ersichtlich, dass nach 20-stündiger Kultivierung praktisch keine Depletion des Nar1-Proteins erfolgte. Die Leu1-spezifische Aktivität diente auch hier als Maß für die Funktionalität des CIA-Faktors. Die Spezifische Aktivität der Apd1-überexprimierenden Zellen ist hier bei Glukose-Wachstum mit $0,17 \pm 0,06$ U/mg leicht höher als mit $0,12 \pm 0,06$ U/mg bei Galaktose-Wachstum. Aus diesem Grund wurde eine ESR-spektroskopischen Analyse des Apd1-Clustereinbaus für 20 h nicht durchgeführt. Nach 40 h Depletion des CIA-Faktors konnte eine Leu1-Aktivität von $0,24 \pm 0,06$ U/mg bei Wachstum auf Galaktose und $0,002 \pm 0,002$ U/mg auf Glukose gemessen werden.

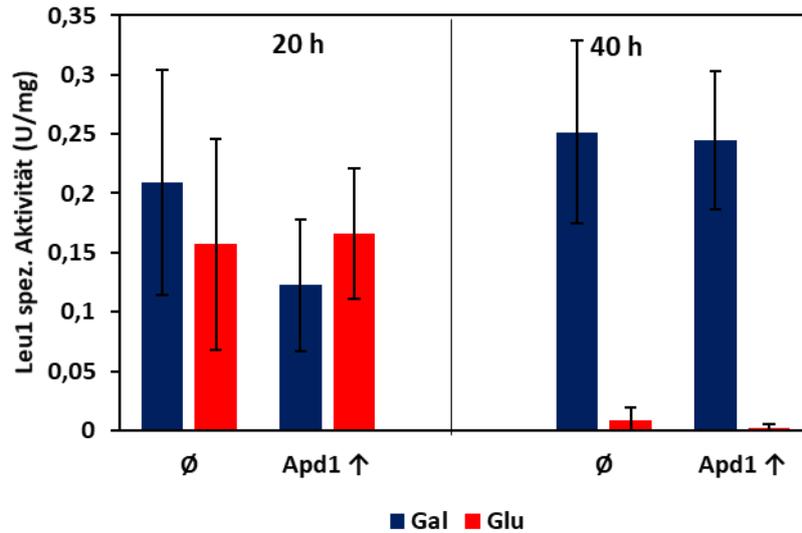


Abbildung 4-40: Spezifische Aktivität von Leu1 in Gal_NAR1-Hefezellen nach 20 resp. 40 h Kultivierung in Glukose oder Galaktose (n = 2 resp. 3 für 20 resp. 40 h).

Dies spiegelt sich auch in der Messung des Apd1-ESR-Signals wider. Bei Wachstum auf galaktosehaltigem Medium ist ein deutliches Apd1-Signal zu detektieren, dass in der nach Wachstum für 40 h auf Glukose nahezu verschwindet (Abb. 4-41 A). Der Nachweis von Apd1 im Zellextrakt wurde auch hier mittels Western Blot und Immundetektion durchgeführt (Abb. 4-41 B).

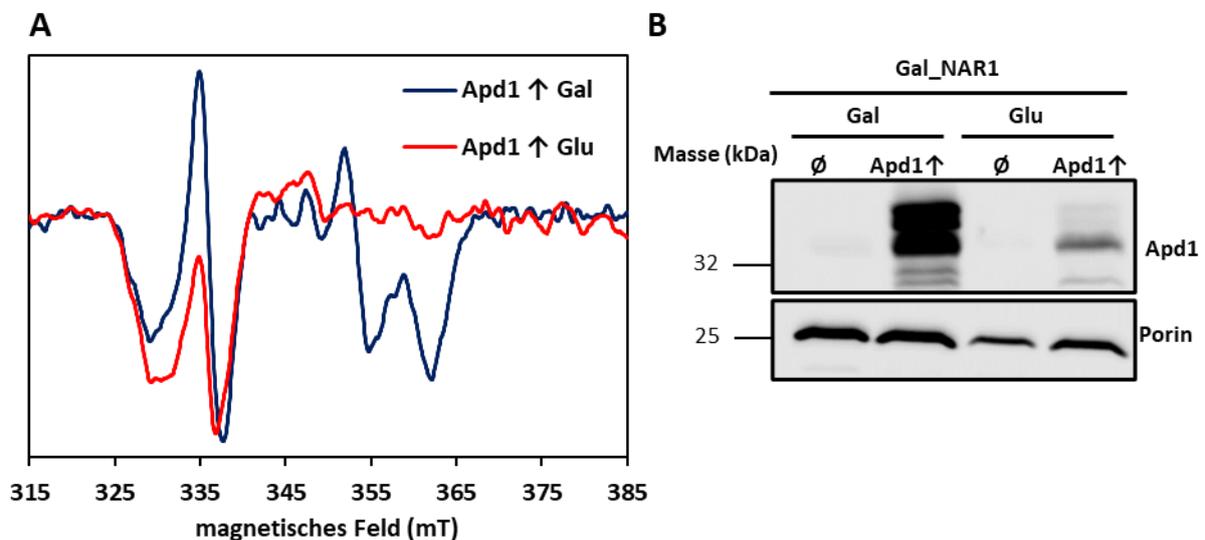


Abbildung 4-41: ESR-Signal und Western-Blot für Apd1 überexprimierende Gal_NAR1-Hefezellen. **A** ESR-Spektren von Apd1 im ZE von Gal_Nar1-Hefezellen nach 40 h Regulierung in glukosehaltigem Medium. Die dargestellten Spektren sind die Summe aus zwei Scans und es wurde eine Baseline-Korrektur mit anschließender Glättung vorgenommen. Die Mikrowellenleistung lag bei 20 mW und die Frequenz bei 9,43 GHz. Die Intensität wurde um den Gesamtproteingehalt, der mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt wurde, korrigiert. **B** Der Nachweis von Apd1 erfolgte durch Immundetektion mit einem Apd1-spezifischen Antikörperserum. Aufgetragen wurden pro Spur 50 µg.

Nach 40 h Nar1-Depletion in den Apd1-überexprimierenden Gal1-10_NAR1-Zellen ist nur noch eine schwache Apd1-Bande zu detektieren, wohingegen die Intensität der Porin-Bande konstant bleibt. Dies bestätigt den in der Literatur beschriebenen Effekt der

verminderten Stabilität von Fe/S-Proteinen in ihrer Apoform (Balk *et al.*, 2005b, Netz *et al.*, 2011).

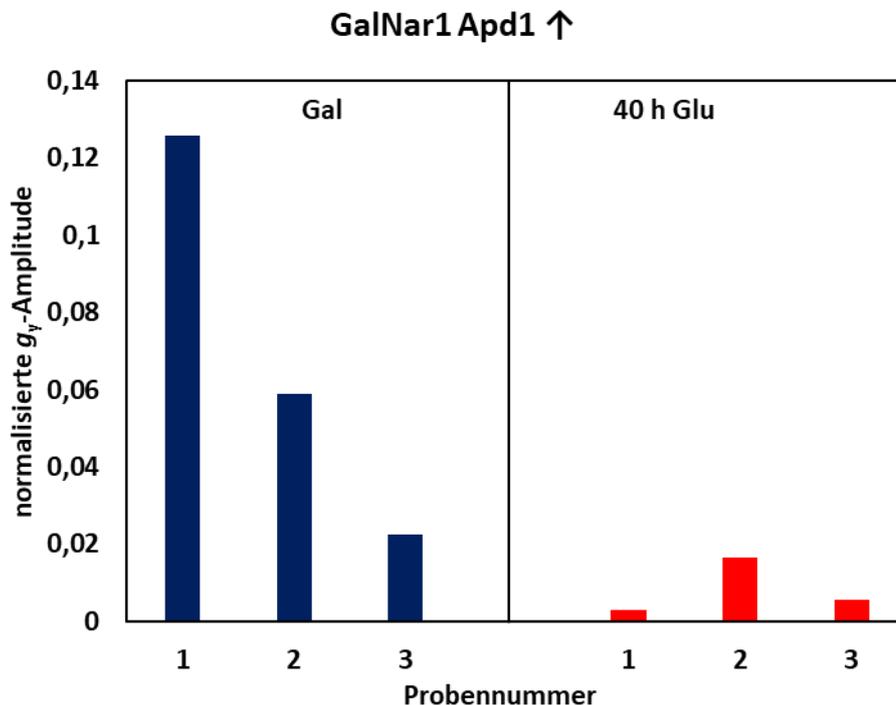


Abbildung 4-42: Intensitäten der gemessenen g_γ -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in Gal_NAR1. Grafische Darstellung der normalisierten g_γ -Amplituden. Die Intensität der g_γ -Amplitude wurde auf den Proteingehalt des Gesamtzellextraktes normalisiert.

Die auf den Gesamtproteingehalt normalisierten g_γ -Amplituden sind in Abbildung 4-42 gezeigt. Auch hier war wieder die hohe Varianz der Intensität der verschiedenen Gal-Proben zu verzeichnen. Die normalisierte Intensität schwankte hier zwischen 0,126 und 0,023. Somit wurde hier auch die auf die Gal-Werte normierte Darstellung zur besseren Übersicht des Effektes gewählt. Die Intensität der g_γ -Amplitude betrug nach 40 h Nar1-Depletion in Glukose lediglich noch 18 % \pm 11 % im Vergleich zur Gal-Probe

Einfluss von Cia1 auf den [2Fe-2S]-Clustereinbau von Apd1

Cia1 ist neben Cia2 und Met18 Teil des CIA-Targeting-Komplexes und somit direkt am Transfer des Fe/S-Clusters auf Zielproteine beteiligt. Ob der [2Fe-2S]-Clustereinbau von dem Faktor Cia1 abhängt, wurde durch die Regulation eines Gal_CIA1-Stammes durch Glukose resp. Galaktose bei gleichzeitiger Überexpression von Apd1 untersucht. Wie in den vorherigen Experimenten wurde mit einer Plasmidkopie von Apd1 unter der Kontrolle des starken *FBA1*-Promotors gearbeitet. Die Kultivierung erfolgte über 40 resp. 64 h in glukose- oder galaktosehaltigem Medium. Zur Überprüfung der Cia1-Depletion des Gal-Stammes bei Wachstum auf Glukose über die verschiedenen Kultivierungszeiträume, wurde auch hier die Leu1-Aktivitätsmessung als Methode der Wahl durchgeführt.

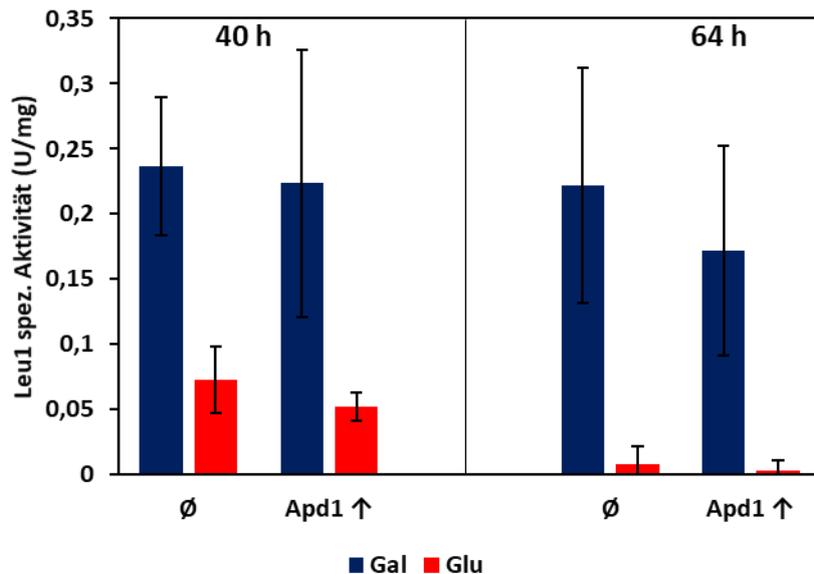


Abbildung 4-43: Spezifische Aktivität von Leu1 in Gal_CIA1-Hefezellen nach 40 resp. 64 h Kultivierung in Glukose oder Galaktose (n = 5 resp. 7 für 40 resp. 64 h).

Nach einer 40-stündigen Kultivierungszeit in Glukose zeigt sich nur noch eine Restaktivität der IPMI von 23 % ($0,05 \pm 0,02$ U/mg) der Apd1 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Zellen in Galaktose-Medium ($0,22 \pm 0,17$ U/mg). Bei einer Verlängerung der Kultivierungsdauer in Glukose auf 64 h verringerte sich diese auf $0,003 \pm 0,005$ U/mg wohingegen jene Aktivität der Galaktose-Kultur sich kaum änderte ($0,17 \pm 0,08$ U/mg) (Abb. 4-43). Zur Messung der Inkorporierung des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 wurden ESR-Proben von Gal_CIA1 Zellen mit überexprimiertem Apd1 nach unterschiedlicher Depletionszeit in Glukose gefertigt. Nach einer Depletionszeit von 40 h sank die Leu1-Aktivität um 77 % im Vergleich zur Gal-Probe, somit wurde auch hier Proben nach 64 h in Glukose gefertigt. In Abbildung 4-44 **A** ist die Abnahme der Intensität des Apd1-ESR-Signals über den gewählten Kultivierungszeitraum in glukosehaltigem Medium dargestellt. Der Nachweis an Apd1 erfolgte über die Immundetektion mit Apd1-spezifischen Antikörpern. Je länger die Kultivierung in Glukose erfolgte, desto schwächer wurde die Apd1-Bande (Abb. 4-44 **B**).

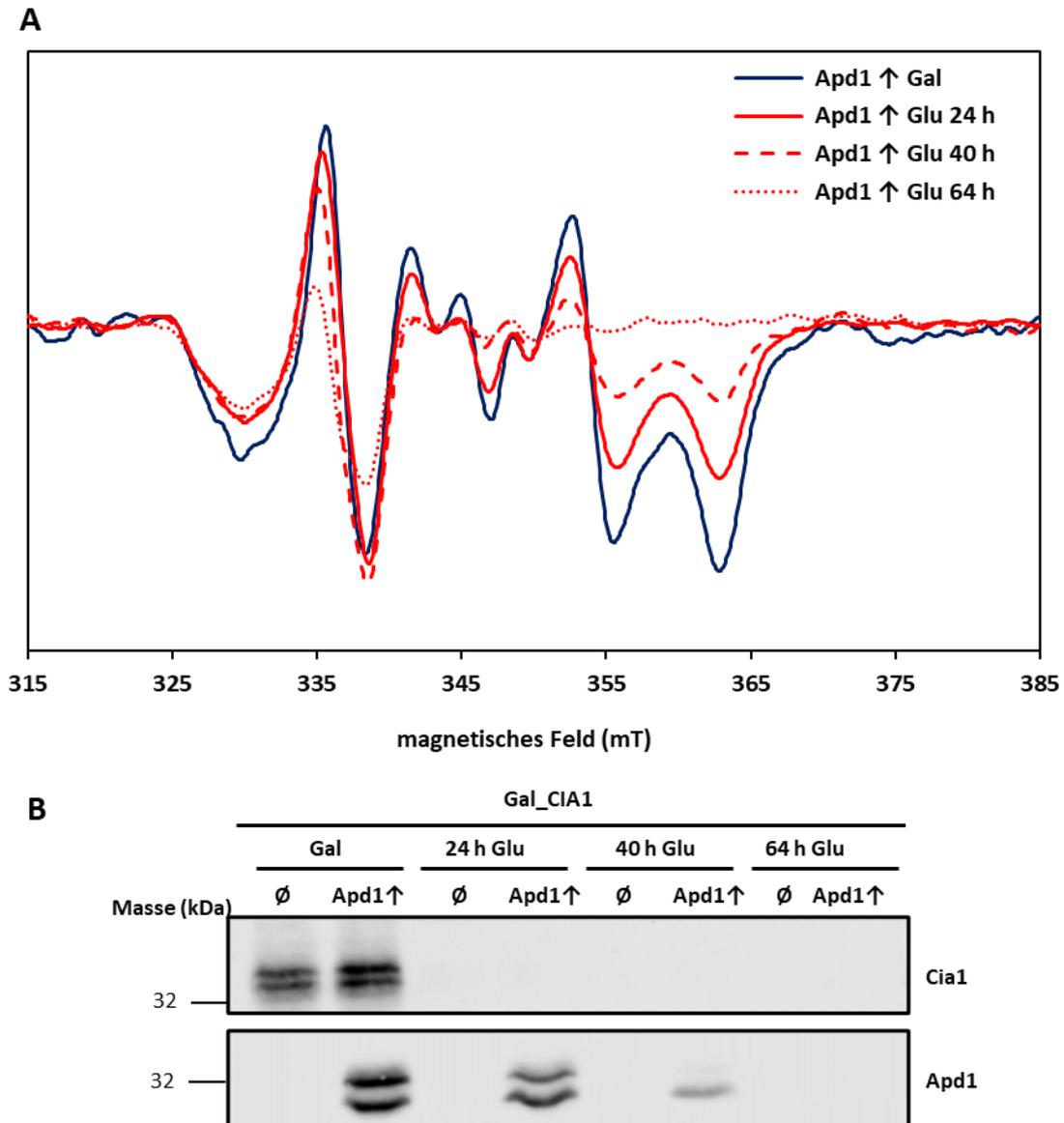


Abbildung 4-44: ESR-Signal und Western-Blot für Apd1 überexprimierende Gal_CIA1-Hefezellen. **A** ESR-Spektren von Apd1 im ZE von Gal_CIA1-Hefezellen nach 24, 40 und 64 h Regulierung in glukosehaltigem Medium. Die dargestellten Spektren sind die Summe aus zwei Scans und es wurde eine Baseline-Korrektur mit anschließender Glättung vorgenommen. Die einzelnen Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die Mikrowellenleistung lag bei 20 mW, die Frequenz bei 9,43 GHz und die Modulationsamplitude bei 1,5 mT. Die Intensität wurde um den Gesamtproteingehalt, der mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt wurde, korrigiert. **B** Der Nachweis von Apd1 erfolgte durch Immundetektion mit einem Apd1-spezifischen Antikörperserum. Aufgetragen wurden pro Spur 50 µg.

In Abbildung 4-45 sind die um den Gesamtproteingehalt normalisierten g_y -Amplituden grafisch dargestellt. Die große Varianz der Messwerte, ist auch in diesem Telexperiment wieder vorhanden. Jedoch war nach einer Kultivierungszeit von 40 h in Glukose im Mittel

eine Intensitätsabnahme des Apd1-Signals um 34 % und nach 64 h Depletionszeit war kein Signal mehr zu detektieren.

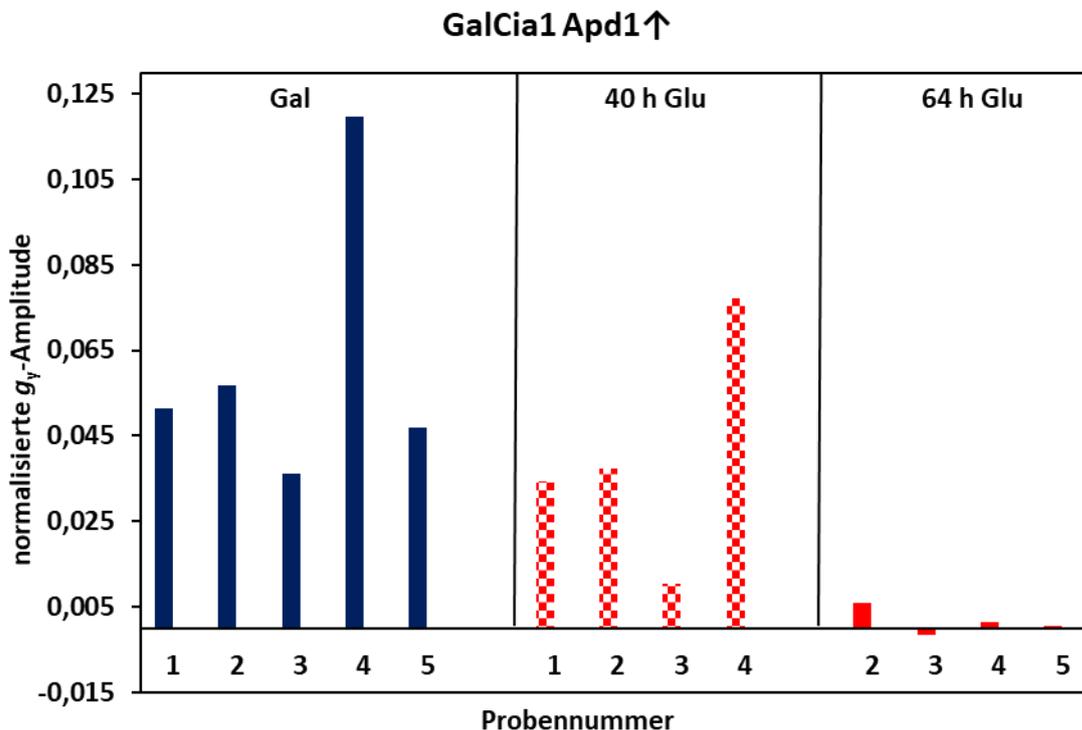


Abbildung 4-45: Intensitäten der gemessenen g_y -Amplituden des Apd1-ESR-Signals in Gal_CIA1. Grafische Darstellung der normalisierten g_y -Amplituden. Die Intensität der g_y -Amplitude wurde auf den Proteingehalt des Gesamtzellextraktes normalisiert.

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Faktoren der CIA-Maschinerie auf die Reifung des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 untersucht. Für jeden der untersuchten Faktoren Cfd1, Nar1 und Cia1 konnte bei Depletion über verschiedene Zeiträume hinweg eine Verminderung des inkorporierten Fe/S-Clusters von Apd1 mittels ESR-Spektroskopie gezeigt werden. Für die CIA-Faktoren Cfd1 und Cia1 konnte sogar durch die langsamere Depletion in Glukose die dazu proportionale Verminderung des Apd1-ESR-Signals belegt werden. Diese Ergebnisse zeugen erstmals von einer CIA-Maschinerie-abhängigen Reifung eines cytosolischen [2Fe-2S]-Proteins.

4.6.3 Einfluss des C-terminalen Tryptophans auf das Fe/S-Cluster von Apd1

Im obigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der Einbau des [2Fe-2S]-Clusters von über einen Vektor überexprimiertem Apd1 CIA-Maschinerie abhängig ist. In unserem Arbeitskreis wurde bereits, nach der in dieser Arbeit etablierten Screening-Methode mit Gallobenzophenon, der Einfluss des C-terminalen Tryptophans auf die Lebensfähigkeit unter Apd1-essenziellen Bedingungen belegt. Auf einem 416-Plasmid unter der Kontrolle des natürlichen Promotors wurden Varianten von Apd1 generiert, deren C-Terminus um eine, drei resp. sechs Aminosäuren gekürzt wurde. Nach Transformation in $\Delta apd1$ wurde ein Tüpfeltest auf Agarplatten mit und ohne 100 μ M Gallobenzophenon durchgeführt.

Bei den C-terminal gekürzten Varianten konnte kein Wachstum unter Apd1-essenziellen Bedingungen festgestellt werden. Unter diesen gewählten Bedingungen verhalten sich die gekürzten Varianten wie die Varianten der Clusterliganden oder ein Leerplasmid (Greth, 2018). In dieser Arbeit wurden weitere Untersuchungen dies bezüglich unternommen. Nach Vorkultivierung der transformierten Zellen wurde ein Tüpfeltest auf Agarplatten nach Zugabe von verschiedenen Gallobenzophenon Konzentrationen durchgeführt.

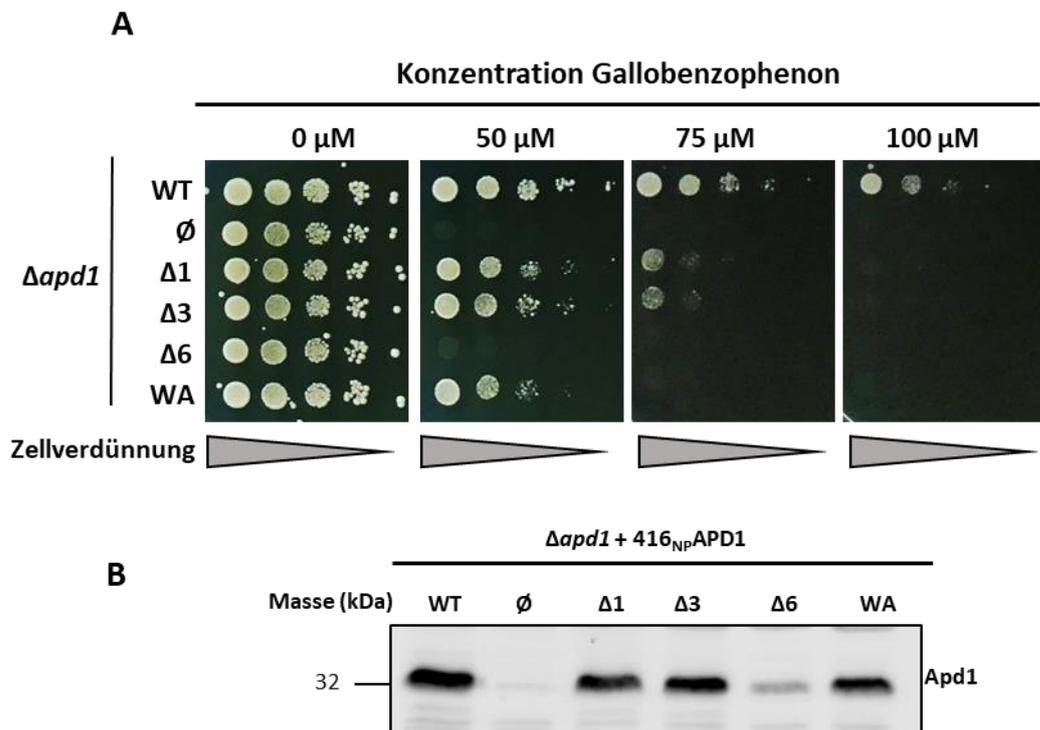
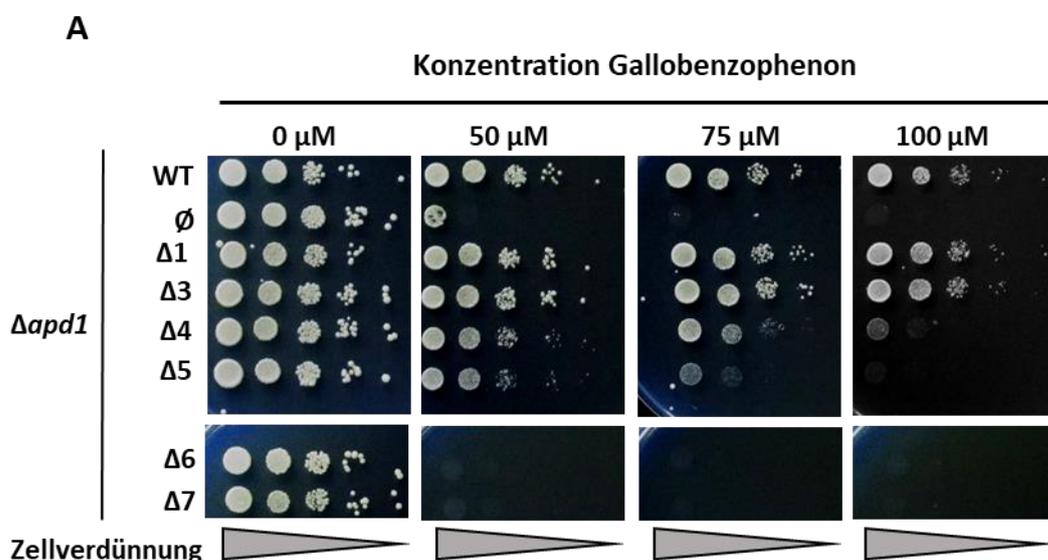


Abbildung 4-46: Tüpfeltest der C-terminal gekürzten Apd1-Varianten bei Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors. **A** Tüpfeltest. *Δapd1* wurde mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in glukosehaltigem SC-Medium wurden auf SC-Agarplatten mit Glukose und Gallobenzophenon in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert. **B** Immundetektion. Der Nachweis von Apd1 erfolgte durch Immundetektion mit einem Apd1-spezifischen Antikörperserum. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μg Zellextrakt.

Abbildung 4-46 **A** zeigt, dass die Letalität von *Δapd1* auf Agarplatten mit einer Konzentration von 50 μM Gallobenzophenon durch eine WT-Kopie des Gens unter der Kontrolle des endogenen Promotors komplementiert wurde. Wurde der C-Terminus um eine resp. drei Aminosäuren verkürzt, resultierte dies jedoch unter diesen Bedingungen (50 μM Gallobenzophenon) in einem verminderten Wachstum der Zellen statt in totaler Letalität. Dieser Effekt verstärkte sich aber bei Erhöhung der Gallobenzophenon-Konzentration auf 75 μM und die Ergebnisse aus der vorhergehenden Untersuchung (Greth, 2018) auf Platten mit 100 μM Gallobenzophenon konnten reproduziert werden. Die Expression von Apd1 und der gekürzten Varianten wurde mittels Western Blot und anschließender Immundetektion überprüft. So zeigen die Mutanten $\Delta 1$ und $\Delta 3$ keinen

deutlichen Unterschied im Gehalt an Apd1 im Zellextrakt (Abb. 4-46 B). Wird das Protein jedoch um sechs Aminosäuren gekürzt, scheint dies in einer verminderten Stabilität des Proteins zu resultieren, da die Apd1-Bande eine deutlich schwächere Intensität aufwies.

Um einen direkten Zusammenhang zwischen der Inkorporierung des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 und dem C-terminalen Tryptophan herstellen zu können, wurde im folgendem Teil der Arbeit die in Kap. 4.5.2 verwendete Plasmidkopie von *APD1* unter Kontrolle des starken *FBA1*-Promotors einer C-terminalen Kürzung des Gens durch Einführen eines Stopp-Kodons unterzogen. Nach Transformation der Plasmide und Vorkultivierung wurde ein Tüpfeltest unter obigen Bedingungen durchgeführt. Abbildung 4-47 A zeigt jedoch, dass der in Abbildung 4-46 A gezeigte Effekt der Deletion des Tryptophans bei Überexpression nicht zum Tragen kam. Bei der Kürzung um eine resp. drei Aminosäuren war unter diesen Bedingungen kein Wachstumsunterschied zu WT-Apd1 zu erkennen. Wurde das Protein weiter gekürzt war bei einer Konzentration von 75 μM bei der $\Delta 4$ -Variante ein stark vermindertes und bei der $\Delta 5$ -Mutante nahezu kein Wachstum mehr feststellbar. Wie schon im vorherigen Experiment ist die $\Delta 6$ Variante bereits ab einer Konzentration von 50 μM nicht mehr lebensfähig. Die Verminderung des Wachstums im Tüpfeltest dieser Mutanten machte sich auch im Nachweis der Proteine mittels Immundetektion bemerkbar. Ab der $\Delta 4$ -Variante nimmt die Intensität der Apd1-Bande bei gleichbleibender Gesamtzellextraktkonzentration stetig ab. Zum Nachweis des [2Fe-2S]-Clusters wurden ESR-Proben aus dem Zellextrakt von $\Delta apd1$ transformiert mit $426_{\text{FBA}}\text{His}_8\text{TS_Apd1}$ resp. den Varianten angefertigt. Bis zu einer Kürzung von drei AS war kein Unterschied in der Signalintensität im Vergleich zur WT-Kontrolle zu beobachten. Ab der Variante $\Delta 4$ ähnelte das ESR-Spektrum jenem des Leerplasmids (Abb. 4-47 C). Somit kann ab diesem Punkt davon ausgegangen werden, dass entweder kein oder eine geringe Menge an Fe/S-Cluster eingebaut wurde oder dass das Protein durch die C-terminale Kürzung an Stabilität verliert, was den schwächeren Banden im Western Blot entsprechen würde (Abb. 4-47 B).



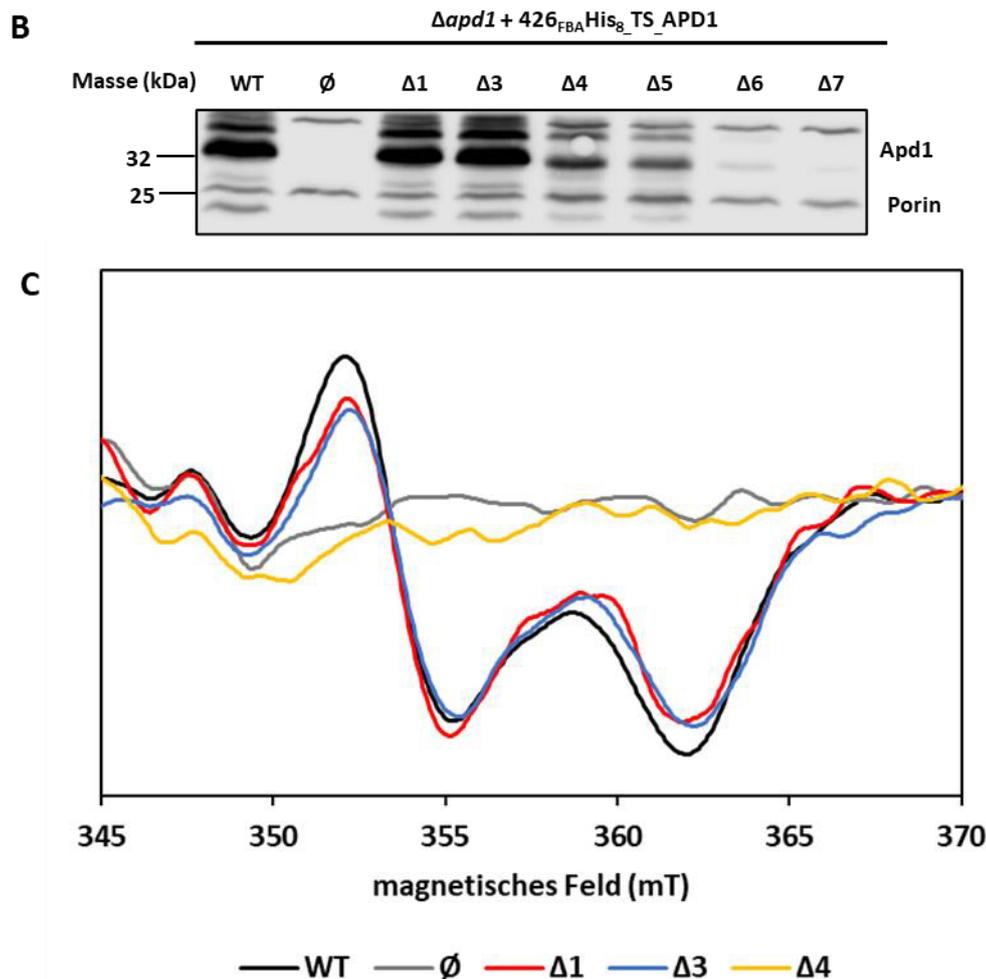


Abbildung 4-47: Tüpfeltest der C-terminal gekürzten Apd1-Varianten bei Expression unter Kontrolle des *FBA1*-Promotors. **A** Tüpfeltest. $\Delta apd1$ wurde mit einem Leerplasmid oder 426_{FBA} -Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in glukosehaltigem SC-Medium wurden auf SC-Agarplatten mit Glukose und Gallobenzophenon in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert. **B** Immundetektion. Der Nachweis von Apd1 erfolgte durch Immundetektion mit einem Apd1- resp. Porin-spezifischen Antikörperserum. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μ g. **C** ESR-Spektren von Apd1 resp. der Varianten $\Delta 1$, $\Delta 3$ und $\Delta 4$ im ZE von $\Delta apd1$. Die dargestellten Spektren sind die Summe aus zwei Scans und es wurde eine Baseline-Korrektur mit anschließender Glättung vorgenommen. Die einzelnen Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die Mikrowellenleistung lag bei 20 mW, die Frequenz bei 9,43 GHz und die Modulationsamplitude bei 1,5 mT. Die Intensität wurde um den Gesamtproteingehalt, der mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt wurde, korrigiert.

4.7 Charakterisierung von *S. cerevisiae* Aim32

In der Dissertation von Kathrin Stegmaier wurde bereits nachgewiesen, dass das Protein Aim32 aus dem Organismus *S. cerevisiae* nach heterologer Expression in *E. coli* einen [2Fe-2S]-Cluster enthält (Stegmaier, 2017). Die putativen Clusterliganden wurden jedoch noch nicht durch Mutagenese, heterologe Expression und Aufreinigung identifiziert. Im

folgenden Teil sollen die Clusterliganden näher untersucht und spektroskopisch analysiert werden.

4.7.1 Identifizierung der Fe/S-Clusterliganden von Aim32 durch Expression in *E. coli*

Bioinformatische Studien zeigten die Ähnlichkeit der C-terminalen Region der *S. cerevisiae* Proteine Apd1 und Aim32 zu TLF's (s. Abb. 4-16). In Kapitel 4.3 wurden bereits durch Mutation jedes Cysteins und bestimmter Histidine der Proteine, die Clusterliganden *in vivo* identifiziert. Jedoch ist unklar, ob jene Aminosäuren auch bei in *E. coli* synthetisiertem Aim32 den Cluster binden. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Mutationen gemäß Kapitel 3.2.9 auf einem *AIM32*-tragenden *E. coli*-Expressionsplasmid eingeführt. Es wurden die Cysteine an Position 213 und 222 sowie die Histidine 249 und 253 zu Alanin mutiert. Die Expression wurde mit dem Zusatzplasmid pRK-ISC zur Unterstützung des Fe/S-Einbaus vorgenommen. Die vier Varianten wurden ebenso wie das WT-Protein über Ni-NTA-Agarose isoliert und aerob gereinigt.

Nach Isolation der Proteine war bereits durch deren Färbung ein markanter Unterschied zwischen WT-Protein und Mutanten auszumachen. Aim32 zeichnete sich durch eine rotbräunliche Farbe aus, wohingegen die Mutanten C213A, C222A und H249A nahezu farblos isoliert wurden. H253A wies hingegen eine schwach rote Färbung auf, präzipitierte aber nach erfolgter Isolierung. Die SDS-Gele der Aufreinigung der vier Alanin-Varianten war bereits ein erster Hinweis auf die geringe Proteinausbeute. In den Eluatfraktionen (E_1 und E_2 in Abbildung 4-48 **D-G**) sind nur schwache Aim32-Banden zu sehen. WT-Aim32 wies im UV/Vis-Spektrum Maxima bei 330, 450 sowie 550 nm auf, was dem typischen Spektrum eines [2Fe-2S]-Proteins ähnelt. Durch die Mutation der Cysteine resp. Histidine in Alanine verlor das UV/Vis-Spektrum diese typischen Eigenschaften und es wurde nur ein Spektrum, das zum größten Teil durch die Lichtstreuung von präzipitiertem Protein zu Stande kam, beobachtet. Nur bei der H253A Mutante war eine sehr schwach ausgeprägte Schulter bei 455 nm zu erkennen (Abb. 4-48 **A**). Die Mutante H253A wies einen [2Fe-2S]-Clustergehalt von ca. 0,5 Cluster pro Monomer auf und wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie weiter untersucht. Die Proteinlösung wurde unter anaeroben Bedingungen mit anaerobem Puffer im geeigneten Maß verdünnt und durch Zugabe von 2 mM Natriumdithionit reduziert. Nach 5 min Inkubation wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die in Abbildung 4-48 **B** dargestellten Spektren wurden bei 77 K gemessen. WT-Aim32 zeigte ein rhombisches Signal einer einzelnen Spezies mit g -Werten von 2,012, 1,902 und 1,860. Bei der H253A Mutante sind alle g -Werte stark verschoben. Es wurde ein zweites ESR-Signal für g_y detektiert, sodass hier eine Mischspezies vorliegen könnte. Die signifikante Änderung des ESR-Spektrums lässt auf eine Änderung der Clusterumgebung schließen. Es könnte sein, dass der Cluster nur noch von drei statt vier Liganden gebunden ist. Das

Ergebnisse

im Elutionspuffer vorhandene Imidazol oder Wasser könnten die Rolle des vierten Liganden übernommen haben.

