

# **Der Einfluss der FeS-Zentrum-Koordination in Glutaredoxinen auf Physiologie und Pathologie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Anna Dorothee Engelke**

aus Cloppenburg

Düsseldorf, Dezember 2020

Aus der Klinik für Neurologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. PD Dr. habil. Carsten Berndt

(Klinik für Neurologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

2. Prof. Dr. Andreas Reichert

(Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2021

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Trnka\*, D., **Engelke\***, A. D., Gellert\*, M., Moseler, A., Hossain, Md F., Lindenberg, T. T., Pedroletti, L., Odermatt, B., de Souza, J. V., Bronowska, A. K., Dick, T. P., Mühlhoff, U., Meyer, A. J., Berndt, C., Lillig, C. H., Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins, Nat. Commun. (2020)

Weitere Publikationen, deren Ergebnisse nicht Teil dieser Arbeit sind:

Sangeetham\*, S. B., **Engelke\***, A.D., Fodor, E., Krausz, S. L., Tatzelt, J., Welker, E., The G127V variant of the prion protein interferes with dimer formation *in vitro* but not *in cellulo*, Sci Rep. (2021)

**Engelke\***, A. D., Gonsberg\*, A., Thapa\*, S., Jung, S., Ulbrich, S., Seidel, R., Basu, S., Multhaup, G., Baier, M., Engelhard, M., Schätzl, H.M., Winklhofer, K. F., Tatzelt, J., Dimerization of the cellular prion protein inhibits propagation of scrapie prions, J. Biol. Chem. (2018)

Ingwersen\*, J., De Santi\*, L., Wingerath, B., Graf, J., Koop, B., Schneider, R., Hecker, C., Schröter, F., Bayer, M., **Engelke, A. D.**, Dietrich, M., Albrecht, P., Hartung, H.-P., Annunziata, P., Aktas, O., Prozorovski, T., Nimodipine confers clinical improvement in two models of experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Neurochem. (2018)

Berndt, C., **Engelke, A.D.**, Bräutigam, L., and Lepka, K.

Glutaredoxins in the brain, in: „Glutathione Systems in Health and Disease“, Flohé, L., Ed., CRC Press (2018)

Publikationen und Konferenzbeiträge befinden sich in Kapitel 8.

\*: gleichberechtigte Autoren

# Inhaltsverzeichnis

|       |  |    |
|-------|--|----|
| I.    | Abbildungsverzeichnis .....  | 1  |
| II.   | Tabellenverzeichnis.....   | 3  |
|       | Zusammenfassung.....   | 4  |
|       | Abstract .....   | 6  |
| 1     | Einleitung .....   | 8  |
| 1.1   | Glutaredoxine.....   | 8  |
| 1.1.1 | Glutaredoxin Klassifizierung.....  | 9  |
| 1.1.2 | Dithiol- und monothiol-Mechanismus.....  | 9  |
| 1.1.3 | Glutaredoxin Isoformen.....  | 11 |
| 1.2   | Eisen-Schwefel-Zentren.....  | 12 |
| 1.2.1 | FeS-Zentrum-Biosynthese .....  | 13 |
| 1.2.2 | Eisenhomöostase.....   | 14 |
| 1.2.3 | Funktionen von FeS-Zentrum-Proteinen .....                                       | 14 |
| 1.2.4 | FeS-Zentrum-kordinierende Glutaredoxine.....                                     | 15 |
| 1.3   | Funktionen des FeS-Zentrums in Glutaredoxinen .....                              | 17 |
| 1.3.1 | Dithiol-FeS-Glutaredoxine als Redoxsensor oder Schutz vor $\cdot\text{NO}$ ..... | 17 |
| 1.3.2 | Monothiol-Glutaredoxine in der Eisenhomöostase .....                             | 18 |
| 2     | Zielsetzung .....  | 20 |
| 3     | Material und Methoden .....  | 21 |
| 3.1   | Material .....   | 21 |
| 3.1.1 | Bakterienstämme .....  | 21 |
| 3.1.2 | Zelllinien.....  | 21 |
| 3.1.3 | Plasmidkonstrukte.....   | 22 |
| 3.1.4 | Primer für Klonierungen.....   | 24 |
| 3.1.5 | Primer für quantitative Echtzeit PCR .....                                       | 25 |
| 3.1.6 | siRNS-Sequenzen .....  | 25 |
| 3.1.7 | Antikörper.....  | 26 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.1.8  | Enzyme .....   | 27 |
| 3.1.9  | Protein und DNS Marker .....   | 27 |
| 3.1.10 | Medien und Zusätze.....  | 27 |
| 3.1.11 | Kits.....  | 28 |
| 3.1.12 | Verwendete Materialien.....  | 29 |
| 3.1.13 | Chemikalien und andere Produkte.....                                 | 29 |
| 3.1.14 | Geräte.....  | 32 |
| 3.1.15 | Software .....   | 33 |
| 3.2    | Molekularbiologische Methoden .....                                  | 35 |
| 3.2.1  | Polymerase-Kettenreaktion.....                                       | 35 |
| 3.2.2  | T/A-Klonierung .....   | 35 |
| 3.2.3  | Ortsspezifische Mutagenese .....                                     | 36 |
| 3.2.4  | Agarose-Gelelektrophorese .....                                      | 36 |
| 3.2.5  | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....         | 37 |
| 3.2.6  | Chemische Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen.....              | 37 |
| 3.2.7  | Plasmidisolation aus <i>E.coli</i> -Zellen .....                     | 37 |
| 3.2.8  | Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung .....                     | 37 |
| 3.2.9  | <i>In vitro</i> -Transkription (RNS-Synthese und PolyA-Tailing)..... | 37 |
| 3.3    | Proteinbiochemie.....  | 38 |
| 3.3.1  | Proteinexpression.....   | 38 |
| 3.3.2  | Proteinaufreinigung .....  | 38 |
| 3.3.3  | Rekonstitution von 2Fe2S-Zentren in Proteinen .....                  | 39 |
| 3.3.4  | Bestimmung von S-Glutathionylierungen <i>in vitro</i> .....          | 40 |
| 3.3.5  | Eisenbestimmung.....   | 40 |
| 3.3.6  | Monobromobiman Methode .....   | 40 |
| 3.3.7  | WSP-1-Messung .....  | 41 |
| 3.3.8  | Glutaredoxin-Aktivitätsassay .....                                   | 41 |
| 3.3.9  | Enzymaktivitäts-Messungen.....                                       | 41 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.3.10 | Molybdän-Kofaktor-Messungen.....  | 41 |
| 3.4    | Zebrafische.....  | 42 |
| 3.5    | Organotypische Schnittkulturen.....   | 43 |
| 3.6    | Zellkultur.....   | 44 |
| 3.6.1  | Primäre Zellkultur.....   | 44 |
| 3.6.2  | Kultivierung von Zelllinien .....   | 45 |
| 3.6.3  | Lipofektion .....   | 45 |
| 3.6.4  | Elektroporation .....   | 45 |
| 3.6.5  | Zellernte und Zellyse .....   | 46 |
| 3.7    | Protein Persulfid Detektions Protokoll.....   | 46 |
| 3.8    | Lipidperoxidations-Färbung.....   | 46 |
| 3.9    | Cell-Titer-Blue-Assay .....   | 47 |
| 3.10   | Quantitative Echtzeit-PCR .....   | 47 |
| 3.10.1 | RNS-Isolation .....   | 47 |
| 3.10.2 | Quantitative Echtzeit-PCR.....  | 47 |
| 3.11   | SDS-PAGE und Western Blot.....  | 48 |
| 3.11.1 | Proteinkonzentrationsbestimmung .....   | 48 |
| 3.11.2 | SDS-PAGE .....  | 49 |
| 3.11.3 | Western Blot .....  | 49 |
| 3.12   | Immunocytochemie .....  | 50 |
| 3.12.1 | Organotypische Schnittkultur .....  | 50 |
| 3.12.2 | Zellkultur .....  | 50 |
| 4      | Ergebnisse .....  | 52 |
| 4.1    | Struktur-Funktionsbeziehungen von FeS-Glutaredoxinen.....   | 52 |
| 4.1.1  | Einfluss der monothiol- und dithiol-Struktur auf die FeS-Zentrum-Koordination und -Stabilität ..... | 52 |
| 4.1.2  | Oxidoreduktaseaktivität der Glutaredoxin-Loop-Mutanten .....  | 54 |
| 4.1.3  | Funktion der Glutaredoxin-Loop-Mutanten in der FeS-Biosynthese.....                                 | 56 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.2   | Einfluss der FeS-Zentrum-Koordination auf die Reaktion mit $\cdot\text{NO}$ und als Folge daraus auf dessen zellprotektive Funktion.....                              | 59  |
| 4.2.1 | Führt die Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$ ausschließlich zu Dinitrosyl-Eisen-Komplexen?.....   | 61  |
| 4.2.2 | Führt die Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$ -Verbindungen zur Bildung schwefelhaltiger, bioaktiver Moleküle? .....                                 | 61  |
| 4.3   | Funktion der FeS-Glutaredoxine und der Einfluss der FeS-Zentrum-Koordination auf Persulfidierungen.....   | 70  |
| 4.4   | Einfluss von monothiol-Glutaredoxinen auf Differenzierung und Myelinisierung...   | 73  |
| 4.4.1 | Modulation der Proteinexpression von monothiol-FeS-Glutaredoxinen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.....  | 74  |
| 4.4.2 | Einfluss eines monothiol-Glutaredoxin-Mangels auf die weitere Entwicklung der Vorläuferzellen.....  | 77  |
| 4.4.3 | Einfluss verminderter monothiol-Glutaredoxin-Expressionen auf die Eisenhomöostase in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.....  | 79  |
| 4.4.4 | Herabgesetzte Proteinexpressionen von monothiol-Glutaredoxinen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beeinflussen die Differenzierung .....                             | 82  |
| 4.4.5 | Einfluss von herabgesetzten Proteinexpressionen der monothiol-Glutaredoxine auf die Oligodendrozytendifferenzierung im Zebrafisch .....                               | 88  |
| 4.5   | Rolle der FeS-Glutaredoxine in der Ferroptose von Oligodendrozyten .....  | 91  |
| 4.6   | Einfluss von monothiol-Glutaredoxinen auf die Molybdän-Kofaktor (MoCo)-Biosynthese.....   | 94  |
| 5     | Diskussion.....   | 97  |
| 5.1   | Der Loop vor dem aktiven Zentrum der Glutaredoxine beeinflusst die Koordination des FeS-Zentrums und ist ein Schlüsselement für die Funktionen der Glutaredoxine..... | 97  |
| 5.2   | Monothiol-Grx5 zeigt verminderten Schutz gegenüber $\cdot\text{NO}$ -Behandlungen im Vergleich zu dithiol-Grx2.....   | 103 |
| 5.3   | Identifikation der Reaktionsprodukte von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$ und ihre physiologische Bedeutung.....   | 105 |
| 5.4   | Glutaredoxine in der Reduktion von Persulfidierungen.....   | 106 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 5.5 | Monothiol-Glutaredoxine in der Differenzierung und Myelinisierung .....       | 108 |
| 5.6 | FeS-Glutaredoxine in der Ferroptose .....                                     | 110 |
| 5.7 | Einfluss der monothiol-Glutaredoxine auf die Molybdän-Kofaktor-Biosynthese... | 112 |
| 6   | Zusammenfassung und Ausblick .....  | 113 |
| 7   | Literaturverzeichnis.....   | 115 |
| 8   | Publikationen und Konferenzbeiträge .....                                     | 129 |
| 9   | Abkürzungsverzeichnis .....   | 131 |
| 10  | Anhang .....  | 134 |
| 11  | Danksagungen .....  | 136 |
| 12  | Eidesstattliche Versicherung .....  | 138 |



## I. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Das Thioredoxin- und Glutaredoxin-System reguliert den zellulären Redoxstatus. ....   | 8  |
| Abbildung 2: Dithiol- und monothiol-Mechanismus der Glutaredoxine. ....  | 10 |
| Abbildung 3: Strukturen und FeS-Zentrum-Koordination von Grx2 und Grx5. ....   | 16 |
| Abbildung 4: Schutz von Oligodendrozyten gegenüber Peroxynitrit durch holo-Grx2. ....  | 18 |
| Abbildung 5: Primärsequenz der generierten Glutaredoxin-Mutanten mit dem Austausch des Loops und des<br>aktiven Zentrums. ....   | 52 |
| Abbildung 6: Einfluss des monothiol- und dithiol-Loops auf die Stabilität des gebundenen FeS-Zentrums. ....  | 54 |
| Abbildung 7: Einfluss der Loop-Strukturen auf die Glutaredoxin-spezifische Oxidoreduktaseaktivität. ....   | 55 |
| Abbildung 8: Vergleich der Deglutathionierungsaktivitäten der Glutaredoxin-Loop-Mutanten. ....   | 56 |
| Abbildung 9: FeS-Zentrum-Transferfunktion der Glutaredoxin-Loop-Mutanten. ....   | 57 |
| Abbildung 10: Komplementierung verminderter Grx5-Proteinexpressionen mit den Glutaredoxin Loop-Mutanten<br>im Zebrafisch. ....   | 58 |
| Abbildung 11: UV/Vis-Spektroskopie der Reaktion des FeS-Zentrums in Grx5 mit Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ). .   | 59 |
| Abbildung 12: Die FeS-Zentrum-Stabilität der Grx-Loop-Mutanten unter $\cdot\text{NO}$ -Behandlung. ....  | 60 |
| Abbildung 13: Einfluss modulierter Proteinexpressionen der mitochondrialen Glutaredoxine in HeLa-Zellen auf<br>die Zellvitalität unter $\cdot\text{NO}$ -Behandlung. ....            | 60 |
| Abbildung 14: Resonanz-Raman-Spektroskopie von humanem FeS-Grx2 nach GSNO-Behandlung. ....   | 61 |
| Abbildung 15: Bestimmung von Sulfid mit der Monobromobiman-Methode bei $\cdot\text{NO}$ -mediierter FeS-Zentrum-<br>Zerstörung. ....   | 63 |
| Abbildung 16: Bestimmung von Sulfid mit dem Schwefelwasserstoffsensor WSP1 bei $\cdot\text{NO}$ -mediierter FeS-<br>Zentrum-Zerstörung. ....   | 64 |
| Abbildung 17: UV/Vis-Absorptionsspektren mit zeitlicher Auflösung der Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit<br>dem $\cdot\text{NO}$ -Donor NOC7. ....                                  | 66 |
| Abbildung 18: Absorptionsspektren zur Bestimmung potenzieller Produkte oder Nebenprodukte bei der Reaktion<br>von FeS-Grx mit NOC7. ....   | 68 |
| Abbildung 19: Detektion von persulfidierten Proteinen in HeLa-Zellen mit modulierten FeS-Grx-Expressionen<br>nach $\cdot\text{NO}$ -Behandlung. ....                                 | 70 |
| Abbildung 20: Glutaredoxin-Aktivitätstest von dithiol Glutaredoxinen mit persulfidiertem Serumalbumin als<br>Substrat. ....  | 71 |
| Abbildung 21: Der Einfluss des Loops auf die Depersulfidierungsaktivität. ....   | 72 |
| Abbildung 22: Potenzielle Rolle der FeS-Glutaredoxine in der Differenzierung und Myelinisierung. ....  | 73 |
| Abbildung 23: Die Genexpression von Grx3 und Grx5 während der Differenzierung von primären NG2-<br>positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. ....                                  | 74 |
| Abbildung 24: Etablierung eines Grx3- und Grx5-Knockdowns in A2B5-positiven Oligodendrozyten-<br>Vorläuferzellen. ....   | 75 |
| Abbildung 25: Etablierung eines Grx3- und Grx5-Knockdowns in NG2-positiven Oligodendrozyten-<br>Vorläuferzellen. ....  | 76 |
| Abbildung 26: Western Blot-Analyse von primären NG2-positiven Zelllysaten zur Untersuchung der<br>Knockdowneffizienz und kompensatorischer Effekte der monothiol-Glutaredoxine. .... | 77 |

## I. Abbildungsverzeichnis

---

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 27: Vergleich von NG2- und GFAP-Mengen in primären NG2-positiven Zellen nach siRNS-Behandlung.....  | 78  |
| Abbildung 28: Relative Zellanzahl in primären Oligodendrozyten-Vorläuferzellkulturen mit verminderter Expression von monothiol-Glutaredoxinen während der Differenzierung.....      | 79  |
| Abbildung 29: Western Blot-Analyse von Markerproteinen der Eisenhomöostase in primären NG2-positiven Zelllysaten mit verminderter Expression der monothiol-Glutaredoxine.....       | 80  |
| Abbildung 30: Transferrin-Rezeptor Lokalisation in NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit herabgesetzter Expression von monothiol-Glutaredoxinen.....                   | 81  |
| Abbildung 31: Differenzierung von A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der quantitativen RT-PCR.....                                      | 83  |
| Abbildung 32: Differenzierung von A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der immunocytochemischen Analyse.....                              | 84  |
| Abbildung 33: Differenzierung von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der quantitativen RT-PCR.....                                       | 85  |
| Abbildung 34: Differenzierung von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der immunocytochemischen Analyse.....                               | 87  |
| Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahmen der Häm-Färbung von Zebrafischembryonen nach Grx3- oder Grx5-Morpholino Injektion.....   | 88  |
| Abbildung 36: Einfluss verminderter Expressionen von monothiol-Glutaredoxinen auf die Integrität des Myelins und auf die Anzahl an MBP-positiven Zellen in Zebrafischembryonen..... | 90  |
| Abbildung 37: Untersuchungen von Ferroptose in Oligodendrozyten in zerebellären, organotypischen Schnittkulturen.....   | 92  |
| Abbildung 38: Einfluss verminderter monothiol-Glutaredoxin-Expressionen auf die Lipidperoxidation in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.....  | 93  |
| Abbildung 39: Einfluss verminderter Grx5-Expressionen auf Enzymaktivitäten in HeLa-Zellen.....  | 95  |
| Abbildung 40: Einfluss von herabgesetzten monothiol-Grx-Expressionen auf die MoCo-Biosynthese.....  | 96  |
| Abbildung 41: Vergrößerte Loop-Struktur vor dem aktiven Zentrum der Glutaredoxine beeinflusst FeS-Zentrum-Koordination und die holo-Grx-Konformation.....                           | 99  |
| Abbildung 42: Halbreaktionen der Oxidation und Reduktion von roGFP2, sowie der Reduktion von Glutathion-Mercaptoethanol durch Glutaredoxin.....                                     | 101 |
| Abbildung 43: Unterschiede und Gemeinsamkeiten der persulfidierten Proteine bei regulierter dithiol-Grx-Expression und der Anteil an glutathionylierten Proteinen.....              | 108 |

### II. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Glutaredoxine ihr aktives Zentrum und ihre FeS-Zentren in <i>Homo sapiens</i> . .....  | 17 |
| Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme. ....  | 21 |
| Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Zelllinien. ....   | 21 |
| Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Expressionsvektoren zur heterologen Expression in <i>E.coli</i> . ....   | 22 |
| Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Plasmide für eine Expression in Säugerzellen. ....   | 23 |
| Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Plasmide für die Klonierung und für die reverse Transkription in RNS für Zebrafischexperimente. ....                                       | 23 |
| Tabelle 7: Übersicht über die von Eurofins Genomic Germany GmbH synthetisierten Oligonukleotide, welche als Primer für die PCR zur Modifikation von cDNS verwendet wurden. .... | 24 |
| Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Primer für die quantitative real-time PCR. ....  | 25 |
| Tabelle 9: Übersicht der siRNS-Sequenzen für RNS-Interferenzexperimente. ....   | 25 |
| Tabelle 10: Übersicht der Antikörper. WB: Western Blot, ICC: Immunocytochemie. ....   | 26 |
| Tabelle 11: Übersicht der Enzyme. ....  | 27 |
| Tabelle 12: Übersicht der Protein- und DNS-Marker. ....   | 27 |
| Tabelle 13: Übersicht der Zellkulturmedien. ....  | 27 |
| Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Kits und ihrer Hersteller. ....   | 28 |
| Tabelle 15: Übersicht der Materialien. ....   | 29 |
| Tabelle 16: Übersicht der Chemikalien. ....   | 29 |
| Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Geräte. ....  | 32 |
| Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Software und ihrer Referenzen. ....   | 34 |
| Tabelle 19: Komponenten und Konzentrationen eines PCR-Reaktionsansatzes. ....   | 35 |
| Tabelle 20: Programm für eine PCR. ....   | 35 |
| Tabelle 21: Komponenten und Konzentrationen eines PCR-Reaktionsansatzes für die ortsspezifische Mutagenese. ....  | 36 |
| Tabelle 22: Programm für eine PCR. ....   | 36 |
| Tabelle 23: Komponenten und Konzentrationen eines Rekonstitutionsansatzes zur Synthese eines 2Fe2S-Zentrums in Proteinen. ....  | 39 |
| Tabelle 24: Übersicht der transgenen Zebrafisch-Reporterlinien. ....  | 42 |
| Tabelle 25: Übersicht der Sequenzen und eingesetzten Verdünnungen der verwendeten Morpholinos. ....   | 42 |
| Tabelle 26: Zusammensetzung und Konzentration der Komponenten für die reverse Transkription. ....   | 48 |
| Tabelle 27: Programm des Thermozyklers für die reverse Transkription. ....  | 48 |
| Tabelle 28: PCR-Programm für die qRT-PCR mit 40 Zyklen und Dissoziationskurve. ....   | 48 |
| Tabelle 29: Kolorimetrische und spektroskopische Bestimmung des Eisen- und FeS-Gehalts in holo-Glutaredoxin-Loop-Mutanten. ....   | 53 |
| Tabelle 30: Die Stabilität der FeS-Zentren in den holo Glutaredoxin-Loop-Mutanten unter aeroben Bedingungen. ....   | 54 |

## Zusammenfassung

Glutaredoxine (Grx) sind lebenswichtige Proteine. Die Proteinfamilie der Grx wird anhand ihres aktiven Zentrums in zwei Untergruppen, die dithiol-Grx (Grx1, Grx2) und monothiol-Grx (Grx3, Grx5), aufgeteilt. Dithiol- und monothiol-Grx weisen zwar nahezu identische Proteinstrukturen auf, haben aber unterschiedliche Funktionen. Dithiol-Grx sind als Oxidoreduktasen wichtig für die Signalübertragung, während monothiol-Grx redox-inaktiv sind und Funktionen in der Eisenhomöostase einnehmen. Außerdem binden monothiol-Grx und wenige dithiol-Grx ein FeS-Zentrum, welches über zwei Cysteine der aktiven Zentren und zwei nicht-kovalent gebundenen Glutathionmolekülen im Homodimer koordinativ gebunden ist. Während die kritischen Aminosäuren im aktiven Zentrum zur FeS-Zentrumsbindung, sowie die Bindungsmotive des FeS-Liganden Glutathion bekannt sind, ist der Einfluss der FeS-Zentrum-Koordination auf die unterschiedlichen Funktionen nicht aufgeklärt. Die Ziele dieser Arbeit sind zum einen die Charakterisierung des Einflusses der Proteinstruktur auf die FeS-Zentrum-Koordination in FeS-Grx, sowie dessen Bedeutung auf die unterschiedlichen Funktionen von monothiol- und dithiol-Grx. Zum anderen sollen neue Funktionen der FeS-Grx in redox- und eisenabhängigen Prozessen, wie bspw. der Oligodendrozytendifferenzierung, identifiziert werden.