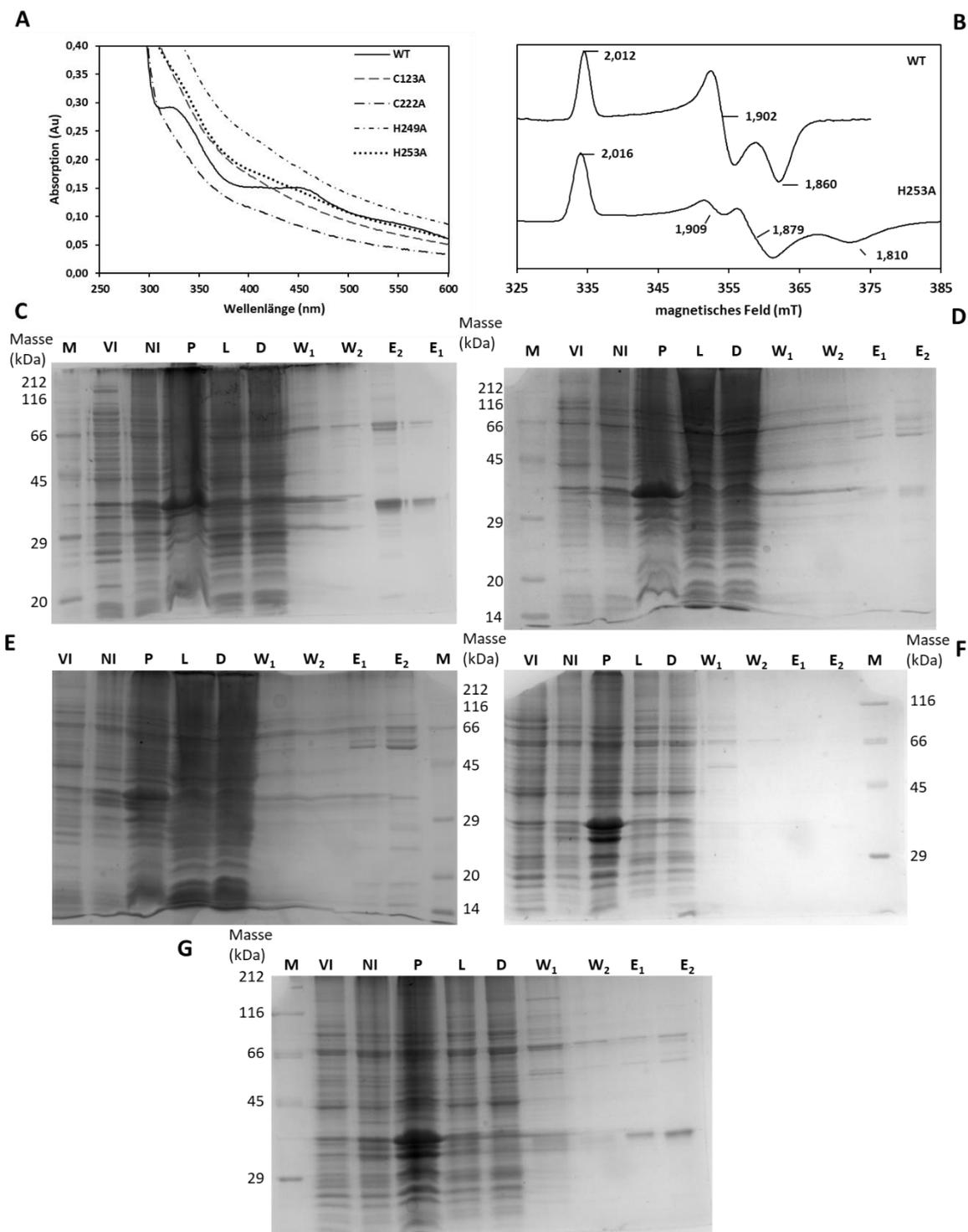


Abbildung 4-48: Vergleich der UV/Vis- und ESR-Spektren und SDS-Gele der Mutanten mit Aim32. A UV/Vis-Spektren. Abgebildet sind Spektren der Proteine zwischen 250 und 600 nm. Die Spektren wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf 280 nm normiert. **B** ESR-Spektren von WT-Aim32 und H253A. Die Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die ermittelten g -Werte sind in den Spektren angezeichnet. Die Proteine lagen in Entsalzungspuffer vor und wurden vor Reduktion mit Natriumdithionit (2 mM) durch die Zugabe von anaerobem Puffer und Inkubation unter Luftausschluss anaerobisiert. SDS-Gele: Marker (mit

den Molekülmassen in kDa), VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, D: Durchlauf, W₁: Waschfraktion zu Beginn, W₂: Waschfraktion am Ende, E₁: 1 µl Eluat, E₂: 2 µl Eluat. **C** WT-Aim32. **D** C123A, **E** C222A, **F** H249A, **G** H253A.

Tabelle 4-4 verdeutlicht die geringere Proteinausbeute der Alanin-Varianten im Vergleich zum WT. Nur H253A konnte in ähnlicher Konzentration isoliert werden, was sich auch an der niedrigen Intensität der jeweiligen Aim32-Banden nach der SDS-PAGE deutlich macht (Abb. 4-48 **D-G**). Ca. 70 % der WT-Protein-Moleküle enthielten einen [2Fe-2S]-Cluster. Der Eisen- und säurelabile Schwefelgehalt der Cystein resp. Histidin zu Alanin-Mutanten resultierte in einer sehr starken Abnahme der Eisen- und Schwefelgehalte. Säurelabiler Schwefel war für C123A, C222A und H249A nicht mehr nachweisbar. Somit können C213, C222 und H249 als Clusterliganden identifiziert werden.

Tabelle 4-4: Protein-, Eisen- und Schwefelgehalt von Aim32 und Varianten.

| | mg Protein/2 l-Kultur | Fe/Protein | S/Protein |
|----------------|-----------------------|------------|-----------|
| Aim32 WT (n=1) | 4,2 | 1,5 | 1,4 |
| C213A (n=1) | 2,3 | 0,4 | 0 |
| C222A (n=1) | 2,3 | 0,3 | 0 |
| H249A (n=1) | 1,8 | 0,6 | 0 |
| H253A (n=1) | 5,3 | 1,0 | 0,9 |

Des Weiteren wurden zur näheren Untersuchung des Histidinbindemotivs Varianten von Aim32 synthetisiert, in denen diese Histidine durch Cysteine ersetzt wurden. Es wurden die Einzelmutanten H249C und H253C sowie die Doppelmutante H249C/H253C analysiert. Nach Expression in *E. coli* mit dem Zusatzplasmid pRK-ISC zur Unterstützung des Fe/S-Einbaus, aerober Isolierung mittels Ni-NTA-Agarose und anschließender Umpufferung, konnten die drei Varianten, die eine rötlich-braune Färbung aufwiesen, mittels SDS-PAGE (Abb. 4-49 **A**) nachgewiesen werden. Die Proteine besaßen die erwartete Größe von ca. 36 kDa und es wurden UV/Vis-Spektren der verdünnten Proteine aufgenommen. Abbildung 4-49 **B** zeigt die deutlichen Auswirkungen auf das UV/Vis-Spektrum von Aim32 bei Änderung der Koordination des Clusters. Im Falle der H249C/H253C-Doppelmutante zeigte sich ein zusätzlicher Peak bei ca. 412 nm. Bei der H253C-Mutante ist jener weniger stark ausgeprägt und der Peak bei ca. 450 nm ist zu leicht höheren Wellenlängen verschoben.

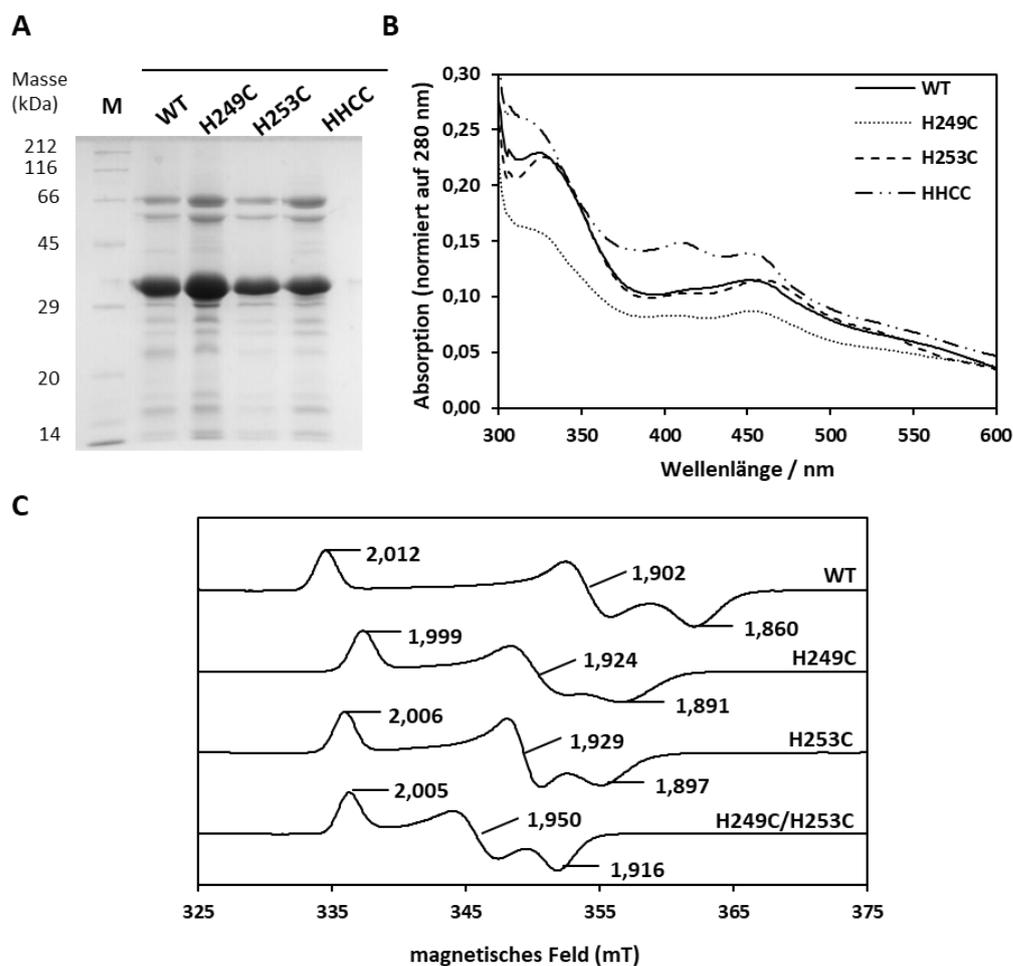


Abbildung 4-49: Vergleich von WT-Aim32 und His zu Cys Varianten. **A** SDS-PAGE von Aim32 und Varianten. Aufgetragen wurden je 1 μ l Proteineluat. **B** UV/Vis-Spektren von Aim32 und Varianten. Abgebildet sind Spektren der Proteine zwischen 250 und 600 nm. Die Spektren wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf 280 nm normiert. **C** ESR Spektren von Aim32 und Varianten. Die Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die ermittelten g -Werte sind in den Spektren angezeichnet. Die Proteine lagen in Entsalzungspuffer vor und wurden vor Reduktion mit Natriumdithionit (2 mM) durch die Zugabe von anaerobem Puffer und Inkubation unter Luftausschluss anaerobisiert.

Die Mutation der Histidin-Liganden zu Cysteinen resultierte in allen drei Varianten in einer starken Veränderung des ESR-Spektrums und der einzelnen g -Werte, dargestellt in Abbildung 4-49 C. Aim32 zeigte bei 77 K ein rhombisches [2Fe-2S]-Cluster-Signal mit den g -Werten 2,012, 1,902 und 1,860. Die ESR-Spektren der beiden Einzelmutanten zeigten ebenfalls typische [2Fe-2S]-Cluster-Eigenschaften. Jedoch war hier g_x zu höherem, g_y und g_z zu niedrigerem Feld verschoben (H249C: 1,999, 1,924 und 1,891; H253C: 2,006, 1,929 und 1,897). Bei der Doppelmutante H249C/H253C ist die Verschiebung des g_y - und g_z -Wertes am stärksten ausgeprägt (2,005, 1,950 und 1,916). Diese Änderungen lassen sich durch eine Änderung der Koordination begründen. Die Mutanten H249C und H253C weisen wahrscheinlich ein Cys3-His1-Koordinationschema auf, wohingegen das Cluster der Doppelmutante von vier Cysteinen gebunden ist. Dies lässt sich durch Vergleich der

ermittelten g -Werte mit Werten aus der Literatur von entsprechenden Proteinen, vor allem mit Apd1 (Stegmaier *et al.*, 2019) verständlich machen (siehe Kap. 5).

Die UV/Vis- und ESR-Spektren lassen durch ihren Verlauf und typischen Eigenschaften auf einen inkorporierten [2Fe-2S]-Cluster schließen. Zudem wurde noch der Nicht-Häm-Eisengehalt der einzelnen Spezies analysiert (Tab. 4-5).

Tabelle 4-5: Konzentration und Eisengehalt der Histidin zu Cystein-Varianten von Aim32.

| | mg Protein/2 l-Kultur | Fe/Protein |
|---------------------|-----------------------|-------------|
| Aim32 WT (n=3) | 5,9/17,6/12,7 | 1,5/1,8/1,2 |
| H249C (n = 2) | 6,1 / 11,10 | 1,6 / 0,9 |
| H253C (n = 2) | 2,8 / 8,6 | 1,5 / 1,0 |
| H249C/H253C (n = 2) | 2,2 / 8,5 | 1,4 / 0,7 |

In allen Varianten konnten signifikante Mengen an Nicht-Häm-Eisen detektiert werden, die einen [2Fe-2S]-Cluster belegen. Jedoch schwankt die Menge an isoliertem Protein und der Gehalt an inseriertem Fe/S--Cluster stark von Aufreinigung zu Aufreinigung. Die Proteinkonzentration der Varianten war geringer als jene von Aim32. Die Mutation der Clusterliganden führte wahrscheinlich zu einer Destabilisierung des Clusters und resultiert so in einer Destabilisierung des Proteins.

4.7.2 Mößbauerspektroskopie von Aim32

Durch die Mutation verschiedener Aminosäuren von Aim32 und Expression der Varianten in *S. cerevisiae* und in *E. coli* war es möglich die Liganden des [2Fe-2S]-Clusters von Aim32 zu identifizieren. Da Aim32 in geringerer Ausbeute isoliert werden konnte, wurde die Mößbauerspektroskopie nur für die Charakterisierung des WT-Proteins zur Anwendung gebracht. Sie stellt im Folgenden das Mittel der Wahl dar, um festzustellen welcher der Clusterliganden ein bestimmtes Eisenion des Clusters koordiniert. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass je ein Eisenion von einem Cystein und einem Histidin ligiert wird. Die zweite Variante würde besagen, dass ein Eisenkern ausschließlich von Cystein-Resten und der zweite von Histidin-Resten koordiniert wird. Die Vorbereitung der Probe erfolgte analog Kapitel 3.3.10. Zur Anreicherung des ^{57}Fe -Isotops im Protein wurden *E. coli*-Zellen in Gegenwart von $100\ \mu\text{M}$ ^{57}Fe kultiviert. Das Protein wurde am Ende der Aufreinigung stark aufkonzentriert. Die Messungen erfolgten an der RPTU im Fachbereich Physik (Biophysik) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Schünemann durch Dr. Christina Müller. Abbildung 4-50 gibt das gemessene Spektrum des oxidierten Proteins bei 77 K ohne äußeres Magnetfeld wieder.

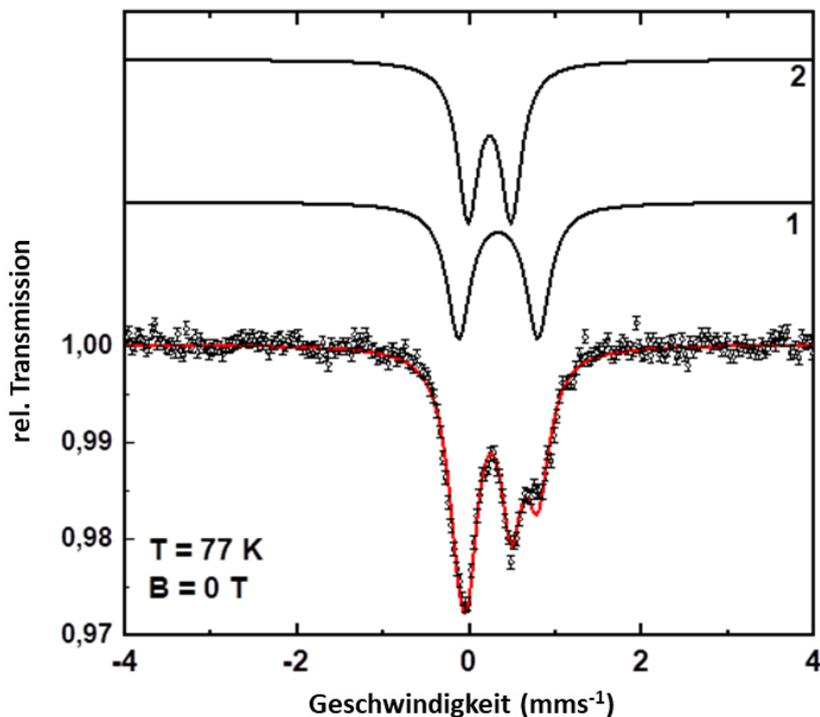


Abbildung 4-50: Mössbauerspektrum von oxidiertem Aim32 (44 mg/ml) in Entsalzungspuffer (pH 9). 1 und 2 stellen die beiden Subspektra der beiden Eisenkerne dar (schwarz). Unten ist der resultierende Fit dargestellt (rot).

Die rote Linie durch die Messpunkte stellt den resultierenden Fit, der von Dr. Christina Müller durchgeführt wurde, dar. Komponente 1 wies eine Isomerieverschiebung von $\delta = 0,34$ mm/s und eine Quadropulaufspaltung von $\Delta E_Q = 0,92$ mm/s auf. Komponente 2 besaß in Relation dazu eine mit $\delta = 0,24$ mm/s niedrigere Isomerieverschiebung und mit $\Delta E_Q = 0,50$ mm/s eine niedrigere Quadropulaufspaltung. Beide Komponenten nehmen je 50 % vom Gesamtspektrum ein. Anhand dieser Parameter ist es nun möglich, die beiden Eisenkerne voneinander zu unterscheiden und die spezifischen Liganden zuzuordnen. Die Elektronegativität von Stickstoff ist höher als von Schwefel, was zu einer niedrigeren Elektronendichte am Eisenzentrum führt, wenn das Erstere gebunden ist. Somit würde sich die Isomerieverschiebung als auch die Quadropulaufspaltung einer Komponente im Vergleich zur anderen erhöhen, wenn die Eisenkerne asymmetrisch koordiniert sind. Dies ist für Aim32 der Fall. Abbildung 4-51 stellt die wahrscheinliche Ligandenanordnung dar.

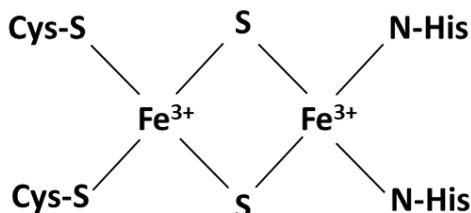


Abbildung 4-51: Schematische Fe/S-Clusterkoordination von Aim32. Ein Eisenkern ist von zwei Cysteinen (213 und 222) der zweite von zwei Histidinen (249 und 253) koordiniert.

4.7.3 Bestimmung des pK_s -Wertes von Aim32

Aim32 koordiniert einen [2Fe-2S]-Cluster mittels zwei Cysteinen und zwei Histidinen. Diese Koordinationsart könnte je nach pK -Wert in einer pH-Abhängigkeit des UV/Vis-Spektrums resultieren, da je nach pH-Wert die Histidine protoniert oder deprotoniert vorliegen können. Die Bestimmung des pK_s -Wertes wurde nach Kapitel 3.3.9 durchgeführt.

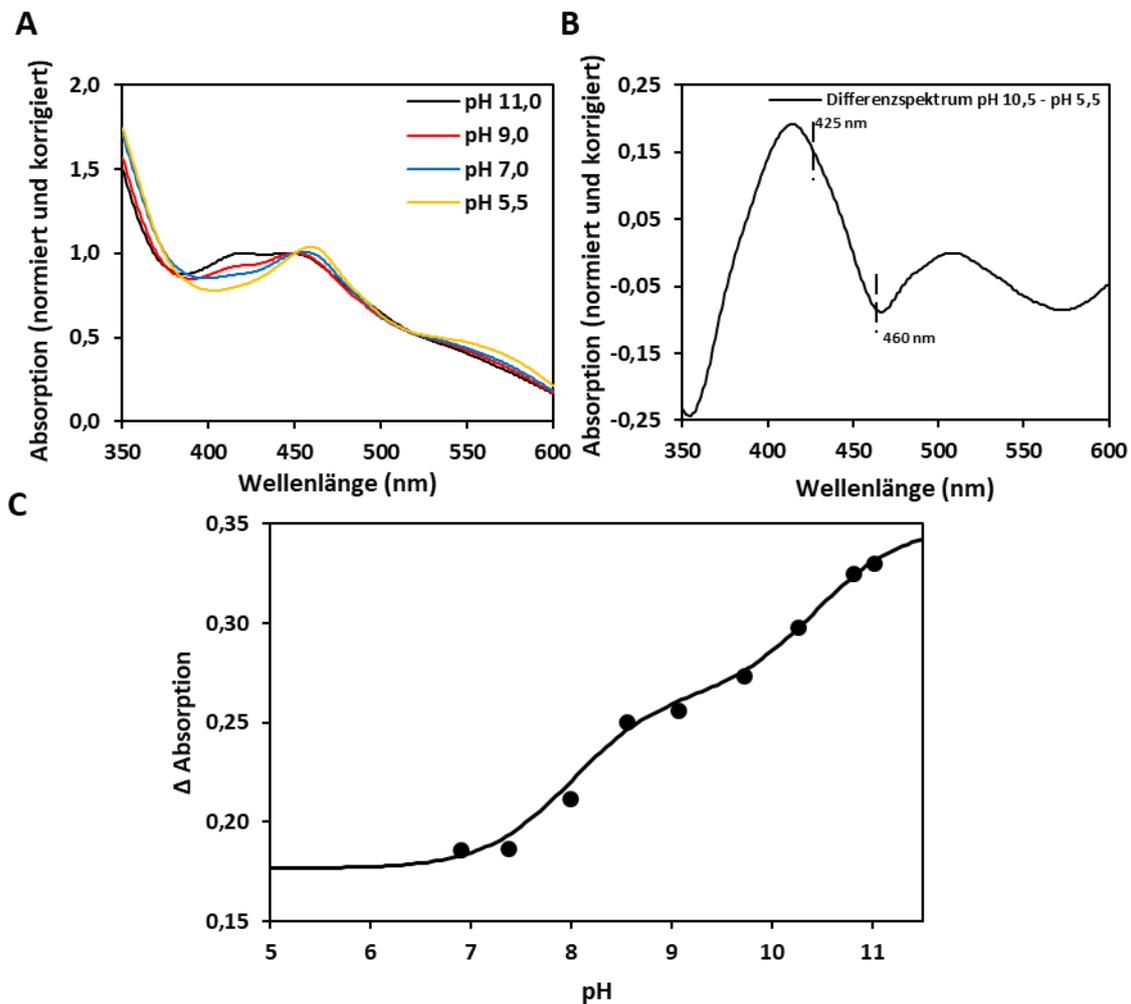


Abbildung 4-52: pK_s -Wert-Bestimmung von Aim32. **A** UV/Vis-Spektren von Aim32 (in Entsalzungspuffer 8 mg/ml) bei verschiedenen pH-Werten. pH 5,5 (gelb), pH 7,0 (blau), pH 9,0 (rot) und pH 11,0 (schwarz). **B** Differenzspektrum zwischen pH 10,5 und 5,5. Die zur Auswertung verwendeten Wellenlängen sind durch gestrichelte Linien markiert. **C** pK_s -Wert-Bestimmung. Die Messungen der pH-Werte 5,5, 6,0 und 6,5 sind aufgrund von Proteinpräzipitation nicht dargestellt.

Abbildung 4-52 **A** zeigt eine Auswahl von UV/Vis-Spektren von Aim32 im pH-Bereich von 7,0–11,0. Zur besseren Vergleichbarkeit und um kleine Konzentrationsunterschiede durch Pipettierfehler auszugleichen, wurden alle Spektren auf 450 nm normiert und um die Absorption bei 650 nm korrigiert. Betrachtet man das Differenzspektrum in Abbildung 4-52 **B** der pH-Werte 10,5 und 5,5 so ist im Bereich zwischen 425 nm und 460 nm eine kleine, aber signifikante Änderung der Absorption zu beobachten. Die weitere Auswertung wurde somit unter Verwendung dieser beiden Wellenlängen

durchgeführt. Die Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz von 425 nm und 460 nm und dem pH-Wert wird aus Abbildung 4-52 C ersichtlich. Der Verlauf der einzelnen Punkte konnte durch eine Summe von zwei Henderson-Hasselbalch-Gleichungen simuliert werden und steht somit für zwei Proto- oder Deprotonierungen, was wiederum mit den zwei Histidin-Liganden des [2Fe-2S]-Clusters im Einklang steht. Bei den pH-Werten 6,0 und 6,5 kam es zur Präzipitation des Proteins. Zudem konnte im Bereich der pH-Werte zwischen 5,5–9,0 der Verlauf der Kurve nur unzureichend gefittet werden. Aus diesem Grund wurde der Fit nur für den Bereich pH 7,0-10,5 durchgeführt. Somit lassen sich für Aim32 zwei pK_S -Werte im oxidierten Zustand bestimmen: $pK_1 \approx 8,0$ und $pK_2 \approx 10,4$. Diese Werte werden hier nur ungefähr angegeben, da die Messung wegen der geringen Menge an verfügbarem Aim32 nur einmal durchgeführt wurde.

4.8 Protein-Kristallisation von Apd1 aus *S. cerevisiae*

Die Kristallstruktur von Proteinen kann zu Erkenntnissen über ihre Funktion durch Aufklärung ihrer Faltung dienen. Der N-Terminus von Apd1 dient womöglich nicht nur der Ausbildung der Proteinstruktur, sondern könnte auch durch die auffällig hohe Anzahl an potenziell ligierenden Aminosäuren weitere Metallionen binden und so das aktive Zentrum des Proteins darstellen. Durch die Lokalisierung des [2Fe-2S]-Clusters von Apd1 innerhalb des Proteinmoleküls, können Vermutungen über seine Funktionalität getroffen werden. Fe/S-Cluster im Inneren des Proteins lassen vielmehr auf eine Stabilisierungs- als auf eine Elektronentransportfunktion schließen. In dieser Arbeit wurde an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Holger Dobbek (Strukturelle Biologie/Biochemie) in Zusammenarbeit mit Dr. Berta Martins Kristallisationsexperimente durchgeführt.

Es wurden Kristallisationsansätze für *S. cerevisiae* Apd1 und dem bakteriellen Homolog aus *Thermomonospora curvata* durchgeführt. Da die Protein Aufreinigung mittels Affinitäts-Tags in einer Inhomogenität der Apd1-Proteinmoleküle resultieren können (Stegmaier, persönliche Mitteilung), wurden beide Proteine über eine Heparinsäule mit anschließender Gelpermeationschromatographie isoliert und aufgereinigt. Mit den ausgewählten Kristallisationsbedingungen konnten nur Kristalle des Proteins aus *S. cerevisiae* erhalten werden. Aus diesem Grund wird in Abbildung. 4-53 nur eine Übersicht der Proteinkristalle von Apd1 dargestellt.

Während der Aufreinigung über die Heparinsäule und auch der anschließenden weiteren Aufreinigung mittels Gelfiltration wurde sowohl die Absorption bei 280 nm, als Maß für den Proteingehalt, als auch die Absorption bei 450 nm als Maß für den Gehalt an Fe/S-Cluster gemessen. Es war möglich Apd1 bereits nach dem ersten Aufreinigungsschritt in einem hohen Reinheitsgrad zu isolieren (Abb. 4-53 A). In der Gelfiltration werden Proteine aufgrund ihrer Größe getrennt. Nach einer Elutionszeit von 160 min (160 ml)

wurde das Zielprotein homogen als einzelner Peak eluiert. Die Elutionszeit deutet auf ein Monomer hin (Stegmaier, 2017).

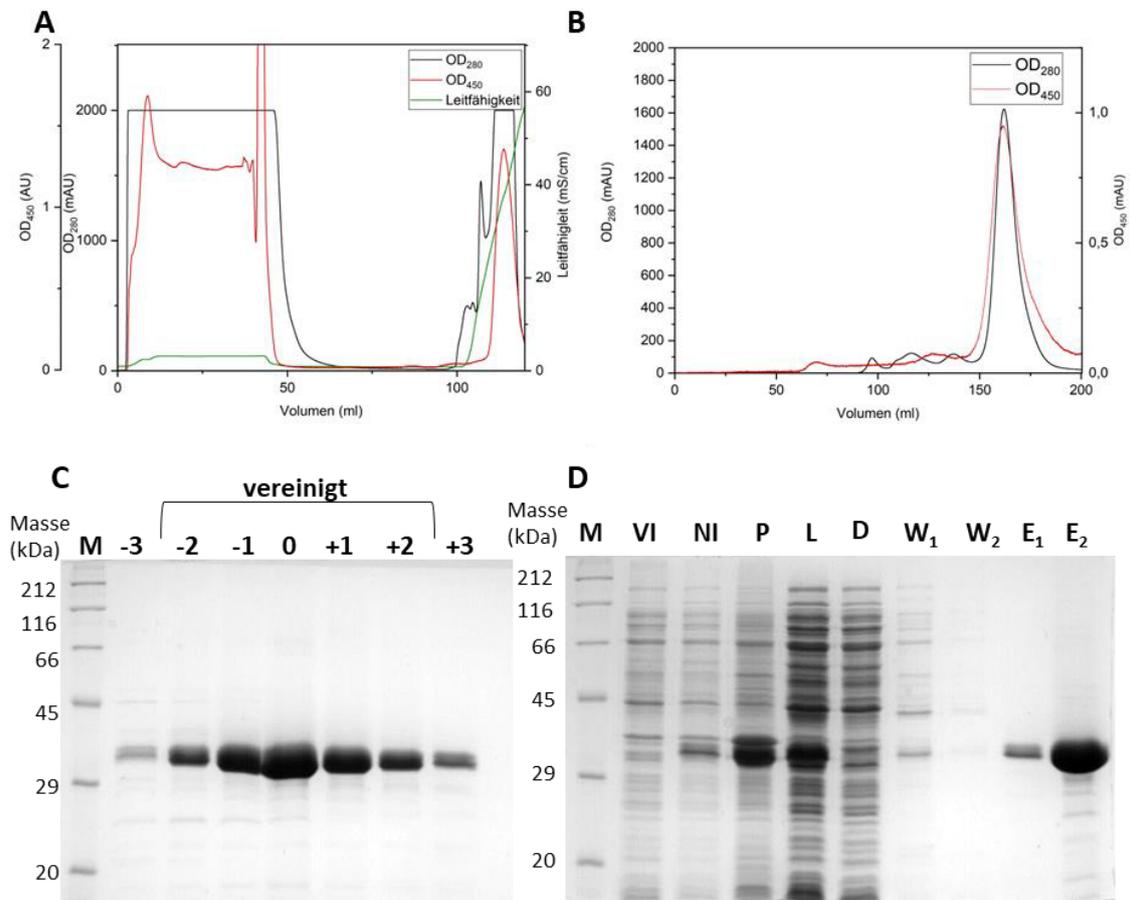


Abbildung 4-53: Übersicht der Aufreinigung von *S. cerevisiae* Apd1 zur Kristallisation. **A** Chromatogramm der Aufreinigung mittels Heparinsäule. **B** Chromatogramm der Aufreinigung mittels Gelfiltration. **C** SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen während der Gelfiltration. **D** SDS-PAGE der gesamten Aufreinigung. M: Marker mit den Molekülmassen der Proteine in kDa, VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, D: Durchlauf, W1: 1. Waschfraktion, W2: 2. Waschfraktion, E1: Eluat 1 μ l (1:10), E2: Eluat 2 μ l (1:10).

Ausgehend vom Peak-Maximum (s. Abb. 4-53 **B**, angedeutet als „0“ in Abb. 4-53 **C**) wurden diese, die beiden vorherigen und die beiden folgenden Fraktionen vereinigt und aufkonzentriert. Abbildung 4-53 **D** zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE einer Isolierung mittels Heparinsäule und anschließender Gelpermeationschromatographie. Die Bande im Pellet (P) auf gleicher Höhe des eluierten Proteins kann entweder auf nicht vollständig aufgeschlossene Zellen zurückzuführen sein oder ein Anteil des Proteins war durch die hohe Proteinkonzentration der Überexpression nicht löslich. In der ersten Waschfraktion (W1) war auch noch eine schwache Bande auf der Höhe des eluierten Proteins zu detektieren was auf eine Überladung der Säule oder eine unzureichende Bindung des Proteins an das Säulenmaterial hindeuten kann.

Die zur Kristallisation verwendeten Proteine wurden in 20 mM Tris pH 9,0, 100 mM NaCl gelagert. Die Kristallisationsversuche starteten mit verschiedenen, kommerziell erhältlichen Screens. Es wurden insgesamt 12 verschiedenen Screens im 96-Well-Maßstab

durchgeführt und somit insgesamt 1152 Kristallisationsbedingungen getestet. Als Proteinkonzentration wurden 10 resp. 20 mg/mg gewählt. Die verschiedenen Screens sind in Kapitel 2.9 aufgelistet.

Die in Abbildung 4-54 **A-D** und **G** gezeigten Kristalle wurden mit dem Screen JCSG (**A**: 0,2 M Ammoniumformat, 20 % PEG 3350, **B**: 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 25 % PEG 3350, **C**: 0,2 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 25 % PEG 3350, **D**: 0,2 M Magnesiumchlorid, 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 25 % PEG 3350, **G**: 0,2 M Natriumthiocyanat, 20 % PEG 3350) und einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml erhalten. Weitere Kristalle konnten mittels des Screens FootPrint (**E**: 0,1 M Natriumacetat pH 5,5, 24 % PEG 5K-MME, **F**: 1 M Natriumacetat pH 5,5, 18 % PEG 5K-MME) generiert werden. Die Kristalle zeichneten sich durch eine rötlich-braune Färbung aus, was sie als Proteinkristalle mit Fe/S-Cluster und nicht als Salzkristalle identifizierte, jedoch konnten unter den Bedingungen keine Einkristalle gewonnen werden. Die Struktur wies durch ungeordnetes Kristallwachstum in allen Fällen Risse auf oder war verzweigt.

Durch Vergleich der Struktur der einzelnen Kristalle wurde verdeutlicht, dass eine Zugabe von Salzmolekülen, sogenannten Additiven, einen eher negativen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten von Apd1 hatte. Ein niedriger pH und die Gegenwart von PEG schienen die Kristallbildung zu begünstigen.

Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden verschiedene Variationen der im Screeningverfahren gefundenen positiven Parameter durchgeführt. Variiert wurden die Parameter der unter Abbildung 4-54 **A, B, D, E, F** und **G** gefunden Kristalle bezüglich ihrer PEG-, Salz- und Proteinkonzentration. Alle Kristallisierungsbedingungen konnten reproduziert werden und schon am nächsten Tag waren dünne, gefärbte Kristalle zu beobachten, die sich aber mit fortschreitendem Wachstum wieder verzweigten und Brüche aufwiesen. Um das geordnete Kristallwachstum zu unterstützen, wurden Seeding-Experimente durchgeführt. Dabei fungiert ein bereits erhaltenes Kristallbruchstück als Impfkristall eines folgenden Ansatzes. Diese Experimente wurden von Dr. Berta Martins weiter fortgeführt und haben inzwischen erfolgreich zur Bildung einzelner Kristalle und zur Auflösung der 3D-Struktur geführt.

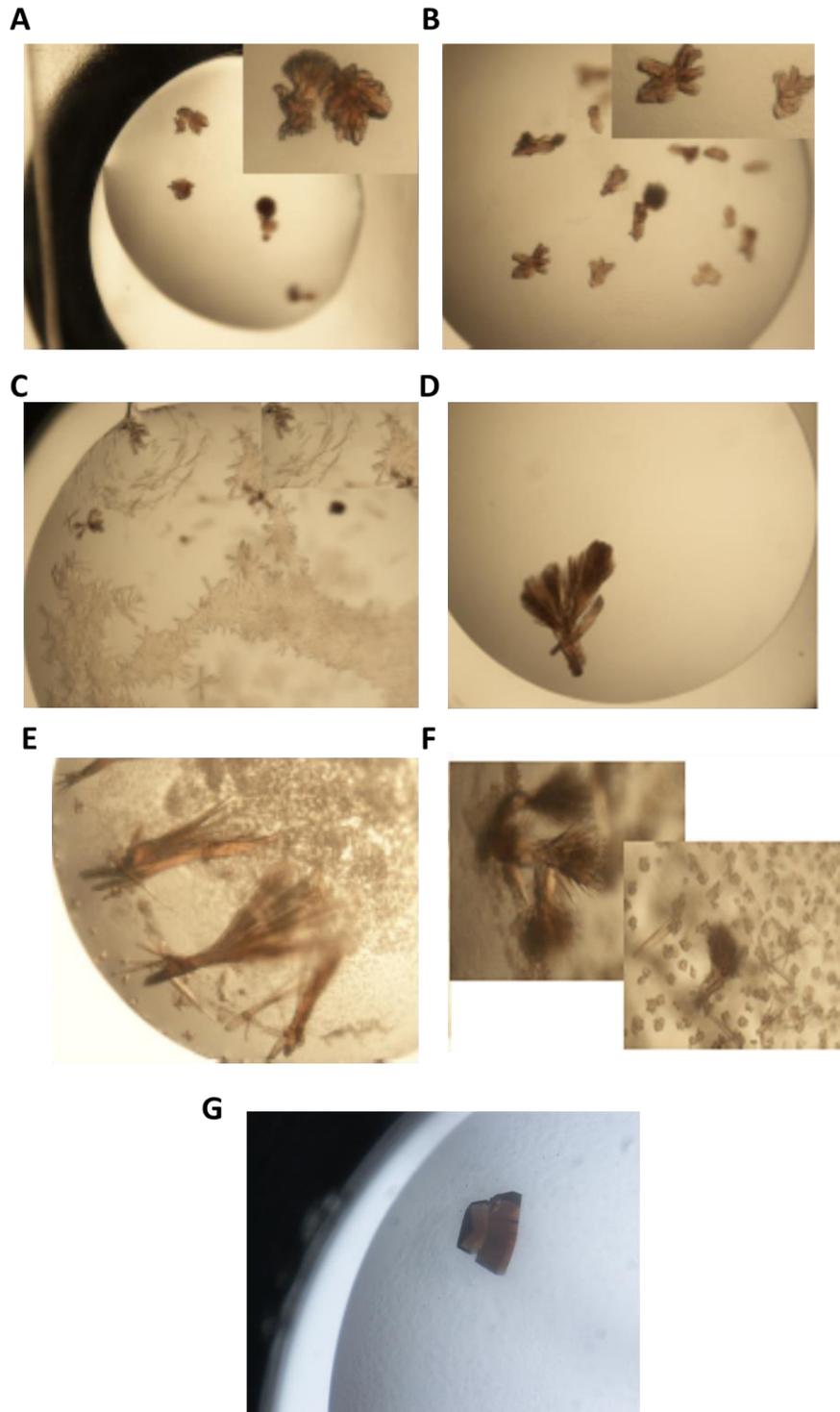


Abbildung 4-54: Proteinkristalle von Apd1. A-D und G JCSG-Screen. E und F Footprint-Screen.

4.9 Versuche zum Nachweis eines mononukleären Fe-Zentrums

Da es mehrere Dioxygenasen gibt, die neben einem [2Fe-2S]-Cluster ein mononukleares Eisenzentrum besitzen, wurde versucht dieses über die ESR-Spektroskopie nachzuweisen. Wird NO an ein mononukleares Fe-Zentrum gebunden, ist es möglich ein Fe²⁺-Eisenzentrum zu detektieren. Bedingt durch die Bindung von NO an Eisen wird ein $S = 3/2$ Zustand erhalten, der starke Signale im Bereich $g = 4$ aufweist. In dieser Arbeit wurde versucht ein Nitrosyl-Proteinkomplex nach Kapitel 3.3.8 zu bilden. Die Messung der Proben wurde von Dipl.-Chem. Dominique Bechtel vorgenommen.

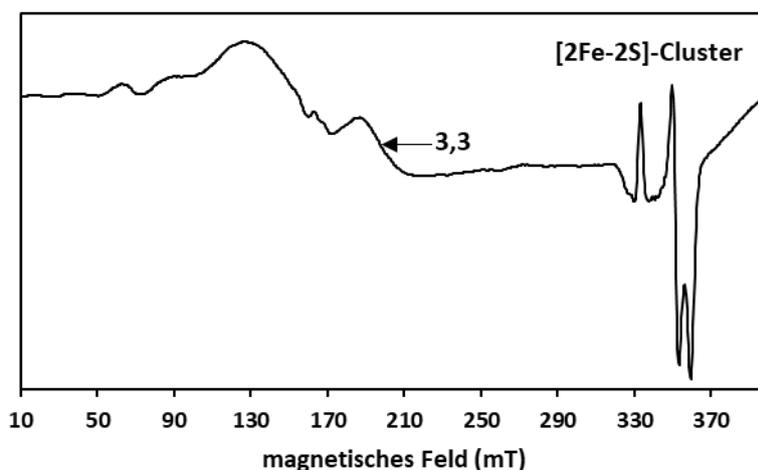


Abbildung 4-55: ESR-Spektrum des Nitrosyl-Proteinkomplexes. NO-behandeltes, dithioniertes Apd1 zeigt kein eindeutiges NO-Fe-Komplex ESR-Signal. Das Spektrum wurde bei 8 K gemessen.

Die erhaltenen Signale (Abb. 4-55) im Bereich $g \approx 4$ sind jedoch sehr breit und nicht einem Nitrosyl-Fe-Komplex zuzuordnen.

4.10 Charakterisierung von *T. curvata* AAH

Der Sequenzvergleich der Clusterdomäne von Aim32/Apd1 mit Eubakterien zeigte ein Protein aus dem thermophilen Bakterium *T. curvata* auf (Stegmaier *et al.* 2019). Obwohl das Protein nur geringe Sequenzähnlichkeit mit Aim32 oder Apd1 besitzt, ist die Konservierung innerhalb der Clusterbindedomäne der Proteine signifikant. Vor allem im Bereich des für Aim32/Apd1 typischen Histidinclusterbindemotiv HxGGH ist eine hohe Konservierung der Aminosäuren zu verzeichnen. Interessanterweise befindet sich an der Position des zweiten Histidins in diesem Protein ein Aspartat (Abb. 4-56, untere Zeile, lila Markierung). In diesem Teil der Arbeit sollte dieses Protein hinsichtlich seiner spektroskopischen Eigenschaften untersucht werden. Die Clusterliganden sollten durch Mutagenese der potenziellen Aminosäuren, Expression in *E. coli* und anschließende Reinigung des Proteins identifiziert und durch Austausch der potenziellen Liganden alternative Clusterbindemotive geschaffen und untersucht werden.

Ergebnisse

| | | |
|-------|---|-----|
| Aim32 | --MLRITVKTQ-----QRASFHHSFKHISVPLDHLTRAQNDQTNQCYCQEIARLPS | 49 |
| Apd1 | MAFLNIFKQKRGEASQLSAKGREETSQSIKICKS-DDAANEHSCSGDCKTEI-----E | 53 |
| TcAAH | -----MSR-TSHC---DHCVGSHTGERSCLATA-----T | 25 |
| | : : . * . : . . * | |
| Aim32 | KTDPLDPHIKLPHRTPNYNKHVLLSPGDRFA-QPWKVAWNHNLDTNTR-PYNAI-S-- | 104 |
| Apd1 | EGEQAFALKIEHETPLLNSK---TPKIHVVPTSQIDWQHDA-CLEDPKSVQYKISQW | 109 |
| TcAAH | AT--ARSWLLIEHPGP-----WPERIEQLTGPAPLVAVIERA | 60 |
| | : : * * * . . . | |
| Aim32 | -----KLRSHL--GGSPGILINAVHLQNEFIPRP-----KQH-DEWLYFFVIPDMKLY | 149 |
| Apd1 | C--DKNSAKFSNVGTGKTLNCAVS--SLPKDIMDIDVMRGTKNNVLI LPYFIWLNDRS- | 164 |
| TcAAH | ARAGVRPQLIRRPGRRRP-----TP--PLQVYLG-----SLGGPVWLEGRTL- | 102 |
| | * | |
| Aim32 | VIKETDIEEFASFLEDEGAIQAPKLSFQDYLSGKAKASQQVHEVHHRKLRFPQGETFLRDW | 209 |
| Apd1 | ----DDV---EA-TLDGLVP-----DLLDENISREKLE-----TRPNVAVARERAF | 203 |
| TcAAH | ----GDHRELEE-LDEGVLA-----EVAAG--RRPRFGE-----PVAGPAGAPGKPL | 142 |
| | * : * : : : . . : : | |
| Aim32 | NLVCGHYKRDACGEMGPDIIAA---FQDEKLFPEN-----NLALISIGGIFAG | 257 |
| Apd1 | VFICSHTRDKRCGITAPYLKVKVFDKLEHGLYRDNSDYRAEGVKIAFVNVGGKFAA | 263 |
| TcAAH | LLVCTHGKRNACCARYGAPLARELAARFGD-----LVWETTVGGRYAA | 187 |
| | : * * . * . : : : : * : * : * | |
| Aim32 | NVIFY-----KLFGRK-----MQNKLDLSLWFGKVYPHNLKL-----LCENL | 294 |
| Apd1 | NV-----QIYLRNPNTLIWLRVTPPTIVPS-IVEHL----- | 293 |
| TcAAH | NLVCLPHGLYYGDLGAAEAASAVESYLRGEVALERLRGRAGLPAPAQAAEHHVVRVLTGVL | 247 |
| | * : : . . | |
| Aim32 | ENGKIIDEMYRGGISMN----- | 311 |
| Apd1 | -----IVPEEPTLPF-PEKVRCIKKYQSW----- | 316 |
| TcAAH | GVDSVSVESLTGTSPYEAVIDVAGARYLVTVEETEPVHDCEPGCQENVRSYVVRGITLLN | 307 |
| Aim32 | ----- 311 | |
| Apd1 | ----- 316 | |
| TcAAH | RAALV 312 | |

Abbildung 4-56: Sequenzvergleich von Aim32, Apd1 und dem Homolog aus *T. curvata*.

Zur Charakterisierung von Proteinen ist es von Nöten, dass sie in genügend großer Menge und geeigneter Reinheit zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurde das Protein TcAAH (*T. curvata* Aim32/Apd1 Homolog), ein Homolog des Proteins Apd1 resp. Aim32 aus *S. cerevisiae*, und dessen Varianten mittels verschiedener Aufreinigungsmethoden nach erfolgter Genexpression in *E. coli* isoliert.

4.10.1 Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose

Der Expressionsvektor pETDuet-1 und die Aufreinigung von Proteinen mit einem His-Tag mittels Ni-NTA stellten für die Hefeproteine Apd1 und Aim32 ein ideales Expressionssystem dar. Vor allem Apd1 konnte in großer Ausbeute und hoher Reinheit aus *E. coli* isoliert werden (Stegmaier, 2017). Aus diesem Grund wurde zur Isolierung des homologen Proteins aus *T. curvata* auch eine Klonierung in pETDuet-1 und anschließender Reinigung via N-terminalen His-Tag über Ni-NTA durchgeführt. Die Expression wurde mit dem Zusatzplasmid pRK-ISC zur Unterstützung des Fe/S-Einbaus vorgenommen. Das Protein konnte in moderater Ausbeute mit $8,2 \pm 2,5$ mg Protein aus einer 2 l-Kultur isoliert werden ($n = 3$). Das Eluat wies eine bräunliche Farbe auf, was bereits einen ersten Hinweis auf einen eingebauten Fe/S-Cluster darstellte. Direkt nach der Aufreinigung und Umpufferung wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen (Abb. 4-57 A). Die Maxima bei 320, 420 und 550 nm identifizierten einen Fe/S-Cluster. Die

Ergebnisse

Eisenbestimmung ergab $1,6 \pm 0,3$ Eisenionen und die Sulfidbestimmung $1,3 \pm 0,4$ Sulfidionen pro Monomer. Abbildung 4-57 C stellt den Verlauf der Expression und Isolierung anhand einer SDS-PAGE dar. Zu verschiedenen Zeitpunkten genommene Proben wurden untersucht und zeigten die Effizienz der Proteinisolierung. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Zugabe von IPTG die Induktion erfolgreich eingeleitet wurde. Es ist eine stärkere Proteinbande (ca. 35 kDa) in der Nachinduktionsprobe (NI) als in der Vorinduktionsprobe (VI) präsent. Die Bande in der Pellet Fraktion nach der Ultrazentrifugation ist auf nichtaufgeschlossene Zellen oder nichtlösliches Protein zurückzuführen. Durch die intensive Bande in den Eluat-Fractionen lässt sich die erfolgreiche Isolierung des Proteins erkennen, die jedoch einige Verunreinigungen aufweist. Die Anwesenheit eines [2Fe-2S]-Clusters wurde nun durch die ESR-Spektroskopie nachgewiesen. Nach Reduktion mit Natriumdithionit unter anaeroben Bedingungen konnte bei 77 K ein rhombisches Signal mit den g -Werten 2,018, 1,892 und 1,777 einer einzelnen Spezies detektiert werden (Abb. 4-57 B).

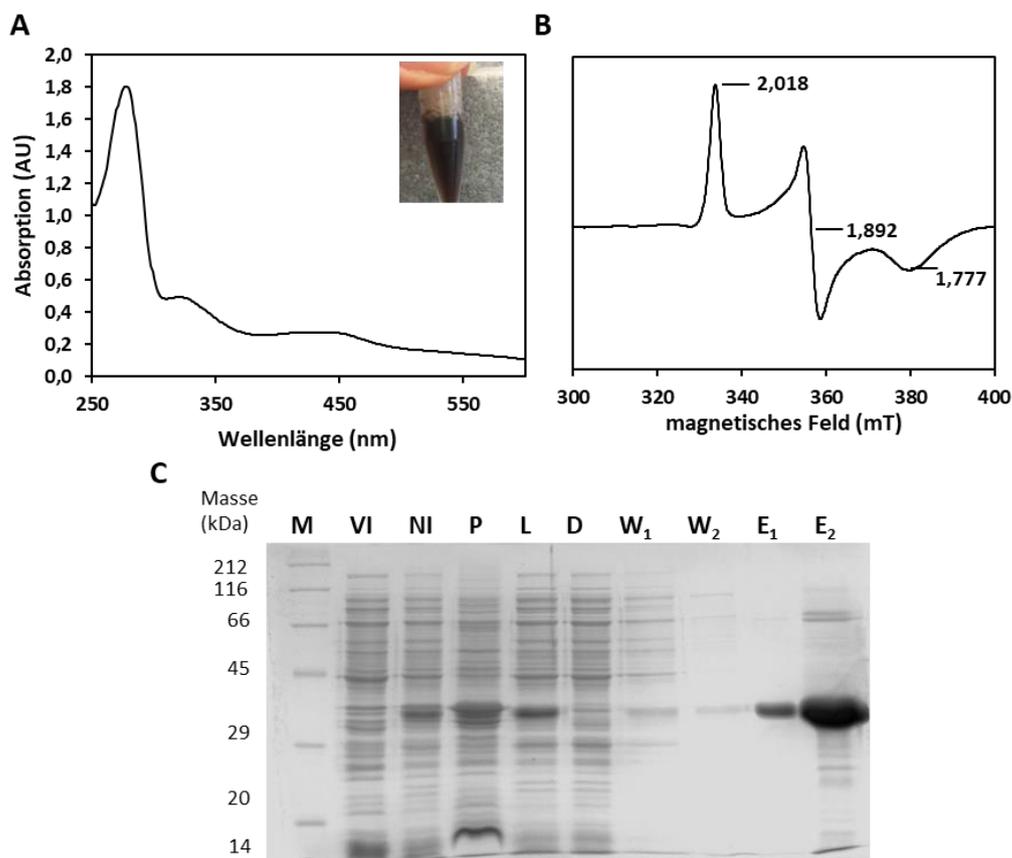


Abbildung 4-57: Aufreinigung von His₆_TcAAH. A UV/Vis-Spektrum von His₆_TcAAH, Inset: isoliertes Protein. **B ESR-Spektrum** von His₆_TcAAH bei 77 K. Die Mikrowellenleistung war 20 mW, die Frequenz 9,43 GHz und die Modulationsamplitude 1,5 mT. **C SDS-PAGE (12 %)**: M: Marker (mit den Molekülmassen in kDa), VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, D: Durchlauf, W₁: Waschfraktion zu Beginn, W₂: Waschfraktion am Ende, E₁: 1 µl Eluat, E₂: 2 µl Eluat (11 mg/ml).

Aufgrund der Konservierung der Aminosäuresequenz im clusterbindenden Bereich von Apd1 aus *S. cerevisiae* und dem Homolog aus *T. curvata* wurden als Cysteinliganden des

Clusters für *TcAAH* die Cysteine 146 und 154 resp. 155 vermutet. Zur Identifizierung wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese Plasmide angefertigt, in denen je eines dieser Cysteine zu Alanin umgewandelt ist. Die Expression in *E. coli* erfolgte erneut mit dem Zusatzplasmid pRK-ISC. Die Reinigung der Varianten erfolgte analog der Aufreinigung des WT-Proteins.

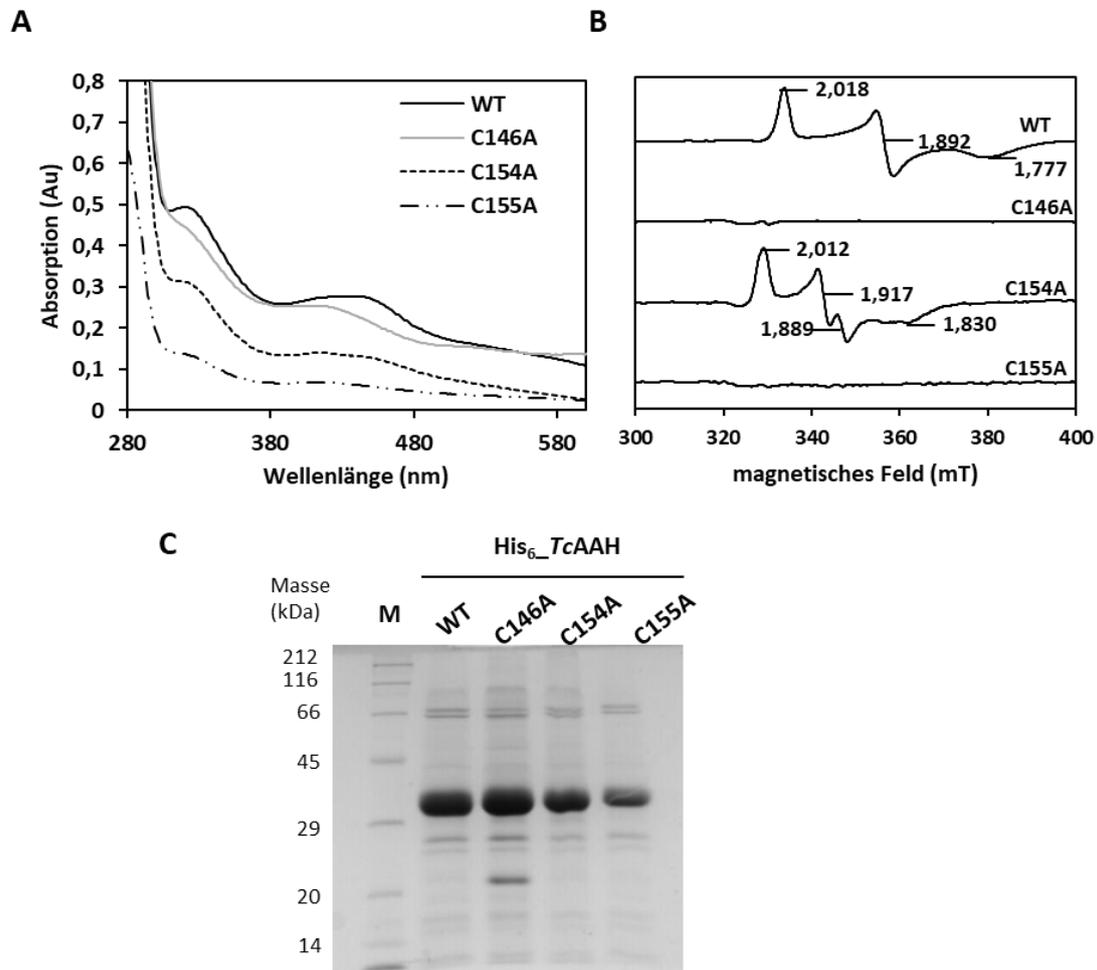


Abbildung 4-58: Aufreinigung der Cystein-Varianten von *TcAAH* via His-Tag. **A** UV/Vis-Spektren der Varianten von His₆-TcAAH. **B** ESR-Spektren der Varianten von His₆-TcAAH bei 77 K. Die Mikrowellenleistung war 20 mW, die Frequenz 9,43 GHz und die Modulationsamplitude 1,5 mT. Es wurde auf die g_V -Amplitude normiert. **C** SDS-PAGE (12 %) der Varianten von His₆-TcAAH: M: Marker (mit den Molekülmassen in kDa), aufgetragen wurden je 1 μ l der Eluatfraktion.

Alle Varianten des Proteins zeigten eine bräunliche Färbung und besitzen somit zu hoher Wahrscheinlichkeit einen eingebauten Cluster. Die UV/Vis-Spektren der drei Varianten wiesen sehr unterschiedliche Formen und Maxima auf und bei allen Varianten war eine Verschiebung des Spektrums im Vergleich zu WT zu beobachten (Abb. 58 **A**). Die Bestimmung des Nicht-Häm-Eisengehaltes lieferte für die drei Varianten 0,70–0,87 Eisenionen pro Proteinmolekül. Anhand der ESR-Spektren der drei Proteine lassen sich daher eher Rückschlüsse auf die potenziellen Clusterliganden treffen. Sowohl die Variante C146A als auch C155A waren im reduzierten Zustand bei 77 K ESR-inaktiv was

möglicherweise auf ein schwach gebundenes [2Fe-2S]-Cluster, das im reduzierten Zustand instabil ist, hindeutet (Abb. 58 B). In der SDS-PAGE aus Abbildung 4-58 C sind die Eluate der Aufreinigungen von WT, C146A, C154A und C155A aufgetragen. Alle Proteine wiesen die erwartete Größe auf und alle Varianten zeigten das gleiche Verhältnis von Abbau/Kontaminations- zu Proteinbanden wie das WT-Protein.

Die Aufreinigung von *TcAAH*-Varianten, in denen jeweils eins der drei potenziellen Cysteinclusterliganden zu Alaninen mutiert waren, lieferte erste Hinweise auf das Ligandenmuster durch die ESR-Spektroskopie. Durch Mutation der Cysteine zu Alaninen konnten in zwei Fällen ESR-inaktive Varianten geschaffen, die somit keinen [2Fe-2S]-Cluster tragen. Der unterschiedliche Verlauf des ESR-Spektrums der Variante C154A lässt sich durch eine mögliche Destabilisierung des Clusters erklären, da dieses mutierte Cystein direkt neben einem Clusterliganden liegen würde. Die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie sowie die Bestimmung des Eisengehaltes waren jedoch nicht eindeutig. Um Aufschluss über die Liganden der jeweiligen Eisenkerne zu erhalten, wurde von *TcAAH* eine Mößbauerprobe angefertigt und vermessen.

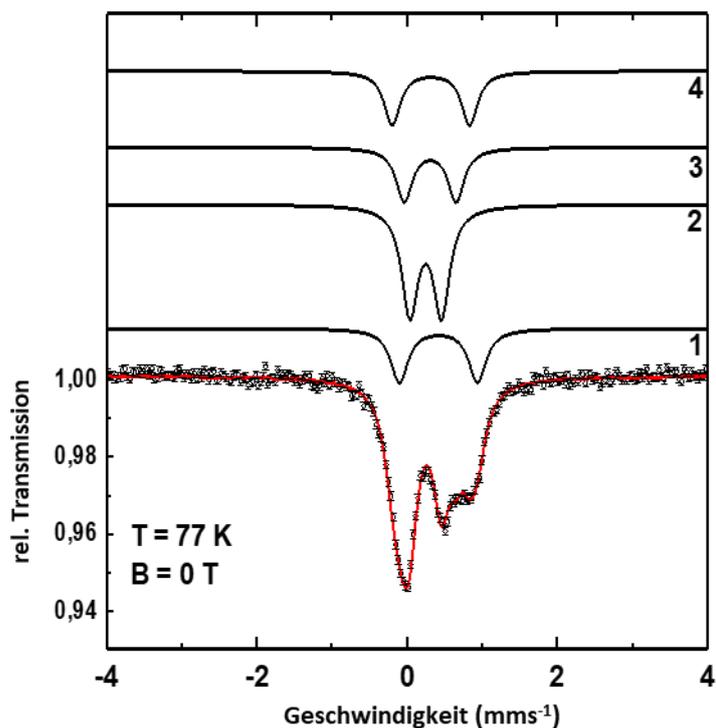


Abbildung 4-59: Mößbauerspektrum von oxidiertem *TcAAH* (30 mg/ml) in Entsalzungspuffer (pH 9). 1 bis 4 stellen die vier Subspektren der beiden Eisenkerne dar (schwarz). Unten ist der resultierende Fit dargestellt (rot).

Anhand der 4 Subspektren kann man auf vier verschiedene Eisenkerne in der Probe schließen. Es scheint, als wäre mit dem Zielprotein noch ein weiteres Protein, vielleicht ein Bestandteil der ISC-Maschinerie über die Ni-NTA-Säule eluiert worden. Aus diesem

Grund wurde im Folgenden versucht über eine weitere Art der Affinitätschromatographie *TcAAH* aufzureinigen.

4.10.2 Aufreinigung mittels Twin-Strep-Tag

Die Proteinisolierung mittels His-Tag und Ni-NTA-Agarose stellte sich für *TcAAH* nur bedingt als geeignetes System aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse der UV/Vis-ESR- und Mößbauerspektroskopie heraus. Zudem konnten die Cysteinclusterliganden nicht eindeutig bestimmt werden. Somit wurde als zweite Methode der Isolierung die Affinitätschromatographie mittels Strep-Tags genutzt.

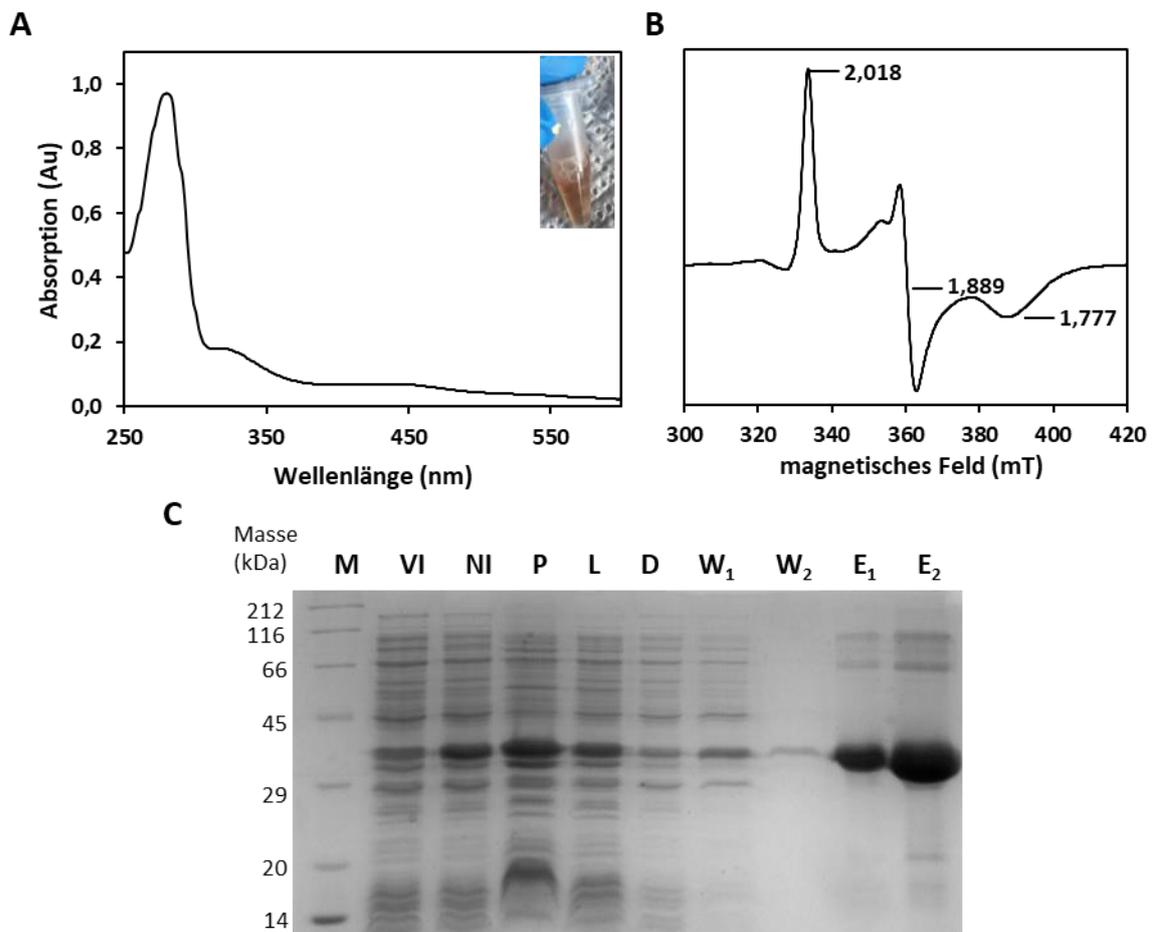


Abbildung 4-60: Analytik Aufreinigung *TcAAH* via Strep-Tag. **A** UV/Vis-Spektrum von *TS_TcAAH*, Inset: isoliertes Protein. **B** ESR-Spektrum von reduziertem *TS_TcAAH* bei 77 K. **C** SDS-PAGE (12 %) der Aufreinigung von *TS_TcAAH*: M: Marker (mit den Molekülmassen in kDa), VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, D: Durchlauf, W₁: Waschfraktion zu Beginn, W₂: Waschfraktion am Ende, E₁: 1 µl Eluat, E₂: 2 µl Eluat (15 mg/ml).

Diese Aufreinigungsmethode ist im Vergleich zur Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose schonender zu Fe/S-haltigen Proteinen da hier kein hochkonzentriertes Imidazol für die Isolierung benötigt wird.

Das Expressionsplasmid IBA102 mit N-terminalem Twin-Strep-Tag stellte hier den Vektor der Wahl dar. Die Expression wurde mit dem Zusatzplasmid pRK-ISC zur Unterstützung

des Fe/S-Einbaus durchgeführt. Die Ausbeute an Protein nach Isolation gemäß Kapitel 3.4.5 war im Vergleich zur Expression mit pETDuet-1 und Aufreinigung mittels Ni-NTA höher. Auch hier ließ sich anhand der Färbung des Proteins und des UV/Vis-Spektrums, gezeigt in Abbildung 4-60 **A**, mit den typischen Maxima auf einen [2Fe-2S]-Cluster schließen. Es konnten mit dieser Aufreinigungsmethode $11,9 \pm 3,0$ mg Protein aus einer 2 l-Kultur mit $1,28 \pm 0,57$ Eisenionen und $0,99 \pm 0,33$ Sulfidionen pro Monomer isoliert werden ($n = 4$). Es wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Proben zur Verfolgung der Aufreinigung genommen. Die SDS-PAGE zeigte auch in dieser Aufreinigungsmethode eine unzureichende Bindung des Proteins an die stationäre Phase während der Isolation. In Abbildung 4-60 **C** sind in der Durchlauffraktion, zu Beginn und auch am Ende der Waschphase eine Bande auf Höhe des Zielproteins zu erkennen. Das gereinigte Protein wurde mit 2 mM Natriumdithionit unter anaeroben Bedingungen reduziert und zeigte bei 77 K ein rhombisches [2Fe-2S]-Signal, das identische g -Werte wie das His-getagte Protein aufweist, obwohl eine Schulter bei $g \approx 1,92$ an der niedrig-Feld Seite von g_y zu beobachten war (Abb. 4-60 **B**).

Zur Bestimmung der Cysteinclusterliganden wurden auch von TcAHH mit N-terminalen Strep-Tag, Varianten angefertigt, bei denen je einer der putativen Cysteinliganden (s. o.) zu Alanin mutiert ist. Die Expression in *E. coli* erfolgte erneut mit dem Zusatz Plasmid pRK-ISC zur Unterstützung des Clustereinbaus. Die Reinigung der Varianten erfolgte analog der Aufreinigung des WT-Proteins. Auch in diesem Fall war es möglich alle drei Varianten als bräunliche Proteine in guter Ausbeute mit 15,3–11,8 mg Protein pro 2 l-Kultur zu isolieren (Abb. 4-61 **C**). Das UV/Vis-Spektrum (Abb. 4-61 **A**) der Varianten mit den typischen Maxima und der Gehalt an Eisenionen von 0,69–1,27 pro Proteinmolekül lassen auf einen inkorporierten [2Fe-2S]-Cluster schließen. Jedoch zeigt sich im ESR-Spektrum auch hier nur die Variante C154A im reduzierten Zustand bei 77 K als ESR-aktiv (Abb. 4-61 **B**). Aufgrund der hohen Kosten und Verfügbarkeit des Säulenmaterials wurde im Folgenden beschlossen für weitere Experimente eine Aufreinigung mittels Ionentauscher zum Einsatz zu bringen.

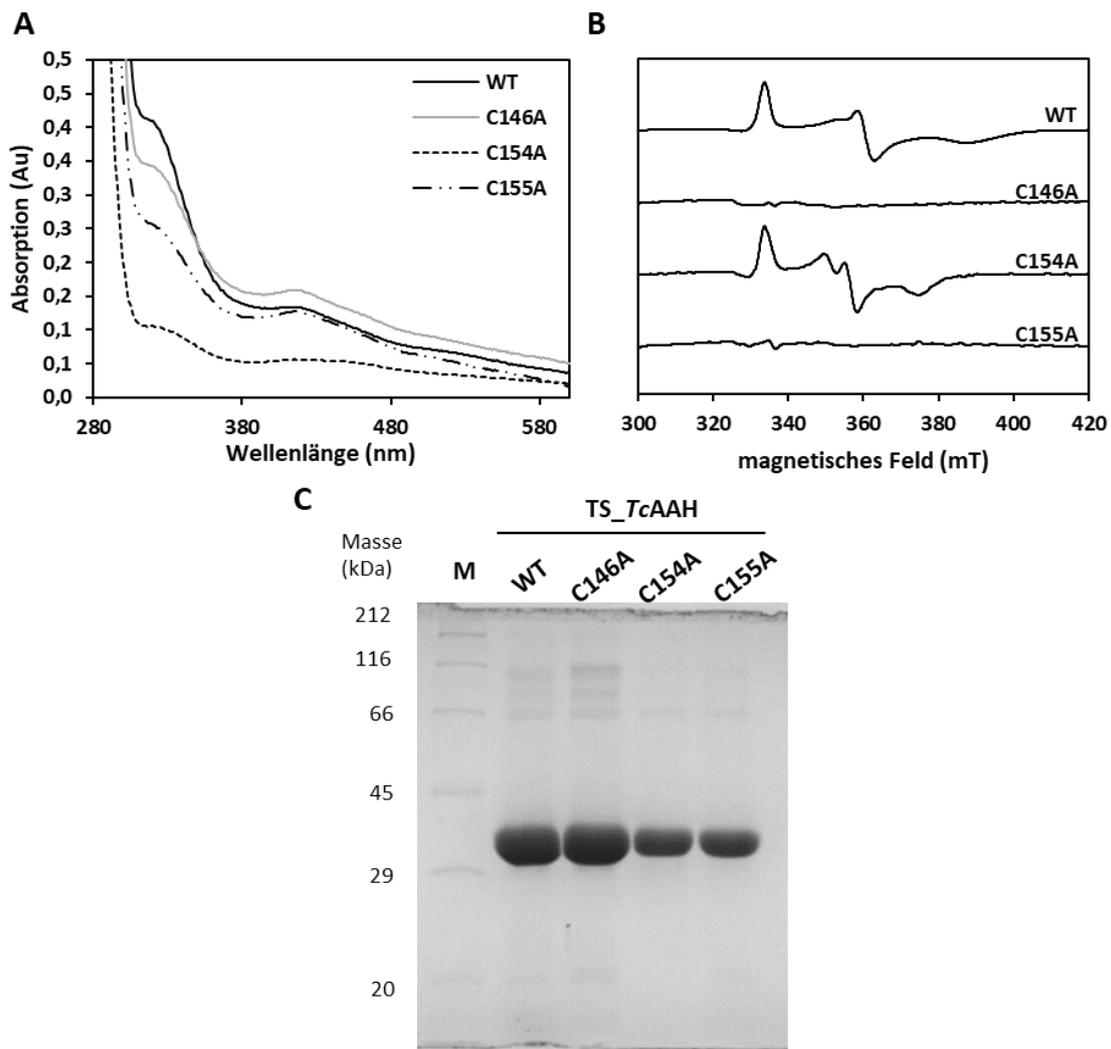


Abbildung 4-61: Analytik und Aufreinigung der Cystein Varianten von TcAAH via Strep-Tag. A: UV/Vis-Spektren der Varianten von TS_TcAAH. **B: ESR-Spektren** der Varianten von TS_TcAAH bei 77 K. **C: SDS-PAGE (12 %)** der Varianten von TS_TcAAH: M: Marker (mit den Molekülmassen in kDa), aufgetragen wurden je 1 μ l der Eluatfraktion.

4.10.3 Aufreinigung von ungetaggtem TcAAH

Es wurden parallel zu *S. cerevisiae* Apd1 Kristallisationsansätze für das bakteriellen Homolog aus *Thermomonospora curvata* durchgeführt. Um eine Inhomogenität der Proteinmoleküle zu vermeiden wurde auch hier eine Aufreinigung mittels Heparinsäule, die hier als Ionentauscher eingesetzt wird, mit anschließender Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Das Gen wurde dafür in pETDuet-1 zwischen die Schnittstellen NcoI und Sall kloniert. Somit wurde der im Vektor befindliche His₆-Tag herausgeschnitten. Die Expression wurde mit dem Zusatzplasmid pRK-ISC zur Unterstützung des Fe/S-Einbaus durchgeführt. Im Verlauf der Chromatographie wurden sowohl die Absorption bei 280 nm als Maß für den Proteingehalt als auch die Absorption bei 450 nm als Maß für den eingebauten Fe/S-Cluster erfasst (Abb. 4-62 A und B).

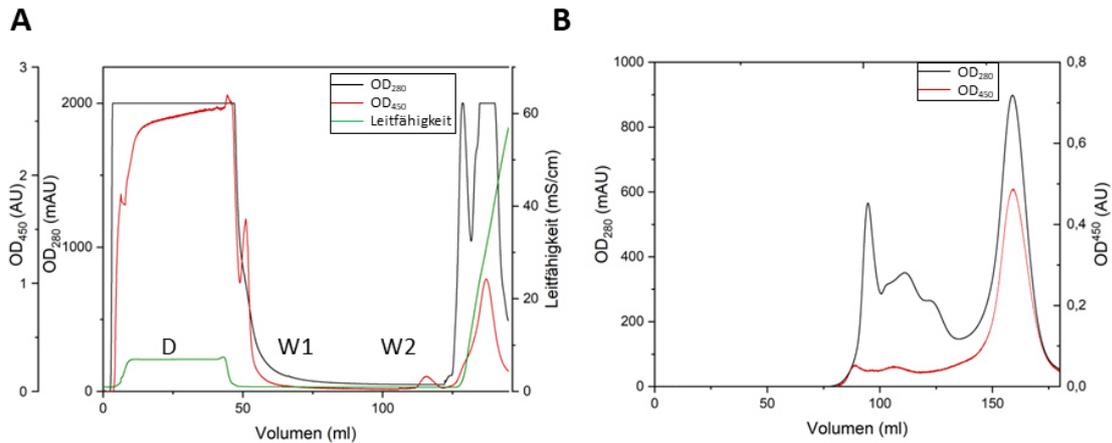


Abbildung 4-62: Übersicht der Aufreinigung von TcAAH ohne Tag (1). A Chromatogramm der Aufreinigung mittels Heparinsäule. B Chromatogramm der Aufreinigung mittels Gelfiltration.

Im Gegensatz zur Aufreinigung des Proteins Apd1 aus *S. cerevisiae* (Kap. 4.8) war in diesem Fall die Reinheit des Proteins nach der Ionenaustauschchromatographie als ersten Aufreinigungsschritt noch nicht zufriedenstellend, verbesserte sich aber deutlich nach der Gelfiltration. Zudem war anhand der SDS-PAGE zu erkennen, dass hier ein Teil des Proteins nicht oder nur unzureichend an das Heparinsäulenmaterial band, da auch am Ende der Waschphase eine deutliche Bande, die TcAAH zuzuordnen ist, vorhanden war. (Abb. 4-63).

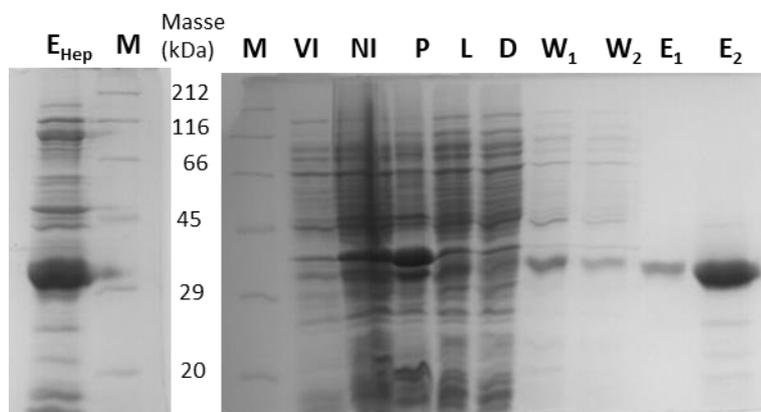


Abbildung 4-63: Übersicht der Aufreinigung von TcAAH ohne Tag (2). SDS-PAGE. M: Marker (mit den Molekülmassen in kDa), VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, P: Pellet, L: Lysat, D: Durchlauf, W₁: Waschfraktion zu Beginn, W₂: Waschfraktion am Ende, E_{Hep}: Eluat der Heparinsäule. E_{1/2}: Eluate der Gelfiltration (1 resp. 2 µl).

Wie in Tabelle 4-6 zu sehen, konnten 12 ± 7 mg Protein aus einer 2 l-Kultur mit einem Eisengehalt von $1,29 \pm 0,39$ Eisenionen pro Proteinmolekül isoliert werden ($n = 4$).

Tabelle 4-6: Protein und Eisengehalt von ungetagtem TcAAH.

| Aufreinigung | mg Protein/2 l-Kultur | Fe/Protein |
|--------------|-----------------------|------------|
| 1 | 9,6 | 1,88 |
| 2 | 10,0 | 1,30 |
| 3 | 4,8 | 1,21 |
| 4 | 24,2 | 0,78 |

In Abbildung 4-64 **A** weist das UV/Vis-Spektrum Maxima bei 325, 450 sowie 550 nm auf, was dem typischen Spektrum eines [2Fe-2S]-Proteins ähnelt. Die Anwesenheit eines [2Fe-2S]-Clusters wurde nun durch die ESR-Spektroskopie nachgewiesen. Nach Reduktion mit Natriumdithionit unter anaeroben Bedingungen konnte bei 77 K ein rhombisches Signal einer einzelnen Spezies mit den g -Werten 2,018, 1,888 und 1,773 detektiert werden (Abb. 4-64 **B**).

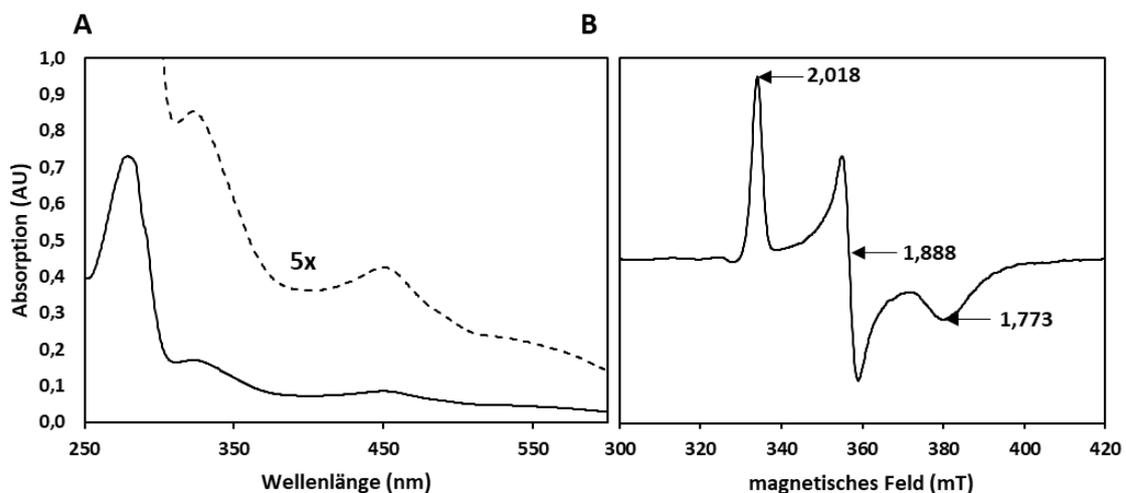


Abbildung 4-64: UV/Vis- und ESR-Spektrum von TcAAH. **A** UV/Vis-Spektrum von TcAAH (19 mg/ml) in Puffer A/B (1:20 in Puffer A/B). Gestrichelt dargestellt: 5-fache Vergrößerung. **B** ESR-Spektrum von reduziertem TcAAH bei 77 K. Die Mikrowellenleistung lag bei 20 mW, die Frequenz bei 9,43 GHz und die Modulationsamplitude bei 1,5 mT.

4.10.4 Aufreinigung der Varianten ohne Tag

Zur Charakterisierung der Clusterliganden von TcAAH wurden unter 4.9.1 und 4.9.2 verschiedene Aufreinigungsmethoden zur Isolierung der Proteine angewandt. Zur ausführlichen Charakterisierung der Clusterliganden wurde auf die Aufreinigung ohne Tag mittels Heparinsäule mit anschließender Gelfiltration zurückgegriffen. Zusätzlich zu den vermuteten Cysteinliganden wurden in diesem experimentellen Zusammenhang auch alle anderen Cysteine des Proteins zu Alaninen mutiert. Des Weiteren wurden zur

Charakterisierung des HxGGD-Motivs auch diese potenziellen Liganden zu Alaninen mutiert. Zudem wurde durch Mutation des Histidins resp. Aspartats zu alternativen Clusterliganden unterschiedliche Clusterumgebungen geschaffen, die spektroskopisch untersucht wurden.

Die Mutation von Clusterliganden des [2Fe-2S]-Clusters resultiert, wie bei Aim32 (Kapitel 4.7.1) gezeigt, in einer starken Änderung eines ESR-Spektrums und der dazugehörigen g -Werte. Somit wird im Folgenden die Identifikation der Clusterliganden nur anhand der ESR-Spektroskopie durchgeführt.

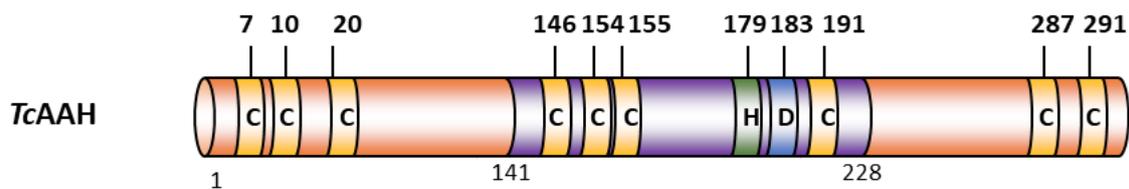


Abbildung 4-65: Schematische Übersicht der mutierten Aminosäuren von TcAAH.

Die Proteine der Cystein zu Alanin-Varianten im ersten und dritten Abschnitt in Abbildung 4-65 (orange) wurden einmal isoliert und es wurde nur über die Heparinsäule ohne anschließende Gelfiltration aufgereinigt. Für C154A wurde eine weitere Aufreinigung mittels Gelfiltration durchgeführt. Die Mutanten C146A und C155A wurden ebenfalls nur über die Heparinsäule aufgereinigt, da es bei dem Versuch die beiden Varianten über Gelfiltration weiter aufzureinigen zur Präzipitation der Proteine kam. Die Generierung und Isolation dieser neun Varianten diente der Identifikation der Cysteinliganden des Fe/S-Clusters über die ESR-Spektroskopie. Von jeder Mutante wurde im reduzierten Zustand ein ESR-Spektrum bei 77 K aufgenommen. Die Signale der drei N-terminalen (C7A, C10A und C20A) sowie der C-terminalen (C191A, C287A und C291A) Cystein-Varianten von TcAAH zeigten das gleiche rhombische Signal wie das WT-Protein. Auch die g -Werte, angedeutet in Abbildung 4-66, sind nahezu identisch mit jenen des WT. Dies spricht dafür, dass eine Mutation dieser Cysteine nicht mit einer Änderung der Liganden des [2Fe-2S]-Clusters einhergeht. Die Varianten C146A und C155A waren wie bei den Proteinen mit His- resp- Strep-Tag bei 77 K ESR-inaktiv im Gegensatz zu C154A. Dessen Signal wies, wie das der N- und C-terminalen Cystein-Varianten, im Gegensatz zu C154A der Reinigung mittels His- resp- Strep-Tag, den gleichen Verlauf mit vergleichbaren g -Werten wie WT auf. Da bei C146A und C155A kein Cluster inkorporiert ist, war der Nachweis des Proteins nur über die SDS-PAGE und nicht über die ESR-Spektroskopie möglich (vgl. Abb. 4-68).