Die Untersuchungen zeigten, dass ein um fünf Aminosäuren vergrößerter Loop in den monothiol-Grx die FeS-Zentrum-Koordination über veränderte Wechselwirkungen beeinflusst. Als Folge daraus konnte eine verminderte FeS-Stabilität in monothiol-Grx5 festgestellt werden. Mithilfe von Protein Engineering konnte das dithiol-Grx2 durch Austausch des Loops in eine FeS-Transferase und das monothiol-Grx5 durch den Loop-Austausch mit zusätzlichem Austausch des aktiven Zentrums in eine Oxidoreduktase umgewandelt werden. Gleichzeitig führte der Austausch der Loop-Struktur zu einem Verlust oder einer Aktivitätsminderung der ursprünglichen Funktion. Des Weiteren konnten wir einen verminderten protektiven Effekt von Grx2 mit monothiol-Loop in der NO-Entgiftung beobachten. Es konnte jedoch kein Einfluss der FeS-Koordination auf den Reaktionsverlauf der NO-Entgiftung oder auf die Reaktionsprodukte identifiziert werden. In dieser Arbeit konnten außerdem Hinweise auf neue Funktionen in Abhängigkeit des Loops der FeS-Grx gesammelt werden. Zum einen konnte eine Depersulfidierungsaktivität für Grx2 *in vitro* und *in cellulo* identifiziert werden, was auf eine regulatorische Funktion von Grx2 an persulfidierten Thiolschaltern schließen lässt. Grx2 und ein Ferroptoseinhibitor zeigten einen protektiven Effekt auf Myelinstrukturen, wobei eine Ferroptoseinduktion nur sehr geringe Effekte darauf hatte. Außerdem konnte in dieser Arbeit

eine beschleunigte Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit herunterregulierten Grx3-Expressionen beobachtet werden. Verminderte Grx5-Level äußerten sich in einer beeinträchtigten Differenzierung. *In vivo* hatten verminderte monothiol Grx-Level keinen Effekt auf die Myelinisierung. Verminderte Expressionen der monothiol-Grx hatten keinen Einfluss auf die Molybdän-Kofaktor-Biosynthese.

Zusammenfassend beeinflusst ein vergrößerter Loop aus fünf Aminosäuren die FeS-Koordination in monothiol- und dithiol-Grx und stellt eine molekulare Erklärung für die unterschiedlichen Funktionen der monothiol- und dithiol-Grx dar. Außerdem konnte Grx2 als potenzieller Regulator von Thiol-Persulfidierungen identifiziert werden. Die vorliegenden Daten schlagen Grx3 als potenziellen Ansatzpunkt für eine beschleunigte Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen vor, was eine schnellere Remyelinisierung bei demyelinisierenden Erkrankungen begünstigen könnte.

## Abstract

Glutaredoxines (Grx) are essential proteins. The protein family of Grx is subdivided by their active site composition into two major subfamilies, the dithiol Grx (Grx1, Grx2) and the monothiol Grx (Grx3, Grx5). Dithiol and monothiol Grx have a very close structural similarity, however, their functions are different. Whereas dithiol Grx are oxidoreductases and important for signaling, monothiol Grx are redox inactive and functioning in iron homeostasis. Additionally, monothiol Grx and a few dithiol Grx coordinate a FeS cluster, which is bound by two active-site cysteines and two non-covalently bound glutathione molecules in a homo dimer. Although the critical amino acids in the active site for FeS cluster binding and the glutathione binding motifs are known, the impact of the FeS cluster coordination and its structural environment on the different functions are unresolved. The aims of this study were firstly, to characterize the impact of the protein structure on the FeS cluster coordination in FeS-Grx, as well as its implications on the different functions of monothiol and dithiol Grx and secondly, to identify new functions of the FeS-Grx in redox- or iron-dependent processes, like the differentiation of oligodendrocytes.

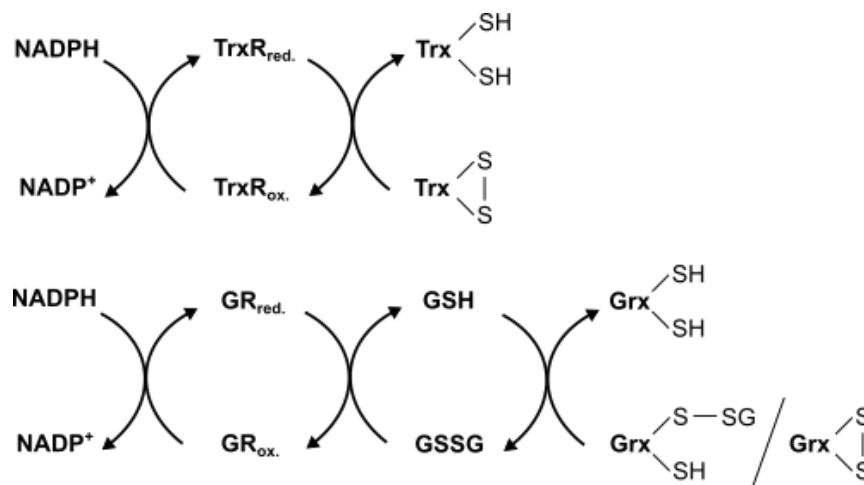
The findings demonstrate that an insertion of five amino acids enlarging a loop in monothiol Grx affects FeS cluster coordination. Consequently, a decreased FeS cluster stability was measured. Protein engineering of dithiol Grx2 with an exchange of the loop leads to a gain of function as FeS-transferase. Monothiol Grx5 with loop exchange and additional active site exchange switched its functions to an oxidoreductase. At the same time the proteins lost their original functions completely or in part when the loop was exchanged. In addition, we showed that Grx2 with the monothiol loop decreased the protective function of Grx2 in NO-detoxification. However, we were not able to show an impact of FeS coordination on the reaction of NO-detoxification or on potential products of this reaction. This thesis revealed further evidence of new functions of the FeS-Grx. Firstly, a de-persulfidation activity of Grx2 was shown *in vitro* and *in cellulo*, which suggests a regulatory function of Grx2 on persulfidated thiol switches. Grx2 and an inhibitor of ferroptosis revealed protective effects on myelin structure, whereas a ferroptosis inductor showed only minor effects. Furthermore, it has been shown, that decreased Grx3 levels in oligodendrocyte progenitor cells accelerated the differentiation. Decreased Grx5 levels lead to an impaired differentiation. *In vivo* experiments with reduced monothiol Grx level in zebrafish resulted in an unaffected myelination. Diminished expression of monothiol Grx revealed no effect on molybdenum cofactor biosynthesis.

In conclusion, an enlarged loop by five additional amino acids affects the FeS-cluster coordination in monothiol and dithiol Grx and provides a molecular explanation for the different functions of monothiol and dithiol Grx. Furthermore, Grx2 was identified as potential regulator of thiol persulfidation. The presented data suggest Grx3 as a potential target for the acceleration of oligodendrocyte progenitor cell differentiation, which could be beneficial for remyelination in demyelinating diseases.

## 1 Einleitung

### 1.1 Glutaredoxine

Glutaredoxine (Grx) gehören zu der Thioredoxin (Trx)-Proteinfamilie und sind wichtige Regulatoren von Redoxsignalwegen, indem sie Redoxreaktionen katalysieren<sup>1-4</sup>. In Redoxsignalwegen wird ein Signal in Form von redox-aktiven-, sekundären Botenstoffen, wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), reaktiven Stickstoffspezies (RNS) oder reaktiven Schwefelspezies (RSS), induziert, welche reversible posttranslationale Modifikationen an Aminosäureresten von Proteinen verursachen<sup>1</sup>. Die Produktion von ROS, RNS und RSS, sowie auch deren Elimination, erfolgt enzymatisch, beispielsweise durch NADPH-Oxidasen (NOX), Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen, Superoxiddismutasen oder Katalasen<sup>4-8</sup>. Cysteine stellen mit ihrer Thiolgruppe die Aminosäure zur Ausbildung eines gemischten Disulfids (R-S-S-X), eines S-Nitrosothiols (R-S-NO) oder eines Persulfids (R-S-SH) dar<sup>9-12</sup>. Glutaredoxine oder Thioredoxine können die genannten Modifikationen spezifisch reduzieren und sind damit Schlüsselemente von Redoxsignalwegen<sup>1,3,4</sup>. Mechanistisch entsteht bei der Reduktion dieser Cysteinmodifikationen ein Disulfid im aktiven Zentrum des Grx oder Trx, welches von der Thioredoxin-Reduktase (TrxR) bzw. Glutathion (GSH) reduziert wird (Abbildung 1). GSH oxidiert dabei zum Glutathiondisulfid (GSSG), welches von der Glutathion-Reduktase (GR) reduziert wird. Schließlich dient NADPH als Elektronenquelle zur Reduktion von TrxR und GR<sup>2-4,13</sup>.



**Abbildung 1: Das Thioredoxin- und Glutaredoxin-System reguliert den zellulären Redoxstatus.**

Thioredoxin (Trx) und Glutaredoxin (Grx) reduzieren Disulfidbrücken oder im Fall von Grx auch glutathionylierte Proteine, wodurch sie selbst oxidiert werden. Das Selenoprotein Thioredoxin-Reduktase (TrxR) reduziert Trx mithilfe des Elektronendonors NADPH. Oxidiertes Grx mit einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen des aktiven Zentrums oder eines glutathionylierten N-terminalen Cysteins des aktiven Zentrums wird durch Glutathion (GSH) reduziert. Oxidiertes Glutathiondisulfid (GSSG) wird von der Glutathion-Reduktase (GR) reduziert. NADPH dient als Elektronenquelle für GR. Abbildung angelehnt an Hanschmann et al.<sup>1</sup>.



Glutaredoxine weisen eine besondere Affinität für Glutathionylierungen und Deglutathionylierungen auf<sup>14</sup>. Die Substratspezifität von Trx und Grx kann mithilfe der Komplementarität der elektrostatischen Oberfläche von Protein und Substrat beschrieben werden<sup>15,16</sup>. Wie bei allen Mitgliedern der Trx-Familie folgt die Tertiärstruktur von Glutaredoxinen der Thio-redoxinfaltung<sup>17,18</sup>. Das charakteristische Motiv der Thio-redoxinfaltung zeichnet sich durch vier  $\beta$ -Faltblätter und drei  $\alpha$ -Helices aus<sup>18,19</sup>. Es ist unter anderem auch in Proteinfamilien wie den Glutathionperoxidasen (GPx), Peroxiredoxinen<sup>20,21</sup> oder Glutathion-S-Transferasen<sup>22</sup> zu finden<sup>23,24</sup>. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit stellen die Glutaredoxine eine eigene heterogene Proteinfamilie dar<sup>3,18,24</sup>.

### 1.1.1 Glutaredoxin Klassifizierung

1976 beschrieb und benannte Arne Holmgren die Glutaredoxine als Glutathion-abhängige Elektronendonatoren für die Ribonukleotid-Reduktase<sup>25,26</sup>. Glutaredoxine werden traditionell anhand der Anzahl ihrer Cysteine im aktiven Zentrum in dithiol- und monothiol-Glutaredoxine unterschieden<sup>3,27</sup>. Die dithiol-Glutaredoxine besitzen ein CxxC-Motiv in ihrem aktiven Zentrum und katalysieren Glutathion-abhängig Thiol-Disulfid-Oxidoreduktionen<sup>28,29</sup>. Sie sind in der Lage Disulfide in Proteinen oder gemischte Disulfide aus Glutathion und Proteinthiolen zu reduzieren<sup>14,30</sup>. Monothiol-Glutaredoxine zeichnen sich in der Regel durch ein CGFS-Motiv im aktiven Zentrum aus und sind mit wenigen Ausnahmen inaktiv als Oxidoreduktasen<sup>27,31–33</sup>. Stattdessen weisen die monothiol-Glutaredoxine Funktionen in der FeS-Zentrum-Biosynthese und Eisenhomöostase auf<sup>31,34–39</sup>.

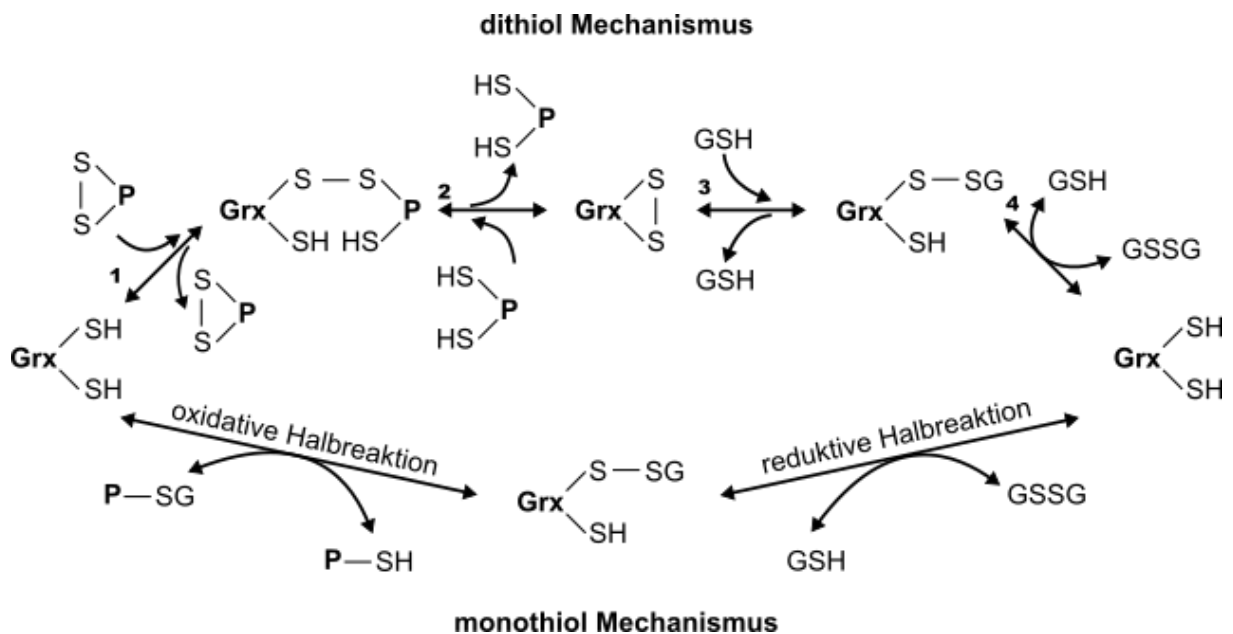
### 1.1.2 Dithiol- und monothiol-Mechanismus

Die Glutaredoxin-katalysierten Reaktionen folgen einem dithiol-Mechanismus zur Reduktion von Disulfidbrücken in Proteinen und einem monothiol-Mechanismus zur Reduktion von Disulfidbindungen zwischen Cysteinen in Proteinen und niedermolekularen Thiolverbindungen<sup>3,9</sup>.

Die Reduktion von inter- oder intramolekularen Disulfidbindungen in Proteinen verläuft nach dem dithiol-Mechanismus und setzt zwei Cysteine im aktiven Zentrum voraus. Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff des N-terminalen Cysteins am Schwefelatom der Proteindisulfidbrücke (Abbildung 2). Dieses N-terminale, katalytische Cystein weist einen niedrigen  $pK_S$ -Wert auf, wodurch der nukleophile Angriff begünstigt wird<sup>3,32,40,41</sup>. Nach der Bildung eines trigonal bipyramidalen Übergangszustandes entsteht das erste freie Thiol am Substrat und es entsteht eine intermolekulare Glutaredoxin-Substrat-Disulfidbindung<sup>42</sup>. Im zweiten Schritt greift das C-terminale Cystein des aktiven Zentrums die Substrat-Glutaredoxin-

Bindung an, wodurch das Substrat mit reduzierten Thiolen freigegeben wird. Zudem entsteht eine Disulfidbindung zwischen den Cysteinen des aktiven Zentrums. Zur Reduktion des Glutaredoxins bildet sich ein gemischtes Disulfid zwischen dem N-terminalen Cystein und einem Glutathion (Schritt 3), welches mit einem zweiten Glutathion unter der Bildung von Glutathiondisulfid (GSSG) reduziert wird (Schritt 4)<sup>3,9,43</sup>.

Glutathionylierungen und Deglutathionylierungen verlaufen nach dem monothiol-Mechanismus, siehe Abbildung 2. Der erste Schritt verläuft wie beim dithiol-Mechanismus über einen nukleophilen Angriff des N-terminalen Cysteins auf die Disulfidbindung des gemischten Disulfids. Dabei bindet das Glutathion des glutathionylierten Substrats an die erste Glutathion-Bindetasche des Glutaredoxins. In dieser oxidativen Halbreaktion verbleibt das Glutathion an dem katalytischen Cystein des Glutaredoxins und das Substrat wird reduziert. In der darauffolgenden reduktiven Halbreaktion wird das Glutaredoxin mithilfe eines Glutathions und unter Freisetzung eines GSSG reduziert. Zur Aktivierung des Glutathions bindet dieses zuvor an der zweiten Glutathion-Bindetasche des Glutaredoxins<sup>44</sup>. Das in beiden Mechanismen entstehende GSSG wird mithilfe der Glutathion-Reduktase und NADPH als Elektronenquelle zu GSH reduziert, siehe Abbildung 1<sup>3,9,43</sup>. Alternativ zu GSH kann Glutaredoxin 2 auch Elektronen von der Thioredoxin-Reduktase akzeptieren<sup>45</sup>.



**Abbildung 2: Dithiol- und monothiol-Mechanismus der Glutaredoxine.**

Disulfidbindungen in Proteinen werden über den dithiol-Mechanismus reduziert. Reduziertes Grx bildet eine Disulfidbindung mit dem Substratprotein (P) (1). Das C-terminale Cystein bildet eine intramolekulare Disulfidbindung und gibt das reduzierte Substrat frei (2). Das oxidierte Grx wird mit zwei GSH-Molekülen reduziert (3, 4). Deglutathionylierungen erfolgen nach dem monothiol-Mechanismus. In der oxidativen Halbreaktion entsteht ein glutathionyliertes Grx und das Substrat wird freigesetzt. Für die Grx-Reduktion bindet ein GSH an der zweiten GSH-Bindestelle des Grx und reduziert dieses. GSSG wird freigesetzt und über die Glutathion-Reduktase (GR) reduziert siehe Abbildung 1. Die Reaktionen sind reversibel. Abbildung angelehnt an Lillig et al.<sup>3</sup>.

Die in Abbildung 2 dargestellten Reaktionen der Glutaredoxine sind im Prinzip reversibel. Glutaredoxine könnten bei niedrigen GSH/GSSG-Verhältnissen die Rückreaktion katalysieren und damit Proteine glutathionylieren<sup>3,46-48</sup>.

### 1.1.3 Glutaredoxin Isoformen

Heutzutage sind vier verschiedene Glutaredoxine in Säugetieren bekannt. Das hauptsächlich zytosolisch lokalisierte Grx1 besitzt ein aktives Zentrum mit einer konservierten CPYC-Sequenz, wohingegen die Sequenz im aktiven Zentrum von Grx2 eine Permutation von Prolin zu Serin aufweist<sup>29</sup>. Das Serin im aktiven Zentrum von Grx2 führt im Vergleich zu dem Prolin in Grx1 zu einer höheren Affinität und gleichzeitig zu einer niedrigeren katalytischen Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) bei glutathionylierten Substraten<sup>45</sup>. Grx1 vermittelt Redox-Signale, beispielsweise in der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -induzierten Apoptose über die Deglutathionylierung und damit Aktivierung von Caspase 3<sup>49</sup>. Außerdem ist Grx1 ein Elektronendonator für die Ribonukleotid-Reduktase<sup>25</sup>. Grx1-defiziente Mäuse sind vital und zeigten keine kompensatorische Deglutathionylierungsaktivität<sup>50</sup>. Von Grx2 liegen verschiedene Isoformen vor. Die in den Mitochondrien lokalisierte Isoform Grx2a aus Mensch, Maus und Ratte besitzt eine N-terminale mitochondriale Transitsequenz<sup>51</sup>. Die Übereinstimmung von Grx2 in Menschen, Mäusen und Ratten beträgt in der Primärsequenz ca. 70 %<sup>29</sup>. Neben der ubiquitären Isoform Grx2a sind die humanen Isoformen Grx2b und Grx2c zytosolisch und nukleär lokalisiert<sup>52</sup>. Das zytosolische murine Grx2c ist homolog zum humanen Grx2c und beide Grx2c-Isoformen sind identisch zur mitochondrialen Isoform nach Abspaltung der Transitsequenz von Grx2a. Grx2 ist wichtig für die mitochondriale Redoxhomöostase, indem es unter anderem die Oxidation von Cardiolipin verhindert und Komplex I redox-reguliert<sup>48,53,54</sup>. Ein Grx2-Mangel in Zebrafischen führt zu einer beeinträchtigten Embryonalentwicklung des Gehirns, der Gefäße und des Herzens<sup>55-57</sup>. In der embryonalen Entwicklung kontrolliert Grx2 das Axonwachstum durch einen Dithiol-Disulfid-Schalter in *collapsin response mediator protein 2* (CRMP2) und die embryonale Angiogenese durch die reversible S-Glutathionylierung der Histondeacetylase Sirtuin 1<sup>55,56,58</sup>. Die Defekte in der Herzentwicklung bei Grx2-Mangel resultieren aus der beeinträchtigten Zellmigration von Neuralleistenzellen<sup>57</sup>. Diese Daten deuten auf eine wichtige Funktion von Grx2 als Regulator in der Organisation des Zytoskeletts hin, die bekanntermaßen redox-reguliert ist<sup>59</sup>. Dies wird weiterhin unterstützt durch eine veränderte Morphologie Grx2-überexprimierender Zellen und der Migration von Krebszellen<sup>60</sup>.

Das zytosolische Grx3 wurde erstmals als Interaktionspartner der Proteinkinase C identifiziert und zunächst als Proteinkinase C-interagierender Cousin von Thioredoxin (PICOT) benannt<sup>61</sup>.

Im Gegensatz zu den anderen Glutaredoxinen im Säugetier besitzt das monothiol-Grx3 zwei Glutaredoxindomänen mit CGFS-Motiven und eine N-terminale redoxinaktive Thioredoxindomäne<sup>62</sup>. Grx3 ist essenziell während der embryonalen Entwicklung und reguliert außerdem das Zellwachstum von Krebszellen sowie deren Metastasierung<sup>63-67</sup>. Eine Überexpression von Grx3 in T-Lymphozyten führt zur Inhibition der c-Jun N-terminalen Kinase und den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B<sup>61</sup>. Außerdem ist die Expression von Grx3 nach verschiedenen Stimuli für kardiale Hypertrophie *in vitro* und *in vivo* in Kardiomyozyten hochreguliert, wodurch Grx3 eine Rolle in der kardialen Hypertrophie zugesprochen wird<sup>68</sup>. Zudem führt ein Grx3-Mangel zu einer gestörten Eisenhomöostase, siehe Abschnitt 1.3.2<sup>37</sup>.

Das monothiol-Grx5 ist in den Mitochondrien lokalisiert und besitzt ein aktives Zentrum mit CGFS-Motiv<sup>69</sup>. Grx5 weist in verschiedenen Organismen Funktionen in der FeS-Zentrum-Biosynthese und der Hämsynthese auf, siehe Abschnitt 1.3.2<sup>34,36,38,69-71</sup>. Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Homologe des Grx5 sind in der Lage Grx5 in *Saccharomyces cerevisiae* funktional zu komplementieren, was auf eine funktionale Konservierung hindeutet<sup>72</sup>. Eine Komplementierung von Grx5-depletiertem *Danio rerio* mit humanem, murinem und aus Hefe stammendem Grx5 wurde ebenfalls gezeigt<sup>36</sup>. Ein Grx5-Mangel im Menschen führt zur sideroblastischen Anämie, welche in Abschnitt 1.3.2 näher erläutert wird. Eine Aminosäuredeletion in Glutaredoxin 5 führt in Patientenfibroblasten zu einer gestörten Lipoylierung von mitochondrialen Proteinen<sup>73</sup>. Wahrscheinlich hat Grx5 eine Funktion in der Bereitstellung eines FeS-Zentrums für die Liponsäure-Synthase<sup>73</sup>. Ein Grx5-Mangel in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu einer hohen Sensitivität gegenüber oxidativen Stressoren und Eisenakkumulationen in den Mitochondrien<sup>74</sup>.