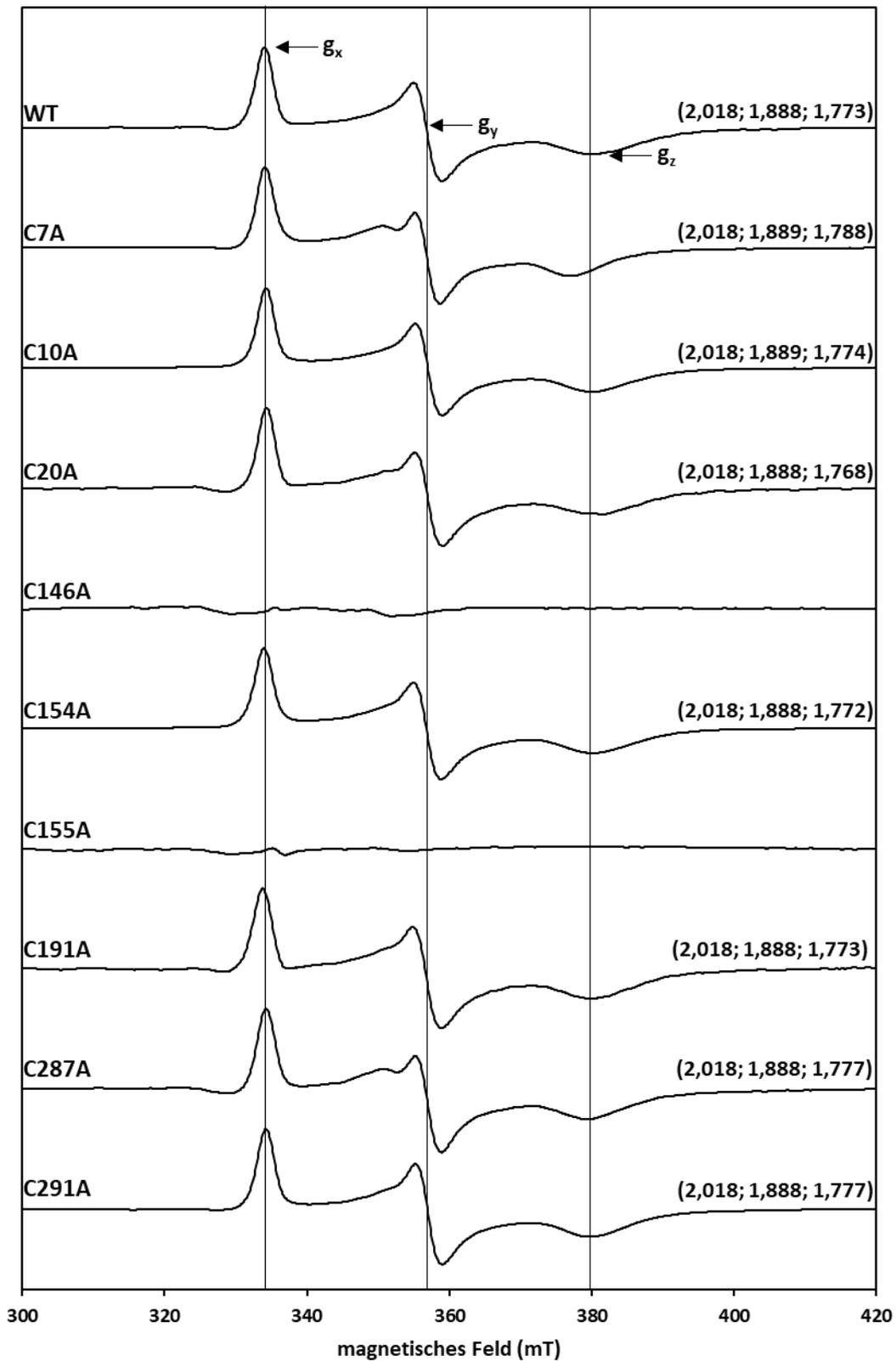


Abbildung 4-66: ESR-Spektren der Cystein-Mutanten von TcAAH. Die Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die ermittelten g -Werte sind in den Spektren angezeichnet. Die Proteine lagen bei pH 9 vor und wurden vor Reduktion durch Natriumdithionit durch die Zugabe von anaerobem PufferA/B und Inkubation unter Luftausschluss anaerobisiert. Die Spektren wurden auf die Intensität des jeweiligen g_x -Wertes normiert. Die Spektren von C146A und C155A sind unverändert dargestellt.

Die beiden anderen Liganden des Clusters wurden nun im Folgenden bestimmt. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum HxGGD-Motiv von Apd1 und Aim32 wurden die Aminosäuren H179 und D183 als putative Clusterliganden vermutet.

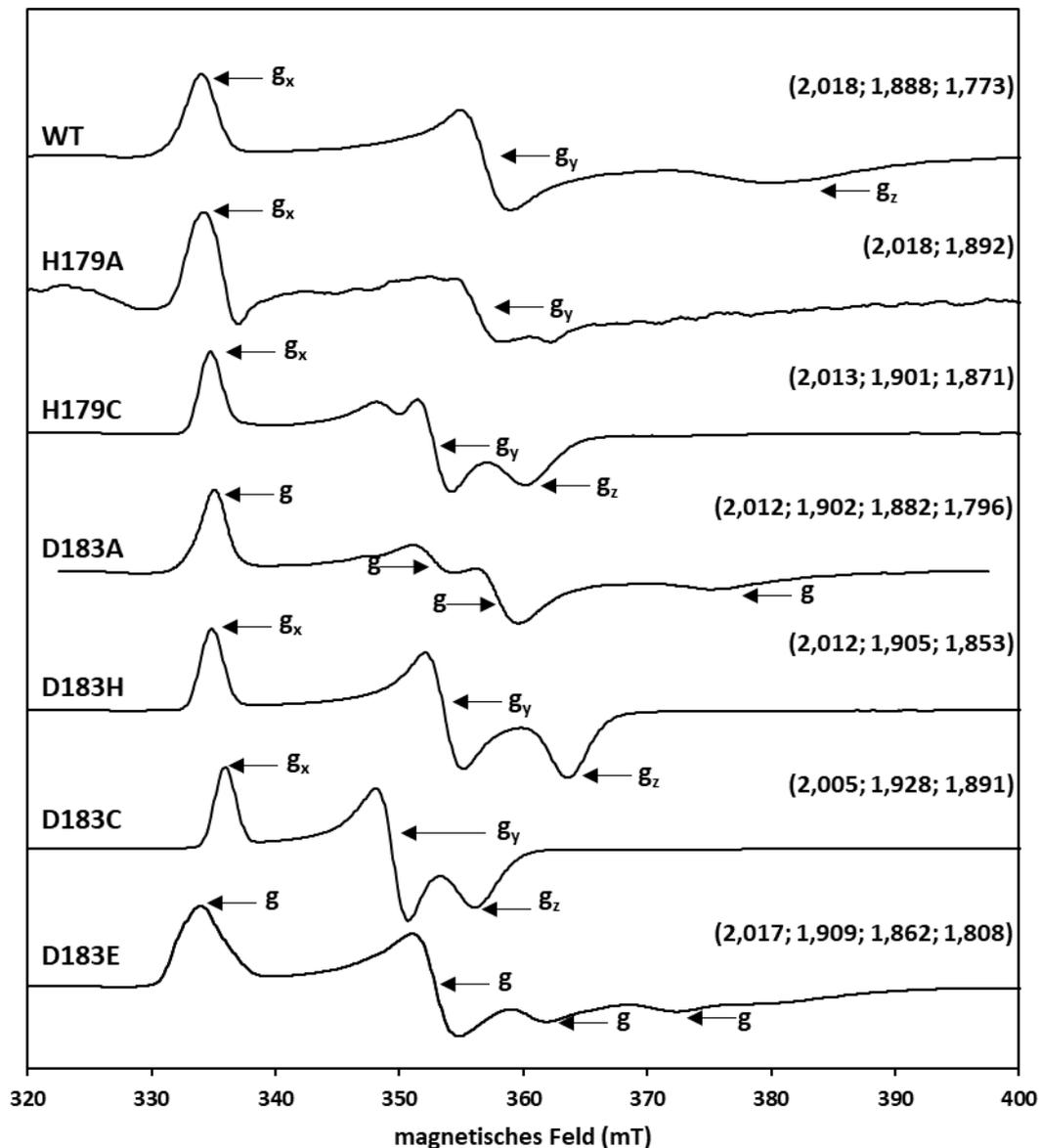


Abbildung 4-67: ESR-Spektren der HxGGD-Mutanten von TcAAH. Die Spektren wurden bei 77 K aufgenommen. Die ermittelten g -Werte sind in den Spektren angezeichnet. Die Proteine lagen bei pH 9 vor und wurden vor Reduktion durch Natriumdithionit durch die Zugabe von anaerobem Puffer A/B und Inkubation unter Luftausschluss anaerobisiert. Die Spektren wurden auf die Intensität des jeweiligen g_x -Wertes normiert.

Die Mutation des Histidins an Position 179 zu Alanin resultierte in einer starken Intensitätsabnahme des ESR-Signals (Abb. 4-67, Reihe 2). Wurde dieses Histidin allerdings in ein Cystein mutiert, ergab sich dadurch ein alternatives Ligandenmotiv und ein Cluster konnte erneut inkorporiert werden, wie aus Abbildung 4-67, Reihe drei deutlich wird. Durch die Generierung eines MitoNEET-artigen Bindemotivs wurde eine effektive Inkorporierung des Clusters begünstigt und es konnte ein Signal mit den

g-Werten 2,013, 1,901 und 1,871 detektiert werden. Wurde D183 zu Alanin mutiert, resultierte dies in einer Überlagerung zweier ESR-Signale und bezeugte somit das Vorhandensein verschiedener Spezies. Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre eine Koordinierung des Clusters mit nur noch drei Aminosäuren und einem externen Liganden (Wasser). Durch den Austausch des Aspartat zu Histidin oder Cystein wurden alternative Liganden zur Verfügung gestellt, was in der Wiederherstellung eines Ligandenbindemotifs mit einem effektiven Clustereinbau resultierte. Die alternative Koordinierung bedingte eine Änderung des ESR-Spektrums und aller *g*-Werte (Abb. 4-67, Reihe 5 und 6). Durch diese Mutationen entstanden Clusterbindemotive wie in Rieske- resp. MitoNEET-Proteinen. Als weitere Variante wurde D183 zu Glutamat ESR-spektroskopisch untersucht. Diese zwei Aminosäuren unterscheiden sich durch die zusätzliche CH₂-Gruppe deutlich. Jedoch präzipitierte diese Variante bei der Aufreinigung über Gelfiltration und deswegen konnte nur ein ESR-Spektrum des Eluates der Heparinsäule aufgenommen werden, das auf einen [2Fe-2S]-Cluster mit nicht-homogener Koordination hindeutet.

Neben der ESR-Spektroskopie konnte ein Nachweis eines Clustereinbaus über die Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen erfolgen. Tabelle 4-7 bestätigt, dass die Varianten des HxGGD-Motivs sowie die wahrscheinlich nicht an der Koordination des nativen Clusters beteiligte Mutante C154A signifikante Mengen Eisen inkorporieren. Die detektierten Mengen an Fe-Ionen pro Proteinmolekül sind spezifisch für den Einbau eines [2Fe-2S]-Clusters.

Tabelle 4-7: Konzentration und Eisengehalt ausgewählter Varianten von TcAAH.

| | mg Protein/2 l-Kultur | Fe/Protein |
|-----------|-----------------------|------------|
| C154A (1) | 9,2 | 1,4 |
| C154A (2) | 12,2 | 1,1 |
| H179C (1) | 10,9 | 1,3 |
| H179C (2) | 14,6 | 2,1 |
| D183H (1) | 17,6 | 1,4 |
| D183H (2) | 14,2 | 1,3 |
| D183H (3) | 12,9 | 1,6 |
| D183C (1) | 18,7 | 1,5 |
| D183C (1) | 20,3 | 1,5 |

Alle Varianten aus Tabelle 4-7 konnten in ähnlicher Ausbeute aus einer 2 l-Kultur isoliert werden, wie die Proteinkonzentration und die SDS-PAGE in Abb. 4-68 belegt. Eine Bestimmung der Konzentration und des Eisengehaltes für jene Varianten nicht möglich, die nur über die Heparinsäule aufgereinigt wurden. Nach diesem Aufreinigungsschritt war der Grad an Verunreinigung zu hoch und das Ergebnis wäre verfälscht worden.

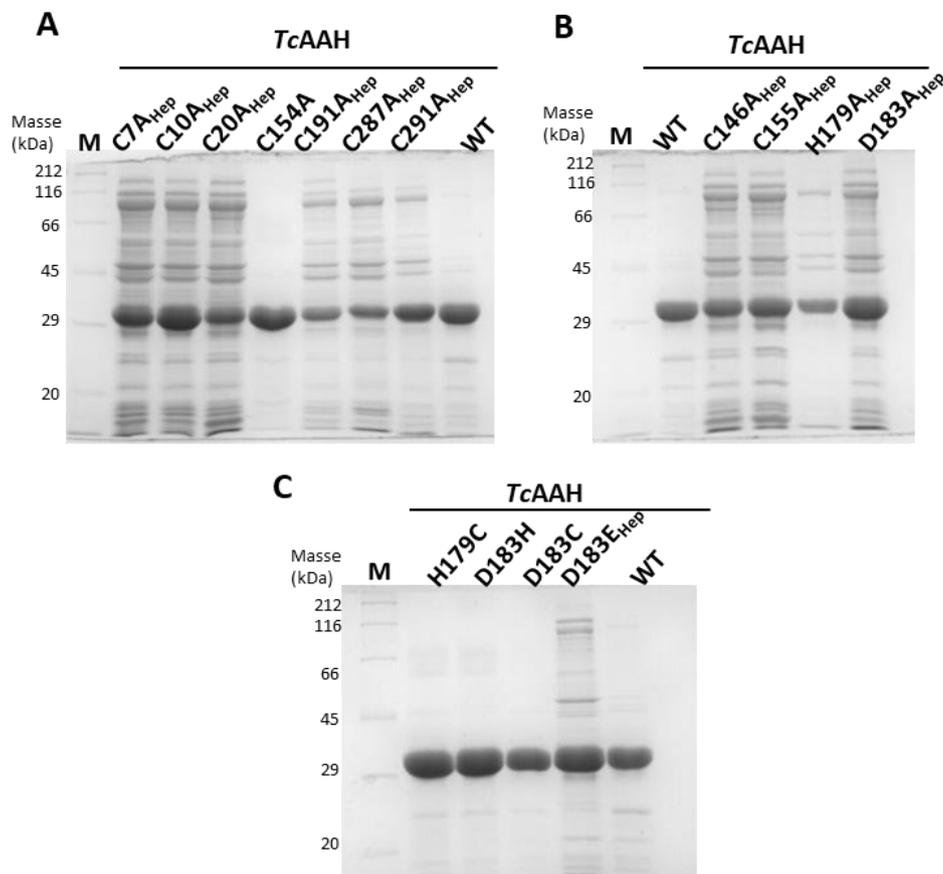


Abbildung 4-68: Nachweis der Expression der *TcAAH*-Varianten über SDS-PAGE. **A** Eluate der Cystein-Varianten, die nicht an der Clusterbindung beteiligt sind. **B** Eluate der Varianten, in denen Clusterliganden zu Alanin mutiert sind. **C** Eluate Varianten mit alternativen Clusterliganden. Hep bedeutet eine alleinige Aufreinigung über Heparinsäule.

4.10.5 Bestimmung des pK_s -Wertes von *TcAAH*

Der Cluster von *TcAAH* wird vermeintlich von zwei Cysteinen, einem Aspartat und einem Histidin koordiniert. Dieses Histidin könnte wie bei *Apd1* und *Aim32* je nach pH-Wert der Umgebung protoniert oder deprotoniert vorliegen. Der pK_s -Wert spiegelt diesen Wendepunkt wider. Wenn das Protein eine pH-Abhängigkeit aufweist, sollte sich dies auf das UV/Vis-Spektrum, aufgenommen bei unterschiedlichen pH-Werten, auswirken. Für das WT-Protein konnte eine kleine Verschiebung des Peaks bei 445 nm beobachtet werden (Abb. 4-69 **A**). Diese Verschiebung wurde auch in den Spektren der Mutanten D183C und D183H (Abb. 4-69 **B** und **D**) detektiert. Das UV/Vis-Spektrum der Variante H179C zeigte keine pH-Abhängigkeit (Abb. 4-69 **C**), nur bei hohem pH kam es zur Änderung und partiellen Präzipitation des Proteins. Anhand der Differenzspektren

zwischen pH 10,5 und 7 wurde zur Auswertung die Wellenlängen 445 nm und 465 nm (WT und D183H) resp. 475 nm (D183C) gewählt (Abb. 4-69 E und F). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Spektren auf 450 nm normiert und um die Absorption bei 600 nm korrigiert.

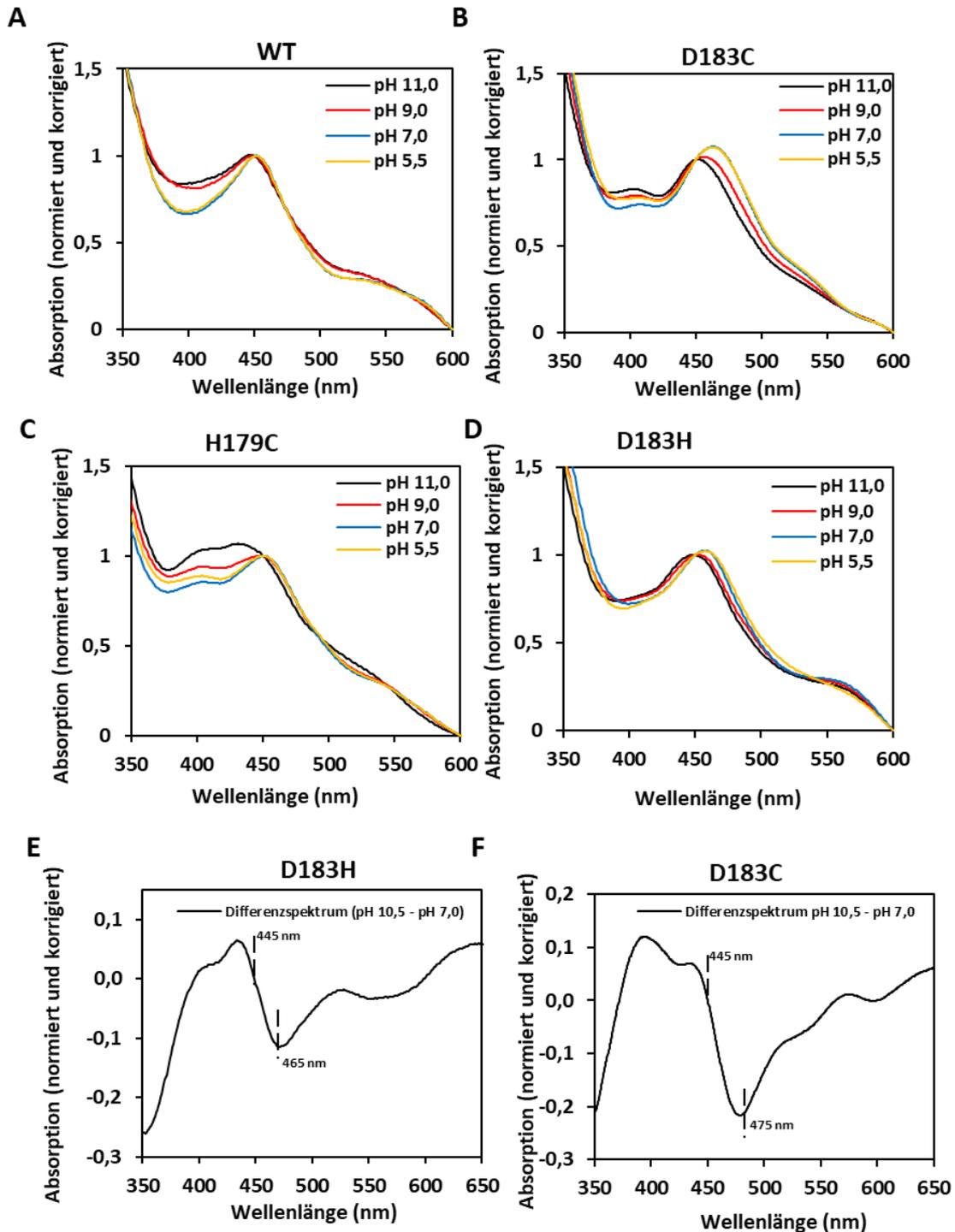


Abbildung 4-69: UV/Vis-Spektren von *TcAAH* und dreier Varianten bei verschiedenen pH-Werten. Spektren von WT (A), D183C (B), H179C (C), und D183H (D) bei pH 5,5 (gelb), pH 7,0 (blau), pH 9,0 (rot) und pH 11,0 (schwarz).

Ergebnisse

Die Absorptionsänderung der UV/Vis-Spektren der verschiedenen Proteine bei pH 5,5-11 in 0,5 er Schritten ist in Abbildung 4-70 dargestellt. Anhand des Kurvenverlaufs von WT und D183C ist deutlich zu erkennen, dass hier eine Protonierung stattfand, was in einem pK_S -Wert resultiert. Die Kurve der Variante D183H hat einen deutlich anderen Verlauf und ließ sich im Gegensatz zu WT nicht mit einer, sondern mit der Summe aus zwei Henderson-Hasselbalch-Gleichungen simulieren. Die H179C Variante keine pH-Abhängigkeit aufweisen. Die Änderung der Absorption beruhte hier möglicherweise nicht auf einem Protonierungsvorgang, sondern auf der Präzipitation des Proteins während der Messung.

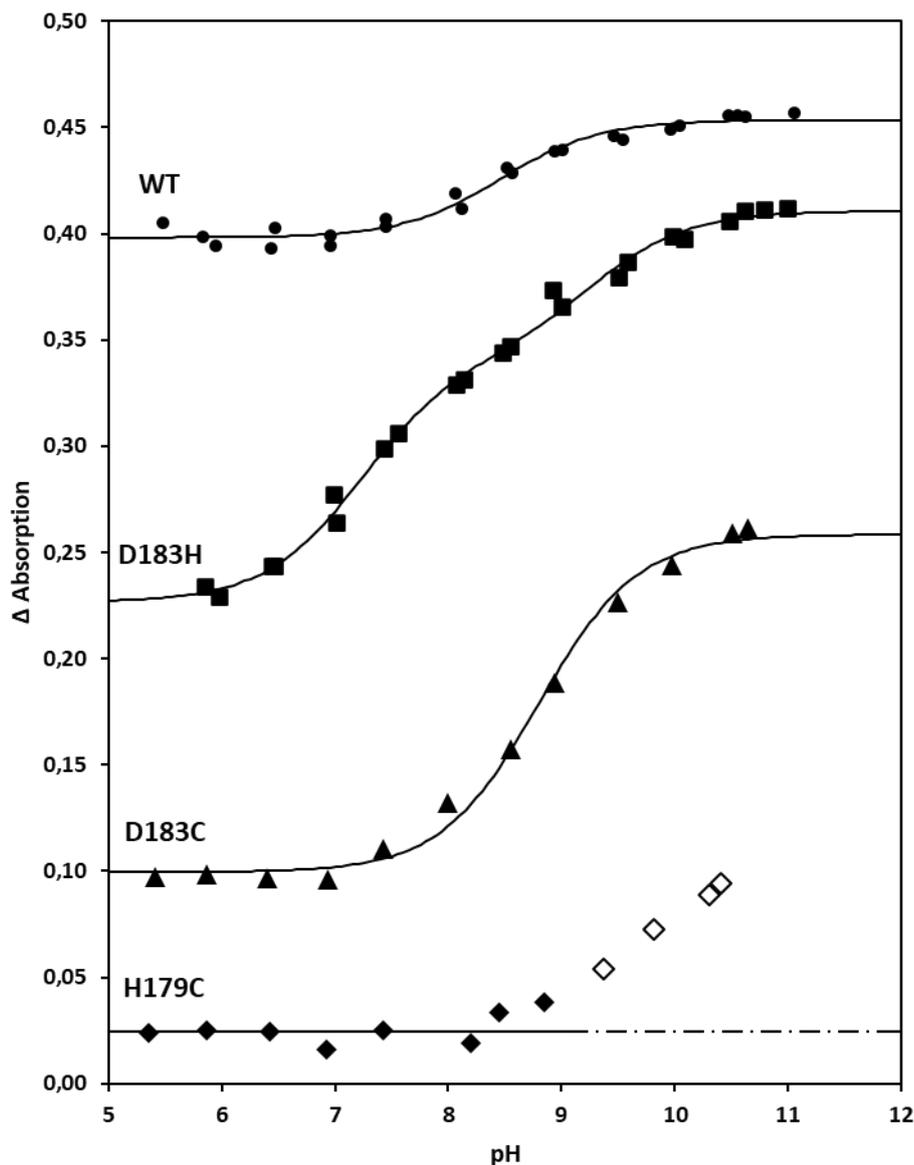


Abbildung 4-70: pK_S -Wert-Bestimmung von *TcAAH* und dreier Varianten. Vergleich der Absorptionsdifferenzen der untersuchten Proteine. Im Falle von WT und D183H wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messwerte und Fits sind zum Teil zur Verbesserung der Übersichtlichkeit vertikal verschoben dargestellt.

Somit errechnet sich für *TcAAH*-WT ein pK_S -Wert von $8,42 \pm 0,08$. Wird der Aspartat-Rest in ein Cystein mutiert, resultiert dies in einer MitoNEET-artigen Clusterformation und der pK_S -Wert erhöht sich um etwa 0,4. Die pK_S -Werte der Variante D183H liegen bei $9,58 \pm 0,01$ und $7,28 \pm 0,02$ und ähneln damit jenen von Aim32 und Apd1 (Tab 4-8).

Tabelle 4-8: pK_S -Werte von *TcAAH* und dreier Varianten.

| Variante | pK_S -Wert |
|----------|--|
| WT | $8,42 \pm 0,08$ |
| D183H | $9,58 \pm 0,01$ (pK_1) $7,28 \pm 0,02$ (pK_2) |
| D183C | $\approx 8,80$ |
| H179C | Keine pH Abhängigkeit (pH=5,3-9) |

4.10.6 Bestimmung des Redoxpotentials von *TcAAH*

Erste Versuche das Redoxpotential von *TcAAH* als auch der Variante D183H zu bestimmen, wurden im Zuge dieser Arbeit unternommen. Die Methode der Wahl stellte hierbei die Redoxtitration in Gegenwart von Redoxmediatoren da. Die Messung der Proben erfolgte mittels ESR-Spektroskopie. Um erste Rückschlüsse auf eine pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials ziehen zu können, wurden reduktive Redoxtitrationen bei pH 6, 8 und 10 durchgeführt. Der gewünschte pH-Bereich wurde durch Verdünnung der Proteinlösung mit einem entsprechenden Puffer erreicht. Durch die portionsweise Zugabe von Natriumdithionit wurden die Potentiale des Gemisches eingestellt. Die davon entnommenen Proben wurden mit dem ESR-Spektrometer bei 77 K gemessen. Die Durchführung ist in Kapitel 3.3.11 beschrieben. In Abbildung 4-71 sind die Spektren der Redoxtitration von *TcAAH* bei pH 8 beispielhaft dargestellt. Die ESR-Spektren der Messungen bei pH 6 und 10 finden sich im Anhang (Abb. 6-9).

Mit sinkendem Potential des Reaktionsgemisches erfolgte die stetige Reduktion des [2Fe-2S]-Clusters. Im Bereich von 335 mT war vor allem bei niedrigerem Potential ein starkes Radikalsignal zu beobachten, verursacht durch verschiedene Redoxmediatoren im Gemisch. Diese Signale werden aufgrund der Übersichtlichkeit nicht in Abbildung 4-71 A dargestellt. Unter Zuhilfenahme der Nernst-Gleichung errechnet sich die Intensität der Amplitude in Abhängigkeit des Redoxpotentials:

$$Red = \frac{k}{1 + e^{(E-E_m)} \times \frac{n \times F}{R \times T}}$$

mit: k = Umrechnungsfaktor für die gemessene Amplitude

E = Potential der Lösung

E_m = Redoxpotential des Proteins

n = Anzahl der Elektronen

F = Faraday-Konstante

R = universelle Gaskonstante

T = Temperatur

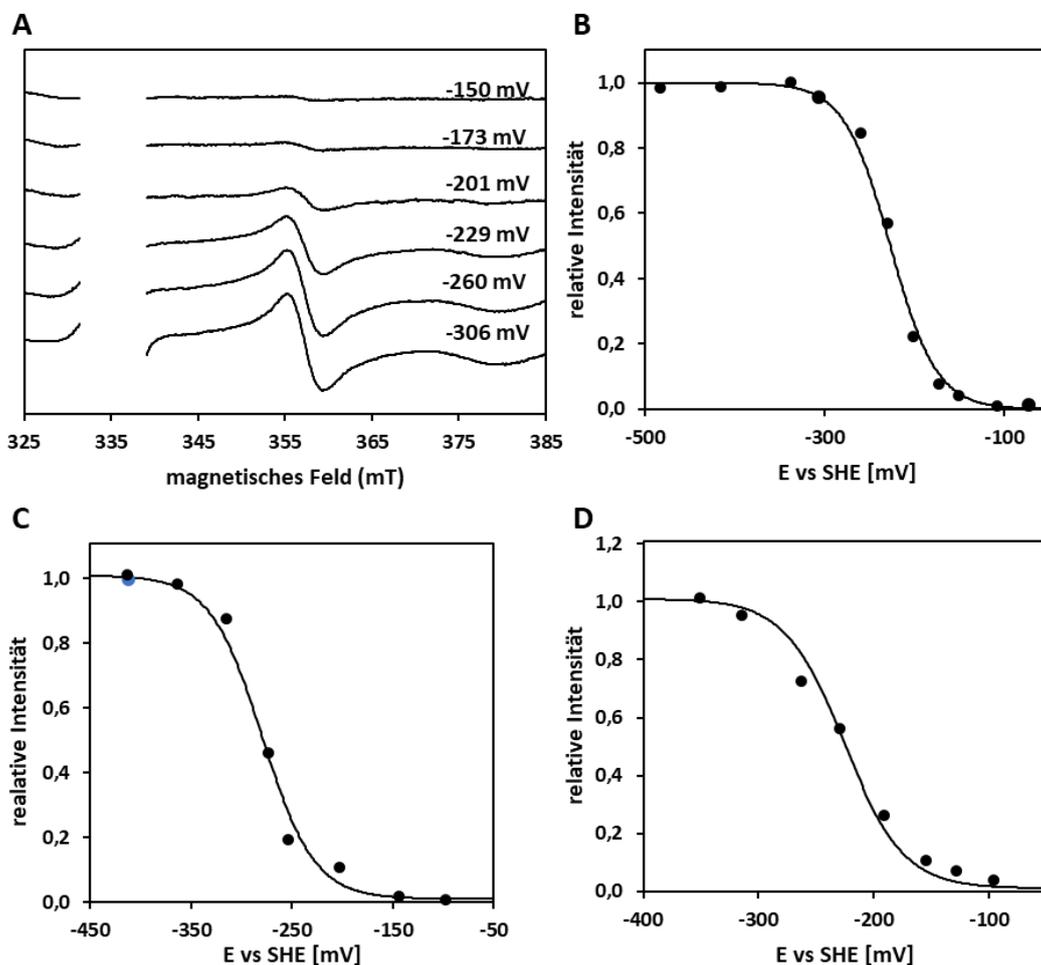


Abbildung 4-71: Redox titration von TcAAH bei verschiedenen pH-Werten (1,8 mg/ml). **A** Auswahl der ESR-Spektren zur Bestimmung des Potentials bei pH 8. Die Amplitude des g_V -Peaks nimmt bei Erniedrigung des Potentials zu. **B** Übersicht der Intensität der g_V -Amplitude bei pH 8. Aufgetragen sind die Intensitäten des g_V -Peaks gegen die gemessenen Potentiale. **C** Übersicht der Intensität der g_V -Amplitude bei pH 10. Aufgetragen sind die Intensitäten des g_V -Peaks gegen die gemessenen Potentiale. **D** Übersicht der Intensität der g_V -Amplitude bei pH 6. Aufgetragen sind die Intensitäten des g_V -Peaks gegen die gemessenen Potentiale. Die ESR-Spektren bei pH 10 und pH 6 sind im Anhang (Abb. 6-9).

Für die Probe wurde anhand der Excel-Solver-Funktion mit der Minimierung der Quadratensumme in einem Fit die Werte für den Umrechnungsfaktor der Amplitude und das Redoxpotential angepasst (Abb. 4-71 **B**). Für die Messung des Potentials bei pH 8 ergab sich der Wert von $E_m = -225$ mV. Die errechneten Redoxpotentiale bei pH 10 (Abb. 4-71 **C**) resp. 6 (Abb. 4-71 **D**) sind Tabelle 4-9 zu entnehmen.

Tabelle 4-9: Redoxpotentiale von TcAAH bei verschiedenen pH-Werten.

| pH-Wert | Potential des Proteins (mV) |
|---------|-----------------------------|
| 6 | -226 |
| 8 | -225 |
| 10 | -279 |

In Übereinstimmung mit dem pK_{ox} Wert von $8,42 \pm 0,08$ änderte sich das Redoxpotential des Proteins kaum zwischen pH 6 und 8. Bei pH 10 war es jedoch um 54 mV niedriger.

Es wurden auch Versuche unternommen das Redoxpotential der Mutante D183H bei verschiedenen pH-Werten zu bestimmen. Die Ermittlung des Potentials wurde analog zu WT durchgeführt. ESR-Spektren unterschiedlicher Potentiale bei pH 8 sind in Abb. 4-72 **A** gezeigt. Die Berechnung des Redoxpotentials (Abb. 4-72 **B**) dieser Mutante erfolgte analog zu dem WT-Protein und ergab -78 mV bei pH 8. Auch für die Variante D183H wurde versucht das Potential bei pH 6 und pH 10 zu bestimmen, es kam jedoch während der Titration zur Präzipitation des Proteins.

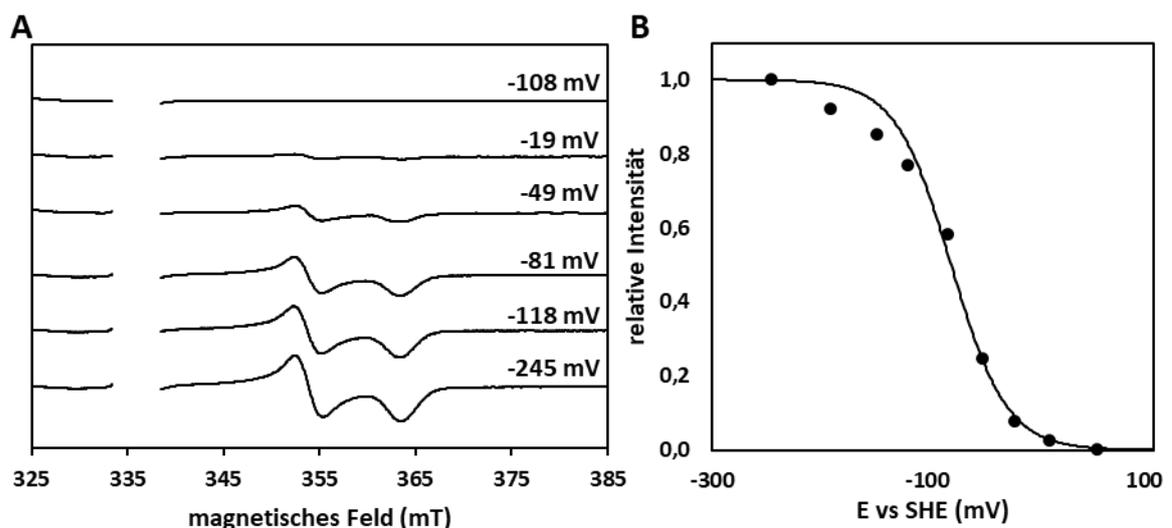


Abbildung 4-72: Redox Titration von TcAAH D183H bei pH 8 (1;2 mg/ml). **A** Auswahl der ESR-Spektren zur Bestimmung des Potentials. Die Amplitude des g_Y -Peaks nimmt bei Erniedrigung des Potentials zu. **B** Übersicht der Intensität der g_Y -Amplitude. Aufgetragen sind die Intensitäten des g_Y -Peaks gegen die gemessenen Potentiale.

4.10.7 Mößbauerspektroskopie von TcAAH

Mittels der Mutagenesestudien aus den vorangegangenen Kapiteln konnten Rückschlüsse die Clusterliganden von TcAAH gezogen werden. Jedoch ist die Fragestellung welche Aminosäure welches Eisenion ligiert noch nicht beantwortet. Anhand des Mößbauerspektrums des gereinigten Proteins sollten Rückschlüsse gezogen werden, ob je ein Eisenkern von einem Cystein und einem Histidin resp. Aspartat oder

ob ein Kern nur von Cysteinen und der zweite von einem Histidin und einem Aspartat koordiniert wird.

Die Vorbereitung der Probe erfolgte analog Kapitel 3.3.10. Zur Anreicherung des Mößbauer-aktiven ^{57}Fe -Isotops im Protein wurden *E. coli* Zellen in Gegenwart von $100\ \mu\text{M}$ ^{57}Fe kultiviert. Das Protein wurde am Ende der Aufreinigung mittels Heparinsäule und anschließender Gelfiltration stark aufkonzentriert. Die Messung erfolgte an der RPTU im Fachbereich Physik (Biophysik) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Schünemann durch Dr. Christina Müller. Das resultierende Spektrum ist in Abbildung 4-73 A gezeigt.

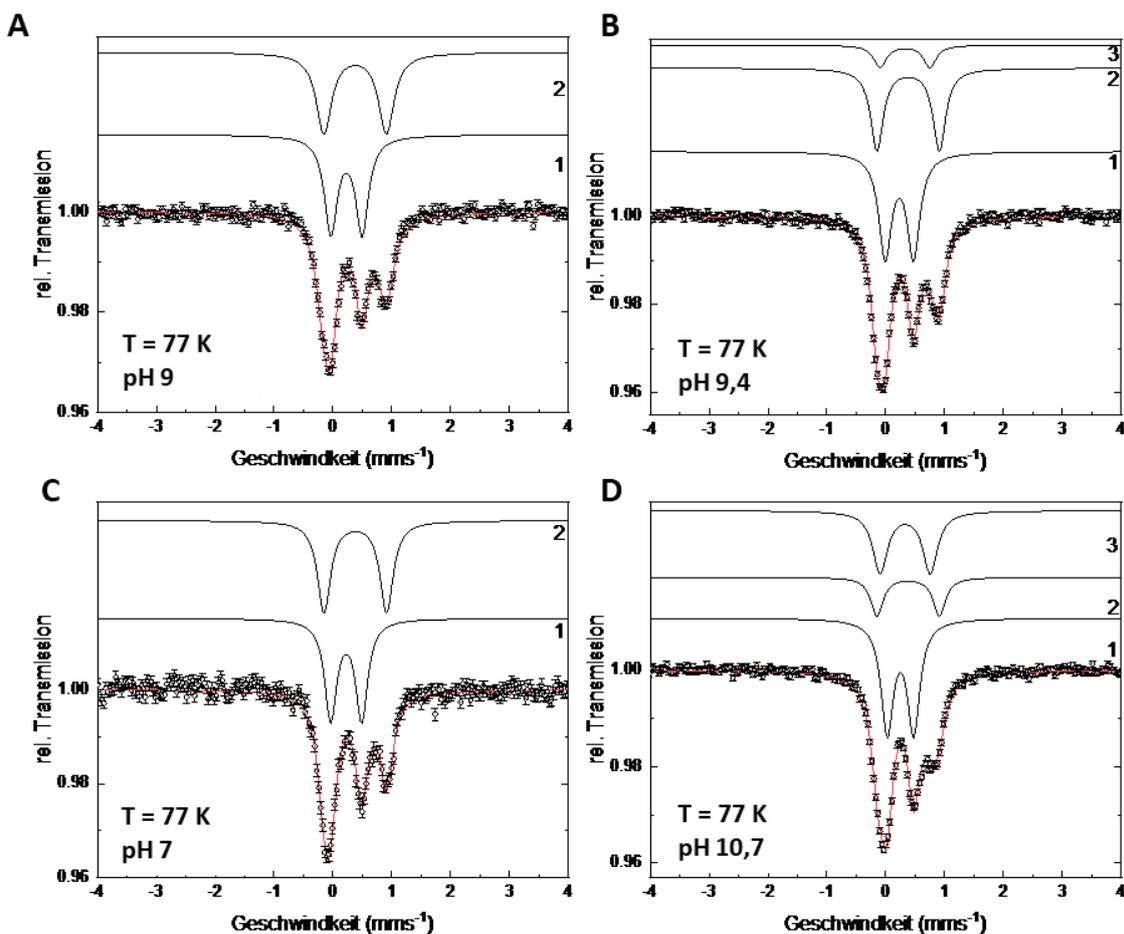


Abbildung 4-73: Mößbauerspektrum von oxidiertem TcAAH. 1 und 2 stellen die Subspektren der zwei Eisenkerne dar (schwarz). Unten ist der resultierende Fit dargestellt (rot). **A** Spektrum bei pH 9. **B** Spektrum bei pH 9,4. **C** Spektrum bei pH 7. **D** Spektrum bei pH 10,7. Für alle pH-Werte wurden Nullfeldmessungen bei 77 K durchgeführt.