### 1.2 Eisen-Schwefel-Zentren

FeS-Zentren können in verschiedenen Strukturen und Oxidationszuständen vorliegen, wodurch sie strukturell und funktionell sehr vielfältig sind<sup>75,76</sup>. Von den verschiedenen FeS-Zentren sind die 2Fe2S- und 4Fe4S-Zentren am weitesten verbreitet<sup>77</sup>. Zudem können sie mit anderen Übergangsmetallen, wie z.B. Molybdän oder Nickel, größere Kofaktoren bilden<sup>78,79</sup>. Der Eisen-Molybdän-Kofaktor (FeMo-Co) kommt in der Natur ausschließlich in der bakteriellen Molybdän-Nitrogenase vor<sup>80,81</sup>. Bei dem zweiten Molybdän-Kofaktorkonstrukt, dem sogenannten Molybdän-Kofaktor (MoCo), wird das Molybdän in einer konservierten Biosynthese in einem Pterin-basierten Gerüst gebunden<sup>81,82</sup>. Die MoCo-Biosynthese ist

abhängig von FeS-Zentrum-koordinierenden Enzymen<sup>80</sup>. Molybdän ist ein essenzielles Spurenelement und führt bei einem Mangel zu der letalen Molybdän-Kofaktor-Defizienz<sup>80</sup>.

### 1.2.1 FeS-Zentrum-Biosynthese

Die FeS-Zentrum-Biosynthese findet in den nicht-pflanzlichen Eukaryoten in der ISC (*iron-sulfur cluster*)-Assemblierungsmaschinerie in den Mitochondrien statt<sup>83</sup>. Der Zusammenbau des initialen 2Fe2S-Zentrums erfolgt an den Cysteinen des Gerüstproteins ISCU2, welches in einem Proteinkomplex mit NFS1, ISD11, Frataxin und ACP vorliegt<sup>84,85</sup>. Das benötigte Sulfid wird mithilfe der Cysteindesulfurase NFS1 von Cystein abstrahiert und die notwendigen Elektronen stammen von Ferredoxin<sup>83,85</sup>. Die Eisenquelle und die genaue Funktion des Frataxins in diesem initialen Schritt wurden viel untersucht und sind bisher nicht eindeutig zugeordnet<sup>83,84,86</sup>. Experimente im Hefemodell zeigen, dass das Isu1 (ISCU2 in Säugetieren) gebundene 2Fe2S-Zentrum Chaperon-vermittelt auf Grx5 transferiert wird und anschließend von Grx5 in mitochondriale apo-Proteine integriert wird<sup>70,87</sup>. Diese Transferfunktion von Grx5 wird aufgrund seiner Konservierung auch in anderen Organismen angenommen<sup>3,36,69,71,72</sup>. Die 4Fe4S-Zentrum-Synthese erfolgt in den Mitochondrien wahrscheinlich auf der Basis von 2Fe2S-Zentren<sup>85,88</sup>.

Die FeS-Zentrum-Prozessierung in Zytosol und Nukleus erfolgt über die CIA (*cytosolic iron-sulfur protein assembly*)-Maschinerie<sup>83</sup>. Der genaue Mechanismus der Prozessierung extramitochondrialer FeS-Proteine ist noch unklar und wird diskutiert. Basierend auf Experimenten in Säugetierzellen wurde das Modell beschrieben, dass parallel zur mitochondrialen FeS-Zentrum-Biosynthese eine zytosolische *de novo* FeS-Zentrum-Synthese mit den zytosolischen Isoformen der FeS-Biosynthese abläuft<sup>89,90</sup>. Anschließend werden die synthetisierten 2Fe2S-Zentren mithilfe eines Chaperonkomplexes direkt in apo-Proteine, wie z.B. Grx3 oder dem NUBP1/NUBP2-Komplex, inseriert<sup>89</sup>. Im Hefe-Modell wurde eine Abhängigkeit der Reifung zytosolischer und nukleärer FeS-Proteine von der mitochondrialen ISC-Maschinerie dargestellt<sup>91-93</sup>. Zudem wird beschrieben, dass ein essentieller schwefel-haltiger Baustein aus den Mitochondrien über die ISC-Exportmaschinerie zu der CIA-Maschinerie exportiert wird<sup>83,85</sup>. Weiterhin wird genannt, dass dieser Baustein zur Assemblierung eines 2Fe2S-Zentrums in einem Grx3-Homodimer oder [Grx3 BolA2<sub>2</sub>]-Heterotrimer verwendet wird<sup>85</sup>. Zusätzlich kann Grx3 eine frühe FeS-Zentrum-Transferfunktion in der zytosolischen FeS-Zentrum-Assemblierung zugeordnet werden, da es in einem Komplex mit BolA2 als Chaperon 2Fe2S-Zentren in apo-Proteine inseriert<sup>94,95</sup>.

### 1.2.2 Eisenhomöostase

Freies zweiwertiges Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in der Zelle ist aufgrund der Fenton-Reaktion hoch toxisch. In der Fenton-Reaktion kann  $\text{Fe}^{2+}$  mit Wasserstoffperoxid zu den hochreaktiven Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\cdot$ ) reagieren, welches die umliegenden Biomoleküle unkontrolliert oxidiert<sup>96</sup>. Defekte in der Eisenregulation sind mit verschiedenen Krankheiten verbunden, wie Friedreich-Ataxie, Sideroblastischer Anämie, Hämochromatose<sup>71,97-99</sup>. Bei Morbus Parkinson wird über die Rolle des Eisens als Ursache oder Folge der Erkrankung diskutiert<sup>100</sup>. Zum Schutz vor diesen hoch reaktiven Sauerstoffspezies haben sich im Verlauf der Evolution viele Mechanismen zur Kontrolle von intrazellulärem Eisen entwickelt. Vertebraten weisen ein posttranskriptionales System über das *iron regulatory protein 1* (IRP1) und IRP2 zur Regulation der Eisenhomöostase auf<sup>3</sup>. IRP1 und IRP2 können an *iron regulatory elements* (IREs), welche eine Haarnadelstruktur ausbilden, an mRNS binden. Die Bindung an ein einzelnes IRE im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) inhibiert die Initiation der Translation, z.B. bei Ferritin, ALAS2 oder Hif2 $\alpha$ . Im Gegensatz dazu stabilisiert die Bindung von IRP an mehrere IREs im 3'-UTR die mRNS und schützt diese vor dem Abbau, z.B. bei Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1)<sup>101,102</sup>.

IRP1 ist ein bifunktionales 4Fe4S-Zentrum Protein, welches in seiner holo-Form zur zytosolischen Aconitase wird. Während eines Eisenmangels liegt IRP1 als apo-Protein vor und nimmt die IRE-bindende Konformation zur Regulation der Eisenhomöostase ein<sup>103</sup>. IRP2 hingegen wird bei ausreichenden Eisenkonzentrationen proteasomal degradiert<sup>104,105</sup>. Eine beeinträchtigte FeS-Zentrum-Biosynthese durch Grx5-Mangel führt zur Aktivierung der IRE-bindenden Funktion von IRP1 mit der Folge, dass die  $\delta$ -Aminolävulinatsynthase (ALAS2) in ihrer Translation inhibiert wird<sup>36,69</sup>. ALAS2 ist das erste Enzym in der Häm-Biosynthese in erythroiden Zellen und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor dar<sup>102</sup>. Folglich hängt die Häm-Synthese von der FeS-Zentrum-Synthese ab, zumal auch das letzte Enzym der Häm-Synthese, die Ferrochelatase, ein FeS-Zentrum-Protein ist<sup>36,106,107</sup>.

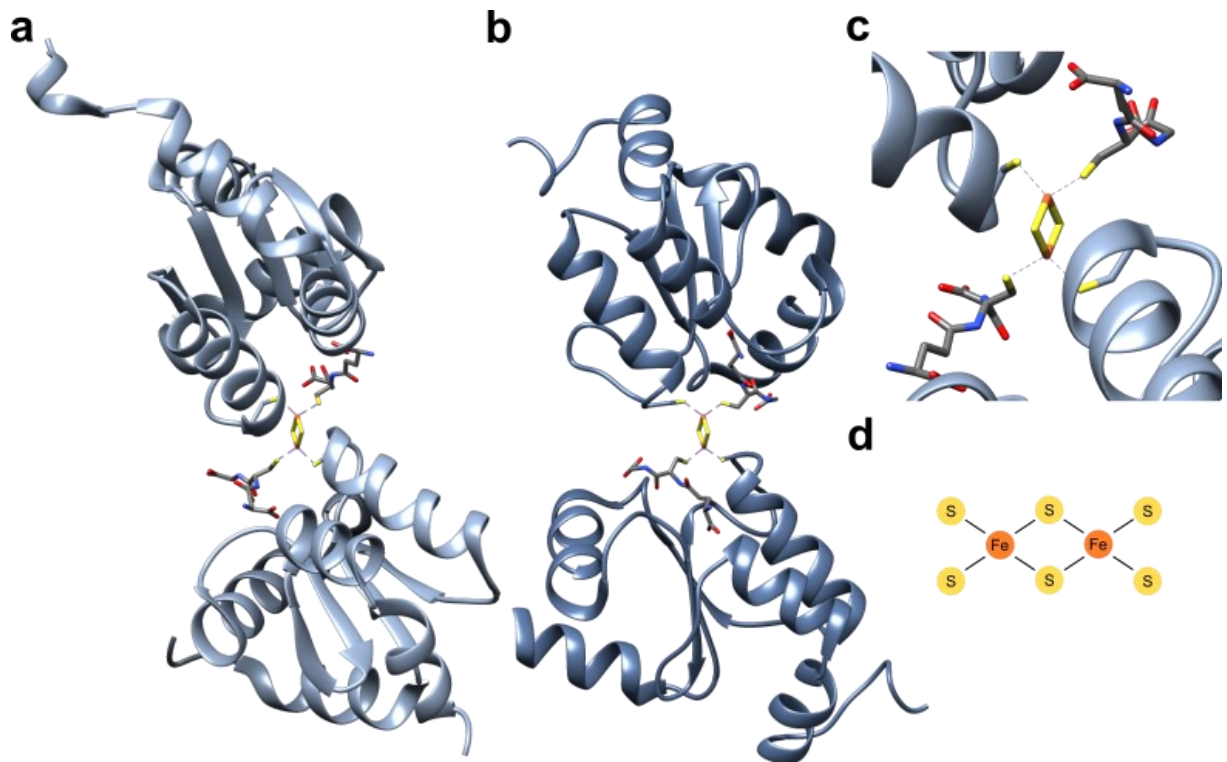
### 1.2.3 Funktionen von FeS-Zentrum-Proteinen

FeS-Zentrum-Proteine sind die fundamentalen Komponenten für den Elektronentransfer in der Atmungskette, der Photosynthese und in der Nitratfixierung<sup>76</sup>. Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex1) der Atmungskette ist einer der größten membrangebundenen Proteinkomplexe mit acht bis neun FeS-Zentren<sup>108</sup>. Neben der Funktion in Elektronentransportketten sind FeS-Zentren in aktiven Zentren zur Bindung und Aktivierung von Substraten beteiligt, wie beispielsweise zur Abstraktion einer Hydroxylgruppe des

Substrats der Aconitase<sup>75,109</sup>. Zudem können die FeS-Zentren als Sensoren für oxidativen Stress, Sauerstoff oder Eisen fungieren und die Genexpression oder Enzymaktivität regulieren, wie beispielsweise bei Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT) oder IRP1<sup>110-112</sup>. Ferner verfügen Enzyme in der Kofaktorsynthese über ein FeS-Zentrum, z.B. MOCS1A in der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese<sup>113</sup>.

### 1.2.4 FeS-Zentrum-koordinierende Glutaredoxine

Das humane Grx2 wurde als erstes FeS-Zentrum-koordinierendes Protein der Trx-Proteinfamilie identifiziert<sup>114,115</sup>. Humanes Grx2 bindet ein 2Fe2S-Zentrum als Brücke zwischen zwei Glutaredoxinmonomeren (Abbildung 3)<sup>114</sup>. Dabei wird das 2Fe2S-Zentrum von den N-terminalen Cysteinen des aktiven Zentrums und den Cysteinen von zwei nicht kovalent gebundenen GSH-Molekülen koordiniert<sup>115,116</sup>. Dieses GSH ist in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem freien GSH, wodurch das FeS-Zentrum in einer Reaktion erster Ordnung stabilisiert wird, während GSSG diesen zerstört<sup>42,114,115</sup>. Der Zerfall des FeS-Zentrums unter oxidativem Stress führt zur Freilegung des katalytischen Cysteins und folglich zur Aktivierung der Oxidoreduktaseaktivität des Grx, wodurch Grx2 eine Funktion als Redoxsensor zugesprochen wird<sup>114,115</sup>. Die Monomere im holo-Komplex weisen zueinander eine Wasserstoffbrückenbindung und zwei hydrophobe Interaktionen auf, während alle anderen Interaktionen das GSH einschließen. Die GSH-Moleküle schützen das FeS-Zentrum weitestgehend vor der Umgebung, sodass direkte Interaktionen von Eisen mit Wasserstoffperoxid verhindert werden können<sup>3</sup>.



**Abbildung 3: Strukturen und FeS-Zentrum-Koordination von Grx2 und Grx5.**

Dreidimensionale Struktur von humanem Grx2 (PDB: 2ht9) (a) und humanem Grx5 (PDB: 2wul) (b) als FeS-Zentrum-koordinierende Dimere. Das FeS-Zentrum ist gelb dargestellt und Glutathion grau. (c) Das 2Fe2S-Zentrum wird von zwei Glutathion-Molekülen (grau) und dem katalytischen Cystein von jedem Monomer koordiniert. (d) Koordination eines 2Fe2S-Zentrums mit vier Schwefelliganden. Die Strukturen wurden mithilfe von UCSF Chimera dargestellt<sup>117</sup>.

Humanes monothiol-Glutaredoxin 3 koordiniert zwei 2Fe2S-Zentren in einem Homodimer mit den Cysteinen seiner Glutaredoxindomänen und nicht-kovalent gebundenem GSH<sup>62</sup>. Monothiol-Glutaredoxin 5 koordiniert das 2Fe2S-Zentrum ebenso wie Grx2 mit den N-terminalen Cysteinen und zwei GSH-Molekülen im Dimer. Des Weiteren offenbarte die Kristallstruktur, dass zwei FeS-Zentren-Homodimere miteinander interagieren und *in vitro* ein Tetramer bilden können<sup>118</sup>.

Während die humanen Glutaredoxine 2, 3 und 5 ein FeS-Zentrum koordinieren, ist Grx1 mit dem CPYC-aktiven Zentrum nicht dazu in der Lage (Tabelle 1). Ein mögliches Kriterium zur FeS-Zentrum-Koordination in Glutaredoxinen ist der Austausch des Prolins in dem aktiven Zentrum. Die konformative Rigidität des Prolins könnte dabei lokale Konformationsänderungen verhindern und eine Substitution des Prolins mit einem Serin oder Glycin die Flexibilität für das Peptidrückgrat erhöhen<sup>115,116,119,120</sup>. Zudem könnte das konservierte *cis*-Prolin eine FeS-Zentrum-Koordination verhindern<sup>121</sup>.



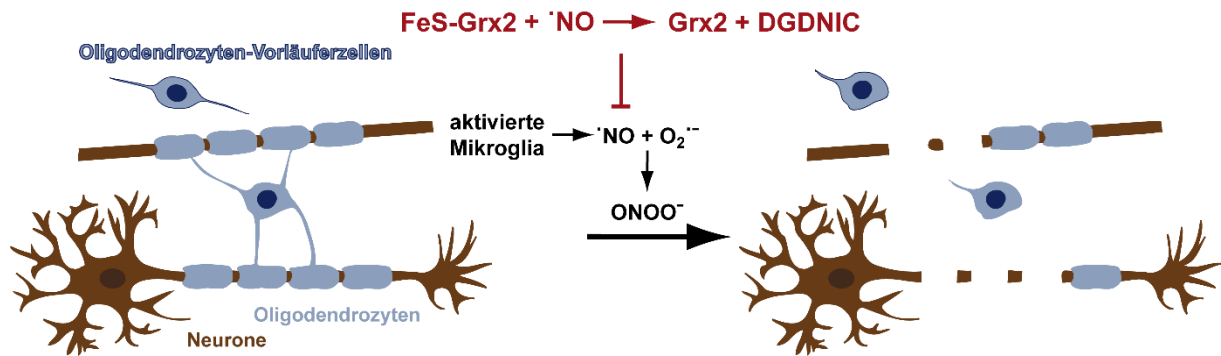
**Tabelle 1:** Glutaredoxine ihr aktives Zentrum und ihre FeS-Zentren in *Homo sapiens*.

| <b>Organismus</b>   | <b>Protein</b> | <b>FeS-Zentren</b> | <b>Aktives Zentrum</b> | <b>Referenz</b> |
|---------------------|----------------|--------------------|------------------------|-----------------|
| <i>Homo sapiens</i> | Grx1           | -                  | CPYC                   | 122             |
| <i>Homo sapiens</i> | Grx2           | 2Fe2S              | CSYC                   | 116             |
| <i>Homo sapiens</i> | Grx3           | 2 x 2Fe2S          | 2 x CGFS               | 62              |
| <i>Homo sapiens</i> | Grx5           | 2Fe2S              | CGFS                   | 118             |

### 1.3 Funktionen des FeS-Zentrums in Glutaredoxinen

#### 1.3.1 Dithiol-FeS-Glutaredoxine als Redoxsensor oder Schutz vor $\cdot\text{NO}$

Glutaredoxin 2 ist im Säugetier das einzige dithiol-Glutaredoxin mit einem FeS-Kofaktor. In Zellen liegt Grx2 hauptsächlich in seiner holo-Form vor<sup>114,123</sup>. Mithilfe seiner Oxidoreduktaseaktivität modifiziert Grx2 Thiol-Zustände in Zielproteinen und reguliert damit unter anderem die embryonale Entwicklung des Gehirns, des Gefäßsystems und des Herzens<sup>55-57</sup>. Für diese Funktionen wird das katalytisch aktive apo-Grx2 vorausgesetzt. Das FeS-Zentrum könnte als Redoxsensor agieren, indem sein Zerfall unter ROS, RNS oder geringen GSH-Konzentrationen zur Aktivierung der Glutaredoxine führt und damit zelluläre Prozesse reguliert<sup>114,115</sup>. Eine andere definierte Funktion des FeS-Zentrums in Grx2 ist die protektive Funktion in Oligodendrozyten gegenüber erhöhten Stickstoffmonoxidradikal- ( $\cdot\text{NO}$ )-Konzentrationen durch aktivierte Mikroglia<sup>124</sup>. Neuroinflammation, wie bei der Multiplen Sklerose, ist durch aktivierte,  $\cdot\text{NO}$ -produzierende Mikroglia charakterisiert<sup>125,126</sup>. Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des zentralen Nervensystems und sind wie auch ihre Vorläuferzellen (Oligodendrozyten-Vorläuferzellen) empfindlich gegenüber Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), der Verbindung aus  $\cdot\text{NO}$  und Superoxidation ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )<sup>127,128</sup>. Hohe intrazelluläre Konzentrationen von Eisen, welches für die Cholesterol- und Lipidsynthese zur Myelinisierung von Axonen benötigt wird, und hohe Konzentrationen von ungesättigten Fettsäuren in Oligodendrozyten erhöhen die Sensitivität gegenüber oxidativer Beschädigung<sup>126,129</sup>. Holo-Grx2 inhibiert die Bildung von zelltoxischem Peroxynitrit dadurch, dass  $\cdot\text{NO}$  mit seinem 2Fe2S-Zentrum einen Dinitrosyl-Diglutathionyl-Eisen-Komplex (DGDNIC) bildet (Abbildung 4)<sup>124</sup>. Erhöhte Grx2-Level in organotypischen Schnittkulturen erhalten die Myelinstruktur auch unter erhöhten  $\cdot\text{NO}$ -Konzentrationen durch aktivierte Mikroglia oder  $\cdot\text{NO}$ -Donatoren<sup>124</sup>.



**Abbildung 4: Schutz von Oligodendrozyten gegenüber Peroxynitrit durch holo-Grx2.**

Neuroinflammation führt zu aktivierten Mikroglia, welche  $\cdot\text{NO}$  produzieren.  $\cdot\text{NO}$  reagiert mit Superoxidanion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) zu dem zelltoxischen Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Holo-Grx2 (FeS-Grx2) inhibiert die Bildung von Peroxynitrit durch die Reaktion seines FeS-Zentrums mit  $\cdot\text{NO}$  zu einem Dinitrosyl-Diglutathionyl-Eisen-Komplex (DGDNIC).

### 1.3.2 Monothiol-Glutaredoxine in der Eisenhomöostase

Monothiol-FeS-Grx3 hat wichtige Funktionen in der Eisenhomöostase. Eine Herabsetzung des Expressionslevels von Grx3 führt zu einer beeinträchtigten Eisenhomöostase, die sich in einer verringerten Aktivität von zytosolischen, eisenabhängigen Enzymen und einem leichten Aktivitätsverlust mitochondrialer, eisenabhängiger Enzyme äußert, während die Eisenaufnahme erhöht ist. Ein Grx3-Mangel führt unabhängig von IRP1 zu einem Verlust von Häm im Zebrafisch<sup>37</sup>. Die Entfernung von zytosolischen monothiol-Glutaredoxinen in *Saccharomyces cerevisiae* (Grx3 und Grx4) führt zu Beeinträchtigungen von eisenabhängigen Reaktionen in den Mitochondrien, dem Zytosol und dem Nukleus. Die Synthese von FeS-Zentren und Häm sind, trotz erhöhter zytosolischer Eisenkonzentrationen, ineffizient. Anhand dessen wird den zytosolischen monothiol-FeS-Glutaredoxinen eine Funktion als Eisensensor und in der intrazellulären Verteilung von Eisen zugeordnet<sup>39</sup>.

Das monothiol-FeS-Grx5 hat ebenfalls wichtige Funktionen in der Eisenhomöostase und speziell in der Assemblierung von FeS-Zentrum-Proteinen. Ein durch eine stille Mutation in der mRNA hervorgerufener Mangel an Grx5 führt zur sideroblastischen Anämie und zu einem Eisenüberschuss in einem Patienten<sup>71</sup>. Außerdem wurden bei einem Patienten mit sideroblastischer Anämie Punktmutationen von konservierten Aminosäuren (K101Q und L148S) in Grx5 identifiziert, bei denen eine gestörte FeS-Zentrum-Bindung und -Transfer vermutet wird<sup>130,131</sup>. Eine verminderte Grx5-Expression in Zebrafischen führt zu Beeinträchtigungen in der FeS-Zentrum-Synthese und nachfolgend zu einem Häm-Defizit<sup>36</sup>. Die Zellen eines Grx5-defizienten Patienten zeigen erhöhte IRE-Bindungsaktivitäten und verringerte Aconitase-Aktivitäten. Der Mangel an Grx5 äußert sich in einer gestörten FeS-Zentrum-Biosynthese, was zur Aktivierung der IRE-Bindung von IRP1 führt<sup>69</sup>. Ein Grx5-Mangel in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu einer Eisenanreicherung und einer Inaktivität von eisenabhängigen Enzymen<sup>34</sup>. In Hefe erhält Grx5 das *de novo* synthetisierte 2Fe2S-Zentrum

von Isu1 mithilfe des Chaperons Ssq1 und Grx5 transferiert dieses in apo-Proteine<sup>87</sup>. Eine Voraussetzung für den effizienten Transfer ist die strukturelle Plastizität des dimeren Grx5. Banci et al. beschreiben, dass es zu einer Protein-Protein Erkennung kommt, bei dem sich ein FeS-Zentrum medierte, transientes Protein-Protein Intermediat bildet<sup>132</sup>.

### 2 Zielsetzung

Die Proteinfamilie der Glutaredoxine (Grx) wird anhand ihres aktiven Zentrums in zwei Klassen, die dithiol- und die monothiol-Grx, unterteilt. Trotz ihrer sehr ähnlichen Struktur haben sie unterschiedliche Funktionen, entweder in der Signalübertragung als Oxidoreduktase oder in der Eisenhomöostase und sie können einander nicht kompensieren<sup>133</sup>. Eines der beiden dithiol-Grx und beide monothiol-Grx der Säugetiere koordinieren ein FeS-Zentrum, welches ebenfalls unterschiedliche Aufgaben hat. In dithiol-Grx agiert das FeS-Zentrum als Redoxsensor, da oxidativer/nitrosativer Stress zur Deassemblierung des FeS-Zentrums führt und damit zur Transformation von  $\text{NO}$  in stabile, nicht toxische Verbindungen und zur Aktivierung der Oxidoreduktasefunktion<sup>114,115,124</sup>. In monothiol-Grx dient das FeS-Zentrum dem FeS-Zentrum-Transfer und der Insertion des Kofaktors in Ziel-apo-Proteine<sup>87,94,134</sup>. Warum dithiol- und monothiol-Grx bei sehr ähnlichen Strukturen unterschiedliche Funktionen haben, wurde bisher nicht identifiziert. Deshalb führte dies zur Fragestellung, welche strukturellen Schlüsselemente über die Funktion der Glutaredoxine in der Signalübertragung oder im FeS-Transfer entscheiden und welchen Einfluss die FeS-Zentrum-Koordination auf die Funktionen der Glutaredoxine hat.

Zur Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung von der Kofaktor-Koordination und den Funktionen der FeS-Glutaredoxine, sowie zur Identifikation neuer Funktionen wurden folgende Zielsetzungen aufgestellt:

- Charakterisierung des Einflusses der Proteinstruktur auf die FeS-Zentrum-Koordination in dithiol- und monothiol-Glutaredoxinen.
- Erläuterung des Einflusses unterschiedlicher FeS-Zentrum-Koordinationen auf die bekannten Funktionen von monothiol- und dithiol-Glutaredoxinen.
- Identifikation neuer Funktionen der FeS-Glutaredoxine in redox- und eisenabhängigen Prozessen. Rolle der Glutaredoxine in der Regulation von Persulfidierungen und Ferroptose, sowie in der Differenzierung von Oligodendrozyten und der Myelinisierung. Charakterisierung potenzieller Interaktionen von FeS-Grx und der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese.

Anhand dieser Untersuchungen soll die Beziehung von Proteinstruktur und Kofaktorkoordination auf die Funktionen der Glutaredoxine auf molekularer Ebene erläutert werden und der Einfluss der FeS-Glutaredoxine in physiologischen und pathologischen Prozessen untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

| Stamm             |   |
|-------------------|---|
| BL21(DE3)pRIL     | <i>hasdS gal</i> ( $\lambda$ Its857 <i>ind</i> 1 <i>Sam</i> 7 <i>nin</i> 5 <i>lac</i> UV5-T7 <i>gene</i> 1)   |
| DH 5 $\alpha$     | F $^-$ $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1<br><i>hsdR</i> 17 (rK $^-$ , mK $^+$ ) <i>phoA</i> supE44 $\lambda^-$ <i>thi</i> -1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1 |
| BL25113 wt        | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Alexios Vlamis-Gardikas, Patras, Griechenland <sup>31,135</sup>  |
| BL25113 GrxD $^-$ | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Alexios Vlamis-Gardikas, Patras, Griechenland <sup>31,135</sup>  |

##### 3.1.2 Zelllinien

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Zelllinien.

|              | Eigenschaften  |
|--------------|--|
| HeLa         | Humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen   |
| HeLa Grx3 KO | Humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen mit Grx3-Depletion freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher Horst Lillig, Greifswald |

#### 3.1.3 Plasmidkonstrukte

**Tabelle 4:** Übersicht der verwendeten Expressionsvektoren zur heterologen Expression in *E.coli*.

| <b>Bezeichnung</b> | <b>Vektor</b> | <b>Eigenschaften</b>   | <b>Referenz</b>   |
|--------------------|---------------|--|---|
| Leervektor         | pET-15b       | T7 Promotor, Lac-Operon, His <sub>6</sub> -Tag, Amp <sup>r</sup> | Novagen   |
| hGrx1 wt           | pET-15b       | Expression von rekombinantem humanen Grx1 wt                     | Johansson et al. <sup>45</sup>  |
| hGrx2c wt          | pET-15b       | Expression von rekombinantem humanen Grx2c wt                    | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |
| mGrx2c wt          | pET-15b       | Expression von rekombinantem murinem Grx2c wt                    | PD Dr. Carsten Berndt   |
| mGrx2c C37S        | pET-15b       | Expression von rekombinantem murinem Grx2c C37S                  | Anna Engelke  |
| hGrx2c MT          | pET-15b       | Expression von rekombinantem humanen Grx2 MT Loop                | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |
| hGrx5 wt           | pET-15b       | Expression von rekombinantem humanen Grx5 wt                     | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |
| hGrx5 DT           | pET-15b       | Expression von rekombinantem humanen Grx5 DT Loop                | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |
| hGrx5 CSYC         | pET-15b       | Expression von rekombinantem humanen Grx5 CSYC                   | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |
| hGrx5 CSYC DT      | pET-15b       | Expression von rekombinantem humanen Grx5 CSYC DT                | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |
| IscS               | pET-28b       | Expression von IscS wt   | PD Dr. Carsten Berndt   |

### 3. Material und Methoden

**Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Plasmide für eine Expression in Säugerzellen.

| Bezeichnung | Vektor   | Eigenschaften  | Referenz  |
|-------------|----------|--|---|
| Leervektor  | pExpress | T7 Promotor, Lac-Operon, His <sub>6</sub> -Tag, Amp <sup>r</sup> | Arakawa et al. <sup>136</sup>   |
| hGrx2a wt   | pExpress | Expression von humanem Grx2a wt                                  | PD Dr. Carsten Berndt   |
| hGrx2c wt   | pExpress | Expression von humanem Grx2c wt                                  | PD Dr. Carsten, Berndt, Leonie Thewes   |
| hGrx3 wt    | pExpress | Expression von humanem Grx3 wt                                   | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |
| hGrx5 wt    | pExpress | Expression von humanem Grx5 wt                                   | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald |

**Tabelle 6:** Übersicht der verwendeten Plasmide für die Klonierung und für die reverse Transkription in RNS für Zebrafischexperimente.

| Bezeichnung   | Vektor     | Eigenschaften  | Referenz   |
|---------------|------------|--|--|
| pVTU ALP      | pVTU-mtALP | Präsequenz (Aminosäure 1-69) der Untereinheit 9 (SU9) der F1F0 ATPase aus <i>Neurospora crassa</i> | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Andreas Reichert, Düsseldorf <sup>137,138</sup> |
| Leervektor    | pGEM       | pGEM®-T Easy Vector Systems  | Promega  |
| SU9 hGrx2c wt | pGEM       | SU9 mitochondriale Transitsequenz N-terminal von humanem Grx2c wt, Promotor                        | Anna Engelke   |
| SU9 hGrx2c MT | pGEM       | SU9 mitochondriale Transitsequenz N-terminal von humanem Grx2c mit monothiol-Loop, Promotor        | Anna Engelke   |

### 3. Material und Methoden

---

|                 |      |  |              |
|-----------------|------|--|--------------|
| SU9 hGrx5 wt    | pGEM | SU9 mitochondriale Transitsequenz<br>N-terminal von humanem Grx5 wt,<br>Promotor               | Anna Engelke |
| SU9 hGrx5<br>DT | pGEM | SU9 mitochondriale Transitsequenz<br>N-terminal von humanem Grx5 mit<br>dithiol-Loop, Promotor | Anna Engelke |

---

#### 3.1.4 Primer für Klonierungen

Die Oligonukleotide zur Modifikation von cDNS mittels PCR wurden bei Eurofins Genomic GmbH synthetisiert und sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7:** Übersicht über die von Eurofins Genomic Germany GmbH synthetisierten Oligonukleotide, welche als Primer für die PCR zur Modifikation von cDNS verwendet wurden.

| DNS-Sequenz |      |   |
|-------------|------|---|
| SU9-Grx2    | fw.  | 5' ATG GCC TCC ACT CGT GTC 3'                 |
|             | rev. | 5' ATGTATTGCTCTCCATGGAAGAGTAGGCGCGCTT 3'      |
| SU9-Grx5    | fw.  | 5' ATG GCC TCC ACT CGT GTC 3'                 |
|             | rev. | 5' CCGCGCCCGAGCCCATGGAAGAGTAGGCGCGCTT 3'      |
| hGrx2c      | fw.  | 5' GCGCGCCTACTCTTCCATGGAGAGCAATACATCATCATC 3' |
|             | rev. | 5' TCACTGAAATTCTTTCCTTAC 3'                   |
| hGrx5       | fw.  | 5' GCGCGCCTACTCTTCC ATG GGC TCG GGC GCG 3'    |
|             | rev. | 5' TCACTTGGAGTCTTGGTCTTTC 3'                  |
| mGrx2       | fw.  | 5' ACATCCAGCTCTTACTGTTCCAT 3'                 |
| C37S        | rev. | 5' AAGAGCTGGATGTTTTTGAGAAG 3'                 |

---



#### 3.1.5 Primer für quantitative Echtzeit PCR

**Tabelle 8:** Übersicht der verwendeten Primer für die quantitative real-time PCR.

| Zielgen | DNS-Sequenz                            | Hersteller                       |
|---------|--|----------------------------------|
| mCNPase | fw. 5' TGCTGCACTGTACAACCAAATTC 3'      | Eurofins Genomic<br>Germany GmbH |
|         | rev. 5' GAGAGCAGAGATGGACAGTTTGAA<br>3' |                                  |
| mGAPDH  | fw. 5' CCAGCCTCGTCCCGTAGAC 3'          | Eurofins Genomic<br>Germany GmbH |
|         | rev. 5' TGGCAACAATCTCCACTTTGC 3'       |                                  |
| mGrx3   | fw. 5' AGCCTTCGCCTGAAAAAGCT 3'         | Eurofins Genomic<br>Germany GmbH |
|         | rev. 5' TCCACCATCTGCTTGCTGAA 3'        |                                  |
| mGrx5   | fw. 5' GCGACTATGCGGCCTACAA 3'          | Eurofins Genomic<br>Germany GmbH |
|         | rev. 5' TCGCCGTTGAGGTACTTG 3'          |                                  |
| mNG2    | fw. 5' CCCCCCATACCCATGTC 3'            | Eurofins Genomic<br>Germany GmbH |
|         | rev. 5' CGATCGGAAATAACCTGAAGCT 3'      |                                  |
| mPLP    | fw. 5' GTATAGGCAGTCTCTGCGCTGT 3'       | Eurofins Genomic<br>Germany GmbH |
|         | rev. 5' AAGTGGCAGCAATCATGAAGG 3'       |                                  |

#### 3.1.6 siRNS-Sequenzen

**Tabelle 9:** Übersicht der siRNS-Sequenzen für RNS-Interferenzexperimente.

| siRNS-Sequenz  | Hersteller |
|--|------------|
| Kontrolle  | Eurogentec |
| 5' CAU UCA CUC AGG UCA UCA G 3'<br>5' CUG AUG ACC UGA GUG AAU G 3' |            |
| hGrx2  | Eurogentec |
| 5' GGU GCA ACU GAC ACU CAU A 3'<br>5' UAU GAG UGU CAG UUG CAC C 3' |            |
| hGrx3  | Eurogentec |
| 5' GCC UAU UCC AGU UGG CCU A 3'<br>5' UAG GCC AAC UGG AAU AGG C 3' |            |
| hGrx5  | Eurogentec |
| 5' UUU AAU GCC UUG UCG GAG C 3'<br>5' GCU CCG ACA AGG CAU UAA A 3' |            |
| Kontrolle  | Dharmacon™ |
| mGrx3  | Dharmacon™ |
| mGrx5  | Dharmacon™ |

#### 3.1.7 Antikörper

**Tabelle 10:** Übersicht der Antikörper. WB: Western Blot, ICC: Immunocytochemie

| <b>Antikörper</b>                     | <b>Organismus</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Referenz</b>  |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|--|
| β-Aktin                               | Maus              | 1:5000 (WB)       | Sigma-Aldrich  |
| CNPase                                | Maus              | 1:1000 (WB)       | Sigma-Aldrich  |
| Ferritin                              | Kaninchen         | 1:1000 (WB)       | Abcam  |
| GFAP                                  | Meerschweinchen   | 1:1000 (ICC)      | Synaptic Systems   |
| Glutaredoxin 2                        | Kaninchen         | 1:1000 (WB)       | Abcam  |
| Glutaredoxin 3                        | Kaninchen         | 1:500 (WB)        | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald <sup>139</sup> |
| Glutaredoxin 5                        | Kaninchen         | 1:500 (WB)        | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald <sup>139</sup> |
| GPAT (Atase)                          | Kaninchen         | 1:250 (WB)        | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Christopher H. Lillig, Greifswald                |
| LAMP1                                 | Ratte             | 1:500 (ICC)       | Abcam  |
| MBP                                   | Ratte             | 1:500 (ICC)       | Merck KGaA   |
| NG2                                   | Kaninchen         | 1:500 (ICC)       | Merck KGaA   |
| Transferrin                           | Maus              | 1: 500 (WB)       | Thermo Fisher Scientific   |
| Rezeptor                              |                   | 1: 250 (ICC)      |  |
| Sek. Antikörper mit IRDye® 680RD IgG  | Ziege             | 1:15000 (WB)      | Li-Cor Biosciences   |
| Sek. Antikörper mit IRDye® 800CW IgG  | Ziege             | 1:15000 (WB)      | Li-Cor Biosciences   |
| Sek. Antikörper mit Cy2, Cy3 oder Cy5 | Ziege             | 1:500 (ICC)       | Merck KGaA   |

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1.8 Enzyme

Tabelle 11: Übersicht der Enzyme.

| Enzym  | Hersteller               |
|--|--------------------------|
| DNase I  | Sigma-Aldrich            |
| GoTaq® Master Mixes                                    | Promega GmbH             |
| KOD Hot Start Mastermix                                | Merck KGaA               |
| Lysozym (aus Hühnereiweiß)                             | Sigma-Aldrich            |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase                     | Thermo Fisher Scientific |
| Pronase  | Sigma-Aldrich            |
| Restriktionsendonuklease ( <i>DpnI</i> , <i>NdeI</i> ) | New England Biolabs GmbH |
| T4 DNA Ligase  | New England Biolabs GmbH |

#### 3.1.9 Protein und DNS Marker

Tabelle 12: Übersicht der Protein- und DNS-Marker.

| Bezeichnung                          | Hersteller                 |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Protein Marker V                     | PEQLAB Biotechnologie GmbH |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific   |
| GeneRuler Low Range DNA Ladder       | Thermo Fisher Scientific   |

#### 3.1.10 Medien und Zusätze

Tabelle 13: Übersicht der Zellkulturmedien.

| Medium   | Hersteller               |
|--|--------------------------|
| StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent                       | Thermo Fisher Scientific |
| B-27™ Supplement   | Thermo Fisher Scientific |
| B-27™ Supplement (50X), minus Vitamin A                            | Thermo Fisher Scientific |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Pyruvat und Glutamin   | Thermo Fisher Scientific |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) | Thermo Fisher Scientific |
| Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)                         | Thermo Fisher Scientific |
| Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)                               | Thermo Fisher Scientific |

### 3. Material und Methoden

---

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Horse Serum   | Thermo Fisher Scientific |
| Fetal calf serum (FCS)                                      | Thermo Fisher Scientific |
| GlutaMAX™ (100 X)   | Thermo Fisher Scientific |
| HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) | Thermo Fisher Scientific |
| L-Thyroxine (T4)  | Sigma-Aldrich            |
| Opti-MEM – Reduziertes Serum Medium                         | Thermo Fisher Scientific |
| Penicillin/Streptavidin (P/S)                               | Thermo Fisher Scientific |
| Recombinant mouse fibroblast growth factor-basic            | ImmunoTools              |
| Recombinant mouse platelet-derived growth factor AA         | ImmunoTools              |
| Triiodo-L-Thyronine (T3)                                    | Sigma-Aldrich            |
| 0,5 % Trypsin-EDTA (10x)                                    | Thermo Fisher Scientific |

---

#### 3.1.11 Kits

**Tabelle 14:** Übersicht der verwendeten Kits und ihrer Hersteller.

| <b>Kit</b>                             | <b>Hersteller</b>            |
|--|------------------------------|
| BC Assay Protein Quantitation Kit      | Interchim                    |
| CellTiter-Blue® Cell Viability Assay   | Promega GmbH                 |
| EndoFree® Plasmid Maxi kit             | Qiagen                       |
| mMessage mMachine™ T7                  | Thermo Fisher Scientific     |
| Neural Tissue Dissociation Kit (P)     | Miltenyi Biotec GmbH         |
| Nucleo Bond® Xtra Midi EF              | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG |
| pGEM®-T Easy Vector Systems            | Promega GmbH                 |
| Poly(A) Tailing Kit                    | Thermo Fisher Scientific     |
| PureYield™ Plasmid Miniprep System     | Promega GmbH                 |
| Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System | Promega GmbH                 |
| Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit        | Zymo Research GmbH           |

---

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1.12 Verwendete Materialien

Tabelle 15: Übersicht der Materialien.

| Material  | Referenz   |
|---|--|
| Anti-A2B5 MicroBeads  | Miltenyi Biotec GmbH                             |
| Anti-AN2 MicroBeads   | Miltenyi Biotec GmbH                             |
| Anti-Strep Beads  |  |
| His GraviTrap™  | GE Healthcare                                    |
| HisTrap™ HP histidine-tagged protein purification columns           | GE Healthcare                                    |
| MACS Separation columns (MS und LS)                                 | Miltenyi Biotec GmbH                             |
| Millicell® Cell Culture Inserts (0,4 µm, 30 mm)                     | Merck KGaA                                       |
| Mini-Protean® TGX™ Gels   | Bio-Rad  |
| Spectrum™ Labs Spectra/Por™ 1 6-8 kD MWCO Dialysemembran            | Thermo Fisher Scientific                         |
| Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs               | Bio-Rad  |
| Zeba™ Spin Desalting Column 7 K MWCO Zellkulturflaschen und Platten | Thermo Fisher Scientific<br>Greiner Bio-One GmbH |

---

#### 3.1.13 Chemikalien und andere Produkte

Tabelle 16: Übersicht der Chemikalien.

| Chemikalien                              | Hersteller              |
|--|-------------------------|
| 4 % Roti-Histofix                        | Carl Roth GmbH + Co. KG |
| Acrylamide/Bis-acrylamide, (30 %) (29:1) | Bio-Rad                 |
| Agarose                                  | Sigma-Aldrich           |
| Albumin fraction V, biotin-free (BSA)    | Carl Roth GmbH + Co. KG |
| Ammonium peroxodisulfat                  | Sigma-Aldrich           |
| Ampicillin                               | Sigma-Aldrich           |
| Brilliant blue R 250 Coomassie           | Carl Roth GmbH + Co. KG |
| Bromphenolblau                           | Sigma-Aldrich           |
| Calciumchlorid                           | Sigma-Aldrich           |
| CHAPS-Hydrat                             | Sigma-Aldrich           |

---

### 3. Material und Methoden

---

| <b>Chemikalien</b>                              | <b>Hersteller</b>                    |
|---|--------------------------------------|
| Chloramphenicol                                 | Sigma-Aldrich                        |
| Chloroform                                      | Merck KGaA                           |
| CutSmart® Puffer                                | New England Biolabs GmbH             |
| D-Cystein                                       | Sigma-Aldrich                        |
| Destilliertes H <sub>2</sub> O DNase/RNase free | Thermo Fisher Scientific             |
| 2,7-Diaminofluorene                             | Sigma-Aldrich                        |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                         | Sigma-Aldrich                        |
| Dithiothreitol (DTT)                            | Sigma-Aldrich                        |
| DNS-Ladepuffer (6 X)                            | Thermo Fisher Scientific             |
| dNTPs (100 mM)                                  | Thermo Fisher Scientific             |
| Essigsäure                                      | Merck KGaA                           |
| Ethanol   | Merck KGaA                           |
| Fluoromount-G®                                  | Southern Biotech                     |
| Formaldehyd                                     | Sigma-Aldrich                        |
| D-Glucose                                       | Sigma-Aldrich                        |
| Glutathion (GSH)                                | Sigma-Aldrich                        |
| Glutathion disulfid (GSSG)                      | Sigma-Aldrich                        |
| Glycerol  | Sigma-Aldrich                        |
| Hoechst 33258                                   | Sigma-Aldrich                        |
| IAB EZ-link iodoacetyl-PEG2 biotin              | Thermo Fisher Scientific             |
| Isopropanol                                     | Merck KGaA                           |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)       | Carl Roth GmbH + Co. KG              |
| Kanamycin                                       | Sigma-Aldrich                        |
| Kynureninsäure                                  | Sigma-Aldrich                        |
| L-Glutamat                                      | Sigma-Aldrich                        |
| LB Broth Base                                   | Thermo Fisher Scientific             |
| LB Agar (Lennox L)                              | Thermo Fisher Scientific             |
| Lipofectamin 2000                               | Thermo Fisher Scientific             |
| Methanol  | VWR                                  |
| Natriumchlorid                                  | Sigma-Aldrich                        |
| Natriumdisulfid                                 | Dojindo Molecular Technologies, Inc. |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                      | Sigma-Aldrich                        |
| Natriumhydroxid                                 | Sigma-Aldrich                        |

---

### 3. Material und Methoden

---

| <b>Chemikalien</b>                         | <b>Hersteller</b>   |
|--|---|
| Normales Ziegenserum                       | Thermo Fisher Scientific  |
| NP40 (Tergitol)                            | Sigma-Aldrich   |
| peqGOLD TriFast                            | PEQLAB Biotechnologie GmbH  |
| Poly-L-Lysin                               | Sigma-Aldrich   |
| Ponceau S Lösung                           | Sigma-Aldrich   |
| Power SYBR® Green PCR Master Mix           | Thermo Fisher Scientific  |
| Protease inhibitor cocktail tablets        | Roche   |
| Protein Ladepuffer (4 X)                   | LI-COR Biosciences  |
| Protein Marker V                           | PEQLAB Biotechnologie GmbH  |
| Pyridoxalphosphat                          | Sigma-Aldrich   |
| Random Primer (Hexamere)                   | Thermo Fisher Scientific  |
| Riboflavin                                 | Sigma-Aldrich   |
| RNase Inhibitor                            | Thermo Fisher Scientific  |
| RT-Buffer (Reverse Transkription)          | Thermo Fisher Scientific  |
| S-Nitrosoglutathion (GSNO)                 | freundlicherweise von Dr. Klaudia Lepka<br>zur Verfügung gestellt |
| Salzsäure                                  | Merck KGaA  |
| Silbernitrat                               | Sigma-Aldrich   |
| SOC Medium                                 | Thermo Fisher Scientific  |
| SYBR™ Safe DNA Gel Stain                   | Thermo Fisher Scientific  |
| TBE-Puffer (10 X) Ultra Pure™              | Thermo Fisher Scientific  |
| TEMED                                      | Sigma-Aldrich   |
| TCEP                                       | Thermo Fisher Scientific  |
| Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid |   |
| TRIS/Glycin Laufpuffer (10 x)              | VWR   |
| Triton X-100                               | Sigma-Aldrich   |
| Tween-20                                   | Sigma-Aldrich   |
| Wasserstoffperoxid                         | Merck KGaA  |
| WSP-1                                      | Cayman Chemical   |

---

#### 3.1.14 Geräte

**Tabelle 17:** Übersicht der verwendeten Geräte.

| <b>Gerät</b>   | <b>Hersteller</b>                      |
|--|--|
| Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System                       | Thermo Fisher Scientific               |
| BioPhotometer  | Eppendorf GmbH                         |
| CPS-100 6-Cell Thermoelectrically Temperature-Controlled Cell Positioner | Shimadzu                               |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator für Zellkulturen                              | Thermo Scientific                      |
| <b>Elektrophorese:</b>   |  |
| Spannungsgeber:  |  |
| Standard Power Pack P25T   | Biometra GmbH                          |
| Electrophoresis Power Supply EPS 601                                     | GE Healthcare                          |
| Elektrophoresekammer:  |  |
| Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell                        | Bio-Rad                                |
| Mini-PROTEAN® Casting Stand  | Bio-Rad                                |
| Elektroporator Gemini SC   | BTX ®                                  |
| Eppendorf® Thermomixer compact   | Eppendorf GmbH                         |
| FPLC System – Äkta Prime   | GE Healthcare                          |
| <b>Inkubatoren für Bakterien:</b>  |  |
| Kompaktschüttler KS 15 control   | Edmund Bühler GmbH                     |
| Inkubationshaube TH15  | Edmund Bühler GmbH                     |
| Inkubator 1000   | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG     |
| Unimax 1010  | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG     |
| Inkubationsschüttler/Thriller  | PEQLAB Biotechnologie GmbH             |
| Intas GDS UV-Systeme   | Intas Science Imaging Instruments GmbH |
| Leica S6 E Stereomicroscope  | Leica Microsystems                     |
| McIlwain Gewebeschnneider  | Mickle Laboratory                      |
| <b>Mikroskope:</b>   |  |
| Olympus BX51   | Olympus Europa SE & Co. KG             |
| Olympus U-RFL-T Burner   | Olympus Europa SE & Co. KG             |
| F-View Fluoreszenzkamera   | Soft Imaging System GmbH               |
| Konfokales Mikroskop Leica SP8   | Leica Microsystems                     |



|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| TriM Scope II - 2-Photon Microscope       | LaVision BioTec GmbH              |
| Nanodrop 2000 Spectrophotometer           | Thermo Fisher Scientific          |
| Odyssee Infrared Imaging System           | LI-COR Biosciences                |
| pH-Meter HI221                            | Hanna Instruments                 |
| Schüttler WT12                            | Biometra                          |
| Sterilbank                                | Heraeus                           |
| Tecan GENios Pro Microplate Reade         | Tecan Group AG                    |
| Thermocycler T Gradient                   | Biometra                          |
| Trans-Blot ® Turbo ™ Transfer System      | Bio-Rad                           |
| Ultraschall-Homogenisator, UW 2070        | Bandelin Electronic GmbH & Co. KG |
| UV1800 UV-Vis-Spectrophotometer           | Shimadzu                          |
| Vortex-Genie 2                            | Scientific Industries             |
| Zellzähler – TC10™ Automatic Cell Counter | BioRad                            |
| <b>Zentrifugen:</b>                       |                                   |
| 5417R                                     | Eppendorf GmbH                    |
| 5415R                                     | Eppendorf GmbH                    |
| Minispin                                  | Eppendorf GmbH                    |
| Rotanta 460R                              | Hettich AG                        |
| 4K15C                                     | Sigma Laborzentrifugen GmbH       |

---

#### 3.1.15 Software

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Aufgrund einer Stichprobengröße unter 20 konnte eine Normalverteilung nicht überprüft werden, weshalb für den Vergleich mehrerer Gruppen der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zum Vergleich von je zwei Gruppen gewählt wurde. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha < 0,05$  festgelegt.