Die rote Linie durch die Messpunkte stellt den resultierenden Fit, der von Dr. Christina Müller durchgeführt wurde, dar. Das Duplett der Komponente 1 weist eine Isomerieverschiebung von $\delta = 0,23\ \text{mm/s}$ und eine Quadrupolaufspaltung von $\Delta E_Q = 0,53\ \text{mm/s}$ auf. Diese Parameter sind typisch für $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster mit Cystein Koordination resp. für das Fe^{3+} -Ion, das durch zwei Cysteine und zwei S^{2-} -Ionen koordiniert wird. Im Vergleich dazu ist die Isomerieverschiebung und die Quadrupol-

aufspaltung von Komponente 2 mit $\delta = 0,38$ mm/s und von $\Delta E_Q = 1,06$ mm/s signifikant höher. Beide Komponenten wurden mit einer Fläche von 50 % gefittet (Abb. 4-73 A).

Durch diese Parameter ist es möglich die Liganden des [2Fe-2S]-Clusters den jeweiligen Eisenkernen zuzuordnen. Sowohl Sauerstoff als auch Stickstoff besitzen eine höhere Elektronegativität als Schwefel. Somit kommt es zu einer niedrigeren Elektronendichte am Eisenkern, wenn eines der ersteren Elemente gebunden ist. Damit steigt die Isomerieverschiebung als auch die Quadrupolaufspaltung an. Da sich die Parameter der einzelnen Kerne weniger stark voneinander unterscheiden würden, wenn je ein Eisenion von einem Cystein und einem Aspartat resp. Histidin koordiniert würde, ergibt sich eine bisher einzigartige Clusterkoordination, gezeigt in Abbildung 4-74.

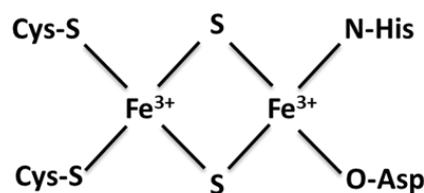


Abbildung 4-74: Schematische Clusterkoordination von TcAAH. Ein Eisenkern ist von zwei Cysteinen (146 und 155) der zweite von einem Histidin (179) und einem Aspartat (183) koordiniert.

Das Fe/S-Cluster koordinierende Histidin kann entweder protoniert oder deprotoniert vorliegen. Anhand des in Kapitel 4.10.5 Bestimmten pK_S -Wertes sollte bei pH 9 das Histidin in protonierter und deprotonierter Form vorliegen. Um den Einfluss des Protonierungsgrads des Histidins auf das Mößbauerspektrum zu bestimmen, wurde im Anschluss an diese Arbeit von Dipl. Biophys Lukas Knauer Proben des Proteins bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Spektren bei pH 7, 9,4 und 10,7 sind in Abbildung 4-73 B-D gezeigt. Die dazugehörigen Mößbauerparameter finden sich im Anhang in Tabelle 6-1, 6-2 und 6-3. Bei pH 7 liegt das Histidin wie bei pH 9 in protonierter Form vor. Erst bei pH 9,4 ändert sich das Spektrum und es liegt eine Mischung aus 78 % protoniertem Cluster und 22 % deprotoniertem Cluster vor. Bei pH 10,4 verschiebt sich dieses Verhältnis zu 34 % protoniertem Cluster und 66 % deprotoniertem Cluster. Daraus lässt sich ein pK_S -Wert von 10,2 ableiten (L. Knauer, persönliche Mitteilung). Dieser Wert steht nicht im Einklang mit dem in Kapitel 4.10.5 bestimmten Wert von 8,4. Dieser Effekt kann auf möglicherweise auf das Einfrieren der Probe und sich dadurch ergebene Strukturänderungen zurückzuführen sein.

4.10.8 Expression von TcAAH in *S. cerevisiae*

Die Depletion verschiedener CIA-Faktoren bei gleichzeitiger Überexpression von *S. cerevisiae* Apd1 gab Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der CIA-Maschinerie und der [2Fe-2S]-Clusterinkorporation unter diesen Bedingungen. In unserem Arbeitskreis konnte von Dr. Carina Greth der Einfluss des C-Terminus von *S. cerevisiae* Leu1 auf den [4Fe-4S]-Clustereinbau des Homologes aus *E. coli* bei der

Expression in Hefe gezeigt werden (Greth, 2018). Falls diese Sequenz als Erkennungsmerkmal für die CIA-Maschinerie dient, könnte es sein, damit eine Funktionalität von *TcAAH* in Hefe zu erreichen. Als Plasmide wurden hierfür zum Einem das 2 μ -Plasmid mit dem starken *FBA1*-Promotor und -Terminator gewählt (Bechtel, 2015; Ghaemmaghami *et al.*, 2003) und zum anderen eine Abwandlung dieses Plasmids, das bereits die Nukleotidsequenz für die letzten 30 C-terminalen Aminosäuren von *Leu1* aus *S. cerevisiae* enthält (Bechtel, 2015). Zwischen geeigneten Restriktionsschnittstellen wurde das Gen von Interesse eingefügt. Bei der Klonierung der Variante mit *Leu1*-C-Terminus wurde das Stopp-Kodon von *TcAHH* entfernt. Die zwei konstruierten Plasmide sowie die entsprechenden Leerplasmide wurden in die Hefestämme Δ *apd1* resp. WT transformiert. Nach erfolgter Vorkultivierung wurde ein Tüpfeltest zur Analyse des Zellwachstums unter Bedingungen, bei denen funktionsfähiges *Apd1* essenziell ist, durchgeführt. Sollte ein Fe/S-Cluster in das *Leu1*-C-Terminus-haltige Plasmid eingebaut werden und in jenes ohne nicht, würde dies für eine CIA-Maschinerie abhängige Funktionsübernahme von *TcAAH* sprechen und die Adapterfunktion des *Leu1*-C-Terminus belegen. Abbildung 4-75 verdeutlicht das Wachstum der Zellen auf Agarplatten mit und ohne Gallobenzophenon.

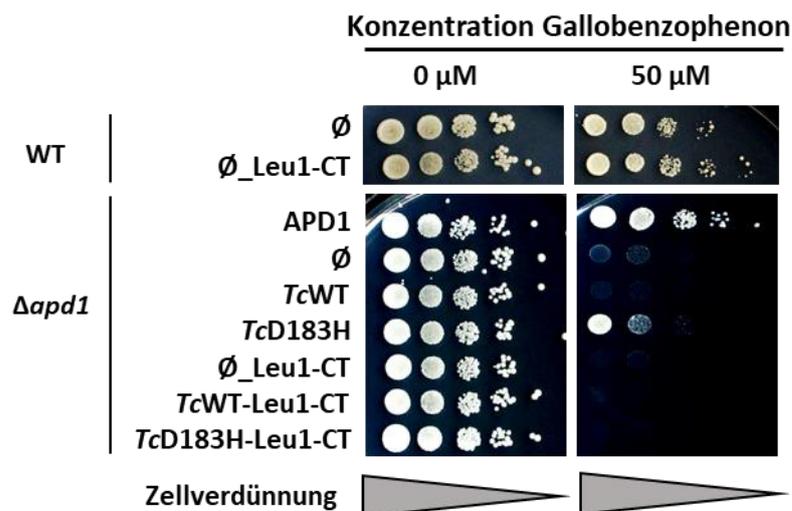


Abbildung 4-75: Tüpfeltest von WT und Δ *apd1*, transformiert mit Plasmiden, die *TcAAH* exprimieren in Gegenwart von Gallobenzophenon. WT oder Δ *apd1* wurden mit einem Leerplasmid oder 426_{FBA}-Plasmiden mit und ohne *Leu1*-C-Terminus, die die Gene für *Apd1*, *TcAAH* resp. Varianten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in glukose-haltigem SC-Medium wurden auf SC-Agarplatten mit Glukose und Gallobenzophenon, in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Die WT-Zellen sind in der Lage mit beiden Leerplasmiden auf 50 μ M Gallobenzophenon-haltigen Agarplatten zu wachsen, wohingegen Δ *apd1*-Zellen mit Leerplasmid nicht lebensfähig ist. Diese Letalität kann durch ein Plasmid, das *S. cerevisiae* *Apd1* exprimiert gerettet werden, jedoch nicht durch eine Kopie von *TcAAH*, mit oder ohne C-terminale Verlängerung.

Da der der [2Fe-2S]-Cluster von *S. cerevisiae* Apd1 durch zwei Cysteine und zwei Histidine koordiniert wird, wurden zudem zwei Konstrukte angefertigt, bei denen das in *TcAAH* koordinierende Aspartat zu einem Histidin mutiert wurde. Bei der Variante D183H ohne Leu1-C-Terminus war ein leichtes Wachstum auf Gallobenzophenon zu verzeichnen. Die Variante mit Leu1-C-Terminus war hingegen nicht lebensfähig. Hier scheinen die 30 zusätzlichen Aminosäuren eher eine inhibierende Rolle auf den Fe/S-Cluster-Einbau innezuhaben.

Zur Verifizierung der Komplementierung des Wachstumphänotyps von $\Delta apd1$ durch *TcAAH* D183H wurden ESR-Spektren von Zellextraktproben gemessen, in denen *TcAAH* WT resp. D183H in hoher Kopiezahl exprimiert wurden.

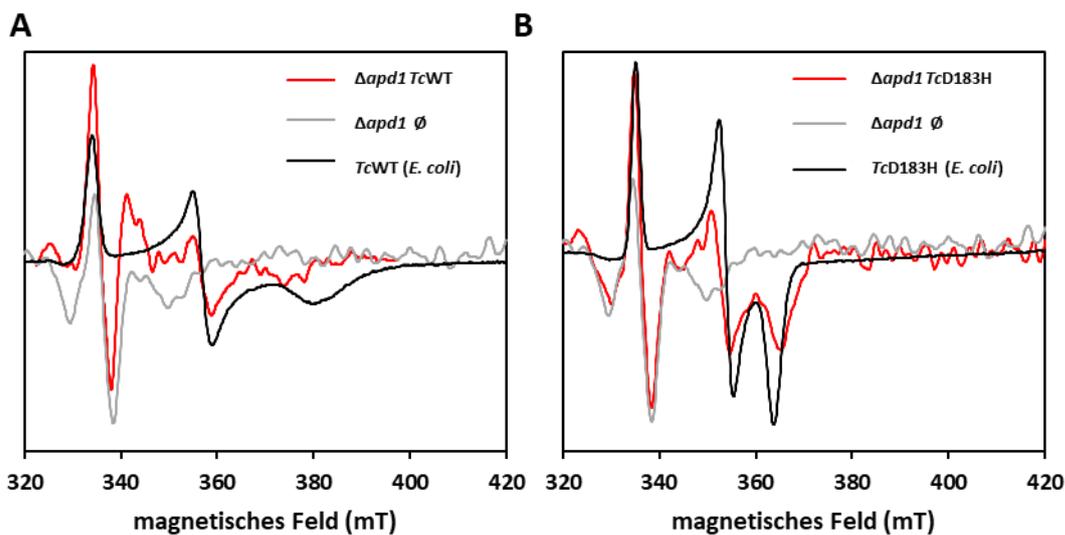


Abbildung 4-76: ESR-Spektren von in *S. cerevisiae* exprimierten *TcAAH* WT und D183H. Rot: Zellextrakt mit exprimierter *TcAAH*-Variante, grau: Zellextrakt mit Leerplasmid (\emptyset), schwarz: gereinigtes Protein aus *E. coli*. **A:** Vergleich der ESR-Spektren der WT-Spezies. **B:** Vergleich der ESR-Spektren der D183H-Mutante. Die ESR-Spektren wurden bei 77 K aufgenommen.

Die Abbildungen 4-76 **A** und **B** zeigen, dass in beiden Spezies ein [2Fe-2S]-Cluster eingebaut wurde. Vergleicht man die Spektren der Zellextraktproben mit jenen von gereinigtem Protein exprimiert in *E. coli*, ist für WT *TcAAH* und dessen D183H-Mutante ein schwaches Spektrum zu detektieren. Wie schon bei den ESR-Spektren der gereinigten Proteine sind auch in den Spektren der Zellextraktproben klare Unterschiede, die für einen Wechsel der Clusterliganden sprechen, zu verzeichnen. Da hier in beiden Fällen ein Cluster eingebaut wurde, ist die Art des Liganden und die damit verbundene Änderung der Eigenschaften essenziell für die Übernahme der Funktion von Apd1 aus *S. cerevisiae*. Durch die Inkorporierung eines [2Fe-2S]-Clusters in *TcAAH* D183H bei Expression in *S. cerevisiae* und die daraus resultierende Resistenz von $\Delta apd1$ gegen 50 μ M Gallobenzophenon eröffnet sich die Möglichkeit auf diesem Weg die potenziellen Cysteinclusterliganden des Proteins *in vivo* zu testen. Hierfür wurden die drei potenziell-ligierenden Cysteine sowie das Histidin an Position 179 zu Alaninen, auf jenem Plasmid mutiert, das bereits die D183H Mutation trug. Als Negativkontrolle fungierte die

Ergebnisse

Mutation D183A. Die so generierten Doppelmutations-Plasmide sowie die Kontrollen wurden in $\Delta apd1$ transformiert und auf ihre Resistenz gegenüber 50 μM Gallobenzophenon getestet.

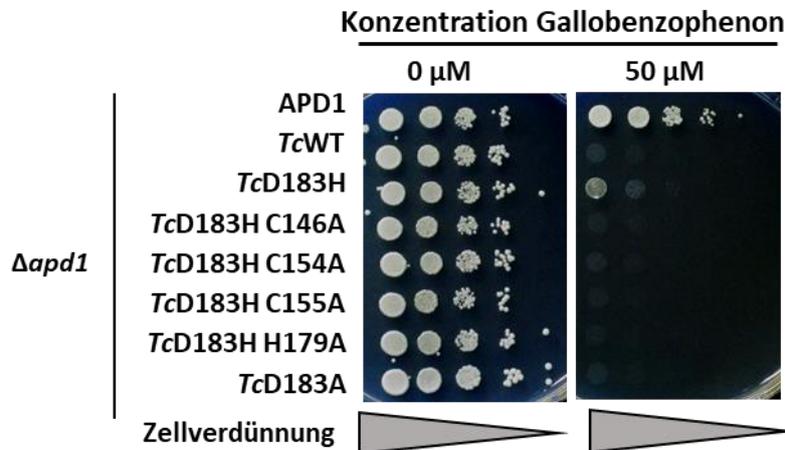


Abbildung 4-77: Tüpfeltest von $\Delta apd1$ transformiert mit Plasmiden, die TcAAH exprimieren in Gegenwart von Gallobenzophenon. $\Delta apd1$ wurde mit einem Leerplasmid oder 426_{FBA}-Plasmiden, die die Gene für Apd1, TcAAH resp. Varianten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in glukose-haltigem SC-Medium wurden auf SC-Agarplatten mit Glukose und Gallobenzophenon, in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C.

Abbildung 4-77 zeigt, dass nur die Mutante D183H, nicht aber eine der Doppelmutanten auf Platten mit Gallobenzophenon lebensfähig war. Bei den Cysteinen an Position 146 und 155 lässt sich dies durch ihre Eigenschaft als Clusterligand erklären. Die D183H/C154A Doppelmutation sollte nach den spektroskopischen Untersuchungen des gereinigten Proteins aus *E. coli* keinen Einfluss auf die Clusterbindung im Protein besitzen. Jedoch erfolgt durch die D183H-Mutante nur eine partielle Rettung und die weitere Mutation an Position 154 könnte zu einer geringfügigen Änderung der Proteinstruktur mit einer Instabilität des Clusters einhergehen.

5 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit sollten unter anderem die Clusterliganden der Proteine Apd1 und Aim32 bestimmt, sowie erste Aussagen über die Funktion getroffen werden. Über die beiden Proteine sind bisher nur spektroskopische Daten nach heterologer Aufreinigung aus *E. coli* vorhanden. Informationen ob diese Proteine *in vivo* einen Cluster inkorporieren und welcher Art dieser ist, liegen nicht vor. Ziel dieser Arbeit war es Informationen über mögliche Funktionen der beiden Proteine *in vivo* zu sammeln und sie sowie eine bakterielle Variante von Apd1 mit einer alternativen Clusterkoordination spektroskopisch zu charakterisieren.

5.1 Besitzen die Deletionsstämme einen Phänotyp, der auch durch eine Plasmidkopie des Gens kompensiert werden kann?

Die Gene *AIM32* und *APD1* des Organismus *S. cerevisiae* sind unter Standardlaborbedingungen nicht essenziell. In den letzten Jahren wurden verschiedene Phänotypisierungsexperimente unternommen, um äußere Einflüsse, die eine Veränderung im Wachstum von den jeweiligen Deletionsmutanten zu WT erreichen, zu identifizieren. Entian *et al.* veröffentlichten Forschungsergebnisse über die Phänotypisierung von 150 Deletionsmutanten von *S. cerevisiae*. Im Zuge der Untersuchungen stellten sich 20 % der untersuchten Gene unter bestimmten Bedingungen als essenziell heraus. Die lebensfähigen Mutanten wurden auf ihr Verhalten unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht, eine dieser Bedingungen stellte die Anwesenheit von Kupfer im Wachstumsmedium dar. In diesen Studien wurden 121 Mutanten auf ihr Wachstumsverhalten in Gegenwart unterschiedlichen Kupferkonzentrationen im Bereich von 0-0,4 mM CuSO₄ getestet. Ergebnis dieser Untersuchung war, dass zehn Mutanten eine erhöhte Sensitivität und sechs eine erhöhte Resistenz im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Ein Stamm, der verringertes Wachstum unter diesen Bedingungen im Vergleich zu Wildtypzellen zeigte, war Δ *apd1*. Im Jahre 2008 veröffentlichten Jin *et al.* ähnliche Studien. Sie ermittelten die Inhibierung des Wachstums verschiedener Deletionsmutanten, die der Exposition verschiedener Metalle ausgesetzt waren. Nach Ermittlung des EC₅₀-Wertes für Wildtyp bei 7 mM CuSO₄, war die Viabilität von Δ *apd1* bei dieser Kupferionenkonzentration um das 2,4-fache geringer. Auch im Zuge dieser Arbeit wurde versucht diesen bereits publizierten, inhibierenden Effekt des Metalls auf das Wachstum von Δ *apd1* zu nutzen. Es konnte jedoch keine geeignete Konzentration an Kupferionen festgelegt werden, innerhalb derer die Viabilität von WT-Zellen nicht vermindert war, aber jene von Δ *apd1*-Zellen. Durch die Änderung weiterer Parameter der Wachstumsbedingungen wie der Zusatz von dem Kupfer(II)-Chelator Elesclomol oder die zusätzliche Deletion des *HIS3*-Gens, wurde die Sensitivität des WT gegenüber Kupfer so stark gesteigert, dass ein zusätzliche Wachstumsinhibition durch die Deletion von *APD1* nicht zu beobachten gewesen wäre. Diese Experimente zeigen, dass Daten aus

Hochdurchsatzstudien nicht immer in einem spezifischen Experiment repliziert werden können. Es steht die Frage im Raum, ob das Wachstumsdefizit von $\Delta apd1$ in den Experimenten von Entian *et al.* resp. Lin *et al.* alleinig auf die Deletion des Gens zurückzuführen ist. Dies hätte damals durch ein Kontrollexperiment, durchgeführt unter identischen Bedingungen mit $\Delta apd1$ transformiert mit einer Plasmidkopie des Zielgens, verifiziert werden müssen.

Durch die Nutzung der Informationen der chemogenomischen Datenbank von Lee *et al.* (2014), mit weiteren Modifizierungen für $\Delta aim32$, konnten für die Deletionsstämme $\Delta apd1$ und $\Delta aim32$ geeignete Wachstumsbedingungen zur Identifizierung der Clusterliganden *in vivo* generiert werden. Für $\Delta apd1$ stellte das Wachstum in Gallobenzophenon-haltigem Medium in einem Konzentrationsbereich ab 50 μM letale Bedingungen dar. Für $\Delta aim32$ konnten diese Bedingungen durch die zusätzliche Deletion von *SOD2* geschaffen werden. Durch diese Experimente war es auch möglich die Spezifität der Deletion des Zielgens auf den letalen Effekt zu belegen. Unter den durchgeführten Wachstumsbedingungen konnte der letale Effekt durch Transformation einer Kopie des Gens auf einem Vektor wieder behoben werden. Um physiologische Bedingungen zu gewährleisten, wurde unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert. Diese Kompensation war für die beiden Deletionsstämme durch Rettung einer jeweiligen Genkopie möglich. Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber Hochdurchsatz-Experimenten dar. In Abbildung 5-1 sind die Strukturen der fünf deutlichsten Treffer des Screens in abnehmender Reihenfolge für $\Delta apd1$ gezeigt.

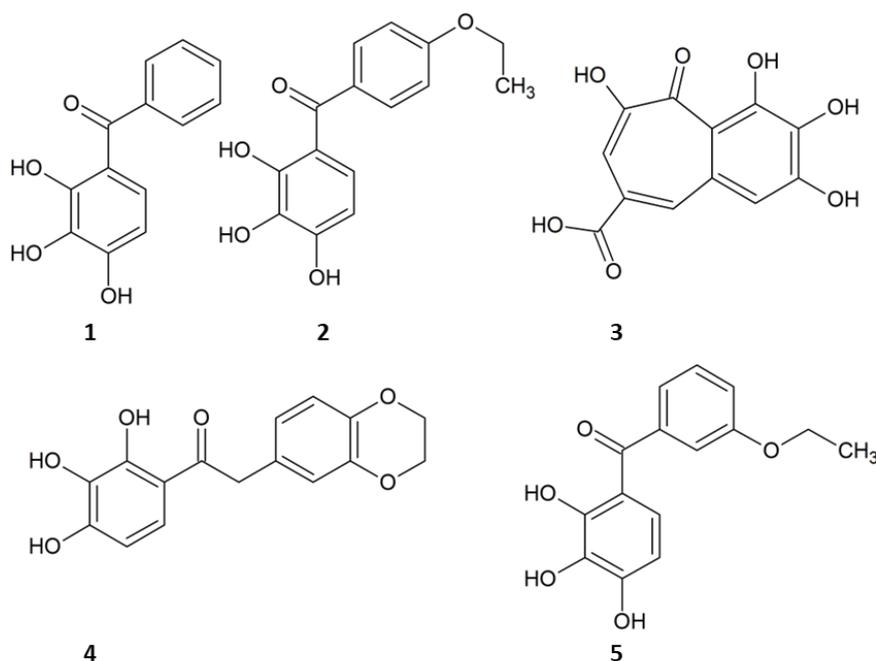


Abbildung 5-1: Strukturformeln der 5 deutlichsten Treffer des chemogenomischen Screens für $\Delta apd1$. 1: Gallobenzophenon, 2: 2,3,4-Trihydroxy- 4'-ethoxybenzophenon, 3: Purpurogallin-4-Carbonsäure, 4: 2-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-1-(2,3,4-Trihydroxyphenyl)ethanon, 5: (3-Ethoxyphenyl)-(2,3,4-trihydroxyphenyl)methanon.

Es ist direkt ersichtlich, dass Pyrogallol als gemeinsames Strukturelement vorliegt. Im Zuge dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass der Phänotyp wahrscheinlich nicht von der Pyrogallol-Gruppe allein ausgelöst wird. Pyrogallol konnte keine Inhibierung auf das Wachstum des Deletionsstammes $\Delta apd1$ im Tüpfeltest hervorrufen (s. Abb. 4-15). Wenn Pyrogallol mit einem cyclischen System derivatisiert ist, ist eine Inhibierung des Wachstums zu beobachten. Die Gruppe kann aromatisch sein wie bei Gallobenzophenon, aber wie Purpurogallin-4-Carbonsäure (3) zeigt, ist das nicht erforderlich. Das der Substituent cyclisch sein muss, konnte in dieser Arbeit mit einem Kontrollexperiment belegt werden. Ist Pyrogallol nur mit einer Säure- oder Estergruppe substituiert, wie in den Verbindungen Gallussäure oder Gallacetophenon (Strukturformel in Abb. 5-2 dargestellt), ist keine Veränderung des Wachstumsverhaltens der Deletionsstämme im Vergleich zu WT zu beobachten, wenn bis zu 200 μM der jeweiligen Substanzen zugegeben werden (s. Abb. 6-3 und Abb. 6-4).

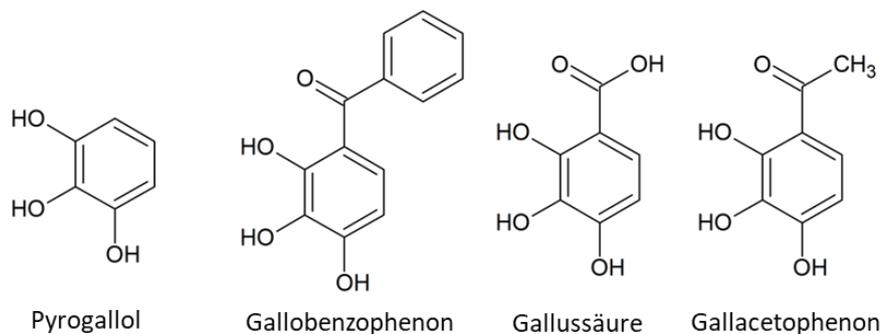


Abbildung 5-2: Strukturformel von Pyrogallol und verschiedener Derivate.

Die Hochdurchsatz-Ergebnisse des chemogenomischen Screens von Lee *et al.* (2014) mit $\Delta aim32$ sind weniger signifikant. Zwar gibt es Scores ungleich 0, jedoch in einer anderen Größenordnung als bei dem Screen für $\Delta apd1$. Der höchste FDS von $\Delta apd1$ liegt mit Gallobenzophenon bei 22 und es gab mehrere Verbindungen mit einem FDS >6, bei $\Delta aim32$ hingegen bei maximal 6 (vgl. Abb. 4-5 & 4-7).

Im Gegensatz zu den letalsten Stoffen im Screen mit $\Delta apd1$, sind bei jenen fünf Stoffen, die die größte Letalität bei $\Delta aim32$ verursachen, keine gemeinsamen Strukturelemente ersichtlich. Die inhibierenden Effekte der chemischen Moleküle auf das Wachstum scheinen somit zufälliger Natur zu sein und lassen sich nicht auf ein bestimmtes Strukturelement herunterbrechen. Bei den Hits 2-5 sind lediglich 5-ringigen Heteroaromaten mit Stickstoff in die Struktur involviert, es sind jedoch Thiazol- als auch Pyrrol-Gruppen beteiligt. In dieser Arbeit konnte kein inhibierender Effekt von Harmaline, der Chemikalie mit dem zweitgrößten inhibierenden Einfluss bei Lee *et al.* (2014), auf das Wachstum von $\Delta aim32$ beobachtet und das Ergebnis der Hochdurchsatzstudie nicht reproduziert werden. Zur Phänotypisierung musste eine zusätzliche Modifikation durch die Deletion eines zweiten Gens herangezogen werden. Die durch die Deletion von *SOD2* generierte Doppeldeletionsmutante $\Delta aim32\Delta sod2$ zeigte

einen starken Wachstumsphänotyp unter dem Einfluss von Pyrogallol und Gallobenzophenon, der durch eine Plasmidkopie von *AIM32* wieder kompensiert werden konnte. Jedoch kam es durch die Deletion der beiden Gene zu einem leichten Wachstumsphänotyp unter Standardlaborbedingungen.

5.2 Strukturelle Aufklärung des Fe/S-Clusters von *Aim32* und *Apd1*

Identifikation der Clusterliganden *in vivo*

Durch die Phänotypisierungsexperimente konnten Bedingungen gefunden werden, die für Deletionsmutanten der Gene von Interesse letal waren, auf WT-Zellen aber keinen, oder einen deutlich geringeren, Einfluss hatten. In beiden Fällen war es auch möglich den Wachstumsphänotyp durch die Transformation eines Plasmids mit einer Kopie des Gens zu kompensieren. Diese Methode wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Clusterliganden der Proteine *Apd1* und *Aim32* zu identifizieren. Potenziell ligierende Aminosäuren des Fe/S-Clusters wurden durch Alanin ersetzt, um die Liganden-Funktion zu eliminieren, ohne eine weitere funktionelle Gruppe einzufügen. Durch Sequenzvergleich von *Apd1* resp. *Aim32* wurden mehrere konservierte Aminosäuren aufgedeckt, die als potenzielle Liganden näher untersucht wurden. In Abbildung 5-3 ist jedes Cystein der beiden Proteine farbig markiert, da diese Aminosäure der häufigste Ligand von Fe/S-Clustern ist. Weiterhin hervorgehoben sind Histidine, die in beiden Proteinen konserviert sind. Die Cysteine an Position 207 und 216 in *Apd1* resp. 213 und 222 in *Aim32* sowie die Histidine an Position 209, 255 und 259 in *Apd1* resp. 215, 249 und 253 sind in den meisten Pilzen konserviert.

```

Saccar_Apd1      MAFLNIFKQKRGDEASQLSAKGRREISQSIKI[KSDDAANEHS[SGD[KTEIEEGEQAF 60
Saccar_Aim32    --MLRITVKTLQQRASFHHS--FKHISVPLDHLTRAQNDQTN[CYCQEINARLPSKTDPLDP 56
                :*. *  :.  :. **  :   :. **  .   : : : :  :.  *  .   : :  :  .

Saccar_Apd1      KLKIEHETPLLNS---SKTPKIHVVPTSQIDWQH--DA[LEDPKSVQYKISQW[DKNSA 115
Saccar_Aim32    HIKLP[HRTPNYNKHVLLSPGDRFAQP-WKVAVNN[LDLNTNRPYNAISKLRSHLGGSPG 115
                :*: * **  *.   : *  :*. *  : : * **  * :  : * ..  * : . . . .

Saccar_Apd1      KFSNVGTGKTLN[AVSSLPKDIMDIDVMRGTKNNVLILPYFIWLNDLRSDDVEATLDGLV 175
Saccar_Aim32    I LINAVHLQNEFI PRPKQHDEWLYFFVIPDMKLYVIKETDIEEFASFLEDEGAIQAPKLSF 175
                : * .   : .   . . .   : : : : * : . *  * : . :  : : . . . . : . .

Saccar_Apd1      PDLLDENISREKLL[ETFPNVAVARER-----AFVFI[SH[TTTRDKR[GITAPYLKQVFD 229
Saccar_Aim32    QDYLSGKAKASQQVHEVHHRKLRFRQGETFLRDWNLV[CHYKRDAR[GEMGPDIIAAFQ- 234
                * *. : . . : : .   : : * :   : : : * . * **  * *  . * :  . * :

Saccar_Apd1      KLQEHGLYRDNSDYRAEGVKIAFVN[VGG[KFAANVQIY-----LRNPNTLIWLGRVT 282
Saccar_Aim32    ---DEKLPENN-----LALISH[IGG[IFAGNVIFYKLFGREKMQNKLDLWFGKVY 283
                : . * : : * .   : : : : * : * * * * * * * * * * * * * * * *

Saccar_Apd1      PTIVPSIVEHLIVPEEPTLPPPEKVR[IKKYQSW 316
Saccar_Aim32    PHNLKLL[ENLENGKI IDEMYRGGISMN----- 311
                * : : * * :   :   :   :

```

Abbildung 5-3: Sequenzvergleich von *S. cerevisiae* *Apd1* und *Aim32*. Hervorgehoben sind alle Cysteine und in beiden Proteinen konservierte Histidine.

Fe/S-Cluster sind als Co-Faktor häufig an der Funktionsausübung von Proteinen beteiligt. Dieser Effekt konnte sich zur Überprüfung der Relevanz der Aminosäuren für den Clustereinbau in beiden Proteinen anhand von Tüpfeltests zu Nutze gemacht werden. Unter letalen Bedingungen für die jeweiligen Deletionsstämme konnte gezeigt werden, dass die Mutation der Clusterliganden von Plasmid-kordierenden Aim32 und Apd1 zur Inviabilität führt. C207, C216, H555 und H259 wurden für Apd1 resp. C213, C222, H249 und H253 für Aim32 *in vivo* als Clusterliganden belegt.

Vergleich der spektroskopischen Daten von Aim32 mit Apd1 und Referenzproteinen

Aim32 und Apd1 teilen sich als einzige Proteine in *S. cerevisiae* das Cluster Bindemotiv HxGGH. Die Liganden eines [2Fe-2S]-Clusters haben großen Einfluss auf die g -Werte des ESR-Spektrums. Aus diesem Grund werden die g -Werte des ESR-Spektrums von mit Natriumdithionit reduziertem Aim32 und Varianten der ligierenden Histidine in Tabelle 5-1 mit jenen von Apd1, dessen Varianten, sowie mit g -Werten von Proteinen mit vergleichbarer Clusterkoordination verglichen. Die g -Werte von WT Aim32 sind sehr ähnlich zu jenen von Apd1 bzw. jenen des Rieske Proteins aus *T. thermophilus*. Die g -Werte von Aim32 und Apd1 sind fast identisch, was mit dem einzigartigen Clusterbindemotif im Konsens steht. Somit sticht der Unterschied zum Rieske-Protein heraus, der durch die unterschiedliche Anordnung der Clusterliganden innerhalb der Proteinsequenz oder der räumlichen Position der Imidazol-Ringe seinen Ursprung haben könnte. Durch Änderung der g -Werte bei Mutation von Histidin zu Cystein ist die Änderung der Clusterkoordination experimentell belegt. Wird ein Histidin zu Cystein mutiert, ergeben sich g -Werte ähnlich zu den Einzelmutanten von Apd1 und den Referenzproteinen MitoNEET und IscR, die beide ein [2Fe-2S]-Cluster koordiniert mit drei Cysteinen und einem Histidin besitzen. Bei Mutation beider ligierenden Histidine zu Cysteinen werden g -Werte beobachtet, die jenen von TLF aus *A. aeolicus*, wo vier Cysteine als Clusterliganden fungieren, gleichen.

Tabelle 5-1: Vergleich der g -Werte von Aim32 mit Referenzproteinen

| | Protein | Organismus | g_x | g_y | g_z |
|----------|---|------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Aim32 | <i>S. cerevisiae</i> | 2,012 | 1,902 | 1,860 |
| | Apd1 (Stegmaier <i>et al.</i> , 2019) | <i>S. cerevisiae</i> | 2,009 | 1,907 | 1,862 |
| 2Cys2His | Rieske (Fee <i>et al.</i> , 1984) | <i>T. thermophilus</i> | 2,02 | 1,90 | 1,80 |
| | Aim32 H249C | <i>S. cerevisiae</i> | 1,999 | 1,924 | 1,891 |
| | Aim32 H253C | <i>S. cerevisiae</i> | 2,006 | 1,929 | 1,897 |
| 3Cys1His | Apd1 H255C (s. Apd1) | <i>S. cerevisiae</i> | 2,000 | 1,935 | 1,879 |
| | Apd1 H259C (s. Apd1) | <i>S. cerevisiae</i> | 2,003 | 1,928 | 1,904 |
| | mitoNEET (Dicus <i>et al.</i> , 2010) | <i>H. sapiens</i> | 2,007 | 1,937 | 1,897 |
| | IscR (Fleischhacker <i>et al.</i> , 2012) | <i>E. coli</i> | 1,99 | 1,93 | 1,88 |
| | Aim32 H249C/H253C | <i>S. cerevisiae</i> | 2,005 | 1,950 | 1,916 |
| 4Cys | Apd1 H255C/H259C (s. Apd1) | <i>S. cerevisiae</i> | 2,006 | 1,955 | 1,922 |
| | TLF (Chatelet <i>et al.</i> 1999) | <i>A. aeolicus</i> | 2,006 | 1,950 | 1,918 |

Durch Mößbauerspektroskopie erhobene Daten ist es möglich die identifizierten Liganden den einzelnen Eisenionen des Fe/S-Clusters zuzuordnen. Zwei verschiedene Anordnungsmöglichkeiten sind theoretisch möglich: Die Eisenionen können sich unterscheiden, wenn ein Eisenkern von zwei Cysteinen und der zweite von zwei Histidinen komplexiert wird. Die zweite mögliche Anordnung wäre eine identische Koordination der beiden Eisenionen durch je ein Cystein und ein Histidin. Durch die unterschiedlichen Parameter der beiden Komponenten des Mößbauerspektrums (vgl. Kapitel 4.7.2) lässt sich auf eine divergente Koordination der beiden Eisenkerne schließen. Ein Fe^{3+} bindet vier Schwefelliganden, zwei von den verbrückenden S^{2-} -Liganden und zwei von Cysteinen (C123 und C222), wohingegen das zweite von den verbrückenden S^{2-} -Ionen und zwei Histidinen (His249 und His253) koordiniert wird (siehe Abb. 4-50).

5.3 Phylogenetische Analyse der Apd1/Aim32 Protein Familie und Hinweise auf mögliche Funktionen

Im phylogenetischen Vergleich zeigten die Sequenzen von Apd1 und Aim32 Ähnlichkeiten zu einer Klasse von Proteinen, die als Pfam06999 dotiert sind (Abb. 5-4).

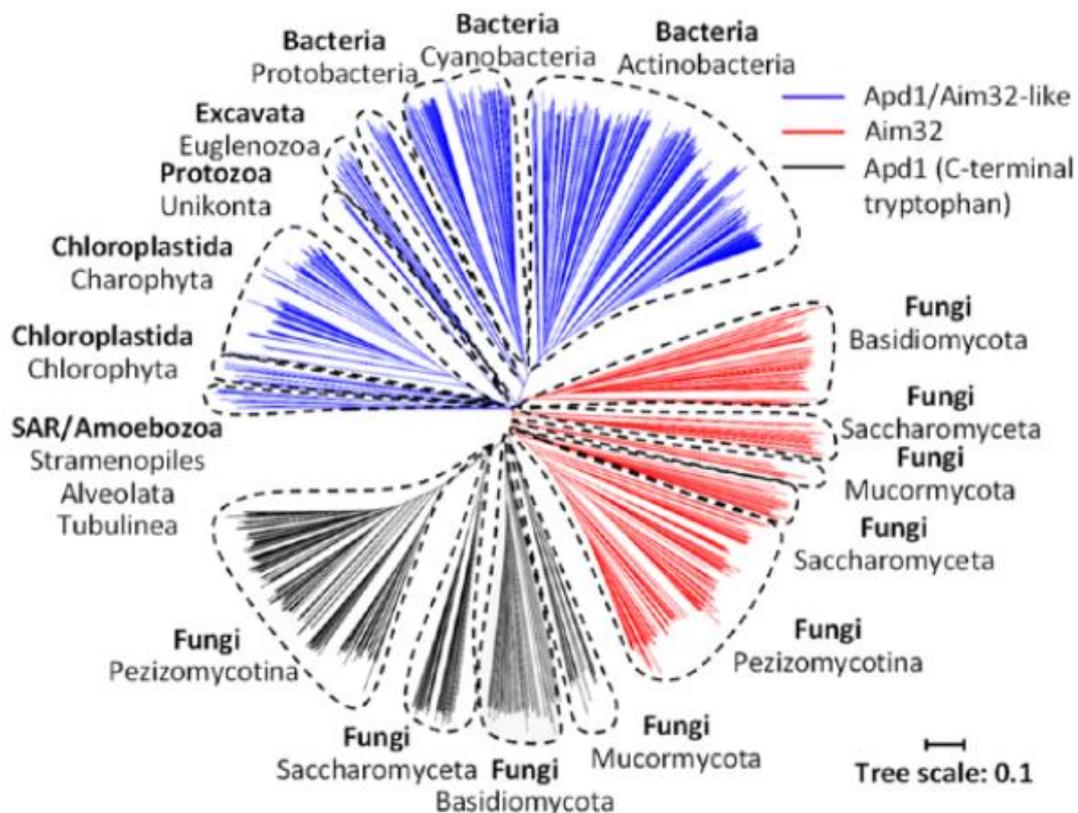


Abbildung 5-4: Phylogenetischer Baum von Pfam06999 mit Apd1/Aim32 Homologen (Stegmaier *et al.*, 2019).

In der Veröffentlichung von Stegmaier *et al.* (2019) wurden insgesamt 1334 Proteinsequenzen in ihrer vollen Länge analysiert und nicht nur Fragmente wie den

Cluster-bindenden Bereich mit einbezogen. Durch die Analyse lassen sich die Blätter des phylogenetischen Baums verschiedenen taxonomische Gruppen zuordnen. Dabei stricht heraus, dass in den Domänen der Pilze und Pflanzen jeweils zwei oder mehr Aim32/Apd1-Homologe existieren. Jedoch kann hier nur bei den Pilzen eine klare Differenzierung zwischen den jeweiligen Aim32- oder Apd1-Homologen getroffen werden. Diese Einteilung wird durch das konservierte C-terminale Tryptophan von Apd1 erleichtert. In dieser Arbeit und auch in der Literatur wird Aim32 als mitochondriales und Apd1 als cytosolisches Protein beschrieben. Aufgrund dessen, könnte das Vorhandensein von mehr als einem Homolog in einem Organismus eine Lokalisierung in verschiedenen Kompartimenten andeuten. Auch in vielen Prokaryoten wie Cyanobakterien sind Homologe vorhanden.

In der Natur sind Polyphenole häufig in Pflanzen vertreten (Haslam & Cai, 1994; Cheynier *et al.*, 2015). Wird Gallussäure erhitzt, findet eine Decarboxylierung statt und Pyrogallol entsteht (Yoshida & Yamada, 1985). In dieser Arbeit konnte eine Sensitivität von $\Delta apd1$ resp. $\Delta aim32$ gegenüber Pyrogallol resp. einem Pyrogallolderivat festgestellt werden. Von Stegmaier *et al.* wurde die Hypothese gestellt, dass Apd1 und Aim32 eine Rolle im Abbau dieser Klasse von Substanzen innehaben, indem sie deren Reaktion und somit die erhöhte Produktion von Redox-aktiven Intermediaten wie Peroxiden in der Zelle vermindern. Ein Experiment, das dies bekräftigen könnte, ist in Abbildung 6-10 dargestellt.