### 3. Material und Methoden

---

**Tabelle 18:** Übersicht der verwendeten Software und ihrer Referenzen.

| <b>Software</b>        | <b>Referenz</b>  | <b>Hersteller</b>       |
|------------------------|--|-------------------------|
| Adobe Illustrator      |  | Adobe Inc.              |
| Adobe Photoshop        |  | Adobe Inc.              |
| Chimera                | UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. <i>J Comput Chem.</i> 2004 Oct;25(13):1605-12. <sup>117</sup>   |                         |
| Expasy                 | Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H. ExpASy: SIB bioinformatics resource portal, <i>Nucleic Acids Res</i> , 40(W1):W597-W603, 2012. <sup>140</sup> |                         |
| Fiji                   | Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", <i>Nature methods</i> 9(7): 676-682 <sup>141</sup>  |                         |
| GraphPad Prism 5       |  | GraphPad Software Inc.  |
| ImageJ                 | Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA<br><a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a> , 1997-2018   |                         |
| Image Studio™ Lite     |  | LI-COR Biosciences GmbH |
| LAS X                  |  | Leica Microsystems      |
| Mendeley               |  | Entwickelt von Elsevier |
| Magellan Data Analysis |  | Tecan Group Ltd.        |
| MS Office              |  | Microsoft Corporation   |
| Snap Gene Viewer       | SnapGene software (von Insightful Science; <a href="http://snapgene.com">snapgene.com</a> )  | GSL Biotech LLC         |

---

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von cDNS verwendet. Dabei wurden synthetische Oligonukleotide (Primer, Tabelle 19) verwendet, damit durch die exponentielle Vervielfältigung Basenaustausche in der cDNS erzeugt werden. Zum Anfügen einer mitochondrialen Transitsequenz an cDNS, wurde die Transitsequenz und die cDNS um eine Teilsequenz der jeweils anderen Sequenz in einer PCR erweitert. Diese PCR-Produkte wurden in einer *overlap extension* PCR als Ausgangsprodukt verwendet. Durch die Hybridisierung der ergänzten und zueinander komplementären Sequenzen wurde die cDNS mit der Transitsequenz erweitert.

**Tabelle 19:** Komponenten und Konzentrationen eines PCR-Reaktionsansatzes.

| Komponente              | Endkonzentrationen |
|-------------------------|--------------------|
| GoTaq® Master Mix (2 X) | 1 X                |
| Forward Primer (10 µM)  | 0,4 µM             |
| Reverse Primer (10 µM)  | 0,4 µM             |
| Ausgangs-DNS            | 1,6 ng/µl          |

**Tabelle 20:** Programm für eine PCR.

|                      | Temperatur /°C   | Zeit    |
|----------------------|------------------|---------|
| Denaturierung        | 95               | 5 min   |
| Denaturierung        | 95               | 30 s    |
| Primerhybridisierung | Primer Tm – 5 °C | 15 s    |
| Verlängerung         | 72               | 60 s/kb |
| Finale Verlängerung  | 72               | 10 min  |

### 3.2.2 T/A-Klonierung

Zum Klonieren von cDNS in den pGEM®-T Easy Vektor wurde das pGEM®-T Easy Vector System von Promega nach Herstellerangaben verwendet. Die cDNS wurde in einer PCR amplifiziert und in den pGEM®-T Easy Vector aus dem Kit ligiert bevor das Produkt in *E.coli* transformiert wurde.

#### 3.2.3 Ortsspezifische Mutagenese

Für einen ortsspezifischen Basenaustausch in einem Plasmid wurde eine PCR nach Tabelle 21 angesetzt. Die methylierten Ausgangsplasmide wurden für eine Stunde bei 37 °C mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* (0,4 U/μL) im CutSmart® Puffer hydrolytisch gespalten. Die verbleibenden und in der PCR amplifizierten Plasmide mit dem Basenaustausch wurden in *E.coli* transformiert.

**Tabelle 21:** Komponenten und Konzentrationen eines PCR-Reaktionsansatzes für die ortsspezifische Mutagenese.

| <b>Komponente</b>      | <b>Endkonzentrationen</b> |
|------------------------|---------------------------|
| KOD Master Mix (2 X)   | 1 X                       |
| Forward Primer (10 μM) | 0,5 μM                    |
| Reverse Primer (10 μM) | 0,5 μM                    |
| Ausgangs-DNS           | 2,5 ng/μl                 |

**Tabelle 22:** Programm für eine PCR.

|                      | <b>Temperatur /°C</b> | <b>Zeit</b> |        |
|----------------------|-----------------------|-------------|--------|
| Denaturierung        | 95                    | 2 min       |        |
| Denaturierung        | 95                    | 30 s        | } 20 X |
| Primerhybridisierung | Primer Tm - 5         | 30 s        |        |
| Verlängerung         | 70                    | 3 min       |        |
| Finale Verlängerung  | 72                    | 10 min      |        |

#### 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle und Aufreinigung verschiedener DNS-Fragmente wurden die DNS-Proben mit DNS-Ladepuffer (6 X) versetzt. Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte mit einem 1 %igem Agarosegel mit SYBR™ Safe DNA Gel Stain in einem TBE-Puffer und einer angelegten Spannung von 80 V. Die DNS-Fragmentlänge wurde mithilfe von DNS-Markern bestimmt. Zur Aufreinigung der DNS wurde das gewünschte Fragment aus dem Gel geschnitten und mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System von Promega nach Herstellerangaben isoliert.

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>TBE-Puffer (10 X)</b> | 0,01 M EDTA<br>0,9 M Borsäure<br>1 M TRIS |
|--------------------------|---|

#### **3.2.5 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen wurde eine Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes für die Inokulation einer Hauptkultur mit 300 ml LB-Medium verwendet. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 inkubiert und 30 min auf Eis abgekühlt bevor die Zellen bei 4 °C mit 1000 g für 10 min pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde in 100 ml kaltem 0,1 M sterilem Calciumchlorid resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert und in 12,5 ml sterilem Calciumchlorid mit 15 % Glycerol aufgenommen. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurden 200 µl Aliquots der chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen bei -80°C gelagert.

#### **3.2.6 Chemische Transformation von *E.coli*-Zellen**

Chemisch kompetente *E.coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und direkt mit Plasmid-DNS versetzt. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert, bevor der Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C erfolgte. Zum Abkühlen wurden die Zellen 5 min auf Eis gelagert und anschließend mit 800 µl SOC- oder LB-Medium für 40 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (1000 g, 5 min, RT), in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert (Ampicillin 100 µg/ml). Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37 °C.

#### **3.2.7 Plasmidisolation aus *E.coli*-Zellen**

Für die Plasmidisolation wurden 5 ml Übernachtskulturen der transformierten *E.coli*-Zellen pelletiert und die Plasmide mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep System von Promega nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für größere Ansätze wurden 200-400 ml Kulturmedium verwendet und mit dem Nucleo Bond® Xtra Midi EF von Macherey-Nagel oder dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit von Qiagen endotoxinfrei nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### **3.2.8 Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung**

Die DNS- und RNS-Konzentrationen wurde am Nanodrop 2000 Spectrophotometer bestimmt. Plasmid DNS wurde bei Microsynth Seqlab GmbH sequenziert.

#### **3.2.9 *In vitro*-Transkription (RNS-Synthese und PolyA-Tailing)**

Für die *in vitro*-Transkription zur Generierung von RNS wurden die cDNSs von Interesse hinter den T7 Promotor des pGEM-Vektors kloniert. Für die Linearisierung des Plasmids wurde eine Restriktionsendonuklease (1,2 U/µl) und CutSmart® Puffer mit 5 µg des Plasmids über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Qualität des Restriktionsverdau wurde in einem Agarosegel überprüft und die linearisierten Plasmide mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit von Zymo

Research isoliert. Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem mMessage mMachine™ T7 Kit von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben. Abweichend dazu wurde die Transkription 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der DNS wurde die von dem Kit bereitgestellte DNase nach Herstellerangabe zugegeben. Für die Polyadenylierung der synthetisierten RNS wurde das Poly(A) Tailing Kit von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNS wurde mit Lithiumchlorid des mMessage mMachine™ T7 Kit von Thermo Fisher Scientific nach den Herstellerangaben präzipitiert und aufgereinigt. Die polyadenylierte RNS wurde in Aliquots bei -80 °C gelagert.

### 3.3 Proteinbiochemie

#### 3.3.1 Proteinexpression

Die heterologe Expression von Proteinen erfolgte in dem BL21(DE3) pRIL *E. coli*-Stamm. Der *E. coli*-Stamm wurden mit dem Expressionsvektor von Interesse transformiert, siehe Tabelle 4, und eine Vorkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C angezogen. Die mit Antibiotikum versetzte Hauptkultur wurde mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde 1 mM IPTG dem Kulturmedium zugesetzt. Für die Expression von Glutathion-Reduktase wurde gleichzeitig 10 mg/l Riboflavin hinzugegeben und für IscS wurde 10 mM Pyridoxalphosphat zugesetzt. Je nach Protein erfolgte die Expression für fünf Stunden oder über Nacht. Es wurden vor der Induktion der Expression und nach der Expression Bakterien entnommen und pelletiert (1000 g, 5 min), um die Expression auf einer SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zu überprüfen. Die Bakterien wurden bei 3000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert bevor das Pellet bei -20 °C gelagert wurde.

#### 3.3.2 Proteinaufreinigung

Für die Proteinaufreinigung wurden die Bakterienpellets in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und mit 20 mg Lysozym und DNase I für eine Stunde schüttelnd inkubiert. Im Anschluss erfolgte die mechanische Lyse durch Ultraschall bei 5 x 10 % und 85 % Intensität für zweimal 2,5 min. Die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 10 000 rpm für 30 min bei 4 °C von unlöslichen Zellbestandteilen separiert. Die löslichen Proteine wurden entweder mithilfe der Äkta Prime von GE Healthcare auf HisTrap™ HP Nickel Säulen geladen oder manuell auf His GraviTrap™ Nickel Säulen gegeben. Die Säulen wurden zuvor mit zehn Säulenvolumen vom Waschpuffer äquilibriert. Die Proteine wurden auf die Säulen geladen und

anschließend mit 15 Säulenvolumen vom Waschpuffer gewaschen. Die Histidin-getaggtten Proteine wurden durch Zugabe von Imidazol im Elutionspuffer von der Säule eluiert. Je nach Experiment wurden die Proteine gegen PBS oder TE-Puffer über Nacht dialysiert oder mithilfe von Zeba™ Spin Entsalzungssäulen nach Herstellerangaben entsalzt. Die Qualität der aufgereinigten Proteine wurde mithilfe einer SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung überprüft. Die Proteinkonzentrationsbestimmung und die molaren Extinktionskoeffizient sind in Abschnitt 3.11.1 aufgeführt.

**Waschpuffer:** 50 mM Natriumphosphat  
200 mM Natriumchlorid  
25 mM Imidazol  
pH 8,0

**Elutionspuffer:** 50 mM Natriumphosphat  
200 mM Natriumchlorid  
250 mM Imidazol  
pH 8,0

#### 3.3.3 Rekonstitution von 2Fe2S-Zentren in Proteinen

Die Rekonstitution von 2Fe2S-Zentren in rekombinante, aufgereinigte Proteine erfolgte nach dem Ansatz in Tabelle 23 in Natriumphosphatpuffer mit pH 8 nach Berndt et al.<sup>115</sup>. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur in einer Argonumgebung für zwei Stunden. Anschließend wurde der Ansatz mit Zeba™ Spin Entsalzungssäulen nach Herstellerangaben entsalzt und UV-Vis-Spektren sowie der Zerfall des FeS-Zentrums im UV-1800 UV-Vis-Spectrophotometer von Shimadzu gemessen. Die Stabilität der FeS-Zentren wurde bei der Wellenlänge 420 nm und bei 25 °C gemessen.

**Tabelle 23:** Komponenten und Konzentrationen eines Rekonstitutionsansatzes zur Synthese eines 2Fe2S-Zentrums in Proteinen.

| <b>Komponente</b>  | <b>Endkonzentrationen</b> |
|--|---------------------------|
| Natriumchlorid   | 200 mM                    |
| Dithiothreitol   | 5 mM                      |
| Glutathion   | 1 mM                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 2 eq                      |
| Cystein  | 2,5 eq.                   |
| Pyridoxalphosphat  | 10 µM                     |
| IscS   | 0,01 eq.                  |

#### 3.3.4 Bestimmung von S-Glutathionylierungen *in vitro*

Die Deglutathionylierungsaktivitäten von Glutaredoxinen wurden mithilfe von fluoreszierendem Di-Eosin-Glutathiondisulfid (Di-Eosin-GSSG) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Carsten Berndt) nach dem Protokoll von Bräutigam et al. bestimmt<sup>56</sup>. 30  $\mu$ M BSA oder rekombinantes Sirtuin1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Carsten Berndt) wurden für 30 min mit 10 mM DTT reduziert, mit Zeba™ Spin Entsalzungssäulen nach Herstellerangaben entsalzt und mit 150  $\mu$ M Di-Eosin-GSSG für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt glutathionyliert. Nach erneuter Entsalzung der glutathionylierten Proteine wurden 10  $\mu$ M BSA oder Sirtuin1 für 15 min mit 50  $\mu$ M reduziertem Grx bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl-Puffer und 1 mM GSH inkubiert. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE separiert und glutathionylierte Proteine im UV-Licht detektiert. Die Proteine wurden wie in Abschnitt 3.11.2 beschrieben mit Coomassie gefärbt.

#### 3.3.5 Eisenbestimmung

Die Bestimmung von proteingebundenem Eisen in frisch rekonstituierten Proteinen erfolgte kolorimetrisch nach Fish et al.<sup>142</sup>.

#### 3.3.6 Monobromobiman Methode

Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Péter Nagy in Budapest in Zusammenarbeit mit Dr. Éva Dóka und Dr. Tamás Ditrói mit den hier angegebenen Änderungen nach Ditrói et al. durchgeführt<sup>143</sup>. 250  $\mu$ l der rekombinanten Proteine mit den angegebenen Konzentrationen an DTT und NOC7 wurden mit 660  $\mu$ l 200 mM HEPES-Puffer pH 8.2 mit 1,5 mM Monobromobiman bei 20 °C versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 71  $\mu$ l des Ansatzes als Probe entnommen und zum Stoppen der Reaktion mit 3.9  $\mu$ l 50 % TCA versetzt. Zur Entfernung von präzipitierten Proteinen wurde die Probe 5 min bei 6000 g zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Gefäße überführt. Die Probe wurde mittels Reverse-Phase-Chromatographie (Phenomenex Luna C18(2) 200x4.6mm 3 $\mu$ m) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten (Lösung A: 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O, Lösung B: 0,1 % TFA/ACN) der über drei Minuten von 15 % Lösung B auf 35 % Lösung B erhöht wird. Nach 6 min mit 35 % von Lösung B wurde diese in 2 min auf 90 % erhöht, für eine Minute gehalten und innerhalb einer Minute wieder auf 15 % Lösung B eingestellt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 475 nm. Die Quantifizierung wurde mithilfe einer externen Kalibrierungskurve mit standardisierten H<sub>2</sub>S-Lösungen bestimmt.



#### 3.3.7 WSP-1-Messung

Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Miriam M. Cortese-Krott und Dr. Christopher L. Bianco (Düsseldorf) durchgeführt. Die Reaktion wurde mit rekombinanten FeS-Grx2 und GSNO in Anwesenheit der Schwefelwasserstoff-Probe Washington State Probe-1 (WSP1) von Cayman Chemical durchgeführt. Sulfide reagieren mit dem WSP1-Sensor unter der Bildung eines Fluorophors. Der Fluorophor wurde mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 520 nm detektiert.

#### 3.3.8 Glutaredoxin-Aktivitätsassay

Die Enzymaktivitäts-Messungen von den Glutaredoxinen wurden in Zusammenarbeit mit Leonie Thewes nach Luthmann et al. und Berndt et al. durchgeführt<sup>115,144</sup>. 1  $\mu$ M Glutaredoxine wurden mit 6  $\mu$ g/ml Glutathion-Reduktase, 250  $\mu$ M NADPH, 1 mM GSH und 0,7 mM HED oder 160  $\mu$ M Polysulfid-behandeltes HSA inkubiert. Während der Reaktion wurde die Änderung der Absorption von reduziertem zu oxidierten NADPH bei 340 nm gemessen. Zur Persulfidierung wurde HSA zunächst für 30 min mit 1 mM TCEP reduziert, entsalzt und anschließend für 30 min mit 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> inkubiert. Nach erneutem Entsalzen mit Zeba™ Spin Desalting Columns von Thermo Fisher Scientific wurde das persulfidierte HSA für die Aktivitätsmessungen eingesetzt.

#### 3.3.9 Enzymaktivitäts-Messungen

Die Enzymaktivitäts-Messungen wurden im Labor von Prof. Dr. Roland Lill (Institut für Zytobiologie, Philipps-Universität Marburg) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Mühlenhoff und Isabell Kothe oder Dr. Oliver Stehling durchgeführt. Die FeS-Transfer Messungen erfolgten wie in Weiler et al. beschrieben<sup>88</sup>. Die Aktivitäten der Citrat-Synthase, der Aconitase und Succinat-Dehydrogenase wurden, wie in Biederbick et al., Srere et al. und Stehling et al. beschrieben, bestimmt<sup>145-147</sup>. Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit einem BCA Assay bestimmt und die Enzymaktivität als Units pro mg Protein berechnet.

#### 3.3.10 Molybdän-Kofaktor-Messungen

Die Aktivitätsmessung der Molybdän-Kofaktor-abhängigen Nitrat-Reduktase und die Bestimmung des FormA-Gehalts in Zellextrakten wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Günter Schwarz (Institut für Biochemie, Universität zu Köln) in Zusammenarbeit mit Dr. Simon Mayr nach den dort vorliegenden Protokollen und nach Mayr et al. und Leimkühler et al. durchgeführt<sup>148-150</sup>.

#### 3.4 Zebrafische

Die Experimente wurden in der Zebrafisch Core Facility (Medizinische Fakultät, Universität Bonn) mit Prof. Dr. Benjamin Odermatt und Tobias Lindenberg durchgeführt. Die Zebrafische wurden unter Standardbedingungen (14/10 Stunden hell/dunkel, 28 °C, pH 7,2, 500 µS) gehalten. Den Eiern der Wildtyp-Linie (ZFIN ID: ZDB-GENO-960809-7; ZDB-GENO-990623-2) oder der in Tabelle 24 angegebenen transgenen Zebrafisch-Reporterlinien wurden verschiedene Morpholino-Verdünnungen oder mRNS injiziert.

**Tabelle 24:** Übersicht der transgenen Zebrafisch-Reporterlinien.

| Transgene Zebrafischlinie       | Referenz                     |
|---------------------------------|------------------------------|
| Tg(mbp:GFP)                     | Almeida, 2011 <sup>151</sup> |
| Tg(cldk:Gal4;UAS:GFP-caax)      | Münzel, 2012 <sup>152</sup>  |
| Tg(cldK:Gal4;UAS:tdTomato-caax) | Münzel, 2012 <sup>152</sup>  |

Die Morpholinos wurden von Gene Tools synthetisiert und mit Wasser auf eine Konzentration von 3 mM eingestellt. Ausgehend davon wurden 1,77 nl der in Tabelle 25 angegebenen Morpholino-Verdünnungen in die Eier injiziert. Für die Komplementierungsversuche der Loop-Grx-Mutanten wurden 1,77 nl einer 1:8-Verdünnung des Morpholinos und 60 pg polyadenylierter mRNS mit 5'-Cap-Struktur (siehe Abschnitt 3.2.9) für die Überlebensrate oder 1,77 nl einer 1:10-Verdünnung und 120 pg polyadenylierter mRNS mit 5'-Cap-Struktur für die Häm-Färbung in die Eier injiziert. Zudem wurden 4 nl einer 1:25-Morpholino-Verdünnung mit 540 pg polyadenylierter mRNS mit 5'-Cap-Struktur injiziert.

**Tabelle 25:** Übersicht der Sequenzen und eingesetzten Verdünnungen der verwendeten Morpholinos.

| Zielprotein | Sequenz                         | Verdünnung | Hersteller |
|-------------|---------------------------------|------------|------------|
| Kontrolle   | 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3' | 1:7        | Gene Tools |
| Grx3        | 5' ATGCCGCGTCCGTGAAGTTCGCCAT 3' | 1:20       | Gene Tools |
| Grx5        | 5' CTGTCGACCTAAAAACGCTATTCAT 3' | 1:7        | Gene Tools |

Das Überleben der Embryonen wurde 24 Stunden nach der Befruchtung anhand von akkumuliertem Methylenblau, welches sich in einer Konzentration von 2 mg/l im Wasser befand, bestimmt. Die Häm-Färbung erfolgte 2 Tage nach der Befruchtung wie in Haunhorst et al. beschrieben<sup>37</sup>. Die Embryonen wurden durch Inkubation in 0,5 mg/ml Pronase dechorioniert und anschließend 30 min in 0,1 mg/ml 2,7-Diaminofluorene (DAF) in 200 mM TRIS/HCl-

Puffer pH 7,0 inkubiert. DAF wurde zuvor in einer 10 mg/ml Konzentration in 90 %-iger Essigsäure angesetzt. Nach der Inkubation wurde Wasserstoffperoxid für eine 0,3 %-ige Endkonzentration zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten wurden die Embryonen einmal in PBS gewaschen und die Häm-Färbung fotografiert. Für die Komplementierungsexperimente der Loop-Glutaredoxinmutanten dienten uninjizierte Embryonen als Kontrolle. Alle Zebrafischexperimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Gesetz durchgeführt.