WT und die Einzeldelentionsmutanten wurden mit 50 μ M Gallobenzophenon bei 30 °C in Gegenwart und unter Ausschluss von Luftsauerstoff inkubiert. WT war in Gegenwart von 50 μ M Gallobenzophenon mit und ohne Luftsauerstoff lebensfähig. Die Einzelmutante $\Delta apd1$ war in Anwesenheit von Luftsauerstoff und Gallobenzophenon hingegen nicht lebensfähig. Findet die Inkubation der Zellen unter Ausschluss von Luftsauerstoff statt, ist $\Delta apd1$ aber in der Lage zu wachsen. Ohne Luftsauerstoff findet keine Reaktion zu Peroxiden statt und somit entsteht kein erhöhter, oxidativer Stress in der Zelle, der zur Letalität führt. Damit ergibt sich der Hinweis, dass die Letalität von $\Delta apd1$ -Zellen in Gegenwart von Gallobenzophenon nicht gegenüber Gallobenzophenon an sich besteht, sondern viel mehr gegen die, bei der Reaktion mit Sauerstoff entstehenden, Reaktionsprodukten wie Radikalen und Peroxiden. Da $\Delta apd1$ keinen Wachstumsphänotyp in Gegenwart von 3 mM H₂O₂ zeigte (Tang *et al.* 2015), kann die Sensitivität als spezifisch angenommen werden.

5.4 Einfluss der CIA-Maschinerie auf die Reifung des Fe/S-Clusters von Apd1

In der Literatur ist bisher nur der [4Fe-4S]-Clustereinbau für cytosolische Proteine eindeutig beschrieben. Es gibt mehrere Veröffentlichungen, die den Einbau in Fe/S-Proteine mittels der CIA-Maschinerie durch den CIA-Targeting-Komplex beschreiben

(Ciofi-Baffoni *et al.*, 2018). In Hefe konnte nachgewiesen werden, dass der [4Fe-4S]-Cluster am Cfd1-Nbp35 Heterotetramer assembliert wird (Netz *et al.*, 2012). Von dort wird der Cluster über einen Transporter zum eigentlichen CIA-Targeting-Komplex transportiert und von diesem auf die eigentlichen Zielproteine übertragen. Dies ist für mehrere Proteine in Hefe und Mensch belegt (Stehling *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2013; Vashisht *et al.*, 2015; Paul & Lill, 2015).

Über die Assemblierung cytosolischer [2Fe-2S]-Proteine ist bisher nur wenig bekannt. Eine Komponente der CIA-Maschinerie, die vor dem Scaffold-Komplex wirkt, ist der Komplex aus Dre2 und Tah18. Dre2 besitzt in Hefe einen [2Fe-2S]- und einen [4Fe-4S]-Cluster, deren Reifung unabhängig von der CIA-Maschinerie eingeleitet wird. Durch den Transport von Elektronen von Tah18 zu Dre2 wird über eine Funktion analog der mitochondrialen Elektronentransportkette bei der Fe/S-Cluster Synthese spekuliert (Netz *et al.*, 2010). Die genaue Funktion der Elektronen ist nicht bekannt, es wurde aber eine beeinträchtigte Reifung des N-terminalen Fe/S-Clusters von Nbp35 beobachtet, wenn Tah18 und Dre2 nicht zu Verfügung standen (Netz *et al.*, 2012). Es gibt zwei Haupthypothesen: Die schwefelhaltige Komponente, die aus den Mitochondrien exportiert wird, wird reduziert oder am Scaffold-Komplex wird die Fusion von [2Fe-2S]-Clustern zu [4Fe-4S]-Clustern erzeugt. Die Quelle derer ist aber bisher unbekannt (Ciofi-Baffoni *et al.*, 2018). Hier könnten extra-mitochondriale ISC-Proteine eine Rolle spielen, von denen einige in geringen Mengen im Cytosol oder Nukleus nachgewiesen werden konnten (Gerber *et al.*, 2005), jedoch ohne einen direkten Zusammenhang zur extramitochondrialen Fe/S-Clustersynthese.

Ein cytosolisches [2Fe-2S]-Protein, das Teil der frühen CIA-Maschinerie, aber dessen Reifung nicht von anderen CIA-Faktoren abhängt, ist Grx3. In Hefe kommen zwei Homologe vor, Grx3 und Grx4. Im Menschen ist hingegen nur GLRX3 vertreten (Li & Outten, 2019). Zwei Grx3 Moleküle bilden einen dimeren Komplex, der in Hefe einen [2Fe-2S]-Cluster bindet. Es besteht eine direkte Interaktion des Komplexes mit dem CIA-Faktor Dre2 und eine Beteiligung an der Reifung der Cluster desselbigen (Mühlenhoff, 2010). Das menschliche Homolog GLRX3 formt auch ein Heterodimer, verbrückt aber zwei [2Fe-2S]-Cluster. Hier konnte sogar eine direkte Übertragung beider Cluster auf CIAPIN1 (in Hefe Dre2) beschrieben werden (Ciofi-Baffoni *et al.*, 2018). Die Quelle des Clusters von Grx3 ist bisher nicht bekannt. Es wird als mögliches Ziel der aus den Mitochondrien exportierten schwefelhaltigen Komponenten diskutiert, jedoch gibt es dazu noch keine Daten. Auch die Cluster Übertragung auf weitere Zielproteine ist zurzeit nicht beschrieben.

In dieser Arbeit konnten Ergebnisse generiert werden, die erste Hinweise auf einen CIA-Maschinerie abhängigen Einbau eines [2Fe-2S]-Clusters darstellen könnten.

Ein cytosolisches [4Fe-4S]-Protein aus *S. cerevisiae*, dessen Clusterinsertion CIA-Maschinerie-abhängig ist, ist Leu1. Es konnte zudem mittels enzymbespezifischer

Aktivitätsmessungen und ^{55}Fe -Einbau eine C-terminale Tryptophan-abhängige Inkorporierung des Clusters dieses Proteins belegt werden (Greth, 2018). Das cytosolische [2Fe-2S]-Protein Apd1 aus *S. cerevisiae* verfügt ebenso über ein C-terminales Tryptophan und könnte durch dieses als eine Art Signalpeptid, analog zu Leu1, mit dem CIA-Targeting-Komplex interagieren. Im Vorfeld wurde innerhalb der Arbeiten zur Dissertation von Carina Greth über die in unserem Arbeitskreis untersuchte „Tryptophan-Hypothese“, unter Zuhilfenahme des in dieser Arbeit etablierten Screens, der Einfluss des C-Terminales Tryptophans von Apd1 unter physiologischen Bedingungen aufgezeigt. Durch Einführung eines Stopp-Kodons auf einer Plasmid-getragenen Kopie von *APD1* wurde das Protein um eine, drei resp. sechs Aminosäuren gekürzt. Die Genexpression stand dabei unter der Kontrolle des endogenen Promotors. So konnte gezeigt werden, dass bei einem Tüpfeltest auf einer Agarplatte, die mit 100 μM Gallobenzophenon versetzt ist, kein Wachstum von Δapd1 , transformiert mit einer dieser gekürzten Gen-Varianten, mehr möglich ist. Die daraus gezogene Schlussfolgerung stellte einen verminderten oder sogar eingestellten Clustereinbau in Apd1 dar. In dieser Arbeit wurden weitere Untersuchungen dies bezüglich unternommen. Um Aufschluss über einen verminderten oder vollständig eingestellten Einbau zu gewinnen, wurde mit einer geringeren Gallobenzophenon Konzentration gearbeitet. Da ab einer Konzentration von 25 μM Gallobenzophenon bereits ein vermindertes Wachstum von Δapd1 zu beobachten ist, wurde der experimentelle Aufbau dementsprechend modifiziert. Dadurch konnte deutlich gemacht werden, dass im Gegensatz zu einer Mutation eines Clusterliganden, die Kürzung des Proteins durch Einsetzen eines Stopp-Kodons an Stelle einer der C-terminalen Aminosäuren nicht zu einer vollkommenen Letalität, sondern nur zu einem verminderten Wachstum des Stammes auf 50 μM resp. 75 μM Gallobenzophenon führt. Dies würde eher auf einen verminderten als einen vollständig eingestellten Einbau des Fe/S-Clusters sprechen. Um den Effekt der Deletion des C-terminalen Tryptophans mit dem Einbau des Fe/S-Clusters direkt in Zusammenhang zu setzen, sollte die ESR-Spektroskopie genutzt werden. Mit dieser spektroskopischen Methode ist es möglich den Einfluss des C-Terminus auf die Reifung direkt anhand eines [2Fe-2S]-Cluster Spektrums und nicht indirekt mittels Tüpfeltest sichtbar zu machen. Zur Detektion des Clusters muss das Detektionsniveau über dem physiologischen liegen, da das Zielprotein nur im geringen Maß in der Zelle vorliegt. Es konnte kein Apd1-verwandtes ESR-Signal im Spektrum von WT-Zellen detektiert werden. Somit wurde mit einem Plasmid mit hoher Kopiezahl und einer Expression unter Kontrolle des starken *FBA1*-Promotors gearbeitet, um ein Überexpressionssystem zu generieren. Jedoch zeigte sich, dass unter Verwendung des für diesen experimentellen Aufbau benötigten Plasmids 426_{FBA}His₈TS_Apd1 kein Effekt bei Deletion des C-terminalen Tryptophans zu beobachten war. Dieses Verhalten bei Überexpression wurde auch schon in früheren Studien bezüglich Nar1 beobachtet. Es wurde in Untersuchungen bezüglich des Einflusses des Tryptophans W491 auf die Inkorporierung von Fe/S-Clustern untersucht. In dieser Studie wurde mit dem starken Promotor *MET25* gearbeitet und es

konnte kein Einfluss auf die Clusterreifung des Tryptophans nachgewiesen werden. In weitergeführten Untersuchungen wurde mit dem natürlichen und einem schwachen Promotor gearbeitet wobei der Einfluss des Expressionsniveaus des Proteins und Abhängigkeit des Tryptophans aufgezeigt wurde (Greth, 2018). Es wurden daher weitere Versuche unternommen mittels ESR-Spektroskopie einen Zusammenhang zwischen dem Fe/S-Clustereinbau in Apd1 und der CIA-Maschinerie herzustellen. In den folgenden Experimenten wurden verschiedene CIA-Faktoren aus der frühen und späten CIA-Maschinerie depletiert um einen möglichen Zusammenhang zur Reifung des [2Fe-2S]-Clusters nachzuweisen. Die sinkende Intensität des ESR-Signals des Proteins Apd1 im Zellextrakt bei verminderter Expression der CIA-Faktoren Cfd1, Nar1 und Cia1 konnte gezeigt werden. Wurde beispielsweise die Expression von Cia1 über 40 h resp. 64 h depletiert, konnte gleichermaßen eine Abnahme der Intensität des Apd1-spezifischen ESR-Signals verzeichnet werden. Diese Ergebnisse können Indizien auf einen Zusammenhang zwischen der Clusterreifung von Apo-Apd1 und der CIA-Maschinerie darstellen. Während der Wachstumsphase der verschiedenen Gal-Stämme konnte kein signifikant vermindertes Wachstum bei der Überexpression von Apd1 in glukosehaltigem Medium festgestellt werden. Auch die Proteinkonzentration im Gesamtzellextrakt lag bei den untersuchten Stämmen in einem ähnlichen Bereich. Jedoch ist im Western-Blot bei gleicher Gesamtproteinkonzentration eine verminderte Intensität der Apd1-spezifischen Bande zu beobachten. Dies könnte durch einen vermehrten Abbau der sehr großen Menge von Holo-Apd1 in der Zelle begründet werden. Um die Ergebnisse zu überprüfen, muss eine Möglichkeit geschaffen werden den Clustereinbau von Apd1 unter endogenen Voraussetzungen nachzuvollziehen. Eine Möglichkeit würde hier eine Untersuchung analog den chemogenomischen Wachstumsmessungen darstellen. Wenn das Wachstum eines CIA-Stamms, der unter der Kontrolle des Gal1-10-Promotors steht, unter dem Einfluss von Glukose und Gallobenzophenon vermindert ist gegenüber dem Wachstum unter Galaktose und Gallobenzophenon, könnte dies für einen verminderten Einbau des Fe/S-Clusters in Apd1 sprechen, da dieses essenziell für das Wachstum in Gegenwart einer gewissen Konzentration der Chemikalie ist. Da jedoch durch die Regulation von CIA-Faktoren die Reifung der cytosolischen Fe/S-Proteine generell inhibiert wird, ist ein kollektiver Effekt auf das Zellwachstum durch Gallobenzophenon möglich. Hier bietet der Nachweis mittels ⁵⁵Fe einen entschiedenen Vorteil. Durch Immunpräzipitation von Apd1 nach Inkubation von einem reguliertem CIA-Stamm mit ⁵⁵Fe, könnte dieser spezifische Nachweis erbracht werden, wenn die Nachweisgrenze von Apd1 unter physiologischen Bedingungen gegeben ist.

5.5 Charakterisierung des Apd1/Aim32 Homologs aus *T. curvata*

Beim Sequenzvergleich des in vielen Organismen hochkonservierten HXGGH-Bindemotivs stachen mehrere bakterielle Apd1/Aim32-Homologe heraus, bei denen anstelle des zweiten Histidins ein Aspartat im Bindemotiv auftritt. Auch diese

Aminosäure ist in der Lage als Ligand eines Fe/S-Clusters zu fungieren, wie im Fnr-Regulator aus *Bacillus subtilis* (Gruner *et al.*, 2011). In dem thermophilen Bakterium *T. curvata* konnte ein Homolog zu Apd1/Aim32 mit alternativen Fe/S-Cluster Liganden identifiziert werden (*TcAAH*).

Zur Isolierung dieses Proteins wurden im Zuge dieser Arbeit verschiedene Aufreinigungsmethoden nach heterologer Genexpression herangezogen. Die klassische Aufreinigung mittels eines Affinitäts-Tags hat den großen Vorteil, dass das Protein von Interesse durch einen einzigen Aufreinigungsschritt in hoher Reinheit isoliert werden kann. Es wurden verschiedene Tags zur Aufreinigung in Betracht gezogen und auch zur Anwendung gebracht. Da die Aufreinigung mittels His- oder Strep-Tag einfache und effektive Methoden darstellen, wurden mit diesen Isolierungsmethoden gestartet. Im weiteren Verlauf ergaben sich durch die Aufreinigung mit Tag jedoch einige Nachteile, wodurch weitere Aufreinigungen mittels Heparinsäule ohne Tag durchgeführt wurden.

Wurde *TcAAH* mittels His-Tag aufgereinigt, wies das Proteineluat eine tiefbraune Farbe auf. Bei der Aufreinigung mit Strep-Tag oder ohne Tag war die Färbung hingegen rötlicher. Beim Vergleich der UV/Vis-Spektren der Eluate ist ein unterschiedlicher Verlauf zu beobachten. Wurde das Protein ohne Tag aufgereinigt ist im Bereich von 450 nm ein ausgeprägtes, scharfes Maximum zu beobachten. Bei der Aufreinigung mittels His-Tag ist dieses, für [2Fe-2S]-Proteine typische Maximum, auch zu beobachten. Bei dieser Variante ist es jedoch breiter und erstreckt sich von 400–450 nm. Bei der Variante mit Strep-Tag liegt das Maximum bei ca. 420 nm (Abb. 5-5).

Es wurden des Weiteren Mößbauerspektren der Protein-Varianten mit His-Tag (Abb. 4-59) und ohne Tag (Abb. 4-73 A) aufgenommen. Betrachtet man das Spektrum der Variante mit His-Tag ist ersichtlich, dass das Spektrum aus vier Einzelkomponenten besteht. Es kann daher angenommen werden, dass neben den Eisenionen, die dem [2Fe-2S]-Cluster des Proteins zuzuordnen sind, noch weitere Eisenspezies mit isoliert wurden. Das Spektrum von *TcAAH* ohne Tag lässt sich im Gegensatz dazu mit 2 verschiedenen Komponenten darstellen, deren Mößbauerparameter die Koordination der zwei unterschiedlichen Eisenionen widerspiegeln, wobei sich jene eines Fe³⁺-Ions bei pH-Verschiebung ändern. Diese Ergebnisse würden auch in Einklang mit dem unterschiedlichen Verlauf der UV/Vis-Spektren der verschiedenen Eluate stehen. Aus diesem Grund wurden weitere Experimente zur abschließenden Identifikation der Clusterliganden mittels ESR- und UV/Vis-Spektroskopie mit der Proteinvariante ohne Tag durchgeführt.

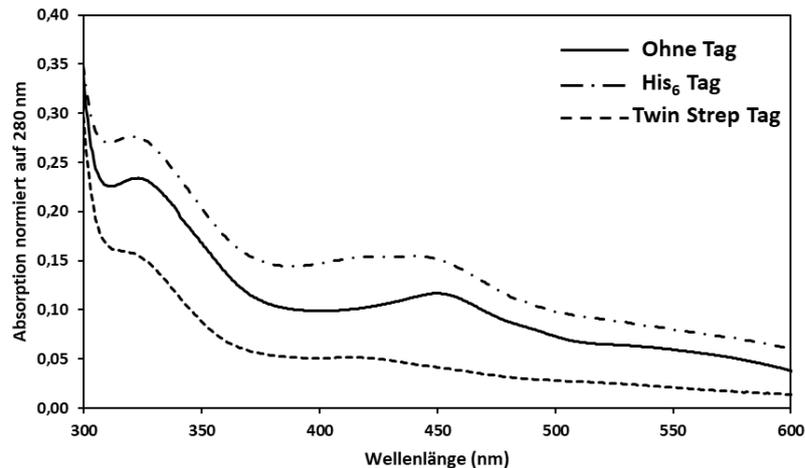


Abbildung 5-5: Spektroskopischer Vergleich von TcAAH nach verschiedenen Aufreinigungsmethoden. Vergleich der UV/Vis-Spektren von TcAAH nach verschiedenen Aufreinigungsmethoden. Normiert auf die Absorption bei 280 nm.

Transfer des Clustereinbaus von TcAAH in *S. cerevisiae*

In einem Teil dieser Arbeit wurde versucht durch die Expression von TcAAH in $\Delta apd1$ eine Kompensation des Wachstumsphänotyps des Stammes in Gegenwart von Gallobenzophenon zu erreichen. Um einen Zusammenhang zur CIA-Maschinerie herzustellen, wurde am Ende des Gens der Leu1 C-Terminus mit C-terminalen Tryptophan fusioniert. Neben der WT-Variante wurde auch noch eine Variante angefertigt, in der durch Mutation des Aspartats an Position 183 in ein Histidin ein Fe/S-Clustermotiv analog zu Apd1 geschaffen wurde. Es konnte jedoch nur ein Wachstum der Histidin-Mutante ohne fusionierten Leu1 C-Terminus beobachtet werden. Dies würde dafürsprechen, dass das C-terminale Tryptophan am Ende des Proteinkonstruktes in diesem Fall den Fe/S-Clustereinbau eher inhibiert als initiiert. Um diese Vermutung zu entkräften, könnte das Experiment mit dem C-Terminus von Apd1 wiederholt werden.

Bestimmung der Struktur von TcAAH

Mittels verschiedener Methoden konnten die Clusterliganden von TcAAH bestimmt werden. Aufgrund der Nachbarschaft war es vor allem für Cys154 und Cys155 anhand des Aminosäuresequenz-Vergleichs nicht möglich den Clusterligand vorherzusagen. Mutation beider Cysteine resultierte in nur einer ESR-aktiven Variante (C154A), jedoch waren die g -Werte dieser Mutante bei den Aufreinigungsversuchen mittels Tags im Vergleich zum WT-Protein verschoben. Ohne Tag war das ESR-Spektrum für die C154A-Variante identisch zu WT-TcAAH.

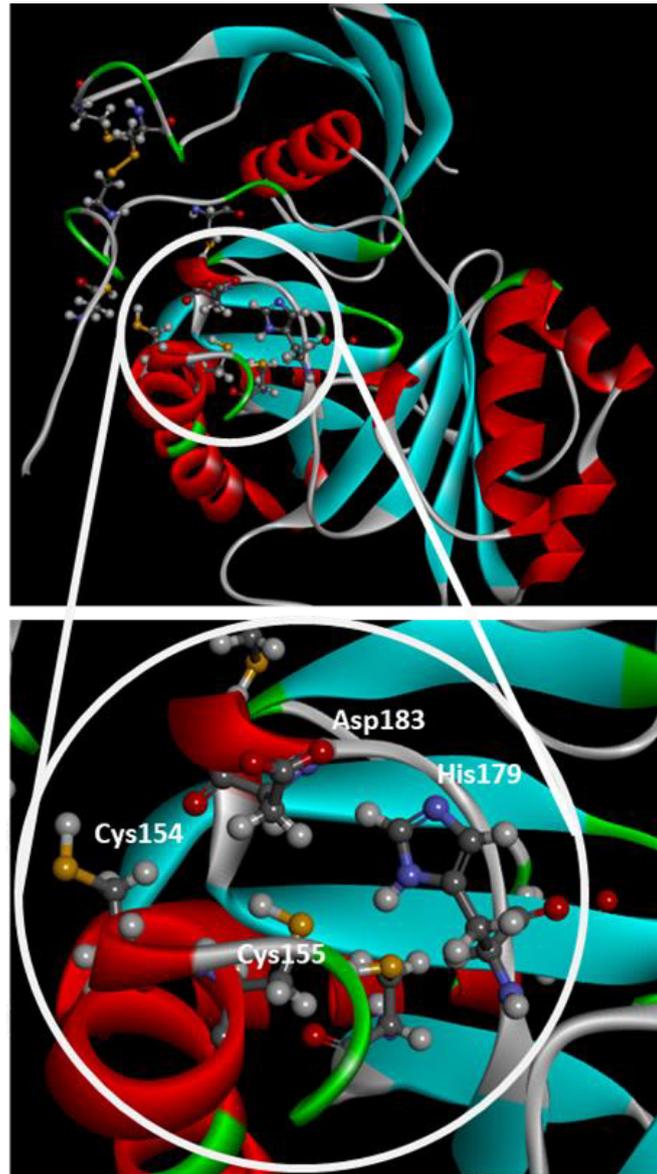


Abbildung 5-6: Struktur von TcAHH visualisiert mittels Discovery Studio. Hervorgehoben sind die Clusterbinden Aminosäuren. Visualisiert mittels Discovery Studie Client, durchgeführt von Dipl Biophys. Lukas Knauer.

Durch die Simulation der Proteinstruktur mittels Alpha Fold (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) wurden die spektroskopischen Ergebnisse bekräftigt. Es wird ersichtlich, dass das ligierende Schwefelatom des Cysteins an Position 154 zu weit entfernt von der Clusterbindetasche, bestehend aus Cys146, Cys155, His179 und Asp183, liegt (Abb. 5.6).

Bisher gibt es noch keine Anhaltspunkte auf die Funktion des Proteins im Organismus *T. curvata*. Eine der Hauptaufgaben von Fe/S-Zentren besteht im Transport von Elektronen. Eine Möglichkeit Informationen zur Funktion informatisch zu erhalten, stellt ein Vergleich der Proteinsequenz mit Sequenzen vergleichbarer Spezies sowie die Analyse des genomischen Kontexts (Operon oder Gen-Cluster) dar. Das Gen, welches

TcAAH kodiert, liegt am 3'-Ende der kodierenden Gene einer FAD-abhängigen Oxidoreduktase und einem Regulator. Diese drei Strukturen bilden einen Gen-Cluster. Vergleicht man mittels JGI Genome Blast die Proteinsequenz mehrerer Mitglieder der *Thermomonosporaceae*, denen *T. curvata* angehört, wird ersichtlich, dass dieses Gen-Cluster konserviert ist (Abb.5-7). Für zwei der gezeigten Genomabschnitte wird die Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase, ein FAD-haltiges Redoxenzym, aufgeführt. Dieses konservierte Cluster könnte einen Hinweis auf die Funktion des Proteins bieten. *TcAAH* könnte als Helferprotein fungieren und beim Elektronentransport beteiligt sein.

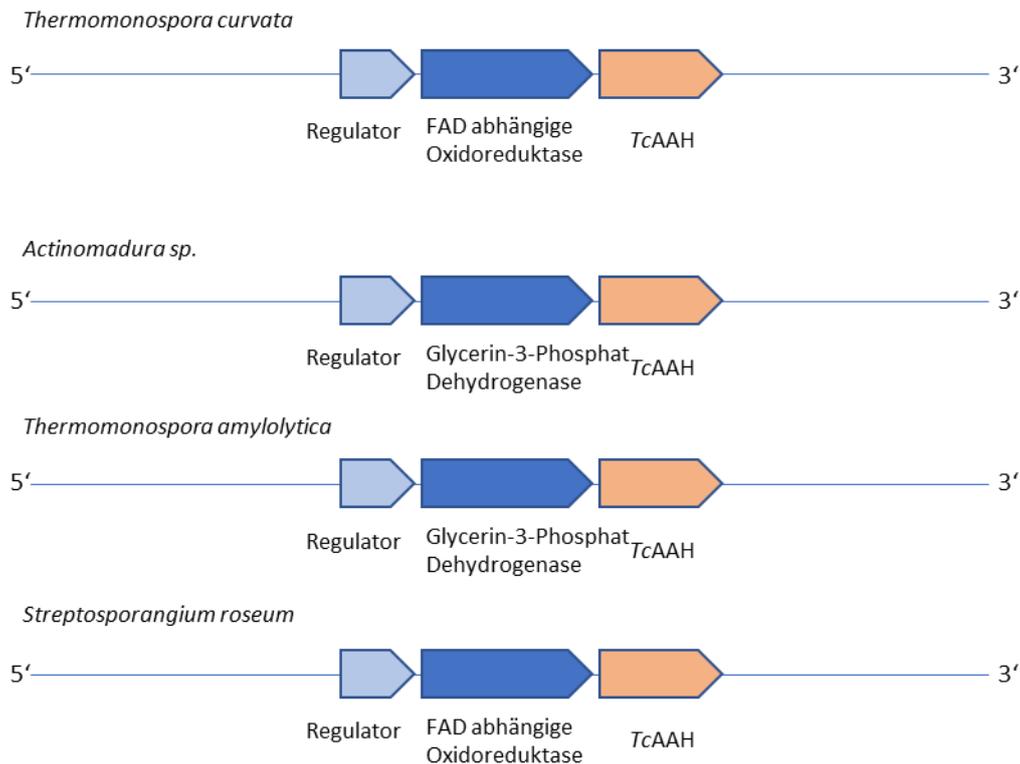


Abbildung 5-7: Gencluster verschiedener Mitglieder der *Thermomonosporaceae*. Dargestellt ist jeweils ein Genabschnitt aus den Organismen *Thermomonospora curvata*, *Actinomadura sp.*, *Thermomonospora amylolytica* und *Streptosporangium roseum*.

Neben dem in dieser Arbeit charakterisierten [2Fe-2S]-Cluster von *TcAAH* ist bis heute nur ein weiteres Exemplar eines Fe/S-Clusters mit drei unterschiedlichen Liganden bekannt. Die Rrf2-Proteinfamilie beinhaltet dimere bakterielle Transkriptionsfaktoren. Einige Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen drei konservierte Cysteine und durch spektroskopische Methoden wurden sie als Fe/S-Cluster tragende Proteine identifiziert (Isabella *et al.*, 2009; Shepard *et al.*, 2011). Bekannte Fe/S-Proteine dieser Klasse sind NsrR, RirR und IscR. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit dieser Proteine unterscheiden sie sich in der Art der eingebauten Fe/S-Cluster. NsrR ligiert einen [4Fe-4S]-Cluster und IscR einen [2Fe-2S]-Cluster. Neben dieser Variabilität der Clusterart sind auch die Liganden variabel, wobei aber drei der vier Liganden normalerweise Cysteine sind. RsrR ist ein [2Fe-2S]-Protein aus dem Organismus *Streptomyces venezuelae*. Der Cluster des Proteins verfügt über die Fähigkeit zwischen den Oxidationsstufen 2+ und 1+ zu wechseln und

dadurch die DNA-Bindeaffinität des Proteins zu kontrollieren (Munnoch *et al.*, 2016). Aufklärung der Kristallstruktur lieferte den Beweis, dass das Protein als Homodimer mit je einem [2Fe-2S]-Cluster pro Monomer vorliegt (Abb. 5-8 A). Dabei wird der Cluster von je zwei Aminosäuren des einen und zwei Aminosäuren des anderen Monomers koordiniert.

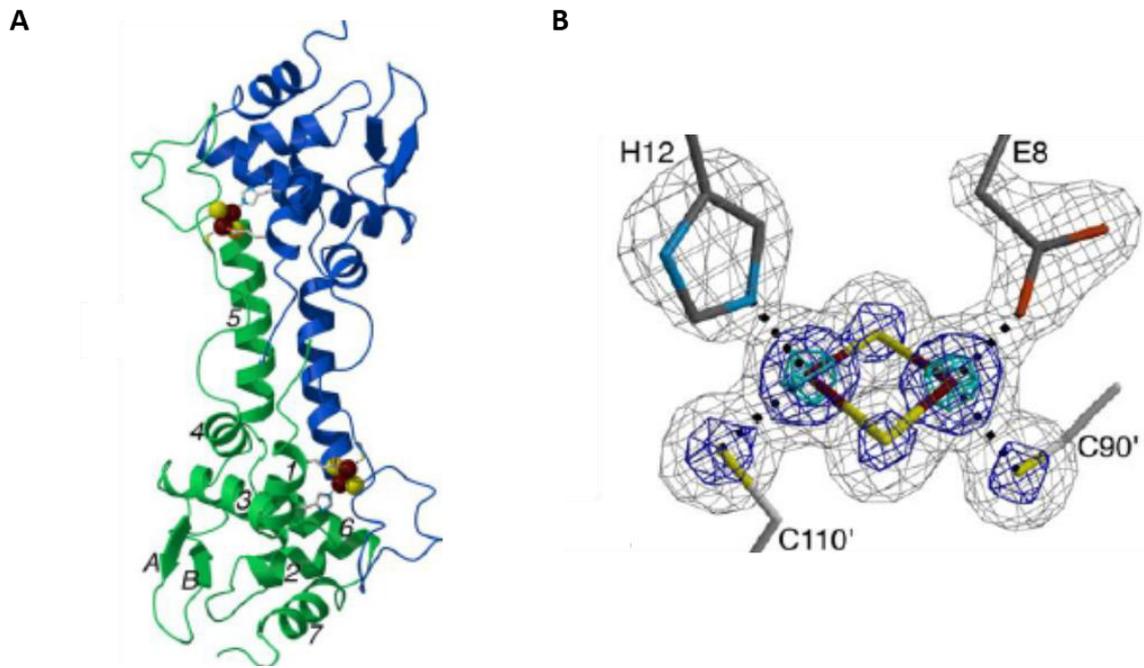


Abbildung 5-8: RsrR verfügt über einen [2Fe-2S]-Cluster mit drei unterschiedlichen Liganden. A:RsrR ist ein Homodimer. **B** Drei verschiedene Liganden koordinieren das Fe/S-Cluster (Volbeda *et al.* 2019).

Das Histidin an Position 12 und das Glutamat an Position 8 der einen sowie zwei Cysteine an Position 90 und 110 der anderen Untereinheit koordinieren je einen [2Fe-2S]-Cluster (Abb. 5-8 B). Ein Eisenion wird dabei von zwei S^{2-} -Ionen und je einem Cystein und einem Histidin resp. Glutamat koordiniert. SvRsrR stellt somit das erste strukturell charakterisierte [2Fe-2S]-Protein dar, dessen Cluster durch drei verschiedene Arten von Liganden gebunden ist (Volbeda *et al.* 2019).

In einer Dissertation von 2017 (Pellicer Martínez, 2017) wurde zudem ein Mößbauerspektrum von RsrR beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt war die Kristallstruktur noch nicht gelöst und es wurden als potenzielle Liganden drei Cysteine und ein Histidin vermutet. Vergleicht man die Parameter der beiden Eisenkerne stellt sich der immer noch einzigartige Charakter des in dieser Arbeit charakterisierten TcAAH heraus (Tab. 5-2).

Tabelle 5-2: Vergleich der Mößbauerparameter von TcAAH und SvRsrR (Pellicer Martínez, 2017)

| Komponente | Parameter | SvRsrR | TcAAH |
|------------|------------------------|--------|-------|
| 1 | δ_1 (mm/s) | 0,285 | 0,23 |
| | ΔE_{Q1} (mm/s) | 0,545 | 0,53 |
| 2 | δ_2 (mm/s) | 0,289 | 0,38 |
| | ΔE_{Q2} (mm/s) | 0,761 | 1,06 |

Wäre der Cluster von TcAAH in gleicher Art koordiniert wie SvRsrR müssten die Mößbauerparameter, vor allem die Isomerieverschiebung, der beiden Komponenten ähnlicher sein. Durch den großen Unterschied ist eine Koordination eines Eisens durch zwei Cysteine und die des zweiten Eisens durch ein Histidin und ein Aspartat in TcAAH anzunehmen. Dies resultiert in einer bisher in der Natur einzigartigen für TcAAH belegten Clusterkoordination.

6 Anhang

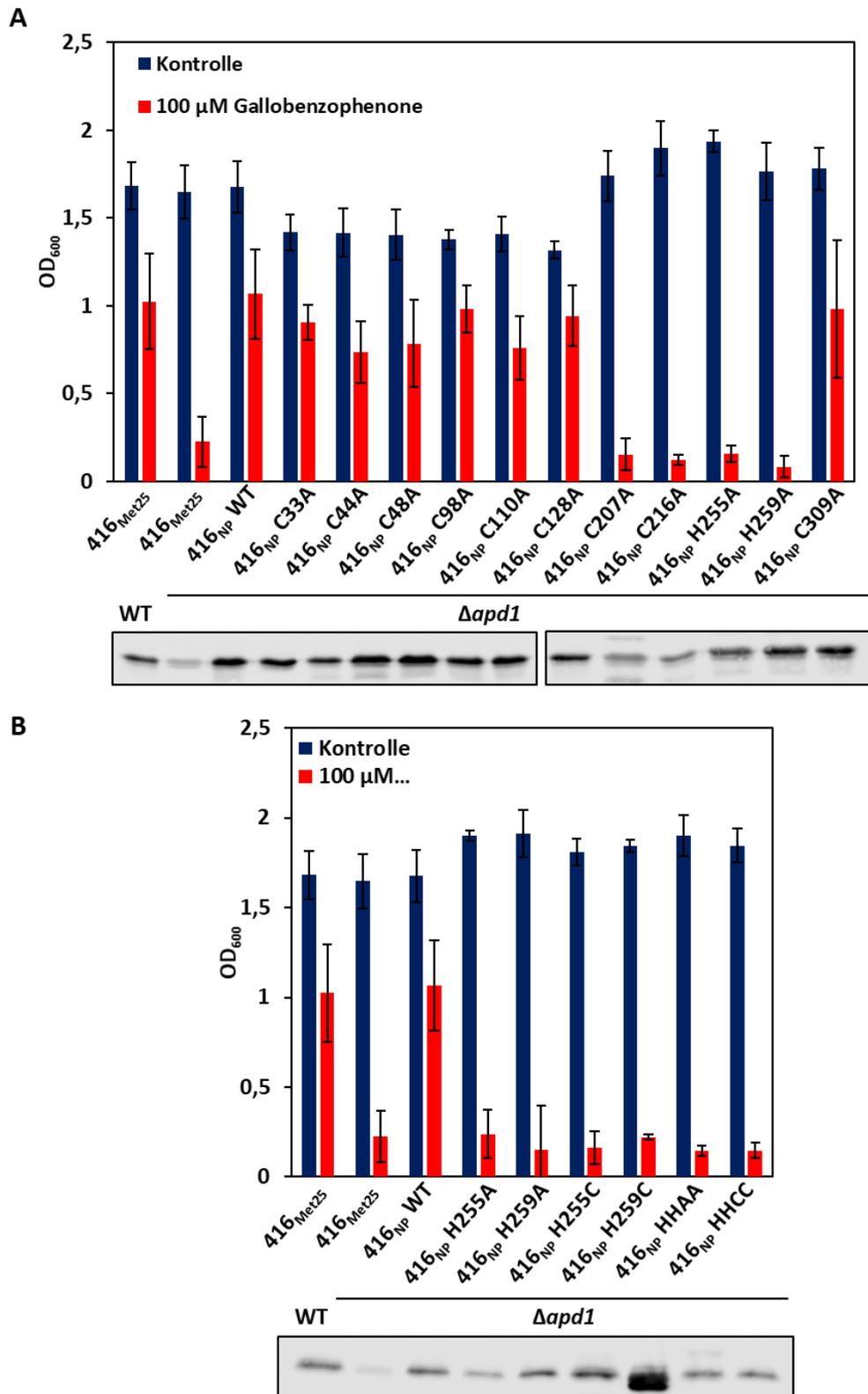


Abbildung 6-1: Wachstum von WT und $\Delta apd1$ in Gegenwart von 100 μM Gallobenzophenon in Flüssigmedium (SC-Glu). WT resp. $\Delta apd1$ wurden einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Nach Vorkultivierung über Nacht wurden die verwendeten Stämme zu OD₆₀₀ = 0,1 verdünnt. Die optische Dichte wurde nach 16 h Wachstum bei 30 °C bestimmt (n = 3).

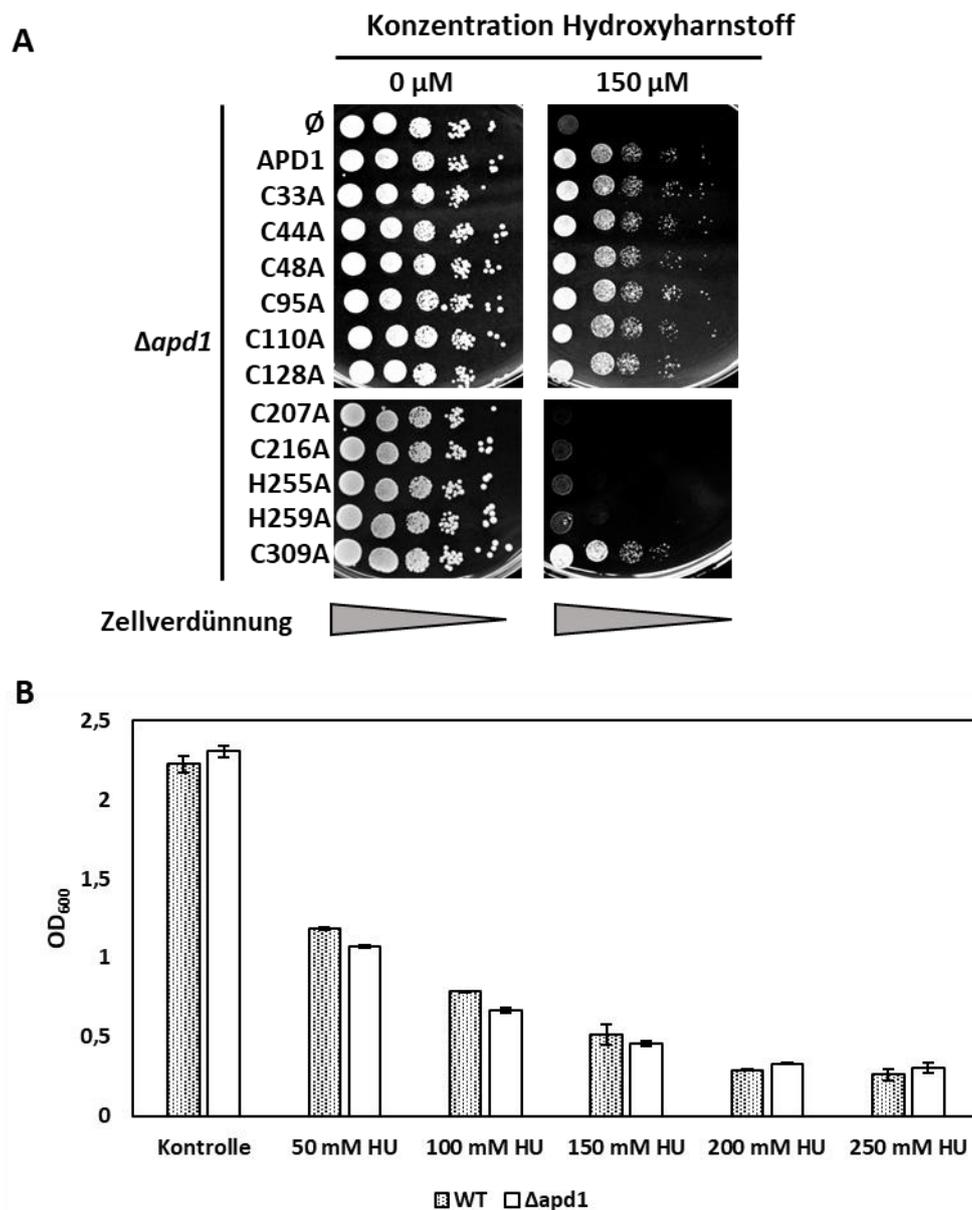


Abbildung 6-2: Wachstum von WT und $\Delta apd1$ in Gegenwart von Hydroxyharnstoff. **A** Wachstum in Gegenwart von 150 mM Hydroxyharnstoff. $\Delta apd1$ wurde mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. dessen Mutanten enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in glukose-haltigem SC-Medium wurden auf SC-Agarplatten mit Glukose und Hydroxyharnstoff in der angegebenen Konzentration getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert. **B** Wachstum von WT und $\Delta apd1$ in Flüssigmedium. WT und $\Delta apd1$ wurden mit einem Leerplasmid transformiert. Flüssigkulturen mit 2 % Glukose und Hydroxyharnstoff (HU) in den angegebenen Konzentrationen wurden inokuliert. Die optische Dichte wurde nach 16 h Wachstum bei 30 °C bestimmt (n=2).