#### **3.5 Organotypische Schnittkulturen**

Organotypische zerebelläre Schnittkulturen wurden wie in Stoppini et al. (1991) und Lepka et al. vorbereitet<sup>124</sup>. Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien und Protokollen und mit der Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) durchgeführt. Die Entnahme des Zerebellums erfolgte nach den Richtlinien und Protokollen des Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter der Projektnummer O 74/08. Die 400 µm Schnitte wurden im Präparationspuffer separiert und im Waschmedium für 15 min inkubiert. Die Kultivierung erfolgte auf Millicell® Cell Culture Inserts (0,4 µm) mit Kulturmedium für zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Schnittkulturen wurden für weitere fünf Tagen bei 33 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bevor sie behandelt wurden. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Behandlung erfolgte durch Zugabe von 2 µM rekombinantem Glutaredoxin zwei Stunden vor und vier Stunden nach der Zugabe von 750 µM GSNO. Liproxstatin wurde in einer Konzentration von 200 nM vier Stunden vor Erastin- oder GSNO-Zugabe in das Medium gegeben. Das GSNO wurde freundlicherweise von Dr. Klaudia Lepka zur Verfügung gestellt. Die Analyse der zerstörten Myelinstruktur erfolgte, wenn nicht anders angegeben 24 Stunden nach der Behandlung durch immunozytochemische Färbungen des basischen Myelinprotein (MBP), wie in Abschnitt 3.12.1 beschrieben.

**Präparationspuffer:** HBSS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)  
1 mM Kynureninsäure  
100 U/mL Penicillin  
100 µg/mL Streptomycin  
0,5 % Glucose

**Waschmedium:** 50 % HBSS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)  
50 % Kulturmedium  
25 mM HEPES  
100 U/mL Penicillin  
100 µg/mL Streptomycin

**Kulturmedium:** 50 % MEM  
25 % Pferdeserum  
25 % HBSS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)  
0,5 % Glucose  
1 X GlutaMAX™  
100 U/mL Penicillin  
100 µg/mL Streptomycin

## 3.6 Zellkultur

### 3.6.1 Primäre Zellkultur

Primäre Zellen wurden nach Lepka et al.<sup>124</sup> mit dem Neural Tissue Dissociation Kit (Papain) isoliert und kultiviert. Die Entnahme des Gewebes erfolgte nach den Richtlinien und Protokollen des Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter der Projektnummer O 74/08. Anschließend wurden entweder A2B5-positive-Zellen mithilfe von Anti-A2B5 MicroBeads oder Anti-AN2 MicroBeads für NG2-positive-Zellen angereichert. Die Isolation und Sortierung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben (Miltenyi Biotec GmbH). Die Einzelzellsuspension wurde auf Poly-L-Lysin beschichteten Oberflächen ausgesät und in Proliferationsmedium kultiviert. Für die Oberflächenbeschichtung wurde die Plastikware für mindestens drei Stunden mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Für Differenzierungsexperimente wurde das Proliferationsmedium vollständig mit Differenzierungsmedium ausgetauscht. Das Splitten der Zellen erfolgte durch Inkubation mit Akkutase. Die Zellen wurden in PBS gesammelt und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 % konditioniertem Medium aufgenommen und ausgesät.

**Proliferationsmedium:** DMEM/F-12 Medium  
100 U/mL Penicillin  
100 µg/mL Streptomycin  
1 X GlutaMAX™  
8 mM HEPES  
1 X B-27™ ohne Vitamin A  
10 ng/ml PDGF $\alpha$   
10 ng/ml FGF

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>Differenzierungsmedium:</b> | DMEM/F-12 Medium<br>100 U/mL Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin<br>1 X GlutaMAX™<br>8 mM HEPES<br>1 X B-27™ mit Vitamin A<br>400 ng/ml T3<br>400 ng/ml T4 |
|--------------------------------|---|

#### 3.6.2 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in DMEM-Medium mit 1 g/L Glucose, 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin. Zelllinien und primäre Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Passagierung wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 X Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von frischem Medium (10 % FCS) inaktiviert und die Zellen vereinzelt ausgesät. Die Zellzahl wurde mit dem Zellzähler – TC10™ Automatic Cell Counter von BioRad bestimmt.

#### 3.6.3 Lipofektion

Für die Lipofektion wurden  $3,5 \cdot 10^6$  Zellen auf einer T75-Flasche ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. 37,5 µl Lipofectamin 2000 von Thermo Fisher Scientific wurde in Ansatz A mit 1875 µl Opti-MEM inkubiert. In Ansatz B wurde 15 µg Plasmid-DNS oder 15 µg siRNS zu 1875 µl Opti-MEM gegeben. Beide Ansätze wurden fünf Minuten separat inkubiert bevor sie zusammengegeben wurden. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurde der Lipofectamin-DNS/RNS-Ansatz zu den Zellen gegeben. Für Plasmid-Transfektionen wurden die Zellen nach 24 Stunden geerntet oder behandelt. Bei siRNS-Transfektionen wurden die Zellen nach 72 Stunden erneut transfiziert und nach weiteren 24 Stunden entsprechend des Experimentes behandelt oder geerntet.

#### 3.6.4 Elektroporation

HeLa-Zellen wurden trypsiniert und  $3,5 \cdot 10^6$  Zellen pelletiert. 550 µL Transfektionspuffer wurden zu 15 µg siRNS oder Plasmid-DNS gegeben und das Zellpellet wurde im DNS/RNS-Transfektionspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden in eine Elektroporationsküvette (4 mm Spaltbreite) übertragen und elektroporiert (250 V, 1500 µF, für 25 ms). Nach Zugabe von 550 µl vorgewärmten FCS wurden die Zellen in 20 % konditioniertem Medium ausgesät. Bei Plasmid-DNS Elektroporationen wurden die Zellen nach 24 Stunden entsprechend des Versuchs behandelt oder geerntet. Bei siRNS-Behandlungen wurden die Zellen nach 72 Stunden erneut elektroporiert und nach 24 Stunden behandelt oder geerntet.

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Transfektionspuffer:</b> | 21 mM HEPES<br>137 mM NaCl<br>5 mM KCl<br>0,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>6 mM D-Glucose<br>pH 7,15 |
|-----------------------------|--|

#### 3.6.5 Zellernte und Zelllyse

Die Zellernte erfolgte nach zweimaligem Waschen der adhärenen Zellen mit PBS durch das Abschaben der Zellen in PBS. Für FormA untersuchungen wurden die Zellen in 50 mM TRIS/Acetate-Puffer pH 8,0 gewaschen und in jenem Puffer mit Zellschabern vom Boden der Kultivierungsflasche gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 1000 g und bei 4 °C für 10 min pelletiert. Primäre Zellen wurden bei 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert.

Für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot wurde das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es bei -80 °C gelagert wurde. Zur weiteren Verwendung wurde das Zelllysate zunächst zentrifugiert (13000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand für eine Proteinkonzentrationsbestimmung und eine SDS-PAGE verwendet.

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>NP40-Lysepuffer:</b> | 10 mM TRIS/HCl<br>0,1 % (v/v) NP40<br>10 mM NaCl<br>3 mM MgCl <sub>2</sub><br>pH 7,4 |
|-------------------------|--|

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>RIPA-Lysepuffer</b> | 50 mM TRIS/HCl<br>150 mM NaCl<br>0,5 % EDTA<br>1 % (v/v) NP40 |
|------------------------|---|

#### 3.7 Protein Persulfid Detektions Protokoll

Das *“protein persulfide detection protocol”* (ProPerDP) von Dr. Éva Dóka<sup>153</sup> wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Péter Nagy (Budapest) in Zusammenarbeit mit Dr. Éva Dóka nach den Angaben der Publikation durchgeführt. Abweichend dazu wurden die Zellen eine Stunde mit IAB behandelt und die persulfidierten Proteine mit 5 mM TCEP von den Beads gespalten.

#### 3.8 Lipidperoxidations-Färbung

Lipidperoxidation wurde mit BODIPY™ 581/591 C11 oder dem Image-iT™ Lipidperoxidations-Kit (beide von Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) untersucht. Primäre Zellen wurden mit 100 nM Liproxtatin für zwei Stunden vorbehandelt und mit 100 µM Wasserstoffperoxid behandelt. BODIPY™ 581/591 C11 wurde 1 µM in neuem Medium mit

den Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und für 5 min mit Hoechst gefärbt bevor mikroskopische Aufnahmen gemacht wurden.

#### **3.9 Cell-Titer-Blue-Assay**

Primäre Zellen wurden auf PLL-beschichteten 24-Well Platten ausgesät (20.000 pro Well) und in Proliferationsmedium kultiviert. CellTiter-Blue®-Reagenz (CTB) des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays wurde nach Herstellerangaben zum Medium zugegeben. 100 µl des konditionierten Mediums wurden in eine 96-Well Platte überführt und die Absorption gemessen. 8000 HeLa-Zellen wurden direkt in 96-Well Platten ausgesät, mit CTB-Reagenz versetzt und die Absorption gemessen.

#### **3.10 Quantitative Echtzeit-PCR**

##### **3.10.1 RNS-Isolation**

Die RNS-Isolation erfolgte durch Resuspension der geernteten Zellen (siehe Abschnitt 3.6.5) in 500 µl peqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH). Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die RNS-Isolation erfolgte durch Inkubation für 10 Minuten mit 100 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C). Die obere wässrige Phase wurde zur Fällung der RNS mit 250 µl Isopropanol gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte RNS wurde durch Zentrifugation pelletiert (12000 g, 10 min, 4 °C) und zweimal mit je 750 µl 75 % igem Ethanol gewaschen. Die RNS wurde bei 55 °C getrocknet und in Wasser aufgenommen, bevor die Konzentration am Nanodrop bestimmt wurde.

##### **3.10.2 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die isolierte RNS wurde direkt für die reverse Transkription (RT) zur Generierung von cDNS eingesetzt. Dafür wurde die RNS mit den Komponenten in Tabelle 26 versetzt und nach dem Programm in Tabelle 27 im Thermozykler in cDNS umgeschrieben. Die Qualität und Konzentration der erhaltenen cDNS wurde am Nanodrop bestimmt. Die erhaltene cDNS wurde mit Power SYBR® Green PCR Master Mix und 0,25 µM Primern (siehe Tabelle 8) entsprechend des Herstellerprotokolls angesetzt und in dem Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System Thermozykler als Duplikat analysiert. Das verwendete Programm ist in Tabelle 28 aufgeführt. Für die Auswertung wurden die delta CT-Werte auf das *housekeeping* Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bezogen und als Vielfaches der Kontrolle berechnet.

### 3. Material und Methoden

---

**Tabelle 26:** Zusammensetzung und Konzentration der Komponenten für die reverse Transkription.

| <b>Komponenten</b>                 | <b>Endkonzentrationen</b> |
|------------------------------------|---------------------------|
| 10 X RT-Buffer                     | 1 X                       |
| dNTPs (100 mM)                     | 4 mM                      |
| 10 X Random Primer (Hexamere)      | 1 X                       |
| RNase Inhibitor                    | 2 Units/ $\mu$ l          |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 2,5 Units/ $\mu$ l        |

**Tabelle 27:** Programm des Thermozyklers für die reverse Transkription.

|                       | <b>Temperatur /°C</b> | <b>Zeit</b> |
|-----------------------|-----------------------|-------------|
|                       | 25                    | 10 min      |
| Primerhybridisierung  | 60                    | 5 min       |
| Reverse Transkription | 37                    | 2 h         |
| Inaktivierung         | 85                    | 5 min       |

**Tabelle 28:** PCR-Programm für die qRT-PCR mit 40 Zyklen und Dissoziationskurve.

| <b>PCR-Phase</b>     | <b>Temperatur /°C</b> | <b>Zeit</b> |
|----------------------|-----------------------|-------------|
| Denaturierung        | 95                    | 15 min      |
| Denaturierung        | 95                    | 15 sec      |
| Primerhybridisierung | 60                    | 20 sec      |
| Amplifikation        | 72                    | 35 sec      |
| Denaturierung        | 95                    | 15 sec      |
| Primerhybridisierung | 60                    | 1 min       |
| Denaturierung        | 95                    | 15 sec      |

### 3.11 SDS-PAGE und Western Blot

#### 3.11.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zelllysate wurden nach dem Auftauen für 10 min bei 14000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für eine Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Die Bestimmung erfolgte in Duplikaten mit dem BC Assay Protein Quantitation Kit von Interchim nach Herstellerangaben.



Die Proteinkonzentration von aufgereinigten Proteinen wurde am Nanodrop bei 280 nm gemessen. Die Konzentrationen wurden mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden mithilfe des Expasy ProtParam Tools von Expasy bestimmt (<https://web.expasy.org/protparam/>).

#### 3.11.2 SDS-PAGE

Zur Kontrolle der Proteinexpression in *E.coli* und der Reinheit von rekombinanten Proteinen aus der Proteinaufreinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Bakterienpellets oder Proteinproben wurden in Protein Ladepuffer von LI-COR Biosciences und 100 mM DTT resuspendiert, für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden mit den Mini-Protean® TGX™ Gelen von BioRad in einer SDS-PAGE bei 120 V separiert. Zur Auftrennung der Pro-PerDP-Proben wurden 12 %-ige Polyacrylamidgele gegossen und anschließend mit Silbernitrat gefärbt. Die Coomassie-Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel erfolgte durch Inkubation in der Coomassie-Färbelösung. Hintergrundsignale wurden durch Zugabe von der Entfärbelösung entfernt.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Laufpuffer:</b>            | 0,025 M TRIS<br>0,192 M Glycin<br>0,1 % SDS             |
| <b>Coomassie-Färbelösung:</b> | 10 % Essigsäure<br>40 % Ethanol<br>0,1 % Coomassie R250 |
| <b>Entfärbe-Lösung:</b>       | 20 % Ethanol<br>10 % Essigsäure                         |

#### 3.11.3 Western Blot

Zur Detektion von spezifischen Proteinen in Zelllysaten wurden definierte Proteinmengen des Lysates mit Protein Ladepuffer von LI-COR Biosciences und 100 mM DTT versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine des Lysates wurden mit Mini-Protean® TGX™ Gelen von BioRad aufgetrennt und mit dem Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packeten von BioRad bei 25 V, 2,5 A für 7 min auf Membranen transferiert. Unspezifische Bindungsstellen der Antikörper wurden durch einstündige Inkubation der Membran in Blockierungspuffer blockiert. Die Inkubation mit primären Antikörpern in Blockierungspuffer (siehe Tabelle 10) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit PBST (PBS mit 0,05 % Tween) gewaschen bevor die sekundären Antikörper zugegeben wurden. Die sekundären Antikörper in Blockierungspuffer inkubierten eine Stunde und die Membran wurde erneut dreimal mit PBST für je 10 min gewaschen. Zur Signaldetektion wurde

das Odyssee Infrared Imaging System verwendet. Die Bandenintensitäten wurden mit der Image Studio Lite Analysis Software von LI-COR Biosciences quantifiziert. Die Signalintensitäten wurden auf das  $\beta$ -Aktin-Signal normalisiert.

**Blockierungspuffer:**                    2,5 % BSA  
    0,05 % Tween  
    PBS

#### 3.12 Immunozytochemie

##### 3.12.1 Organotypische Schnittkultur

Für Immunfluoreszenzaufnahmen der organotypischen Schnittkulturen wurden diese nach der Behandlung für 30 min in 4 % Roti-Histofix fixiert. Die Schnitte wurden für 45-60 min in Permeabilisierungspuffer inkubiert und dreimal für je 15 min in PBS gewaschen. Vor der Zugabe von den primären Antikörpern wurden die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer blockiert. Der Antikörper inkubierte über Nacht bei 4 °C mit den Schnitten, siehe Tabelle 10. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 15 Minuten wurden die Proben eine bis zwei Stunden mit den sekundären Antikörpern in Antikörperpuffer inkubiert und anschließend erneut dreimal mit PBS für je 15 Minuten gewaschen. Die Schnitte wurden mit Fluoromount-G<sup>®</sup> auf Objektträger eingebettet und bis zur Analyse dunkel bei 4 °C gelagert.

**Permeabilisierungspuffer**            1 % Triton X-100  
    in PBS

**Blockierungspuffer**                    5 % (v/v) normales Ziegen Serum  
    0,2 % Triton X-100  
    in PBS

**Antikörperpuffer**                    2,5 % (v/v) normales Ziegen Serum  
    0,1 % Triton X-100  
    in PBS

##### 3.12.2 Zellkultur

Für die Immunozytochemie wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin (PLL) beschichtete Deckgläschen ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 4 % Roti-Histofix für 15 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS mit 0,1 % Triton X-100 wurden unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern, siehe Tabelle 10, in Antikörperpuffer erfolgte über Nacht bei 4 °C. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Proben dreimal in PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Der sekundäre Antikörper inkubierte eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Proben wurden erneut dreimal in

### 3. Material und Methoden

---

PBS mit 0,1 % Triton X-100 für je 10 min gewaschen. Für Zellkernfärbungen wurde Hoechst im ersten Waschschrift zugesetzt. Die Deckgläschen wurden mit Fluoromount-G® auf Objektträgern eingebettet und bis zur Analyse dunkel bei 4 °C gelagert. Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und mit ImageJ analysiert.

**Blockierungspuffer**                      5 % (v/v) normales Ziegenserum  
  0,5 % BSA  
  0,1 % Triton X-100  
  in PBS

**Antikörperpuffer**                        2,5 % (v/v) normales Ziegenserum  
  0,25 % BSA  
  0,1 % Triton X-100  
  in PBS

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Struktur-Funktionsbeziehungen von FeS-Glutaredoxinen

#### 4.1.1 Einfluss der monothiol- und dithiol-Struktur auf die FeS-Zentrum-Koordination und -Stabilität

Eine strukturelle Analyse von monothiol-Glutaredoxinen (Grx) mit CGFS-aktivem Zentrum und dithiol-Glutaredoxinen mit CxxC/S-aktivem Zentrum identifizierte fünf konservierte zusätzliche Aminosäuren in den monothiol-Grx, die eine verlängerte Loop-Struktur formen. Die Position des Loops liegt an einer strukturell interessanten Position direkt vor dem aktiven Zentrum und folglich auch in der direkten Umgebung des FeS-Zentrums<sup>154</sup>. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christopher H. Lillig (Greifswald) wurde der Einfluss des Loops und des aktiven Zentrums auf die unterschiedlichen Funktionen der monothiol- und dithiol-Grx untersucht. Zur Untersuchung des Einflusses von monothiol- oder dithiol-Strukturelementen auf die Koordination und Stabilität des FeS-Zentrums wurden Mutanten generiert, in denen die Loop-Strukturen ausgetauscht sind (Abbildung 5). Das monothiol-Grx5 wurde mit dem dithiol-Loop modifiziert und nachfolgend Grx5 DT abgekürzt und dithiol-Grx2 wurde mit dem monothiol-Loop versehen (Grx2 MT). Da für manche Funktionen und die Koordination des FeS-Zentrums von Grx2 das CSYC-Motiv des aktiven Zentrums notwendig ist, wurden zusätzlich Grx5-Mutanten generiert, die dieses aktive Zentrum mit monothiol- oder dithiol-Loop besitzen.

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>Grx2 wt</b>             | ... K - - - - - TS <b>CSYC</b> ...           |
| <b>Grx2 MT (monothiol)</b> | ... K <b>GTPEQ</b> TS <b>CSYC</b> ...        |
| <b>Grx5 CSYC</b>           | ... K <b>GTPEQ</b> <b>PQ</b> <b>CSYC</b> ... |
| <b>Grx5 wt</b>             | ... K <b>GTPEQ</b> <b>PQ</b> <b>CGFS</b> ... |
| <b>Grx5 DT (dithiol)</b>   | ... K - - - - - <b>PQ</b> <b>CGFS</b> ...    |
| <b>Grx5 DT CSYC</b>        | ... K - - - - - <b>PQ</b> <b>CSYC</b> ...    |

**Abbildung 5: Primärsequenz der generierten Glutaredoxin-Mutanten mit dem Austausch des Loops und des aktiven Zentrums.**

Der verlängerte Loop in monothiol-Grx5 wird von fünf Aminosäuren (grau) gebildet, welche in das dithiol-Grx2 eingefügt wurden. In monothiol Grx5 wurden die fünf Aminosäuren zur Generierung des dithiol-Loops deletiert. Außerdem wurde das Motiv des aktiven Zentrums (blau) ausgetauscht.

Zur Sicherstellung eines gleichmäßigen Verhältnisses von holo- und apo-Grx für spektroskopische Untersuchungen, wurde der Eisengehalt der rekonstituierten Proteine kolorimetrisch nach Fish et al.<sup>142</sup> bestimmt (Tabelle 29). Die Mutanten lagen zu rund 70 % in ihrer holo-Form vor. Die spektroskopische Bestimmung des FeS-Zentrum-Gehalts mithilfe des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{430\text{ nm}} = 3260\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  von holo-Grx2<sup>114</sup> bestätigte eine gleichmäßige FeS-Zentren-Besetzung von 70 %.

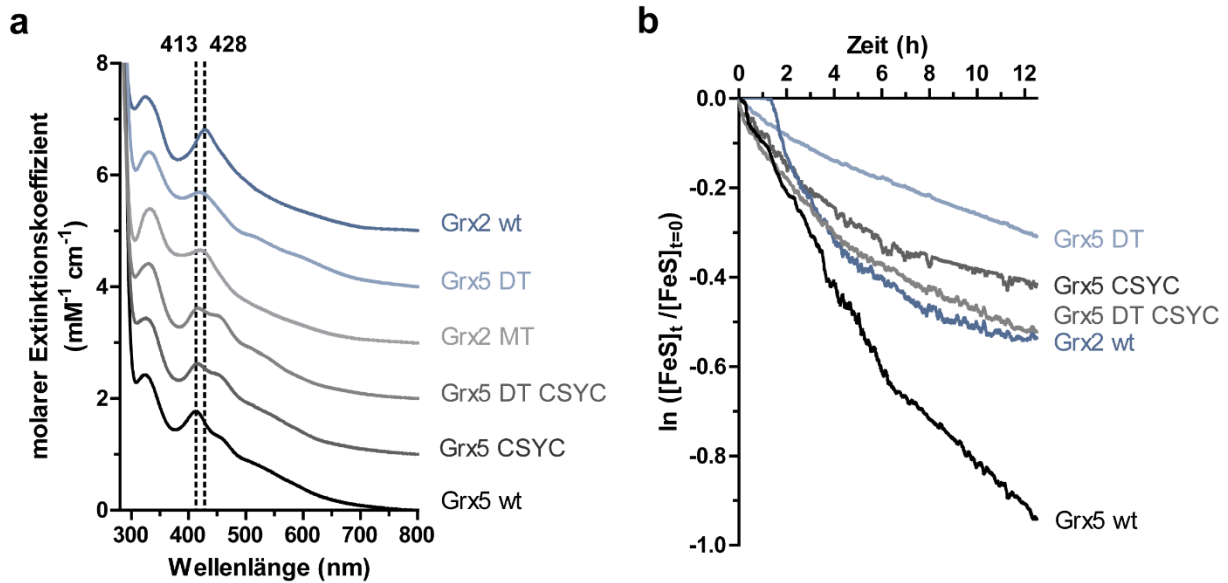
## 4. Ergebnisse

**Tabelle 29: Kolorimetrische und spektroskopische Bestimmung des Eisen- und FeS-Gehalts in holo-Glutaredoxin-Loop-Mutanten.**

In den Glutaredoxin-Loop-Mutanten wurde ein FeS-Zentrum rekonstituiert und die holo-Grx in PBS umgepuffert. Die Daten der kolorimetrischen Bestimmung sind als Mittelwert mit der absoluten Abweichung von zwei Experimenten dargestellt. Die spektroskopische Bestimmung des FeS-Gehalts zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung bei  $n = 3$ . Die Daten sind publiziert in Trnka, Engelke, Gellert et al.<sup>154</sup>.

| Protein      | Eisengehalt                                 | FeS-Gehalt                                 |
|--------------|---|--|
|              | kolorimetrisch<br>(mol pro mol Grx-Monomer) | spektroskopisch<br>(mol pro mol Grx-Dimer) |
| Grx2 wt      | 0,72 ± 0,03                                 | 0,69 ± 0,14                                |
| Grx2 MT      | 0,62 ± 0,00                                 | 0,64 ± 0,14                                |
| Grx5 wt      | 0,73 ± 0,01                                 | 0,72 ± 0,26                                |
| Grx5 CSYC    | 0,72 ± 0,10                                 | 0,68 ± 0,21                                |
| Grx5 DT      | 0,67 ± 0,03                                 | 0,65 ± 0,17                                |
| Grx5 DT/CSYC | 0,79 ± 0,04                                 | 0,69 ± 0,19                                |

UV/Vis-Spektroskopie der Glutaredoxine 2 und 5 und ihrer Mutanten mit rekonstituierten FeS-Zentren zeigten die charakteristischen FeS-Zentrum-Absorptionsbanden bei 320 nm und um 420 nm (Abbildung 6 a). Bei Grx2 liegt das zweite Maximum bei 428 nm, bei Grx5 bei 413 nm. Die Loop-Mutation in Glutaredoxin 5 führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 420 nm und folglich in die Richtung des Maximums von Grx2. Grx2 mit monothiol-Loop zeigte eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 421 nm. Während der Austausch der Loop-Struktur einen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften der gebundenen FeS-Zentren zeigte, zog die zusätzlich veränderte Sequenz des aktiven Zentrums keine deutlichen Veränderungen nach sich. Anschließend wurde die Stabilität der FeS-Zentren unter aeroben Bedingungen bei 25 °C durch Messung der Absorption bei 420 nm verglichen. Der Zerfall des Zentrums konnte mit einer Kinetik erster Ordnung beschrieben werden und zeigte einen schnelleren Zerfall mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $4,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  bei holo-Grx5 im Vergleich zu holo-Grx2 mit  $1,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 6 b, Tabelle 30). Die Insertion des dithiol-Loops in Grx5 führte zu einer Stabilisation des FeS-Zentrums mit einer Zerfallgeschwindigkeitskonstante von  $0,94 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  und damit zu einer vergleichbaren Geschwindigkeitskonstante wie der des FeS-Zentrums in Grx2. Die Grx5-Mutante mit dem CSYC-Motiv im aktiven Zentrum zeigte ebenfalls eine Stabilisation des FeS-Zentrums mit einer Zerfallgeschwindigkeitskonstante von  $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  und für die Doppelmutante von  $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .



**Abbildung 6: Einfluss des monothiol- und dithiol-Loops auf die Stabilität des gebundenen FeS-Zentrums.**

(a) UV/Vis-Spektren von rekonstituierten, entsalzten holo-Grx-Loop-Mutanten zeigen eine Verschiebung der Absorptionsbande um 420 nm. Die Spektren wurden auf ihren molaren Extinktionskoeffizienten normiert und für eine deutlichere Übersicht um einen Wert von  $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  nach oben verschoben. Die Daten dieser Abbildung sind publiziert in Trnka, Engelke, Gellert et al.<sup>154</sup>. (b) Die Stabilität der FeS-Zentren in den Grx-Loop-Mutanten wurde bei 420 nm unter aeroben Bedingungen bei 25 °C bestimmt.  $[\text{FeS}]_t$  stellt die FeS-Zentrum-Konzentration zum Zeitpunkt  $t$  dar und  $[\text{FeS}]_{t=0}$  die initiale Konzentration dar. Die Steigung der linearen Regression ergab die Geschwindigkeitskonstante  $k$  (Kinetik erster Ordnung). Die Absorptionsabnahme ist eine Beispielmessungen von  $\geq 3$  Messungen.

**Tabelle 30: Die Stabilität der FeS-Zentren in den holo Glutaredoxin-Loop-Mutanten unter aeroben Bedingungen.**

Die FeS-Zentrum-Stabilität unter nativen Bedingungen wurde mithilfe einer linearisierten Kinetik erster Ordnung als Geschwindigkeitskonstante  $k$  berechnet. Die Daten sind publiziert in Trnka, Engelke, Gellert et al.<sup>154</sup>.

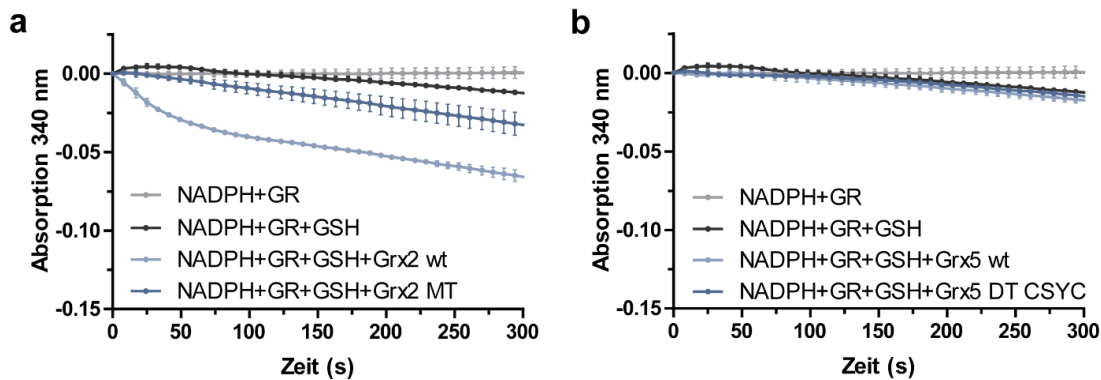
| Protein       | k-Rate ( $\cdot 10^{-5} \cdot \text{s}^{-1}$ ) |
|---------------|--|
| Grx2 wt       | $1,1 \pm 0,2$                                  |
| Grx5 wt       | $4,1 \pm 0,6$                                  |
| Grx5 CSYC     | $1,6 \pm 0,3$                                  |
| Grx5 DT       | $0,9 \pm 1,7$                                  |
| Grx5 DT /CSYC | $1,2 \pm 0,2$                                  |

#### 4.1.2 Oxidoreduktaseaktivität der Glutaredoxin-Loop-Mutanten

Die Oxidoreduktaseaktivität der Grx-Loop-Mutanten wurde mit dem Standardexperiment zur Untersuchung der Glutaredoxinaktivität, dem HED-(Hydroxyethyl-disulfid)-Assay untersucht. Dafür wurde *in vitro* das GSH-System mit Glutathion, Glutathion-Reduktase und NADPH, dessen Reduktion durch Absorptionsmessung bei 340 nm detektiert wurde, nachgestellt. HED ist die Disulfidform des  $\beta$ -Mercaptoethanols und reagiert mit Glutathion zu glutathionyliertem  $\beta$ -Mercaptoethanol, welches anschließend von den Glutaredoxinen unter NADPH-Verbrauch

## 4. Ergebnisse

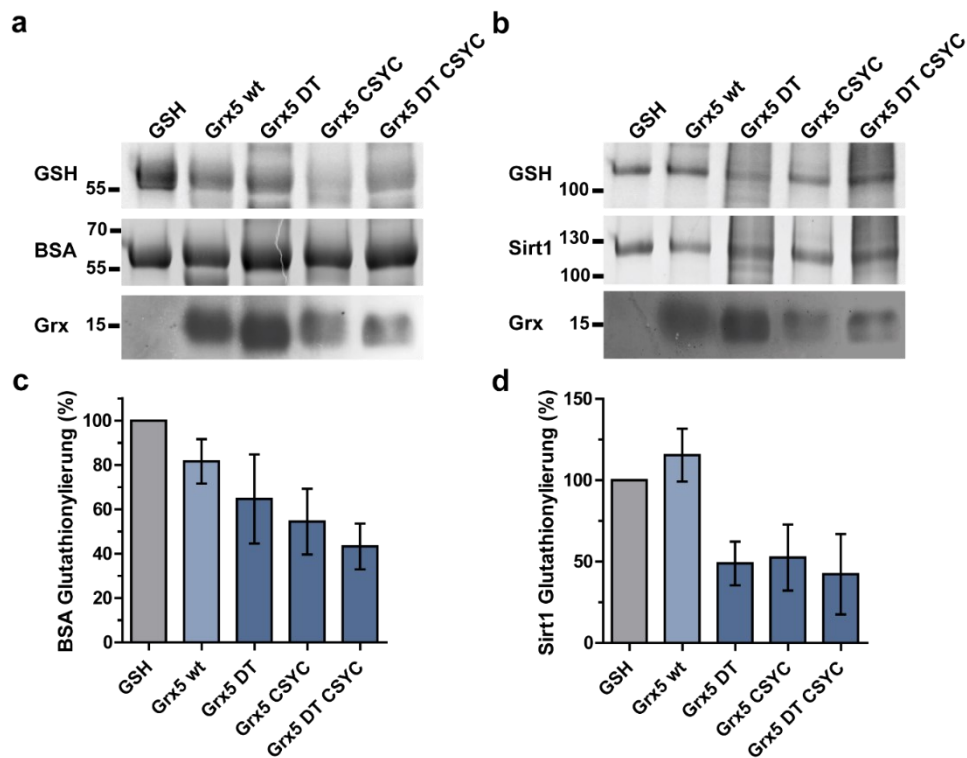
reduziert werden kann. Der Wildtyp von Grx2 führte im Gegensatz zum Wildtyp von Grx5 zu einer Absorptionsabnahme (Abbildung 7). Modifikation des Grx2 mit dem monothiol-Loop führt zu einer Verminderung der Oxidoreduktaseaktivität (Abbildung 7 a). Monothiol-Grx5 mit dithiol-Loop-Mutation und aktivem Zentrum der dithiol-Glutaredoxine (CSYC) zeigte keinen erhöhten NADPH-Verbrauch und damit keine Oxidoreduktaseaktivität in diesem Experiment (Abbildung 7 b).



**Abbildung 7: Einfluss der Loop-Strukturen auf die Glutaredoxin-spezifische Oxidoreduktaseaktivität.**

NADPH-Absorptionsabnahme bei 340 nm mit dem artifiziellen Substrat Hydroxyethylidisulfid (HED) (7 mM) nach Zugabe von je 1  $\mu$ M Grx2 und Grx2-Loop-Mutante (a) oder Grx5 und Grx5-Loop-Mutante mit Austausch des aktiven Zentrums zu CSYC (b) im zeitlichen Verlauf. GR steht für Glutathion-Reduktase. Es sind die Mittelwerte aus zwei Messwerten mit der absoluten Abweichung als Fehlerbalken dargestellt.

Glutathionyliertes  $\beta$ -Mercaptoethanol stellt ein artifizielles Substrat der Glutaredoxine dar. Zur Untersuchung der Deglutathonylierungsaktivität der Glutaredoxin-Mutanten an Proteinen wurden Rinder-Serumalbumin (BSA) und rekombinantes Sirtuin1 (Sirt1) mit Dieosinglutathiondisulfid (Di-Eosin-GSSG) glutathionyliert und die Deglutathonylierungsaktivität durch Inkubation mit reduzierten Glutaredoxin-Mutanten betrachtet. Die Menge an fluoreszierendem, glutathionyliertem (Eosin-GSH)-BSA oder (Eosin-GSH)-Sirt1 wurde nach der Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE im UV-Licht detektiert und die Proteinmenge mittels Coomassie-Färbung (Abbildung 8 a, b). Alle Grx5-Mutanten zeigen eine erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Protein in der Deglutathonylierung der Proteine (Abbildung 8 c, d). Die Doppelmutante von Grx5 mit CSYC-aktivem Zentrum und dithiol-Loop wies die höchste Aktivität mit 57 % deglutathonyliertem BSA oder Sirt1 auf, während Grx5 mit dithiol-Loop 35 % des BSA und 51 % des Sirt1 deglutathonylierte.



**Abbildung 8: Vergleich der Deglutathionierungsaktivitäten der Glutaredoxin-Loop-Mutanten.**

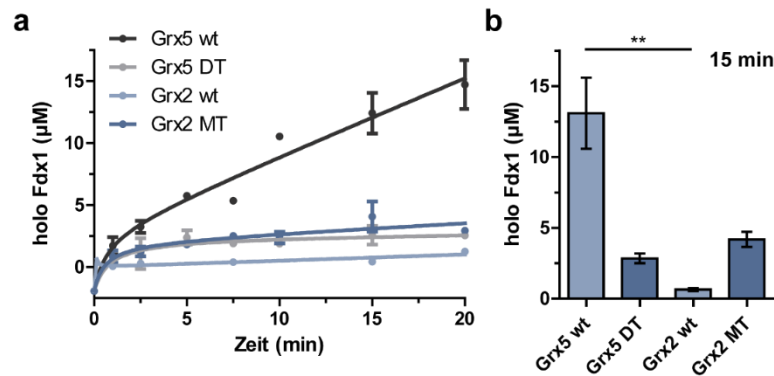
(a, b) Reduziertes BSA (a) oder Sirt1 (b) wurden mit Di-Eosin-GSSG für eine Stunde glutathionyliert. Reduzierte Glutaredoxin-Mutanten wurden für 15 Minuten mit 1 mM GSH und mit 10  $\mu$ M glutathionyliertem BSA oder Sirt1 inkubiert. Fluoreszierende, glutathionylierte Proteine wurden mithilfe von UV-Licht nach einer SDS-PAGE detektiert und Proteine mit Coomassie gefärbt. (c, d) Quantifizierung der Deglutathionierungsaktivität der Grx5-Mutanten durch Korrelation der densitometrischen Intensitäten der GSH- und Proteinbanden der Substrate und der Proteinbanden des eingesetzten Grx. Die Daten sind als Mittelwerte von drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung dargestellt und publiziert in Trnka, Engelke, Gellert et al.<sup>154</sup>.

### 4.1.3 Funktion der Glutaredoxin-Loop-Mutanten in der FeS-Biosynthese

Eine essenzielle Funktion in der FeS-Zentrum-Biosynthese ist der Transfer des synthetisierten FeS-Zentrums auf apo-Zielproteine. Zur Untersuchung der FeS-Zentrum-Transferfunktion von Grx5 und den Loop-Mutanten wurden FeS-Zentrum-Transferexperimente in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Mühlhoff (Marburg) durchgeführt. Es wurde der Transfer des FeS-Zentrums von holo-Grx auf apo-Ferredoxin1 wie in Abschnitt 3.3.9 beschrieben untersucht. Holo-Ferredoxin ist eine geschwindigkeitsbestimmende Komponente für die Reduktion von Cytochrom c in Anwesenheit von Ferredoxin-NADPH-Reduktase und NADPH. Mithilfe einer Kalibrierungskurve mit definierten Konzentrationen an holo-Ferredoxin konnte der FeS-Transfer über kolorimetrische Messungen der Cytochrom c-Reduktion quantifiziert werden. Grx2 Wildtyp wies im Gegensatz zu Grx5 Wildtyp keine Funktion in der Übertragung des FeS-Zentrums auf (Abbildung 9). Der Austausch der Loop-Strukturen zeigte einen deutlichen Einfluss auf den FeS-Zentrum-Transfer. Die Loop-Mutation in Grx5 führte zu einem Aktivitätsverlust auf 22 % der Grx5 Wildtyp Aktivität (Abbildung 9 b). Die Insertion des



monothiol-Loops in Grx2 (Grx2 MT) führte zu einem Gewinn der FeS-Transferfunktion auf 32 % der Grx5 Wildtyp Aktivität.

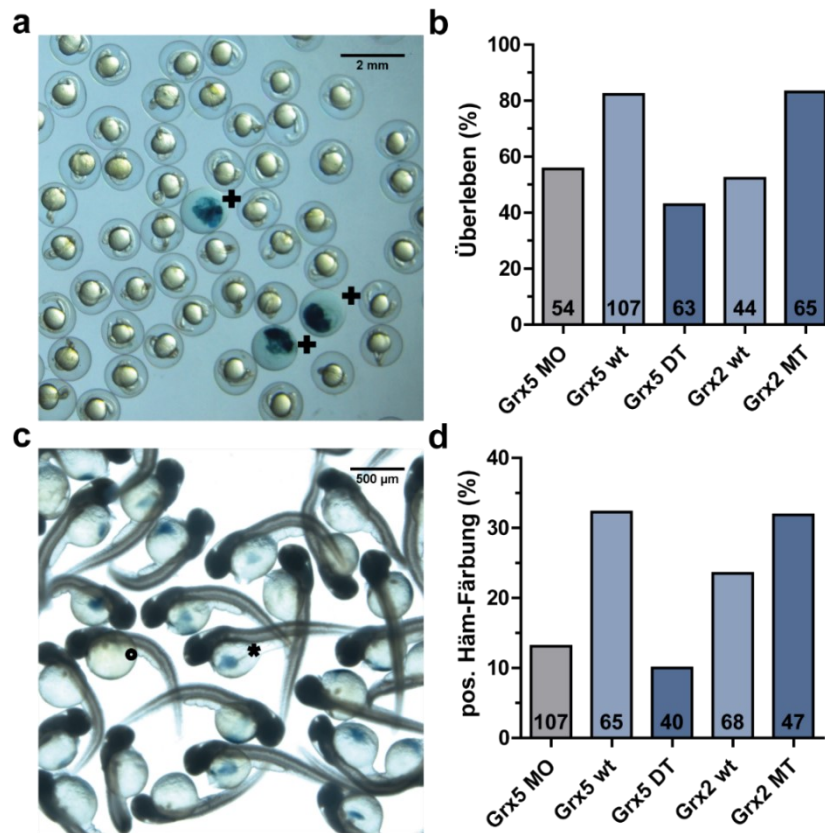


**Abbildung 9: FeS-Zentrum-Transferfunktion der Glutaredoxin-Loop-Mutanten.**

(a) 50 µM holo-Grx wurde mit 25 µM apo-Ferredoxin (Fdx1) in Anwesenheit von 4 mM GSH und 25 µM Grx1 inkubiert und der zeitliche Verlauf des FeS-Zentrum-Transfers beobachtet. Die Quantifizierung der FeS-Zentrum-Insertion in apo-Fdx1 wurde kolorimetrisch über die Reduktion von Cytochrom c in Anwesenheit der Ferredoxin-NADPH-Reduktase und NADPH gemessen. Eine Kalibrierungskurve von definierten holo-Fdx1 Konzentrationen diente der holo-Fdx1 Bestimmung. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf einer Beispielmessung mit Mittelwert und der absoluten Abweichung von zwei Messpunkten. Grx2 wurde im zeitlichen Verlauf einmal gemessen. (b) Die Holo-Fdx1 Konzentration nach 15 min ist als Mittelwert ± SEM von drei bzw. vier Messungen dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zum Vergleich der Grx5 wt-Aktivität mit Grx5 DT, Grx2 wt und Grx2 MT durchgeführt. Die Sterne markieren einen p-Wert mit \*\* p < 0,01.

Außerdem wurde die Funktion der Grx-Loop-Mutanten in der FeS-Zentrum-Biosynthese *in vivo* im Zebrafisch untersucht, siehe Abschnitt 3.4. Die Zebrafischexperimente wurden in der Core Facility Bonn unter Prof. Dr. Benjamin Odermatt und in Zusammenarbeit mit Tobias T. Lindenberg durchgeführt. Zur Untersuchung der Funktionalität der Grx-Loop-Mutanten wurde die Grx5-Expression im Zebrafisch mithilfe eines Morpholinos herabgesetzt. Verminderte Grx5-Expressionen verringerten die Überlebensrate der Zebrafischlarven von 98 % auf 56 %. Komplementierung der Grx5-Defizienz durch die Injektion von Grx-Loop-Mutanten-kodierender mRNA führte zu einer Erhöhung der Überlebensrate auf 82 % für Grx5 wt und auf 83 % für Grx2 mit monothiol-Loop-Mutation (Abbildung 10 a, b). Grx2 wt und Grx5 mit dithiol-Loop waren nicht in der Lage, den Verlust des Grx5 wt zu komplementieren. Eine Grx5-Defizienz im Zebrafisch führt zu einer Störung der Häm-Synthese<sup>36</sup>. Lediglich 13 % der Grx5-defizienten Fische wiesen eine positive Häm-Färbung auf, während 96 % uninjizierter Kontrollfische eine positive Häm-Färbung zeigten (Abbildung 10 c, d). Während 32 % der mit Grx5 wt mRNA komplementierten Fische eine Häm-Färbung aufwiesen, führte die Injektion von mRNA, kodierend für Grx5 mit dithiol-Loop, zu keiner Rettung des Phänotyps in der Häm-Biosynthese (10 % Häm-positive Fische). Grx2 mit monothiol-Loop-Mutation war in der Lage, die Häm-Defizienz im Zebrafisch mit 32 % Häm-positiver Fische im gleichen Umfang wie Grx5 wt zu komplementieren. Wiederholungen des Experiments nach längerer Zeit zeigten die gleichen Trends, jedoch in abgeschwächter Form, was auf die Degradierung der verwendeten

mRNS zurückzuführen sein könnte. Der Loop stellt folglich ein zentrales Element für die Funktion der monothiol-Glutaredoxine im Transfer von FeS-Zentren dar.

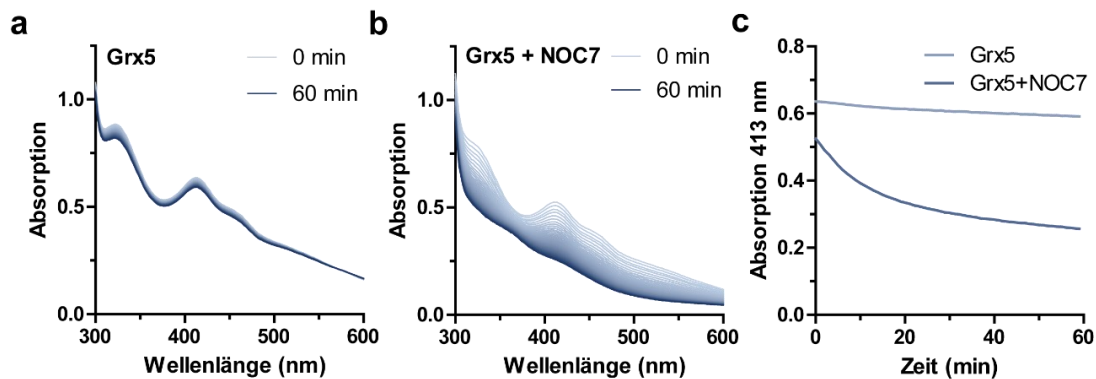


**Abbildung 10: Komplementierung verminderter Grx5-Proteinexpressionen mit den Glutaredoxin Loop-Mutanten im Zebrafisch.**

Die Proteinexpression von Grx5 wurde mithilfe eines Grx5-spezifischen Morpholinos (Grx5 MO) in Zebrafischembryonen inhibiert. Gleichzeitig wurde die verminderte Expression mit mRNS kodierend für die Grx-Loop-Mutanten komplementiert. Die mRNS der Grx-Loop-Mutanten wurde mit der identischen mitochondrialen Signalsequenz modifiziert. (a, b) Die Überlebensrate der Zebrafischembryonen 24 Stunden nach der Befruchtung ist in Grx5-defizienten Fischen vermindert. Verstorbene Embryonen wurden mit Methylenblau angefärbt (Kreuz) (a) und quantifiziert (b). (c, d) Häm-Färbung 48 Stunden nach der Befruchtung (Stern: positiv, Kreis: negativ) und Quantifizierung (d). Die Anzahl an untersuchten Fischen wurde im jeweiligen Balken dargestellt. Die Daten dieser Abbildung sind publiziert in Trnka, Engelke, Gellert et al.<sup>154</sup>.