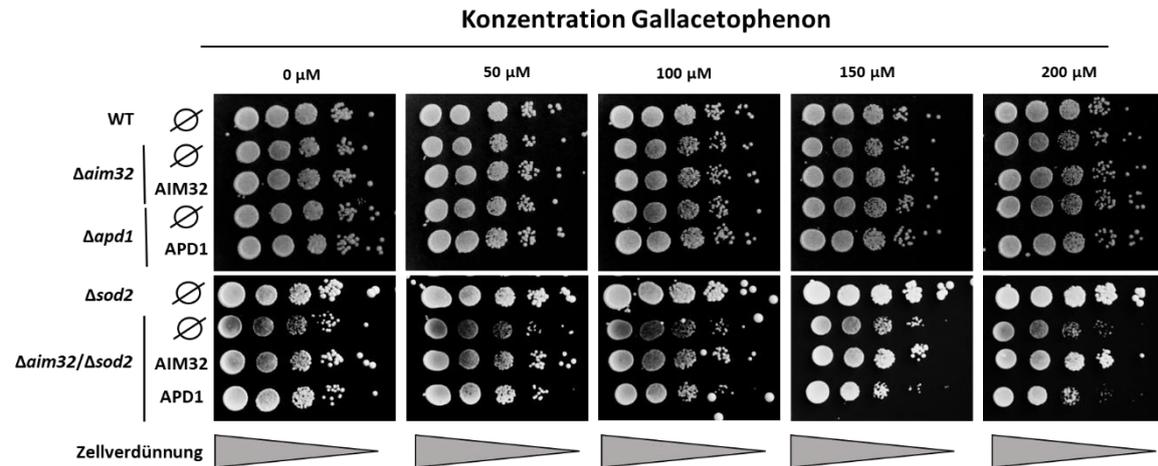


Abbildung 6-3: Tüpfeltest verschiedener Stämme in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Gallacetophenon. WT oder die Deletionsstämme $\Delta apd1$, $\Delta aim32$, $\Delta sod2$ oder $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, die die Gene *APD1* resp. *AIM32* enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Gallacetophenon, in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

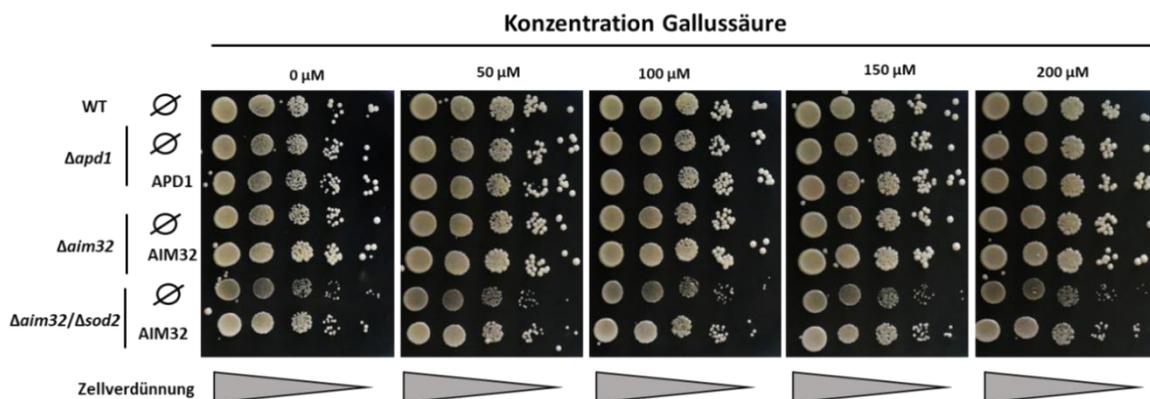


Abbildung 6-4: Tüpfeltest verschiedener Stämme in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Gallussäure. WT oder die Deletionsstämme $\Delta apd1$, $\Delta aim32$, $\Delta sod2$ oder $\Delta aim32\Delta sod2$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, die die Gene *APD1* resp. *AIM32* enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in SC-Glu-Medium wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit Gallussäure in den angegebenen Konzentrationen, getüpfelt. Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C fotografiert.

Anhang

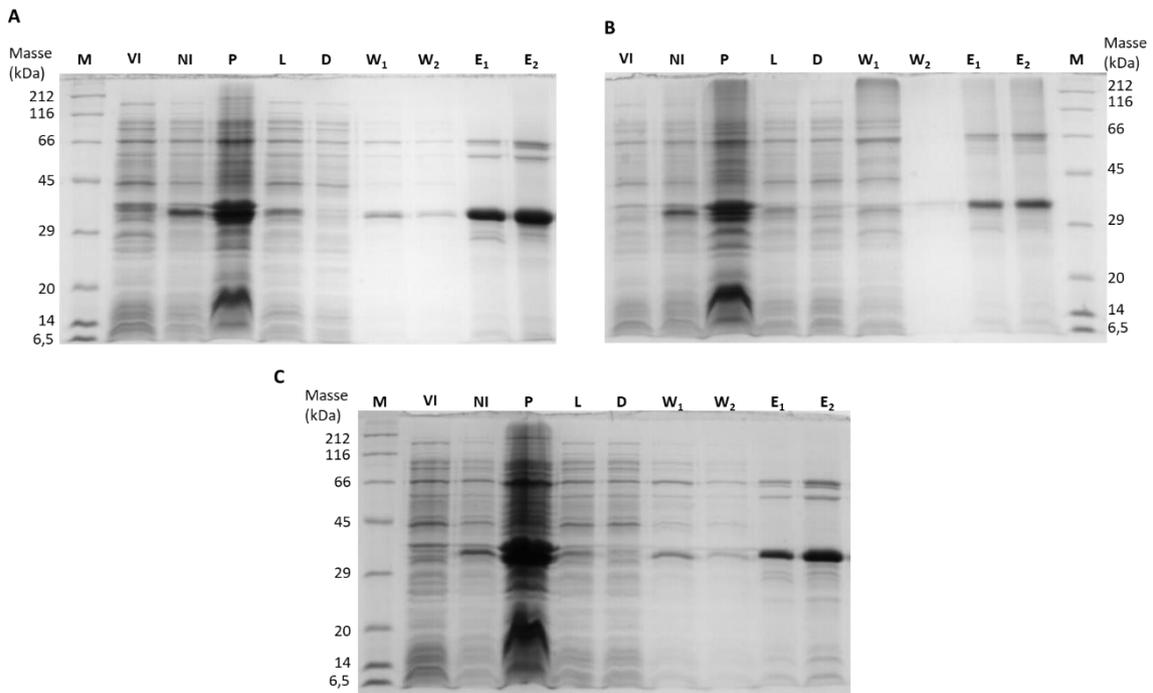


Abbildung 6-5: SDS-Gele der Aufreinigung der His₆Aim32 Varianten . A H249C, B H253C, C HH249_53CC.

```

ATGAGCCGTACCAGCCATTGTGATCATTGTGTTGGTAGCCATACCGGTGAACGTAGCTGTCTGGCAACCGCCACCGCAACCGC
ACGTAGCTGGCTGCTGATTGAACATCCTGGTCCGTGGCCTGAACGTATTGAACAGCTGACCGGTCCGGCACCGCTGGTTGCAG
TTATTGAACGTGCAGCACGTGCCGGTGTTCGTCCGCAGCTGATTTCGTTCGTCCGTGGTTCGTTCGTCCGACACCGCCTCTG
CAAGTTTATTTAGGTGGTAGCTTAGGTGGTCCGGTTTGGCTGGAAGGTCGTACCCCTGGGTGATCATCGTGAACCTGGAAGAACT
GGATGAAGGTGTTCTGGCAGAAGTTGCAGCAGGTGCGCGTCCGCGTTTTGGTGAACCGGTTGCAGGTCCGGCAGGCGCACCGG
GTAACCGCTGCTGCTGGTTTTGTACACATGGTAAACGTAATGCATGTTGTGCAGTTATGGTGCTCCGCTGGCAGCGCAACTG
GCAGCACGCTTTGGTGATCTGGTTTGGGAAACCACACATGTTGGTGGTGATCGTTATGCAGCAAATCTGGTGTGTCTGCCGCA
TGGTCTGTATTATGGCGATCTGGGTGCAGCAGAAGCAGCAAGCGCAGTTGAAAGCTATCTGCGTGGTGAAGTTGCACTGGAAC
GCCTGCGTGGTTCGTGCAGGTCTGCCTGCACCAGCACAGGCAGCAGAACATCATGTTTCGTGTTCTGACCGGTGTGCTGGGTGTT
GATAGCGTTAGCGTTGAAAGCCTGACCGGCACCAGTCCGTATGAAGCCGTTATTGATGTTGCCGGTGCGCGTTATCTGGTTAC
CGTTGAAGAAACCGAACCGGTGCATGATTGTGAACCGGTTGTCAAGAAAATGTTTCGTAGCTATGTTGTTTCGTGGTATTACCC
TGCTGAATCGTGCAGCCCTGGTTTAA
    
```

Abbildung 6-6: Sequenz des verwendeten synthetischen Gens von TcAAH.

Tabelle 6-1: Mößbauerparameter von TcAAH bei pH 7.

| Komponente | 1 | 2 |
|---------------------|-------------------|--------------------------|
| δ (mm/s) | 0,23 | 0,38 |
| ΔE_Q (mm/s) | 0,53 | 1,06 |
| Γ (mm/s) | 0,24 | 0,27 |
| Oberfläche (%) | 50 | 50 |
| Interpretation | Fe _{Cys} | Fe _{HisprotAsp} |

Tabelle 6-2: Mößbauerparameter von TcAAH bei pH 9,4.

| Komponente | 1 | 2 | 3 |
|---------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| δ (mm/s) | 0,23 | 0,38 | 0,33 |
| ΔE_Q (mm/s) | 0,48 | 1,06 | 0,85 |
| Γ (mm/s) | 0,26 | 0,26 | 0,26 |
| Oberfläche (%) | 50 | 38 | 11 |
| Interpretation | Fe _{Cys} | Fe _{HisprotAsp} | Fe _{HisdeprotAsp} |

Tabelle 6-3: Mößbauerparameter von TcAAH bei pH 10,7.

| Komponente | 1 | 2 | 3 |
|---------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| δ (mm/s) | 0,25 | 0,38 | 0,33 |
| ΔE_Q (mm/s) | 0,45 | 1,06 | 0,85 |
| Γ (mm/s) | 0,25 | 0,25 | 0,30 |
| Oberfläche (%) | 50 | 17 | 33 |
| Interpretation | Fe _{Cys} | Fe _{HisprotAsp} | Fe _{HisdeprotAsp} |

Anhang

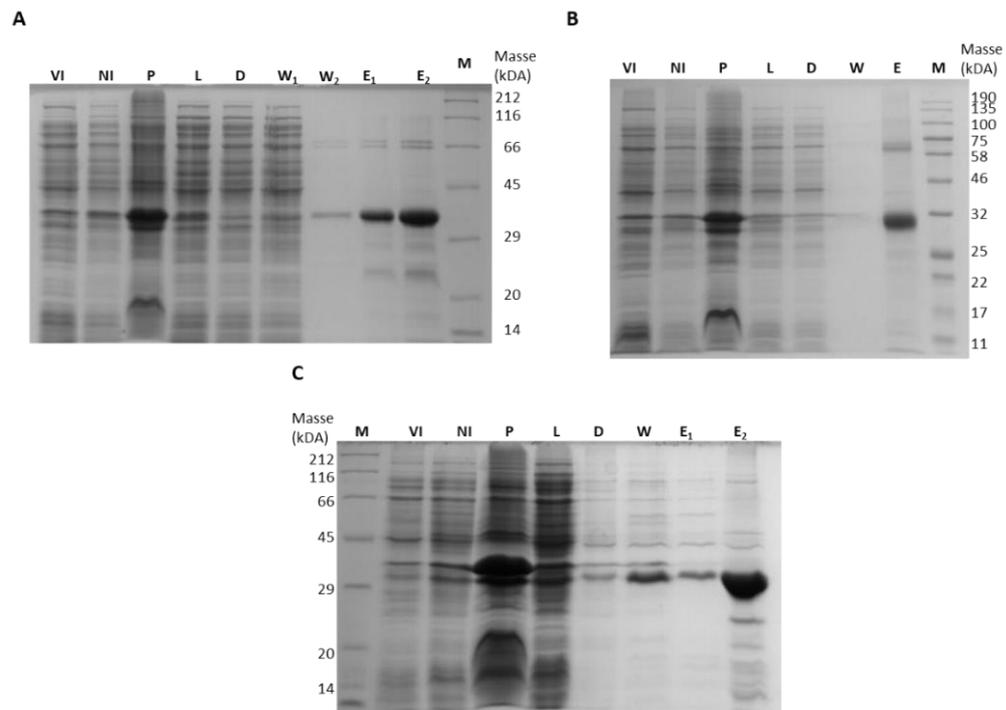
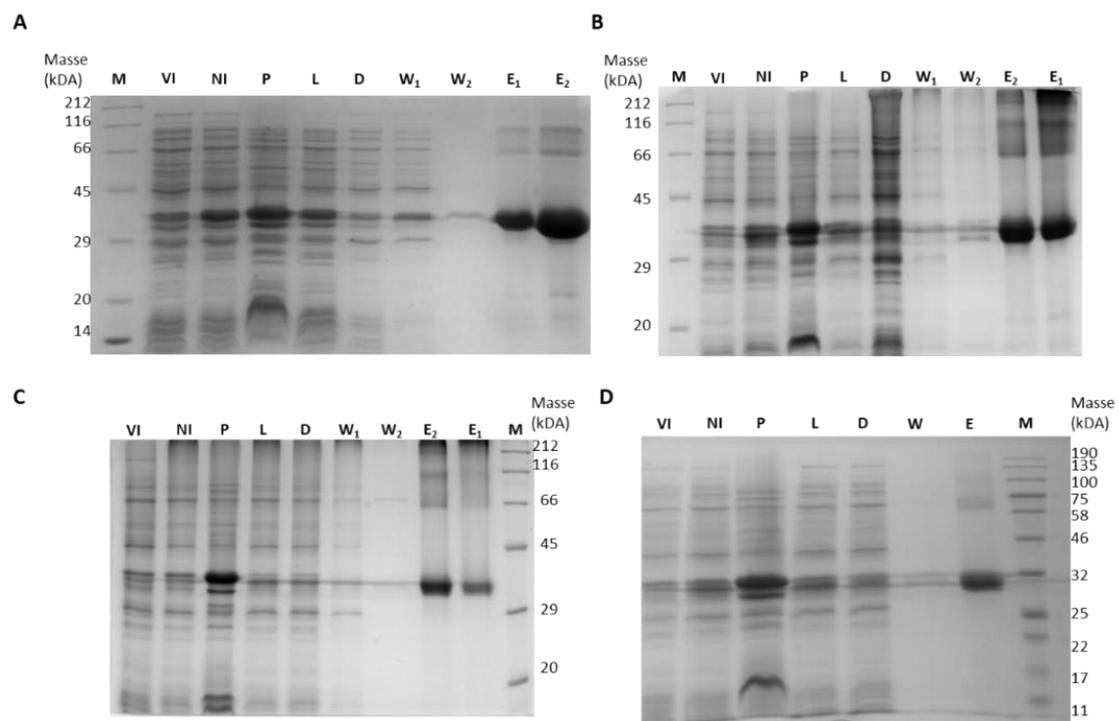
Abbildung 6-7: SDS-Gele der Aufreinigung von His₆-TcApd1 Varianten. A: C146A, B: C154A, C: C155A.

Abbildung 6-8: SDS-Gele der Aufreinigung von TS-TcApd1 Varianten. A: WT, B: C146A, C: C154A, D: C155A.

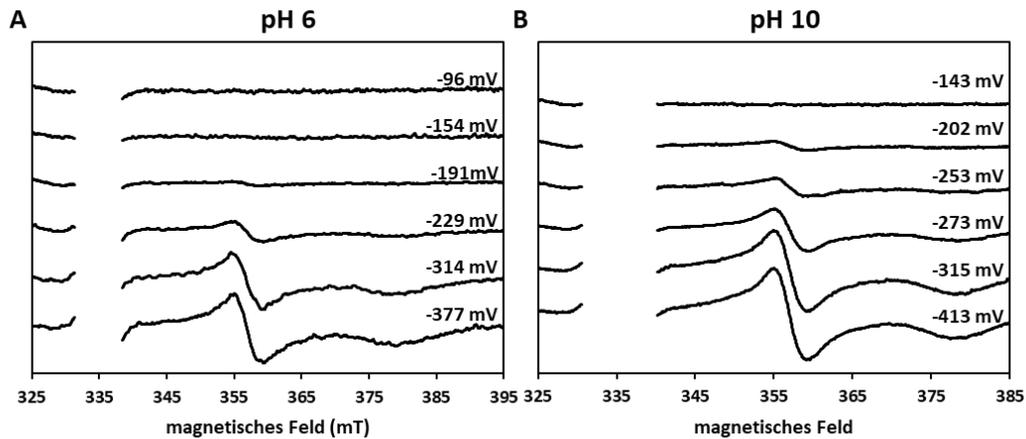


Abbildung 6-9: Redox titration von TcAAH bei pH 6 und pH 10 (1,8 mg/ml). **A** Auswahl der ESR-Spektren zur Bestimmung des Potentials bei pH 6. Die Amplitude des g_{γ} -Peaks nimmt bei niedrigerem Redoxpotential zu. **B** Auswahl der ESR-Spektren zur Bestimmung des Potentials bei pH 10. Die Amplitude des g_{γ} -Peaks nimmt bei niedrigerem Redoxpotential zu.

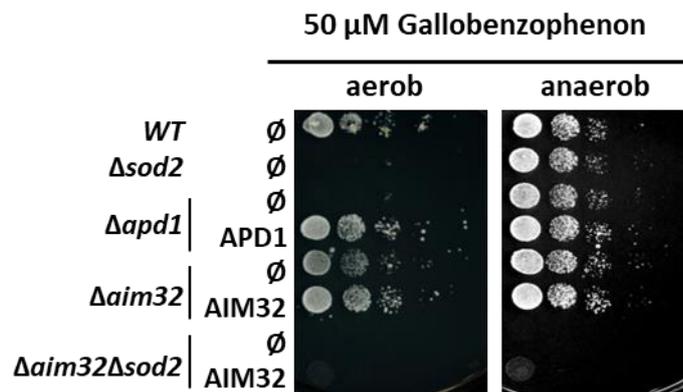


Abbildung 6-10: Wachstum in Gegenwart von 50 μ M Gallobenzophenon mit und ohne Luftsauerstoff. Tüpfeltest in Gegenwart von 50 μ M Gallobenzophenon. WT, $\Delta sod2$, $\Delta apd1$ und $\Delta aim32$ wurden mit einem Leerplasmid oder 416_{NP}-Plasmiden, welche das Gen für Apd1 resp. Aim32 enthielten, transformiert. Serielle 10-fach Verdünnungen von flüssigen Vorkulturen in glukose-haltigem SC-Medium wurden auf SC-Agarplatten mit Glukose und Gallobenzophenon in der angegebenen Konzentration getüpfelt. Um ein Wachstum von W303 unter anaeroben Bedingungen möglich zu machen, wurde das Standardmedium zusätzlich mit folgendem supplementiert: 0,2 % (v/v) Tween-80, 0,2 % (v/v) Ethanol, 30 μ g/ml Ergosterol (Mühlenhoff *et al.*, 2010) und 55,6 μ g/ml Methionin (Crisp *et al.*, 2003). Die Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C in Gegenwart oder unter Ausschluss von Luftsauerstoff fotografiert.

Anhang

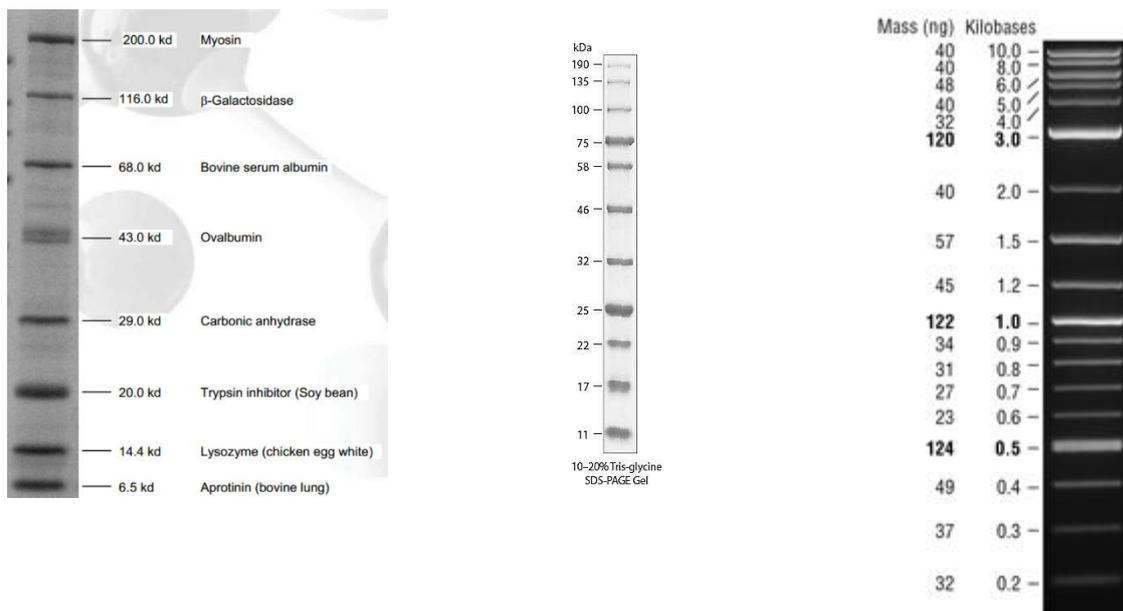


Abbildung 6-11: Verwendete Größenstandards. Links: Protein Marker III. (AppliChem); Mitte: Blue Protein Standard, Broad Range (11-190 kDa), rechts: 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb).

Ergänzende Arbeiten zur „Dissertation Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung.“

Im Folgenden wurden ergänzende Untersuchungen zur Dissertation von Carina Greth unternommen. Es sollte eine geeignete Methode zum Nachweis der Interaktion des C-terminalen Tryptophans mit dem CIA-Targeting-Komplex gefunden werden, dies stellte aber kein Hauptthema dieser Arbeit dar. Es wurde mit dem Stamm Gal_CIA1/ Δ leu1 mit transformierten Plasmidkopie des Gens *LEU1* resp. Δ 1-Variante unter der Kontrolle des endogenen Promotors gearbeitet. Bei moderater Regulation von Gal_CIA1/ Δ leu1 durch 40 h Kultivierung in Glukose, konnte ein gesteigerter Aktivitätsverlust der Δ 1-Mutante im Vergleich zu WT bei physiologischer Cia1-Menge gefunden werden. So betrug die Aktivität der Δ 1-Mutante, jeweils bezogen auf den WT, noch 57 % bei physiologischer Cia1-Menge und nur noch 8 % bei moderater Depletion in diesem Stamm. Diese Daten gaben die ersten Hinweise auf eine mögliche Interaktion des C-terminalen Tryptophans mit Cia1, da bei geringer Cia1-Konzentration im Cytosol das C-terminale Tryptophan an Bedeutung zu gewinnen scheint (Greth, 2018). Es wurde zudem versucht diesen Effekt für die weiteren Mitglieder des CIA-Targeting-Komplexes nachzuweisen. Jedoch konnten keine Wachstumsbedingungen identifiziert werden, die zu einer moderaten Depletion von Cia2 oder Met18 in den Gal_CIA/ Δ leu1- oder Gal_MET18/ Δ leu1-Stammes führten.

Im Verlauf dieser Arbeit sollte nun der Effekt des Tryptophans von Leu1 bei moderater Depletion von Cia1 reproduziert, sowie Wachstumsbedingungen für Gal_CIA2/ Δ leu1 und Gal_MET18/ Δ leu1 analysiert werden, die zu deren moderaten Herunterregulation führen. Zudem sollte überprüft werden, ob der Effekt des C-terminalen Tryptophans bei kritischer Menge eines CIA-Faktors spezifisch für den CIA-Targeting-Komplex ist oder auch bei Depletion früherer Mitglieder der CIA-Maschinerie wie Cfd1 und Nar1 eine Rolle spielt.

In die Stämme Δ leu1, Gal_CIA1/ Δ leu1, Gal_CIA2/ Δ leu1, Gal_MET18/ Δ leu1, Gal_CFD1/ Δ leu1 und Gal_NAR1/ Δ leu1 wurden die entsprechenden Plasmide transformiert und in galaktosehaltigem Medium vorkultiviert. Die Stämme wurden danach 20 h resp. 40 h in glukosehaltigem Medium kultiviert. Zur Überprüfung des Effektes der Deletion des C-terminalen Tryptophans unter unbeeinflussten Bedingungen wurde für die Gal-Stämme eine Kontrolle in galaktosehaltigem Medium mitgeführt. Diese Zellen wurden nach 20 h-Kultivierungszeit geerntet. Die Enzymaktivität von Leu1 wurde nach Gesamtzellextraktpräparation bestimmt.

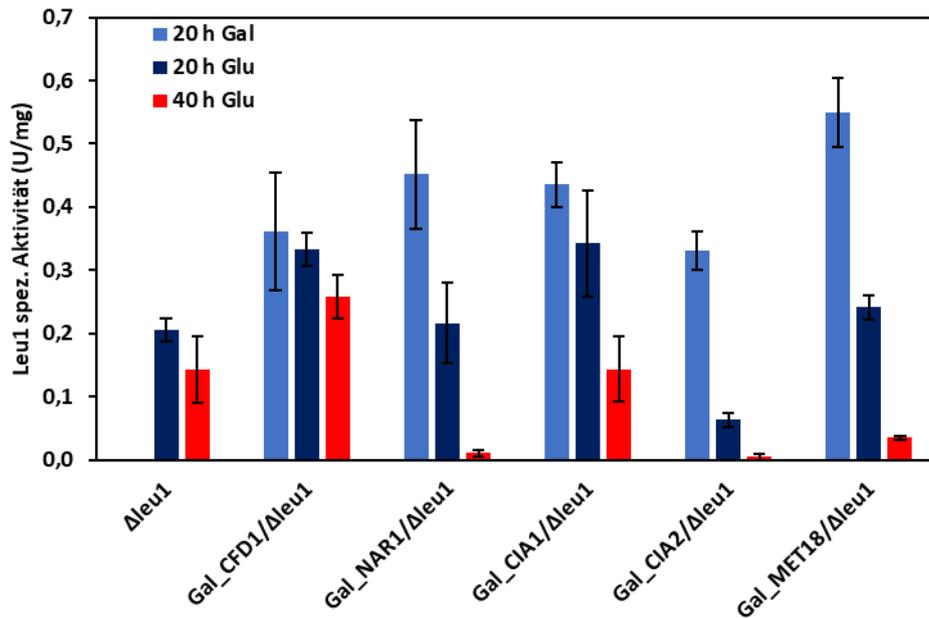


Abbildung 6-12: Aktivitätsmessung von Leu1 für regulierbare CIA-Stämme (1). Die Stämme Gal_CIA1 $\Delta leu1$, Gal_CIA2 $\Delta leu1$, Gal_MET18 $\Delta leu1$, Gal_CFD1 $\Delta leu1$ und Gal_NAR1 $\Delta leu1$ mit transformierter WT-Kopie von LEU1 unter der Kontrolle des endogenen Promotors wurden 20 h in Galaktose, 20 h in Glukose und 40 h in Glukose kultiviert. Nach Ernte der Zellen und Zellextraktion wurde die Enzymaktivität von Leu1 im Zellextrakt gemessen (n = 3).

Zur Veranschaulichung der Regulation nach 20 h resp. 40 h in Glukose, sind die Leu1-Aktivitäten dieser Zellen mit transformierter WT-Kopie im Vergleich zur Kontrolle in Galaktose dargestellt. Als Vergleichswert wurde die Aktivität von $\Delta leu1$ mit WT-Kopie nach 20 h resp. 40 h Kultivierung in Glukose herangezogen. Die Aktivität nahm im Mittel von der 20 h-Kultur zur 40 h-Kultur um ca. 30 % ab, der Unterschied verringert sich mit Berücksichtigung der Standardabweichung. Am wenigsten herunterreguliert war Gal_CFD1/ $\Delta leu1$. Hier konnte nach einer Depletionsdauer von 40 h noch eine Restaktivität von 77 % detektiert werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte für Gal_CIA1/ $\Delta leu1$ beobachtet werden. Dieser Stamm wies nach 40 h eine Abnahme der Aktivität von ca. 60 % auf. Dies deckt sich aber mit den Erwartungen, da für diese Stämme eine 64-stündige Depletion für die vollständige Herunterregulation von Nöten ist. Die Stämme Gal_NAR1/ $\Delta leu1$, Gal_CIA2/ $\Delta leu1$ und Gal_MET18/ $\Delta leu1$ wiesen bereits nach 20 h Depletion in Glukose eine stark verminderte Leu1-Aktivität auf. Nach 20 h war sie für Gal_NAR1/ $\Delta leu1$ und Gal_MET18/ $\Delta leu1$ um ca. die Hälfte verringert und nach 40 h auf Hintergrundniveau. Die Depletion von Gal_CIA2/ $\Delta leu1$ war sogar noch schneller, da nach 20 h in Glukose eine Abnahme der Aktivität um 80 % zu verzeichnen war (Abb. 6-12).

Für alle verwendeten Gal-Stämme konnten Depletionszeiten ermittelt werden, in denen die Expression des jeweilige CIA-Faktor moderat depletiert ist. Im Folgenden sollte der Effekt der Deletion des C-terminalen Tryptophans unter diesen Bedingungen untersucht

werden. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden die jeweiligen Aktivitäten auf die Aktivität des WT normiert. Sind die Stämme nicht im CIA-Faktor depletiert, verringert sich die Leu1-Aktivität durch Deletion des C-terminalen Tryptophans um ca. 50 % (Ausnahme Gal_NAR1/ Δ leu1, Abb. 6-13 A). Nach 20 h Depletion in Glukose hat für die Stämme Gal_CIA2/ Δ leu1 und Gal_MET18/ Δ leu1 dieser Aktivitätsverlust zugenommen. Diese beiden Stämme erreichten nun eine kritische Konzentration in der Zelle und die Deletion des Tryptophans hatte nun einen stärkeren Effekt, die Aktivität betrug nur noch 15 % für Gal_CIA2/ Δ leu1 resp. 29 % für Gal_MET18/ Δ leu1 im Vergleich zur WT-Kopie. Die Leu1 Aktivität in Gal_CIA1/ Δ leu1 ist nach 20 h noch nicht gesunken, hier ist kein vermehrter Effekt der Deletion zu beobachten. Dies gilt ebenso für die Stämme Gal_CFD1/ Δ leu1 und Gal_NAR1/ Δ leu1, obwohl sich die Konzentration an Nar1 drastisch reduzierte (Abb. 6-13 B). Nach weiteren 20 h Depletion in Glukose waren die Stämme Gal_NAR1/ Δ leu1, Gal_CIA2/ Δ leu1 und Gal_MET18/ Δ leu1 vollkommen herunterreguliert (Abb. 6-13 C) und wurden in die weitere Betrachtung nicht mehr miteinbezogen. Der Stamm Gal_CIA1/ Δ leu1 war moderat herunterreguliert, dies wirkte sich auch auf die Aktivität der Δ 1-Mutante aus, im Vergleich zur WT-Kopie konnte nur noch eine Leu1-Aktivität von 18 % detektiert werden. Die Depletion des Gal_CFD1/ Δ leu1-Stammes war nach dieser Zeitspanne weniger effektiv und die Aktivität der Δ 1-Mutante betrug noch 40 % in Relation zu WT. Die Proteinmenge wurde mittels Immundetektion nachgewiesen (Abb. 6-14). Somit kann die Regulation aller Gal-Stämme bestätigt werden. Die hier erhaltenen Daten weisen auf des C-terminale Tryptophan als kritischen Faktor bei einer verminderten Konzentration der Mitglieder des CIA-Targeting-Komplexes hin. Für die hier eingesetzten Komponenten der früheren CIA-Maschinerie ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt.

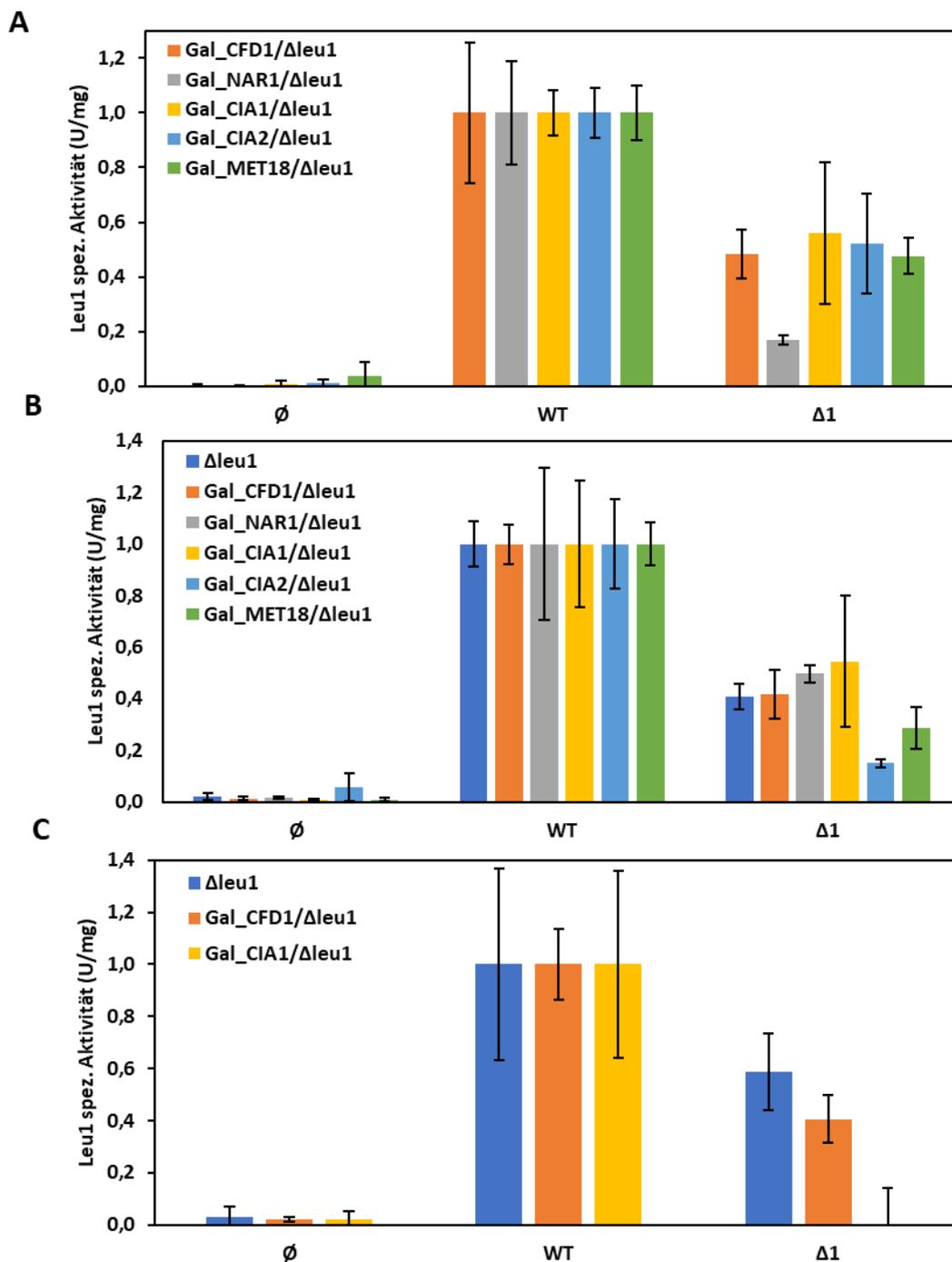


Abbildung 6-13: Aktivitätsmessung von Leu1 für regulierbare CIA-Stämme (2). Die Stämme $\Delta leu1$ Gal_CIA1/ $\Delta leu1$, Gal_CIA2/ $\Delta leu1$, Gal_MET18/ $\Delta leu1$, Gal_CFD1/ $\Delta leu1$ und Gal_NAR1/ $\Delta leu1$ mit transformierter WT-Kopie von *LEU1* resp. dessen Mutante $\Delta 1$, sowie ein Leerplasmid (\emptyset) wurden unter der Kontrolle des endogenen Promotors wurden 20 h in Galaktose (**A**), 20 h in Glukose (**B**) und 40 h in Glukose (**C**) kultiviert. Nach Ernte der Zellen und Zellextraktpräparation wurde die Enzymaktivität für Leu1 gemessen (n = 3).

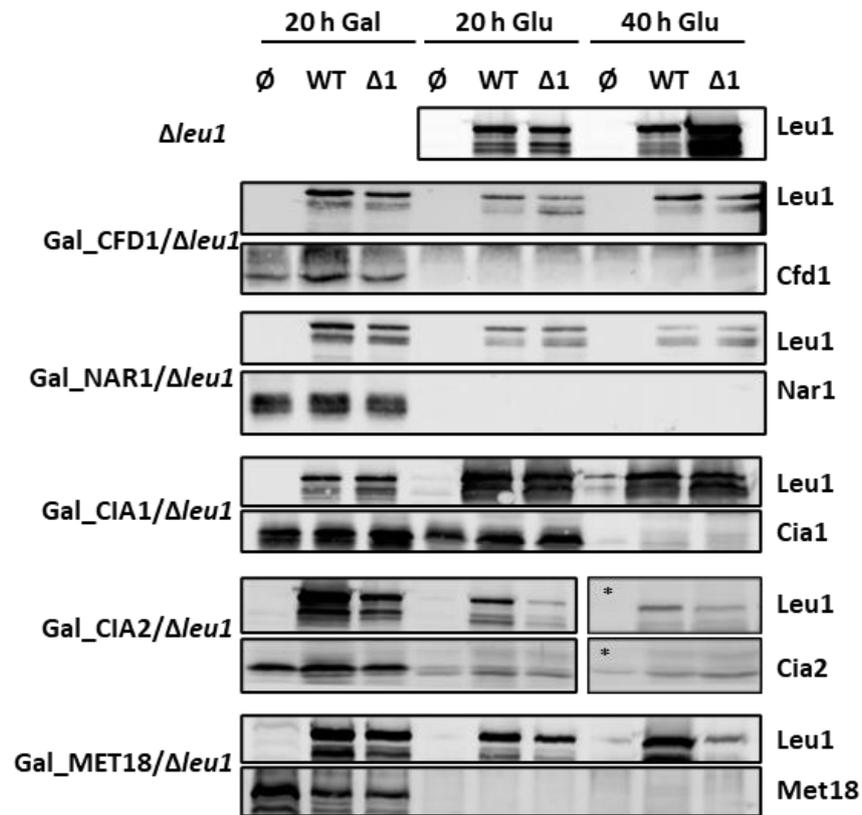


Abbildung 6-14: Nachweis der Proteine mittels Immundetektion. Es wurden 50 μ g Gesamtzellextrakt analysiert mit spezifischen Antikörpern analysiert. * Proben wurden in falscher Reihenfolge aufgetragen ($\Delta 1$, WT, \emptyset) und der Bereich wurde hier zur deutlichen Darstellung gespiegelt dargestellt.

Literaturverzeichnis

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

Albers A., Bayer T., Demeshko S., Dechert S., Meyer F. **(2013)** A Functional Model for the Rieske Center: Full Characterization of a Biomimetic N-Ligated [2Fe-2S] Cluster in Different Protonation States. *Chem. Eur. J.* 19, 10101–10106.

Ambler R.P., Meyer T.E., Kamen M.D. **(1993)** Amino Acid Sequence of a High Redox Potential Ferredoxin (HiPIP) from the Purple Phototrophic Bacterium *Rhodospila globiformis*, Which Has the Highest Known Redox Potential of Its Class. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 215–222.

Amr S., Heisey C., Zhang M., Xia X.-J., Shows K.H., Ajlouni K, Pandya A., Satin L.S., El-Shanti H., Shiang R. **(2007)** A Homozygous Mutation in a Novel Zinc-Finger Protein, ERIS, Is Responsible for Wolfram Syndrome 2. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 673–683.

Andreini C., Banci L., Rosato A. **(2016)** Exploiting Bacterial Operons To Illuminate Human Iron-Sulfur Proteins. *J. Proteome Res.* 15, 1308–1322.

Armour B.L., Barnes S.R., Moen S.O., Smith E., Raymond A.C., Fairman J.W., Stewart L.J., Staker B.L., Begley D.W., Edwards T.E., Lorimer D.D. **(2013)** Multi-target parallel processing approach for gene-to-structure determination of the influenza polymerase PB2 subunit. *J. Vis. Exp.* 76, 4225.

Ayala-Castro C., Saini A., Wayne Outten F. **(2008)** Fe-S Cluster Assembly Pathways in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 110–125.

Bak D. W., Elliott S. J. **(2013)** Conserved hydrogen bonding networks of MitoNEET tune Fe-S cluster binding and structural stability. *Biochemistry* 52, 4687–4696.

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., Mühlhoff 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., Mühlhoff 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.

Bechtel, D.F. **(2015)** Studie zur Optimierung der Dihydroxysäure-Dehydratase-Expression in *S. cerevisiae*. Diplomarbeit. Fachbereich Chemie, RPTU.

Blackman R.K., Cheung-Ong K., Gebbia M., Proia D.A., He S., Kepros J., Jonneaux A., Marchetti P., Kluza J., Rao P.E., Wada Y., Giaever G., Nislow C. **(2012)** Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug elesclomol. *PLoS One* 7, e29798.

Beinert H. **(1997)**: Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* 277, 653–659.

Beinert H. & Sands R.H. **(1960)** Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 41–46.

Beinert H., Kennedy M.C., Stout C.D. **(1996)** Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme and Iron Regulatory Protein. *Chem. Rev.* 96, 2335–2373.

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

Bill E., Bernhardt F.H, Trautwein A.X., Winkler H. **(1985)** Mössbauer investigation of the cofactor iron of putidamonooxin. *Eur. J. Biochem.* 121, 39–46.

Blinn, C.M. **(2014)** Die Thioredoxin-artigen Ferredoxine Aim32 und Apd1 der Bäckerhefe. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, RPTU.

Boldogh I.R., Pon L.A. **(2007)** Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell. Biol.* 80, 45-64.

Booker S.J. **(2009)** Anaerobic Functionalization of Unactivated C-H Bonds. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 58–73.

Bornhorst J.A., Falke J.J. **(2000)** Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 326, 245–254.

Botstein D. & Fin G.R. **(2011)** Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 189, 695–704.

- Boxhammer S., Glaser S., Kühl A., Wagner A.K., Schmidt C.L. **(2008)** Characterization of the recombinant Rieske [2Fe-2S] proteins HcaC and YeaW from *E. coli*. *Biometals* 21, 459–467.
- Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke J.D. **(1998)** Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115–32.
- 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.
- Braymer J.J. & Lill R. **(2017)** Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 292, 12754–12763.
- Braymer J.J., Stümpfig M., Thelen S., Mühlenhoff U., Lill R. **(2019)** Depletion of thiol reducing capacity impairs cytosolic but not mitochondrial iron-sulfur protein assembly machineries. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 1866, 240-251.
- Brandt U. **(2006)** Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 75, 69–92
- Breker M., Gymrek M., Schuldiner M. **(2013)** A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses. *J. Cell. Bio.* 200, 839-850.
- Bretscher A., persönliche Mitteilung. Cornell University.
- Broderick J.B., Duffus B.R., Duschene K.S., Shepard E.M. **(2014)** Radical S-Adenosyl-methionine Enzymes. *Chem. Rev.*, 114, 4229–4317.
- Brzóška K., Meczyńska S., Kruszewski M. **(2006)** Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond. *Acta Biochim. Pol.* 53, 685–691.
- Butt T.R., Sternberg E.J., Gorman J.A.; Clark P., Hamer D., Rosenberg M., Crooke S.T. **(1981)** Copper metallthionein of yeast, structure of a gene, a regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 3332–3336.
- 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.
- Cammack R. **(1973)** “Super-reduction” of high-potential iron-sulphur protein in the presence of dimethyl sulphoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 548–554.
- Camponeschi F., Ciofi-Baffoni S., Banci L. **(2017)** Anamorsin/Ndor1 Complex Reduces [2Fe-2S]-MitoNEET via a Transient Protein-Protein Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 9479–9482.

Cardenas-Rodriguez M., Chatzi A., Tokatlidis K. **(2018)** Iron–sulfur clusters: from metals through mitochondria biogenesis to disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* 23, 509–520.

Carter C.W., Kraut J., Freer S.T., Alden R.A., Sieker L.C., Adman E., Jensen L.H. **(1972)** A Comparison of Fe₄S₄ Clusters in High-Potential Iron Protein and in Ferredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3526–3529.

Cecchini G. **(2003)** Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 77–109.

Chakravarti A., Selvadurai K., Shahoei R., Lee H., Fatma S., Tajkhorshid E., Huang R.H., **(2018)** Reconstitution and substrate specificity for isopentenyl pyrophosphate of the antiviral radical SAM enzyme viperin. *J. Biol. Chem.* 293, 14122–14133.

Chatelet C., Gaillard J., Pétillet Y., Louwagie M., Meyer J. **(1999)** A [2Fe-2S] protein from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 885–889.

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

Cheng Z., Landry A.P., Wang Y., Ding H. **(2017)** Binding of Nitric Oxide in CDGSH-type [2Fe-2S] Clusters of the Human Mitochondrial Protein Miner2. *J. Biol. Chem.* 292, 3146–3153.

Cheynier V., Tomas-Barberan F.A., Yoshida K. **(2015)** Polyphenols: From Plants to a Variety of Food and Nonfood Uses. *J. Agric. Food. Chem.* 63, 7589–7594.

Cicchillo R.M. & Booker S.J. **(2005)** Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2860–2861.

Ciofi-Baffoni S., Nasta V., Banci L. **(2018)** Protein networks in the maturation of human iron–sulfur proteins. *Metallomics* 10, 49–72.

Claros M.G. **(1995)** MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput. Appl. Biosci.* 11, 441–447.

Colca J.R., McDonald W.G., Waldon D.J., Leone J.W., Lull J.M., Bannow C.A., Lund E.T., Mathews W.R. **(2004)** Identification of a novel mitochondrial protein (“208itoNEET”) cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E252–E260.

Cline J.F., Hoffman B.M., Mims W.B., LaHaie E., Ballou D.P., Fee J.A. **(1985)** Evidence for N Coordination to Fe in the [2Fe-2S] Clusters of *Thermus* Rieske Protein and Phthalate Dioxygenase from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 260, 3251–3254.

- Conlan A.R., Axelrod H.L., Cohen A.E., Abresch E.C., Zuris J., Yee D., Nechushtai R., Jennings P.A., Paddock M.L. **(2009)** Crystal structure of Miner1: The redox-active 2Fe-2S protein causative in Wolfram Syndrome 2. *J. Mol. Biol.* 392, 145–153.
- Costa V., Reis E., Quintanilha A., Moradas-Ferreira P. **(1993)** Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 608–614.
- Couture M. M.J., Colbert C. L., Babini E., Rossel F. I., Mauk A. G., Bolin J. T., Eltis L. D. **(2001)** Characterization of BphF, a Rieske-Type Ferredoxin with a Low Reduction Potential. *Biochemistry* 40, 84–92.
- Crack J.C., Green J., Hutchings M. I., Thomson A. J., Le Brun N. E. **(2012a)** Bacterial Iron–Sulfur Regulatory Proteins As Biological Sensor-Switches. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1215–1231.
- Crack J.C., Green J., Thomson A.J., Le Brun N.E. **(2012b)** Iron-sulfur cluster sensor-regulators. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 35–44.
- Crisp R.J., Pollington A., Galea C., Jaron S., Yamaguchi-Iwai Y., Kaplan J. **(2003)** Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *J. Biol. Chem.* 278, 45499–45506.
- Davidson E., Ohnishi T., Atta-Asafo-Adjei E., Daldal F. **(1992)** Potential Ligands to the [2Fe-2S] Rieske Cluster of the Cytochrome bcx Complex of *Rhodobacter capsulatus* Probed by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* 31, 3342–3351.
- De Freitas J., Wintz H., Kim J.H., Poynton H., Fox T.; Vulpe C. **(2003)** Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals* 16, 185–197.
- Dessau M. A., Modis Y. **(2011)** Protein Crystallization for X-ray Crystallography. *J. Vis. Ex.* 47, 2285
- Dicus M.M., Conlan A., Nechushtai R., Jennings P.A., Paddock M.L., Britt R.D., Stoll S. **(2010)** Binding of histidine in the (Cys)₃(His)₁-coordinated [2Fe-2S] cluster of human mitoNEET. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2037–2049.
- Diekert K., de Kroon A.I.P.M., Kispal G., Lill R. **(2001)** Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell. Biol.* 65, 37-51.
- Dos Santos P., Dean D. R., Hu Y., Ribbe M.W. **(2004)** Formation and Insertion of the Nitrogenase Iron-Molybdenum Cofactor. *Chem. Rev.* 104, 1159–73.
- Dunham W.R., Bearden Alan J., Salmeen I.T., Palmer G., Sands R.H., Orme-Johnson W.H., Beinert H. **(1971)** The two-iron ferredoxins in spinach, parsley, pig adrenal cortex,

Azotobacter vinelandii, and *Clostridium pasteurianum*: Studies by magnetic field Mössbauer spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 253, 134–152.

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

Ellis P.J., Conrads T., Hille R., Kuhn P. (2001) Crystal Structure of the 100 kDa Arsenite Oxidase from *Alcaligenes faecalis* in Two Crystal Forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 9, 125–132.

Entian K.D., Schuster T., Hegemann J.H., Becher D., Feldmann H., Güldener U. Götz R., Hansen M., Hollenberg C.P., Jansen G., Kramer W., Klein S., Kötter P., Kricke J., Launhardt H., Mannhaupt G., Maierl A., Meyer P., Mewes W., Munder T., Niedenthal R.K., Ramezani Rad M., Röhmer A., Römer A., Hinnen A. *et al.* (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol. Gen. Genet.* 262, 683–702.

Fee J.A., Findling K.L., Yoshida T., Hille R., Tarr G.E., Hearshen D.O., Dunham W.R., Day E.P., Kent T.A., Münck E. (1984) Purification and characterization of the Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus*. Evidence for a [2Fe-2S] cluster having non-cysteine ligands. *J. Biol. Chem.* 259, 124–133.

Ferecatu I., Goncalves S., Golinelli-Cohen M.-P., Clémancey M., Martelli A., Riquier S., Guittet E., Latour J.M., Puccio H., Drapier J.C., Lescop E., Bouton C. (2014) The diabetes drug target MitoNEET governs a novel trafficking pathway to rebuild an Fe-S cluster into cytosolic aconitase/iron regulatory protein 1. *J. Biol. Chem.* 289, 28070–28086.

Ferraro D.J., Gakhar L., Ramaswamy S. (2005) Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 175–190.

Fleischhacker A.S., Stubna A., Hsueh K.-L., Guo Y., Teter S.J., Rose J.C., Brunold T.C., Markley J.L., Münck E., Kiley P.J. (2012) Characterization of the [2Fe-2S] cluster of *Escherichia coli* transcription factor IscR. *Biochemistry* 51, 4453–4462.

Fogo, J.K. & Popowsky M. (1949) Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide. *Anal. Chem.* 21, 732–734.

Forsburg S. L. (2001) The art and design of genetic screens: yeast. *Nat. Rev. Genet.* 2, 659–668.

Fukuyama K., Nagahara Y., Tsukihara T., Katsube Y., Hase T.; Matsubara H. (1988) Tertiary Structure of *Bacillus thermoproteolyticus* [4Fe-4S] Ferredoxin. *J. Mol. Biol.* 199, 183–193.

Fürst P., Hu S.; Hackett R., Hamer D. (1988) Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* 55, 705–717.

- Gari K., León Ortiz A.M., Borel V., Flynn H., Skehel J.M., Boulton S.J. **(2012)** MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science* 337, 243–245.
- Gerber J., Neumann K., Prohl C., Mühlhoff U., Lill R. **(2005)** The Yeast Scaffold Proteins Isu1p and Isu2p Are Required inside Mitochondria for Maturation of Cytosolic Fe/S Proteins. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4848–4857.
- Ghaemmaghami S., Huh W.K., Bower K., Howson R.W., Belle A., Dephore N., O'Shea E.K., Weissman J.S. **(2003)** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741.
- Giel J.L., Rodionov D., Liu M., Blattner F.R., Kiley P.J. **(2006)** IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 60, 1058–1075.
- Gnandt E., Dörner K., Strampraad M.F.J., de Vries S., Friedrich T. **(2016)** The multitude of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 1068–1072.
- Golinelli-Cohen M.P. & Bouton C. **(2017)** Fe-S Proteins Acting as Redox Switch: New Key Actors of Cellular Adaptive Responses. *Curr. Chem. Biol.* 11, 70–80.
- Golinelli-Cohen M.P., Lescop E., Mons C., Gonçalves S., Clémancey M., Santolini J., Guittet E., Blondin G., Latour J.M., Bouton C. **(2016)** Redox Control of the Human Iron-Sulfur Repair Protein MitoNEET Activity via Its Iron-Sulfur Cluster. *J. Biol. Chem.* 291, 7583–7593.
- Good N.E., Winget G.D., Winter W., Connolly T.N., Izawa S., Singh R.M.M. **(1966)** Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry* 5, 467–477.
- Greth C. **(2018)** Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung. Dissertation. Fachbereich Chemie, RPTU.
- Grinberg A.V., Hannemann F., Schiffler B., Müller J., Heinemann U., Bernhardt R. **(2000)** Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* 40, 590–612.
- Grossman J.D., Camire E.J., Glynn C.A., Neil C.M., Seguinot B.O., Perlstein D.L. **(2019)** The Cfd1 Subunit of the Nbp35-Cfd1 Iron Sulfur Cluster Scaffolding Complex Controls Nucleotide Binding. *Biochemistry* 58, 1587–1595.
- Gruner I., Frädrieh C., Böttger L.H., Trautwein A.X., Jahn D., Härtig E. **(2011)** Aspartate 141 is the fourth ligand of the oxygen-sensing [4Fe-4S]²⁺ cluster of *Bacillus subtilis* transcriptional regulator Fnr. *J. Biol. Chem.* 268, 2017–2021.
- 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.

Hanke G. & Mulo P. **(2013)** Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant. Cell. Environ.* 36, 1071–1084.

Hansen K., persönliche Mitteilung. RPTU

Haslam E. & Cai Y. **(1994)** Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat. Prod. Rep.* 11, 41-66.

Hernández-Gallardo A.K. & Missirlis F. **(2020)** Cellular iron sensing and regulation: Nuclear IRP1 extends a classic paradigm. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1867, 118705.

Hess D.C., Myers C.L., Huttenhower C., Hibbs M.A., Hayes A.P., Paw J., Clore J.J., Mendoza R.M., Luis B.S., Nislow C., Giaever G., Costanzo M., Troyanskaya O.G., Caudy A.A. **(2009)** Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet.* 5, e1000407.

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.

Inupakutika M.A., Sengupta S., Nechushtai R., Jennings P.A., Onuchic J.N., Azad R.K., Padillam P., Mittler R. **(2017)** Phylogenetic analysis of eukaryotic NEET proteins uncovers a link between a key gene duplication event and the evolution of vertebrates. *Sci. Rep.* 7, 42571.

Isabella V.M., Lapek J.D. Jr., Kennedy E.M., Clark V.L. **(2009)** Functional analysis of NsrR, a nitric oxide-sensing Rrf2 repressor in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Micro-biol.* 71, 227–239.

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

Iwata S., Saynovits M., Link T.A., Michel H. **(1996)** Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome *bc₁* complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure* 4, 567–579.

Janke C., Magiera M.M., Rathfelder N., Taxis C., Reber S., Maekawa H. *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.

Jiang D., Guo H., Xu C., Chang J., Gu B., Wang L., Block T.M., Guo J.T. **(2008)** Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus. *J. Virol.* 82, 1665–1678.

Jin Y.H., Dunlap P.E., McBride S.J., Al-Refai H., Bushel P.R., Freedman J.H. **(2008)** Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet.* 4, 1000053.

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.

Jung J.S., Gao-Sheridan H.S., Christiansen J., Dean D.R., Burgess B.K. **(1999)** Purification and biophysical characterization of a new [2Fe-2S] ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a putative [Fe-S] cluster assembly/repair protein. *J. Biol. Chem.* 274, 32402–32410.

Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J. Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D.. **(2021)** Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589.

Kachroo A.H., Laurent J.M., Yellman C. M., Meyer A.G., Wilke C.O., Marcotte E.M. **(2015)** Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science* 348, 921–925.

Karmi O., Marjault H.B., Pesce L., Carloni P., Onuchic J.N., Jennings P.A., Mittler R., Nechushtai R. **(2018)** The unique fold and lability of the [2Fe-2S] clusters of NEET proteins mediate their key functions in health and disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* 23, 599–612.

Kassube S.A. & Thomä N.H. **(2020)** Structural insights into Fe-S protein biogenesis by the CIA targeting complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 735–742.

Kiley P.J. & Beinert H. **(2003)** The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 181–185.

Kim H., Botelho S.C., Park K., Kim H. **(2015)** Use of carbonate extraction in analyzing moderately hydrophobic transmembrane proteins in the mitochondrial inner membrane. *Protein Sci.* 24, 2063–2069

Kita K., Oya H., Gennis R.B., Ackrell B.A.C., Kasahara M. **(1990)** Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of iron sulfur(lp) subunit of liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 101–108.

Klingen A.R. & Ullmann G.M. **(2004)** Negatively charged residues and hydrogen bonds tune the ligand histidine pK_a values of Rieske iron-sulfur proteins. *Biochemistry* 43, 1283–1289.

Knauer L., persönliche Mitteilung. RPTU

Konkle M.E., Muellner S.K., Schwander A.L., Dicus M.M., Pokhrel R., Britt R.D., Taylor A.B., Hunsicker-Wang L.M. (2009) Effects of pH on the Rieske protein from *Thermusthermophilus*: a spectroscopic and structural analysis. *Biochemistry* 48, 9848–9857.

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

Lange H., Lisowsky T., Gerber J., Mühlenhoff U., Kispal G., Lill R. (2001) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* 277, 26944–26949.

Lange C. & Hunte C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome *bc₁* complex with its bound substrate cytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2800–2805.

Lalève A., Vallières C., Golinelli-Cohen M.-P., Bouton C., Song Z., Pawlik G., Tindall S.M., Avery S.V., Clain J., Meunier B. (2016) The antimalarial drug primaquine targets Fe-S cluster proteins and yeast respiratory growth. *Redox Biol.* 7, 21–29.

Lee A.Y., St Onge R.P., Proctor M.J., Wallace I.M., Nile A.H., Spagnuolo P.A., Jitkova Y., Gronda M., Wu Y., Kim M.K., Cheung-Ong K., Torres N.P., Spear E.D., Han M.K., Schlecht U., Suresh S., Duby G., Heisler L.E., Surendra A., Fung E., Urbanus M.L., Gebbia M., Lissina E., Miranda M., Chiang J.H., Aparicio A.M., Zeghouf M., Davis R.W., Cherfils J., Boutry M., Kaiser C.A., Cummins C.L., Trimble W.S., Brown G.W., Schimmer A.D., Bankaitis V.A., Nislow C., Bader G.D., Giaever G. (2014) Mapping the cellular response to small molecules using chemogenomic fitness signatures. *Science* 344, 208–211.

Lee J.S., Huh W.K., Lee B.H., Baek Y.U., Hwang C.S., Kim S.T., Kim Y.R., Kang S.O. (2001) Mitochondrial NADH-cytochrome *b₅* reductase plays a crucial role in the reduction of D-erythroascorbyl free radical in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1527, 31–38.

Lledó B., Martínez-Espinosa R.M., Marhuenda-Egea F.C., Bonete M.J. (2004) Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 167, 450–459.

Lemire B.D. & Oyedotun K.S. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 102–106.

Li D. & Roberts R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 2085–97.

Li H., Mapolelo D.T., Dingra N.N., Keller G., Riggs-Gelasco P.J., Winge D.R., Johnson M.K., Outten C.E. (2010) Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for *in vivo* iron signaling in yeast. *J. Biol. Chem.* 286, 867–876.

- Li H. & Outten C.E. (2019) The conserved CDC motif in the yeast iron regulator Aft2 mediates iron–sulfur cluster exchange and protein–protein interactions with Grx3 and Bol2. *J. Biol. Inorg. Chem.* 24, 809–815.
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838.
- Lill R., Diekert K., Kaut A., Lange H., Pelzer W., Prohl C., Kispal G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol. Chem.* 380, 1157–1166.
- Lill R., Dutkiewicz R., Elsässer H., Hausmann A, Netz D.J.A., Pierik A.J. Stehling O., Urzica E., Mühlhoff U. (2006) Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 652–667.
- Lill R., Dutkiewicz R., Freibert S. A., Heidenreich T., Mascarenhas J., Netz D.J.A., Paul V.D., Pierik A.J., Richter N., Stümpfig M., Srinivasan V., Stehling O., Mühlhoff U. (2015) 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.
- Lill R. & Mühlhoff U. (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 457–86.
- Lill R., Srinivasan V., Mühlhoff U. (2014) The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron–sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 22, 111–119.
- Lin J., Zhou T., Ye K., Wang J. (2007) Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14640–14645.
- Lipper C.H., Paddock M.L., Onuchic J.N, Mittler R., Nechushtai R., Jennings P.A. (2015) Cancer-Related NEET Proteins Transfer 2Fe-2S Clusters to Anamorsin, a Protein Required for Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *PLoS One* 10, e0139699.
- Liu H., Krizek J., Bretscher A. (1992) Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics* 132, 665–673.
- Liu L. & Huang M. (2015) Essential role of the iron-sulfur cluster binding domain of the primase regulatory subunit Pri2 in DNA replication initiation. *Protein Cell* 6, 194–210.
- Lovenberg W., Buchanan B.B., Rabinowitz J.C. (1963) Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 238, 3899–3913.
- 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 Gen. Subj.* 1862, 1980–1987.

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

Marquez M.D., Greth, C, Buzuk A., Liu Y., Blinn C.M., Beller S. Leiskau L., Hushka A., Wu K., Nur K., Netz D.J., Perlstein D.L., Pierik A.J. **(2023)** Cytosolic iron-sulfur protein assembly system identifies clients by a C-terminal tripeptide. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2023.05.19.541488.

Martins B., persönliche Mitteilung. Humboldt-Universität zu Berlin.

Mayhew S.G. **(1978)** The redox potential of dithionite and SO_2 from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 85, 535–547.

McPherson A. & Gavira J.A. **(2014)** Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 70, 2–20.

Mendel R.R. & Bittner F. **(2006)** Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 621–635.

Meyer J. **(2001)** Ferredoxins of the third kind. *FEBS Lett.* 509, 1–5.

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

Meyer J., La Andrade S., Einsle O. **(2006)** Thioredoxin-Like [2Fe-2S] Ferredoxin. *Albrecht Messerschmidt (Hg.): Handbook of Metalloproteins*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Meyer, J.; Bruschi, M. H.; Bonicel, J. J.; Bovier-Lapierre, G. E. **(1986)** Amino acid sequence of 2Fe-2S ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* 25, 6054–6061.

Mortenson L.E **(1964)** Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta* 81, 71–77.

Mortenson L.E., Valentine R.C., Carnahan J.E. **(1962)** An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 448–452.

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

Mühlhardt C. **(2013)** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 7. Auflage. *Springer Spektrum*.

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

Munnoch J.T., Pellicer Martínez M.T., Svistunenko D.A., Crack J.C., Le Brun N.E., Hutchings M.I. (2016) Characterization of a putative NsrR homologue in *Streptomyces venezuelae* reveals a new member of the Rrf2 superfamily. *Sci. Rep.* 6, 31597.

NEB (2019) *PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530)*. Von <https://international.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information>. Abgerufen am 21.09.2019.

Neti S.S., Sil D., Warui D.M., Esakova O.A., Solinski A.E., Serrano D.A., Krebs C., Booker S.J. (2022) Characterization of LipS1 and LipS2 from *Thermococcus kodakarensis*: Proteins Annotated as Biotin Synthases, which Together Catalyze Formation of the Lipoyl Cofactor. *ACS Bio. Med. Chem. Au* 2, 509–520.

Netz D.J.A., Mascarenhas J., Stehling O., Pierik A.J., Lill R. (2014) Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell. Biol.* 24, 303–312.

Netz D.J.A., Pierik A.J., Stümpfig M., Bill E., Sharma A.K., Pallesen, L.J., Walden W.E., Lill R. (2012) A Bridging [4Fe-4S] Cluster and Nucleotide Binding Are Essential for Function of the Cfd1-Nbp35 Complex as a Scaffold in Iron-Sulfur Protein Maturation. *J. Biol. Chem.* 287, 12365–12378.

Netz D.J.A., Pierik A.J., Stümpfig M., Mühlenhoff U., Lill R. (2007) The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat. Chem. Biol.* 3, 278–286.

Netz D.J.A., Stith C.M., Stümpfig M., Köpf G., Vogel D., Genau H.M., Stodola J.L., Lill R., Burgers P.M., Pierik A.J. (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., Stümpfig M., Doré C., Mühlenhoff U., Pierik A.J., Lill R. (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat. Chem. Biol.* 6, 758–765.

Nicolet Y., Lemon B.J., Fontecilla-Camps J.C., Peters J.W. (2000) A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 138–143.

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.

Ozer H.K., Dlouhy A.C., Thornton J.D., Hun J., Liu Y., Barycki J.J., Balk J., Outten C. E. (2015) Cytosolic Fe-S Cluster Protein Maturation and Iron Regulation Are Independent of the Mitochondrial Erv1/Mia40 Import System. *J. Biol. Chem.* 290, 27829–27840.

Paddock M.L., Wiley S.E., Axelrod H.L., Cohen A.E., Roy M., Abresch E.C., Capraro D., Murphy A.N., Nechushtai R., Dixon J.E., Jennings P.A. **(2007)** MitoNEET is a uniquely folded 2Fe 2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14342–14347.

Pandey A.K., Pain J., Dancis A., Pain D. **(2019)** Mitochondria export iron-sulfur and sulfur intermediates to the cytoplasm for iron-sulfur cluster assembly and tRNA thiolation in yeast. *J. Biol. Chem.* 294, 9489–9502.

Pedroletti L., Moseler A., Meyer A.J. **(2023)** Assembly, transfer and fate of mitochondrial iron-sulfur clusters. *J. Exp. Bot.* 74, 3328–3344.

Paul V.D., Mühlenhoff U., Stümpfig M., Seebacher J., Kugler K.G., Renicke C., Taxis C., Gavin A.C., Pierik A.J., Lill R. **(2015)** The deca-GX3 proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion. *eLife* 4, e08231.

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.

Pearce & Sherman **(1999)** Toxicity of Copper, Cobalt, and Nickel Salts Is Dependent on Histidine Metabolism in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181, 4774–4779.

Peleh V., Riemer J., Dancis A., Hermann J.M. **(2014)** Protein oxidation in the intermembrane space of mitochondria is substrate-specific rather than general. *Microbial Cell* 1, 81–93.

Pellicer Martínez M.T. **(2017)** Studies of iron- sulfur cluster containing regulators of the Rrf2 family. PhD thesis, School of Chemistry, University of East Anglia.

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

Reents H., Münch R., Dammeyer T., Jahn D., Härtig E. **(2006)** The Fnr Regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 1103–1112.

Rieske J.S., MacLennan D.H., Coleman R. **(1964)** Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome c reductase complex of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 338–344.

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. **(2015)** Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 16, 45–55.

- Rouault T.A. (2019) The indispensable role of mammalian iron sulfur proteins in function and regulation of multiple diverse metabolic pathways. *Biometals* 32, 343–353.
- Robinson K.M. & Lemire B.D. (1996) Covalent Attachment of FAD to the Yeast Succinate Dehydrogenase Flavoprotein Requires Import into Mitochondria, Presequence Removal, and Folding. *J. Biol. Chem.* 271, 4055–4060.
- 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.
- Rudolf J., Makrantonis V., Ingledew W.J., Stark M. J., White M.F. (2006) The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol. Cell.* 23, 801–808.
- Sauguet L., Kling, S., Perera R.L., Maman J.D., Pellegrini L. (2010) Shared active site architecture between the large subunit of eukaryotic primase and DNA photolyase. *PLoS One* 5, e10083.
- Savojardo C., Bruciaferri N., Tartari G., Martelli P.L., Casadio R. (2020) DeepMito: accurate prediction of protein sub-mitochondrial localization using convolutional neural networks. *Bioinformatics* 36, 56–64.
- Schägger H. & Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Schmidt C.L. & Shaw L. (2001) A Comprehensive Phylogenetic Analysis of Rieske and Rieske-Type Iron-Sulfur Proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 9–26.
- Schmidt T.G.M. & Skerra A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2, 1528–1535.
- Schmidt T.G.M., Batz L., Bonet L., Carl U., Holzapfel G., Kiem K., Matulewicz K., Niermeier D., Schuchardt I., Stanar K. (2013) Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expr. Purif.* 92, 54–61.
- 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.
- Siegel L.M., Murphy M.J., Kamin H. (1973) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. I. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: molecular parameters and prosthetic groups. *J. Biol. Chem.* 248, 251–264.

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.

Sheftel A., Stehling O., Lill R. (2010) Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 302–314.

Shepard W., Soutourina O., Courtois E., England P., Haouz A., Martin-Verstraete I. (2011) Insights into the Rrf2 repressor family – the structure of CymR, the global cysteine regulator of *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* 278, 2689–2701.

Sohn Y.S., Tamir S., Song, L., Michaeli D.; Matouk I. Conlan A.R., Harir Y., Holt S.H., Shulaev V., Paddock M.L., Hochberg A., Cabanchick I.Z., Onuchic J.N., Jennings P.A., Nechushtai R., Mittler R. (2013) NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1476–1481.

Srinivasan V., Netz, D.J.A., Weibert H., Mascarenhas J., Pierik A.J., Michel H., Lill R. (2007) Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure* 15, 1246–1257.

Srinivasan V, Pierik A.J., Lill R. (2014) Crystal Structures of Nucleotide-Free and Glutathione-Bound Mitochondrial ABC Transporter Atm1. *Science* 343, 1137–1140.

Stegmaier K., persönliche Mitteilung. RPTU

Stegmaier K. (2017) Spektroskopische und elektrochemische Studien der neuartigen Clusterkoordination in Proteinen mit C-terminaler Thio-redoxin-Ferredoxin-Domäne. Dissertation. Fachbereich Chemie, RPTU.

Stegmaier K., Blinn C.M., Bechtel D.F., Greth C., Auerbach H., Müller C.S., Jacob V., Reijerse E.J., Netz D.J.A., Schünemann V., Pierik A.J. (2019) Apd1 and Aim32 Are Prototypes of BishistidinyI-Coordinated Non-Rieske [2Fe-2S] Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 5753–5765.

Stehling O., Vashisht A.A., Mascarenhas J., Jonsson Z.O., Sharma T., Netz D.J.A., Pierik A.J., Wohlschlegel J.A., Lill R. (2012) MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* 337, 195–199.

Stehling O., Jeoung J H., Freibert S.A., Paul V.D., Bänfer S., Niggemeyer B., Rösser R., Dobbek H., Lill R. (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.* 115, E9085E9094.

Stehling O., Mascarenhas J., Vashisht A.A., Sheftel A.D., Niggemeyer B., Rösser R., Pierik A.J., Wohlschlegel J.A., Lill R. (2013) Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B integrate

iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell Metab.* 18, 187–98.

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

Tamir S., Paddock M.L., Darash-Yahana-Baram M., Holt S.H., Sohn Y.S., Agranat L., Michaeli D., Stofleth J.T., Lipper C.H., Morcos F., Cabantchik I.Z., Onuchic J.'N., Jennings P.A., Mittler R., Nechushtai R. **(2015)** Structure-function analysis of NEET proteins uncovers their role as key regulators of iron and ROS homeostasis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1294–1315.

Tang H.M.V., Pan K., Kong K.Y.E., Hu L., Chan L.-C., Siu K.-L., Sun H., Wong C.M., Jin, D.Y. **(2015)** Loss of *APD1* in yeast confers hydroxyurea sensitivity suppressed by Yap1p transcription factor. *Sci. Rep.* 5, 7897.

Thomas, B.J. & Rothstein, R. **(1989)** Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619–630.

Trnka D., Hossain M.F., Jordt L.M., Gellert M., Lillig C.H. **(2020)**. Role of GSH and Iron-Sulfur Glutaredoxins in Iron Metabolism. *Molecules* 25, 3860.

Twilfer H., Bernhardt F.-H., Gersonde K. **(1985)** Dioxygen-activating iron center in putidamonooxin: Electron spin resonance investigation of the nitrosylated putidamonooxin. *Eur. J. Biochem.* 147, 171–176.

Upadhyay A.S., Vonderstein K., Pichlmair A., Stehling O., Bennett K.L., Dobler G., Guo J.T., Superti-Furga G., Lill R., Överby A.K., Weber F. **(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., Stehling O., Panayiotou C., Rösser R., Lill R., Överby A.K. **(2017)** Cellular requirements for iron-sulfur cluster insertion into the antiviral radical SAM protein viperin. *J. Biol. Chem.* 292, 13879–13889.

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.

Valentine R.C. **(1964)** Bacterial Ferredoxin. *Bacteriol. Rev.* 28, 497–517.

Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., Yuan D., Stroe O., Wood G., Laydon A., Židek A., Green T., Tunyasuvunakool K., Petersen S. Jumper J., Clancy E., Green R., Vora A., Lutfi M., Figurnov M., Cowie A., Hobbs N., Kohli P., Kleywegt G., Birney E., Hassabis D., Velankar S. **(2022)** AlphaFold Protein Structure Database:

massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 50, D439–D444.

Vranken, J.G. von, Jeong M.Y., Wein P., Chen Y.C., Gygi S.P., Winge D.R., Rutter J. **(2016)** The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *eLife* 5, e17828.

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, 1418–1425.

Venkateswara Rao P. & Holm R.H. **(2004)** Synthetic analogues of the active sites of iron-sulfur proteins. *Chem. Rev.* 104, 527–559.

Vo A., Fleischman N.M., Froehlich M.J., Lee C.Y., Cosman J.A., Glynn C.A., Hassan Z.O., Perlstein D.L. **(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.

Volbeda A., Pellicer Martínez M.T., Crack J.C., Amara P., Gigarel O., Munnoch J.T., Hutchings M.I., Darnault C., Le Brun N.E., Fontecilla-Camps J.C. **(2019)** The Crystal Structure of the Transcription Regulator RsrR Reveals a [2Fe-2S] Cluster Coordinated by Cys, Glu and His Residues. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 2367–2375.

Wackett L.P. **(2002)** Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 577–587.

Walden W.E., Selezneva A.I., Dupuy J., Volbeda A., Fontecilla-Camps J.C., Theil E.C., Volz K. **(2006)** Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* 314, 1903–1908.

Waldron K.J & Robinson N.J. **(2009)** How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 25–35.

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.

Webert H., Freibert S.A., Gallo A., Heidenreich T., Linne U., Amlacher S., Hurt E., Mühlhoff U., Banci L., Lill R. **(2014)** Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat. Commun.* 5, 5013,

Weiler B.D., Brück M.-C., Kothe I., Bill E., Lill R. Mühlhoff U. **(2020)** Mitochondrial [4Fe-4S] protein assembly involves reductive [2Fe-2S] cluster fusion on ISCA1-ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 20555–20565.

- Wiedemann N., Urzica E., Guiard B., Müller H., Lohaus C., Meyer H.E., Ryan M.T., Meisinger C., Mühlenhoff U., Lill R., Pfanner N. **(2006)** Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J.* 25, 184–195.
- Wiley S.E., Paddock M.L., Abresch E.C., Gross L., van der Geer P., Nechushtai R., Murphy A.N., Jennings P.A., Dixon J.E. **(2007a)** The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster. *J. Biol. Chem.* 282, 23745–23749.
- Wiley S.E., Murphy A.N., Ross S.A., van der Geer P., Dixon J.E. **(2007b)** MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3518–3523.
- Winston F., Dollard C., Ricupero-Hovasse S. L. **(1995)** Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11, 53–55.
- Wirth C., Brandt U., Hunte C., Zickermann V. **(2016)** Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 902–914.
- White M.F., Dillingham M.S. **(2012)** Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 94–100.
- Wolfe M.D., Parales J.V., Gibson D.T., Lipscomb J.D. **(2001)** Single turnover chemistry and regulation of O₂ activation by the oxygenase component of naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276, 1945–1953.
- Wu Y. & Brosh R.M.Jr. **(2012)** DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster. *Nucleic Acids Res.* 40, 4247–4260.
- Xiong S., Zhang L., He Q.Y. **(2008)** Fractionation of proteins by heparin chromatography. *Methods Mol. Biol.* 424, 213–221.
- Yeo W.S., Lee J.H., Lee K.C., Roe J.H. **(2006)** IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol. Microbiol.* 61, 206–218.
- Yoshida H. & Yamada H. **(1985)** Microbial Production of Pyrogallol through Decarboxylation of Gallic Acid. *Agric. Biol. Chem.* 49, 659–663.
- Zhang D., Dailey O.R., Simon D.J., Roca-Datzer K., Jami-Alahmadi Y., Hennen M.S., Wohlschlegel J.A., Koehler C.M., Dabir D.V. **(2021)** Aim32 is a dual-localized 2Fe-2S mitochondrial protein that functions in redox quality control. *J. Biol. Chem.* 297, 101135.
- Zhang Y.; Lyver E.R.; Knight S.A.B., Pain D., Lesuisse, E., Dancis A. **(2006)** Mrs3p, Mrs4p, and frataxin provide iron for Fe-S cluster synthesis in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 281, 22493–22502.

Zhang Y., Lyver E.R., Nakamaru-Ogiso E., Yoon H., Amutha B., Lee D.W., Bi E., Ohnishi T., Daldal F., Pain D., Dancis A. **(2008)** Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5569–5582.

Zhang Y., Yang, C., Dancis A., Nakamaru-Ogiso E. **(2017)** EPR studies of wild type and mutant Dre2 identify essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters and their cysteine ligands. *J. Biochem.* 161, 67–78.

Zheng L., Baumann U., Reymond J.-L. **(2004)** An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32, e115.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Antonio J. Pierik für die Übernahme des Erstgutachtens, die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, sowie die Überlassung des interessanten Themas bedanken. Die ausführlichen Gespräche über die Eisen-Schwefel-Proteine waren mehr als lehrreich und haben mir stets weitergeholfen.

Herrn Prof. Dr. Volker Schünemann danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau PD Dr. Daili J. A. Netz danke herzlich ich für den lehrreichen Austausch und die Diskussionen rund um diese Arbeit und Ihre Hilfsbereitschaft bei allerlei Fragen.

Ein besonderer Dank gilt Kathrin Stegmaier und Carina Greth. Ihre Ratschläge, Hilfestellungen und auch die Diskussion von Ergebnissen trugen wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit bei. Ohne sie wären einige Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Dominique Bechtel danke ich für die Unterstützung und Hilfestellung bei der Messung der ESR-Spektren sowie den anregenden Diskussionen dazu.

Ein Dankeschön möchte ich auch meiner Laborgefährtin Monika Schneider aussprechen. Ihre Unterstützung durch Worte und auch Taten hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein Dank gilt der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Volker Schünemann, im Besonderen Dr. Christina Müller und Jonathan Oltmanns, die für mich die Messungen und anschließenden Simulationen der Mößbauerspektroskopie durchgeführt haben und darüber hinaus immer offen für Diskussionen waren.

Lukas Knauer danke ich für die erneute Messung und Simulation der TcAAH Probe bei verschiedenen pH-Werten.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Johannes Herrmann, insbesondere Dr. Katja Hansen danke ich für die zur Verfügungstellung von Antikörperseren und anregende Diskussionen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek für die freundliche Aufnahme in seinem Labor während meiner Zeit in Berlin, im Besonderen Frau Dr. Berta Martins für ihre Hilfe bei allen Kristallisationsexperimenten.

Bei Prof. Dr. Anthony Bretscher bedanke ich mich für die Überlassung und Tipps zur Amplifizierung der der cDNA-Bibliothek zur Durchführung des High-Copy-Suppressor Screens.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Praktikanten bzw. Bachelor-Studenten Louisa Linn, Andrej Feist, Lena Langer, Marie Brehm, Roumani Israel und Rahel de Bruyn für die zielführende Unterstützung.

Ferner möchte ich meinen Dank gegenüber Frau Carolin Fluck und Frau Doreen Knochenhauer für die Erledigung organisatorischer Aufgaben, die während der Zeit angefallen sind, aussprechen.

Für die Finanzierung eines Teils dieser Arbeit im Rahmen des Schwerpunktprogrammes 1927 „Iron-sulfur for Life“ danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit meine Forschungsergebnisse auf einem internationalen Kongress in Madison, USA zu präsentieren durch Gewährung eines Reisestipendiums bedanken.

Schließlich möchte ich den übrigen Mitarbeitern der Fachrichtung für die schöne, lustige und natürlich lehrreiche Zeit danken.

Mein herzlichstes Dankeschön geht zu guter Letzt an meine Liebsten, die mich in dieser Zeit stets unterstützten, mir auch in schwierigen Momenten zur Seite standen und mich wiederaufrichteten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Catharina Marianne Blinn

Akademische Ausbildung

- 10/2014-07/2019 **Promotion in der Fachrichtung Biochemie**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. J. Pierik, RPTU
- 09/2014 **Diplomhauptprüfung in Chemie**
Abschluss Diplom Chemikerin
- 01/2014-09/2014 **Diplomarbeit in der Fachrichtung Biochemie**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. J. Pierik, RPTU
Titel: *Die Thioredoxin-artigen Ferredoxine Aim32 und Apd1 der Bäckerhefe*
- 05/2013-08/2013 **Forschungsarbeit in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. Richling, RPTU
Titel: *Synthese der Chlorogensäuren und -lactone sowie deren zeitabhängige Inkubation in Vollblut bzw. Plasma*
- 10/2009-09/2014 **Studium der Chemie**
Vertiefungsrichtung **Life Science in Chemistry**, RPTU

Schulbildung

- 06/2009 **allgemeine Hochschulreife**
- 08/2006-06/2009 Willi-Graf-Schule St. Ingbert

Publikationen

Stegmaier K., Blinn C.M., Bechtel D.F., Greth C., Auerbach H., Müller C.S., Jacob V., Reijerse E.J., Netz D.J.A., Schünemann V., Pierik A.J. **(2019)** Apd1 and Aim32 Are Prototypes of Bishistidinyl-Coordinated Non-Rieske [2Fe-2S] Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 5753-5765.

Marquez M.D., Greth, C, Buzuk A., Liu Y., Blinn C.M., Beller S. Leiskau L., Hushka A., Wu K., Nur K., Netz D.J., Perlstein D.L., Pierik A.J. **(2023)** Cytosolic iron-sulfur protein assembly system identifies clients by a C-terminal tripeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 120, in press.

Konferenzbeiträge

Freiburg (2018), Posterbeitrag: „Apd1 and Aim32 are Prototypes of a New Class of [2Fe-2S] Proteins“

Madison (2018) Vortrag und Posterbeitrag: „Apd1 and Aim32 are Prototypes of a New Class of [2Fe-2S] Proteins“

Bunsentagung (2017) Posterbeitrag: „Characterisation of a novel [2Fe 2S] cluster type via chemogenomic and EPR based studies“

Mosbach (2017) Posterbeitrag: „Identification of the ligands of a novel class of [2Fe-2S] proteins via chemogenomics“

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„*In vivo* und *in vitro* Untersuchungen neuer, Thioredoxin-artiger
[2Fe-2S]-Proteine“**

ohne fremde Hilfe erstellt habe. Bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht. Ich bin mir bewusst, dass eine unwahre Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Waldmohr, den 13.09.2023

(Catharina Blinn)