## 4.2 Einfluss der FeS-Zentrum-Koordination auf die Reaktion mit $\cdot\text{NO}$ und als Folge daraus auf dessen zellprotektive Funktion

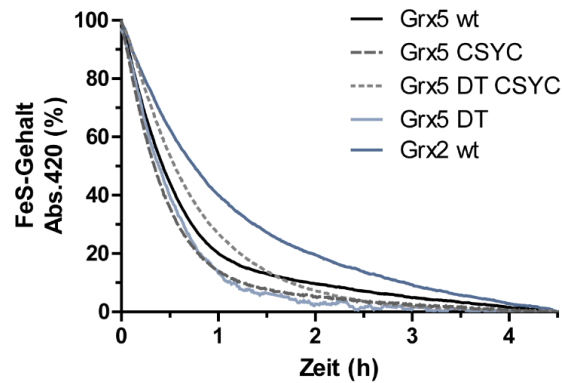
Lepka et al. zeigten den Abbau des FeS-Zentrums in Grx2 durch Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ) und die Bildung eines zell- und myelinprotektiven Dinitrosyl-Eisenkomplexes<sup>124</sup>. Daher stellte sich die Frage, ob FeS-Grx5 auch die protektive Funktion von Grx2 gegenüber hohen  $\cdot\text{NO}$ -Konzentrationen übernehmen kann. Zunächst wurde untersucht, ob das FeS-Zentrum in Grx5 auch durch  $\cdot\text{NO}$  zerstört wird. UV/Vis-Spektroskopie zeigte, wie für das in Grx2 koordinierte FeS-Zentrum, eine  $\cdot\text{NO}$ -verursachte Absorptionsabnahme bei der FeS-Zentrum-spezifischen Wellenlänge für Grx5 von 413 nm (Abbildung 11). Die Zerstörung des FeS-Zentrums durch  $\cdot\text{NO}$  ist nicht spezifisch für Grx2, sondern ist auch in FeS-Grx5 gegeben.



**Abbildung 11:** UV/Vis-Spektroskopie der Reaktion des FeS-Zentrums in Grx5 mit Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ).

(a, b) UV/Vis-Spektroskopie von rekombinantem FeS-Grx5 in An- und Abwesenheit von dem  $\cdot\text{NO}$ -Donor NOC7. Es wurde über 60 Minuten jede Minute ein Spektrum aufgenommen, was durch den Farbverlauf von hellblau (0 min) nach dunkelblau (60 min) dargestellt ist. (c) Die Absorption der FeS-Zentrum-spezifischen Wellenlänge bei 413 nm zeigt eine NOC7-induzierte Abnahme.

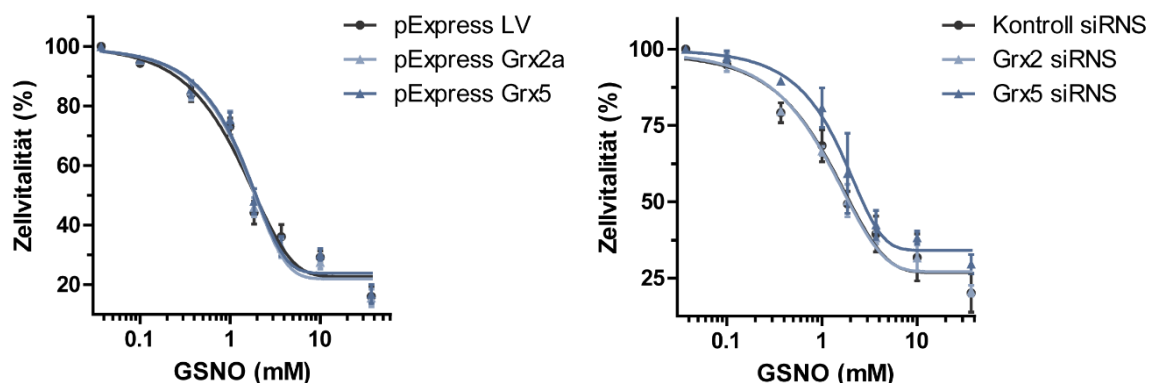
Im Folgenden wurde untersucht, ob die veränderte FeS-Zentrum-Koordination in den Loop- und aktives-Zentrum-Mutanten einen Einfluss auf die Reaktion mit  $\cdot\text{NO}$  hat (Abbildung 12). Grx5 zeigte eine geringere FeS-Zentrum-Stabilität als Grx2 gegenüber GSNO, da nach einer Stunde 20 % des ursprünglichen FeS-Gehalts in Grx5 vorlag und bei Grx2 40 %. Grx5 mit dithiol-Loop-Mutation oder Austausch des aktiven Zentrums zum Grx2-aktiven Zentrum zeigten im Gegensatz zu dem Verhalten unter nativen Bedingungen keine erhöhte Stabilität. Die Doppelmutante zeigt jedoch eine erhöhte FeS-Zentrum-Stabilität, weil nach einer Stunde 27 % des ursprünglichen FeS-Gehalts vorlag.



**Abbildung 12: Die FeS-Zentrum-Stabilität der Grx-Loop-Mutanten unter 'NO-Behandlung.**

Rekonstituierte holo-Grx-Loop-Mutanten wurden mit 1 mM GSNO versetzt und die Stabilität des FeS-Zentrums durch Absorptionssmessung bei 420 nm bei 25 °C untersucht.

Nachdem UV/Vis-Spektroskopie zeigte, dass 'NO das FeS-Zentrum in monothiol-Grx5 zerstört, wurde eine funktionale Rolle des FeS-Zentrums in Grx5 untersucht. Dafür wurde die Zellvitalität in HeLa-Zellen mit modulierten Grx2- und Grx5-Expressionen unter 'NO-Behandlung verglichen (Abbildung 13). Die Überexpression von Grx2a erhöhte die RNA-Transkriptmenge um das durchschnittlich 221-fache bezogen auf die endogene Grx2a-Expression in dem Leervektor pExpress. Die Grx5-Genexpression war 282-fach erhöht und beide Grx-Überexpressionen hatten keinen Einfluss auf die Zellvitalität unter GSNO-Behandlung. Die Grx2-Genexpression bei siRNS-Behandlung lag durchschnittlich bei 16% und für Grx5 bei 13 % bezogen auf die Grx-Expressionen in den Kontroll siRNS-behandelten Zellen. Die verminderte Grx2-Genexpression hatte keinen Einfluss auf die 'NO-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Herunterregulierte Grx5-Expression zeigte eine leichte Erhöhung der Zellvitalität. Grx2 mit monothiol-Loop zeigte im Gegensatz zu Grx2 wt einen verminderten Schutz gegenüber GSNO in organotypischen Schnittkulturen, siehe Abbildung 37 e.



**Abbildung 13: Einfluss modulierter Proteinexpressionen der mitochondrialen Glutaredoxine in HeLa-Zellen auf die Zellvitalität unter 'NO-Behandlung.**

HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren transfiziert und 24 Stunden später für 24 Stunden mit einer GSNO-Konzentrationsreihe behandelt. Für eine Herunterregulation der Proteinexpression wurden die Zellen in einem Abstand von drei Tagen zweimal mit siRNS transfiziert und 24 Stunden später für 24 Stunden mit GSNO behandelt. Die Zellvitalität wurde mit dem Cell-Titer-Blue-Assay Kit unter Messung der Fluoreszenz bestimmt und auf die Kontrollbedingungen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 4$  für die Überexpression und die Mittelwerte mit der absoluten Abweichung als Fehlerbalken bei  $n = 2$  für die Zellvitalitätsmessungen bei herunterregulierter Grx-Expression.

### 4.2.1 Führt die Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$ ausschließlich zu Dinitrosyl-Eisen-Komplexen?

Zur Untersuchung des Eisens in der Reaktion von FeS-Grx mit  $\cdot\text{NO}$ , kann eine zeitaufgelöste Resonanz-Raman-Spektroskopie Aufschluss über entstehende Eisenverbindungen geben. Eine Analyse des FeS-Zentrum-Zerfalls und die Identifikation der Produkte dieser Reaktion wurden mit der Resonanz-Raman-Spektroskopie in Kooperation mit Dr. Ingo Zebger und Dr. Anke Keidel (Berlin) untersucht. Rekombinantes FeS-Grx2 mit GSNO-Behandlung zeigte jedoch keine Banden im Resonanz-Raman-Spektrum bei der FeS-Zentrum-spezifischen Anregungswellenlänge von 514 nm (Abbildung 14). Anregungswellenlängen von 413 nm und 488 nm führten ebenfalls zu keinen Ergebnissen.

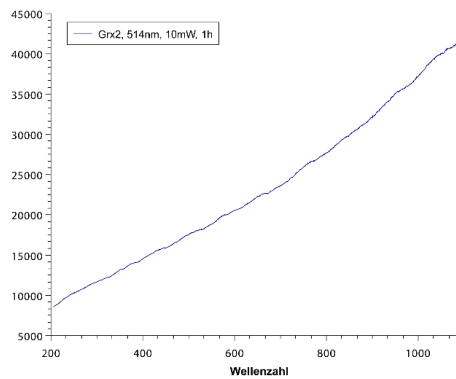


Abbildung 14: Resonanz-Raman-Spektroskopie von humanem FeS-Grx2 nach GSNO-Behandlung. Die Messung wurde für eine Stunde mit einer Anregungswellenlänge von 514 nm durchgeführt.

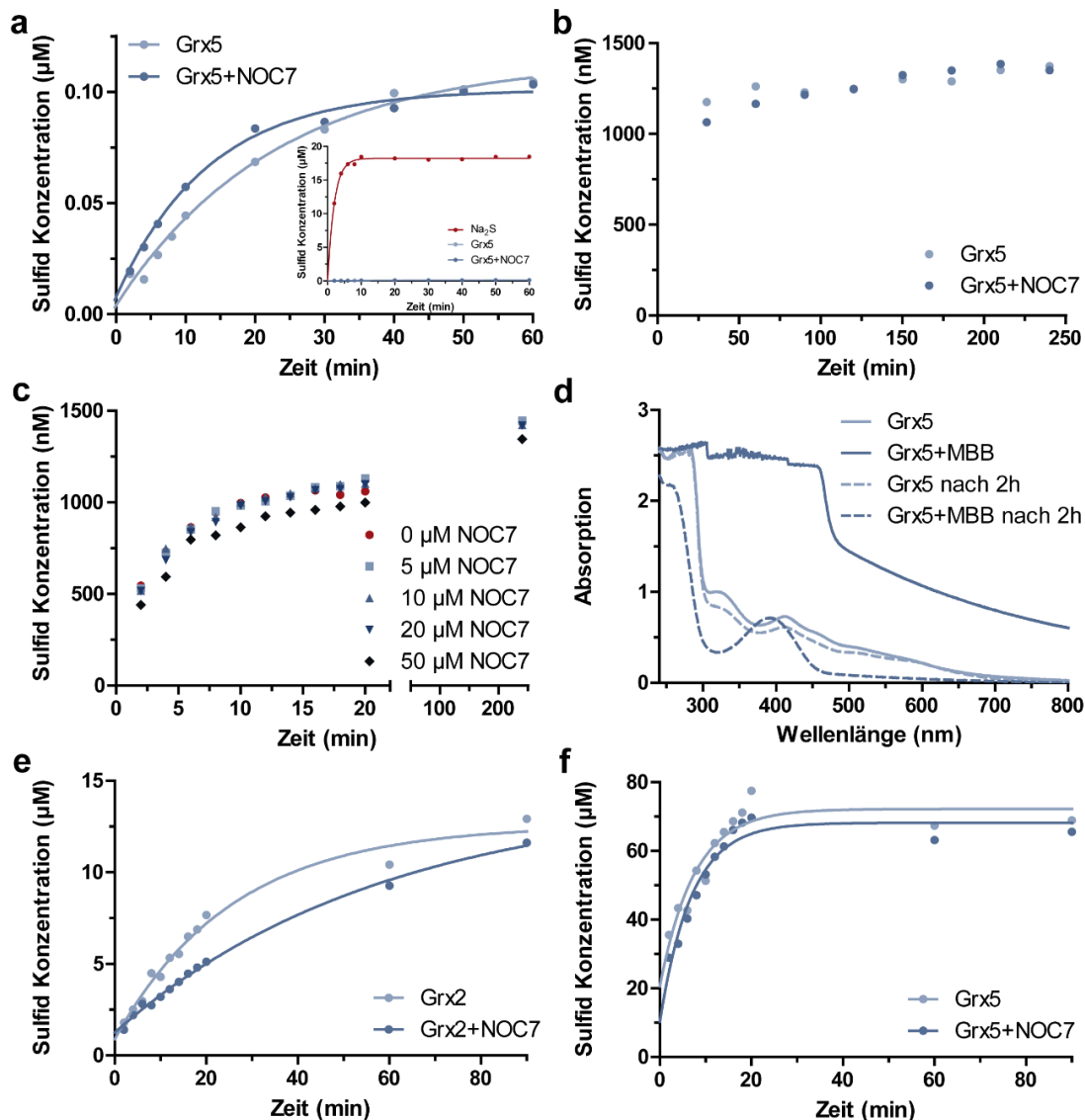
### 4.2.2 Führt die Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$ -Verbindungen zur Bildung schwefelhaltiger, bioaktiver Moleküle?

Die Degradierung des 2Fe<sub>2</sub>S-Zentrums in Glutaredoxin mit  $\cdot\text{NO}$ -Donatoren führt zur Bildung eines Dinitrosyl-Eisenkomplexes<sup>124</sup>. Der Verbleib des Schwefels aus dem FeS-Zentrum in dieser Reaktion ist bisher nicht untersucht worden. Es wurden potenzielle Produkte dieser Reaktion in den folgenden Kapiteln untersucht.

#### 4.2.2.1 Schwefelwasserstoff als potenzielles Produkt der Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$ -Verbindungen

Zunächst wurde die Entstehung von Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) als potenzielles Produkt der Reaktion von FeS-Grx mit  $\cdot\text{NO}$  untersucht. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Péter Nagy (Budapest) wurde mithilfe der Monobromobiman-Methode die Bildung von H<sub>2</sub>S bei der Reaktion von FeS-Grx mit  $\cdot\text{NO}$  untersucht. Monobromobiman (MBB) reagiert mit freigesetztem Sulfid zu dem Fluorophor Sulfidbiman, das chromatographisch aufgetrennt und quantifiziert wurde. Mithilfe einer Kalibrierungskurve wurde die Sulfidkonzentration der Probe

bestimmt. 1  $\mu\text{M}$  FeS-Grx5 führte nach einer Stunde zur Freisetzung von 100 nM Sulfid in An- und Abwesenheit des  $\cdot\text{NO}$ -Donors NOC7 (5  $\mu\text{M}$  NOC7) (Abbildung 15 a). Die Sulfidfreisetzung nahm über einen Reaktionszeitraum von vier Stunden weiter leicht zu und zeigte den stärksten Anstieg in den ersten 40 Minuten. Die Anwesenheit des  $\cdot\text{NO}$ -Donors führte zu einer beschleunigten Sulfidfreisetzung, was auf eine NOC7-induzierte Freisetzung von Sulfid hinweist. Diese Beobachtung konnte durch die Zugabe verschiedener NOC7-Konzentrationen nicht bestätigt werden. Eine 10-fach höhere NOC7-Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die gemessene Sulfidkonzentration (Abbildung 15 c). Eine Limitation der MBB-Methode ist, dass eine MBB-induzierte FeS-Zentrum-Zerstörung nicht ausgeschlossen werden kann. Zur Überprüfung einer FeS-Degradierung durch MBB wurden UV/Vis-Spektren der FeS-Glutaredoxine in An- und Abwesenheit von 5 mM MBB aufgenommen (Abbildung 15). Allerdings überlagerte die Absorption von MBB bei 398 nm die FeS-Zentrum-spezifischen Absorptionsbanden bei 320 und 420 nm. Auch nach der Entsalzung der Proben konnte aufgrund der Absorptionsüberlagerung keine Aussage über eine MBB-induzierte FeS-Zentrum-Zerstörung getroffen werden. MBB reagiert mit Thiolen von Cysteinen und wird auch zur Bestimmung des Redoxpotentials von Proteinen verwendet<sup>155</sup>. Möglicherweise ist ein Teil des MBB an den Cysteinen des apo-Grx gebunden, weshalb nach der Entsalzung eine Absorption bei 398 nm detektiert wurde. Rouhier et al. beobachteten die Degradierung des FeS-Zentrums in Grx C1, dessen 2Fe2S-Zentrum ebenso wie bei Grx2 und Grx5 über die katalytischen Cysteine und zwei Glutathion-Moleküle im Dimer koordiniert ist, innerhalb von zwei Stunden in Anwesenheit von MBB<sup>120</sup>. Der direkte Vergleich der Sulfidfreisetzung von 300  $\mu\text{M}$  Grx2 oder Grx5 mit 600  $\mu\text{M}$  NOC7 zeigte in der MBB-Methode eine Freisetzung von 10  $\mu\text{M}$  bzw. 65  $\mu\text{M}$  Sulfid nach einer Stunde Inkubation (Abbildung 15 e, f). Unter der Annahme, dass Grx zu 100 % als holo-Grx vorliegt und der Schwefel des FeS-Zentrums vollständig zu Sulfid reagiert, würden theoretisch 300  $\mu\text{M}$  Sulfid erwartet werden. Die gemessenen Sulfid-Konzentrationen betragen jedoch nach einer Stunde nur 3,3 % der theoretisch freigesetzten Sulfidkonzentration für Grx2 und 22 % bei Grx5. Zusammenfassend konnte im Vergleich zum theoretisch berechneten Wert nur eine geringe Sulfidfreisetzung bei FeS-Zentrum-Zerstörung gezeigt werden.



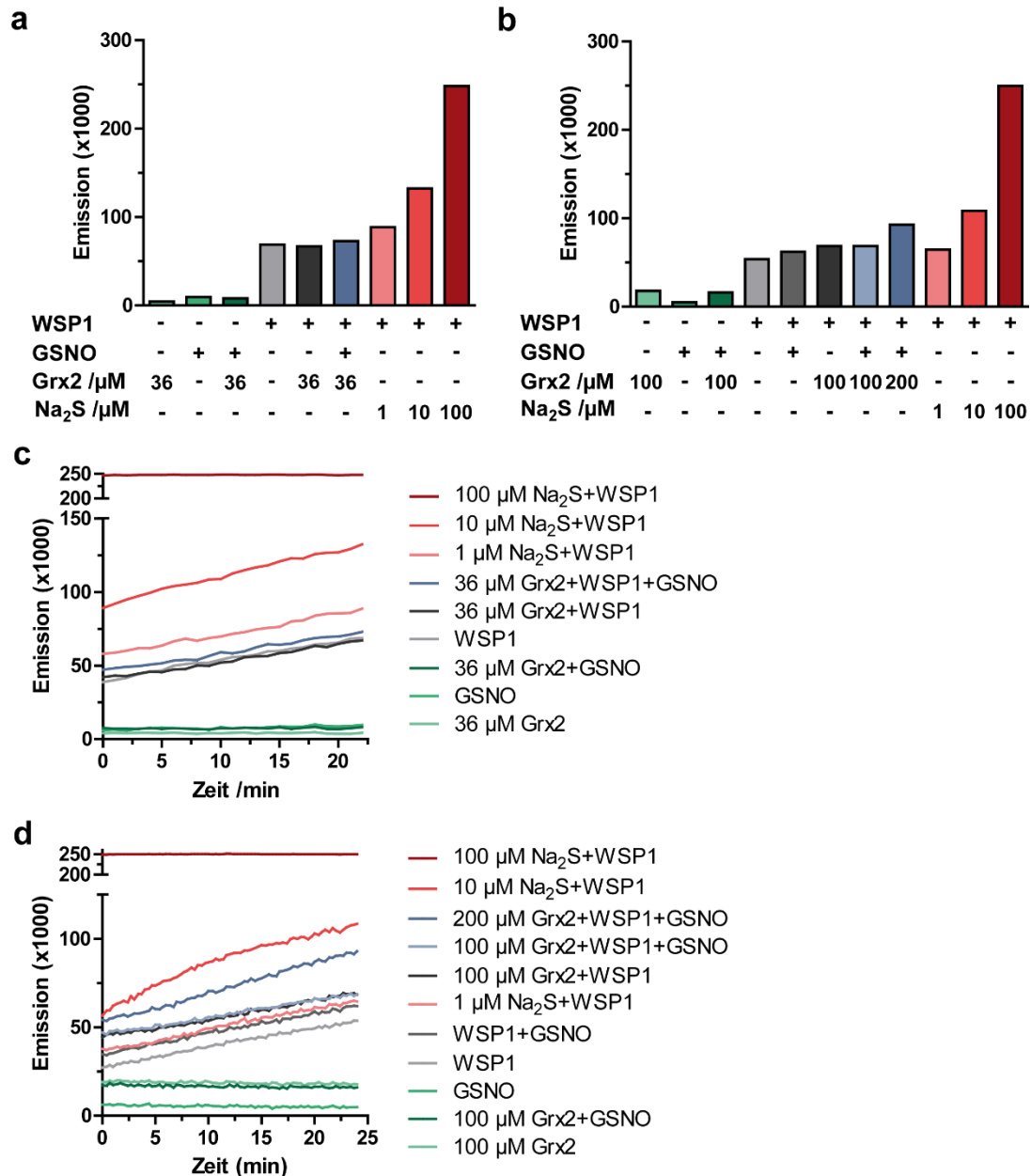
**Abbildung 15: Bestimmung von Sulfid mit der Monobromobiman-Methode bei NO-mediierter FeS-Zentrum-Zerstörung.**

Monobromobiman (MBB) reagiert mit freigesetztem Sulfid zu einem Fluorophor der chromatographisch aufgetrennt und anschließend quantifiziert wurde. **(a, b)** 1 µM Grx5 wurde mit 5 µM NOC7 für eine Stunde **(a)** bzw. vier Stunden **(b)** inkubiert. **(Insert in a)** Als Kontrolle dienten 20 µM Na<sub>2</sub>S. **(c)** Zugabe einer Konzentrationsreihe von 0-50 µM NOC7 zu 1 µM Grx5. **(d)** UV/Vis-Spektren von FeS-Grx5 in An- und Abwesenheit von 5 mM MBB (durchgezogene Linie). FeS-Grx5 wurde zwei Stunden in An- und Abwesenheit von MBB aerob inkubiert, entsalzt und UV/Vis-Spektren aufgenommen (gestrichelte Linie). **(e, f)** MBB-Methode von jeweils 300 µM Grx2 **(e)** oder Grx5 **(f)** mit 600 µM NOC7 für 90 min.

Die Bildung von Sulfid bei der Reaktion von FeS-Grx mit NO-Donatoren wurde außerdem mithilfe der Washington State Sonde-1 (WSP1) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Miriam M. Cortese-Krott (Düsseldorf) untersucht. WSP1 enthält ein Disulfid, welches mit Schwefelwasserstoff reagiert und ein Fluorophor bildet<sup>156</sup>. Zeitlich aufgelöste Fluoreszenzmessungen der Reaktion von 36 µM rekombinantem Grx2 mit GSNO zeigte einen Anstieg der Fluoreszenz innerhalb von 25 Minuten bis auf das gleiche Niveau der WSP1-Kontrolle (Abbildung 16 a, c). Folglich stellt das Sulfid nicht das Hauptprodukt dieser Reaktion dar. Erst der Einsatz von 100 µM FeS-Grx2 führte zu einer Zunahme der Fluoreszenz bis oberhalb der Werte der WSP1-Probe, was einer Sulfidkonzentration zwischen 1 und 10 µM

#### 4. Ergebnisse

Sulfid entspricht. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in einem geringen Maß Sulfid freigesetzt wird. Außerdem kann eine erhöhte Sulfidkonzentration mit zunehmender eingesetzter Grx-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 16 b, d). Allerdings führt auch die Reaktion von holo-Grx2 und WSP1 zu einem Anstieg der Fluoreszenz, was darauf hinweist, dass WSP1 möglicherweise in geringem Umfang die FeS-Zentren des Proteins zerstörte. Ebenso wie bei der MBB-Methode kann bei der Fluoreszenzmessung mit WSP1 eine WSP1-induzierte Zerstörung des FeS-Zentrums in Grx nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 16: Bestimmung von Sulfid mit dem Schwefelwasserstoffsensor WSP1 bei NO-mediierter FeS-Zentrum-Zerstörung.**

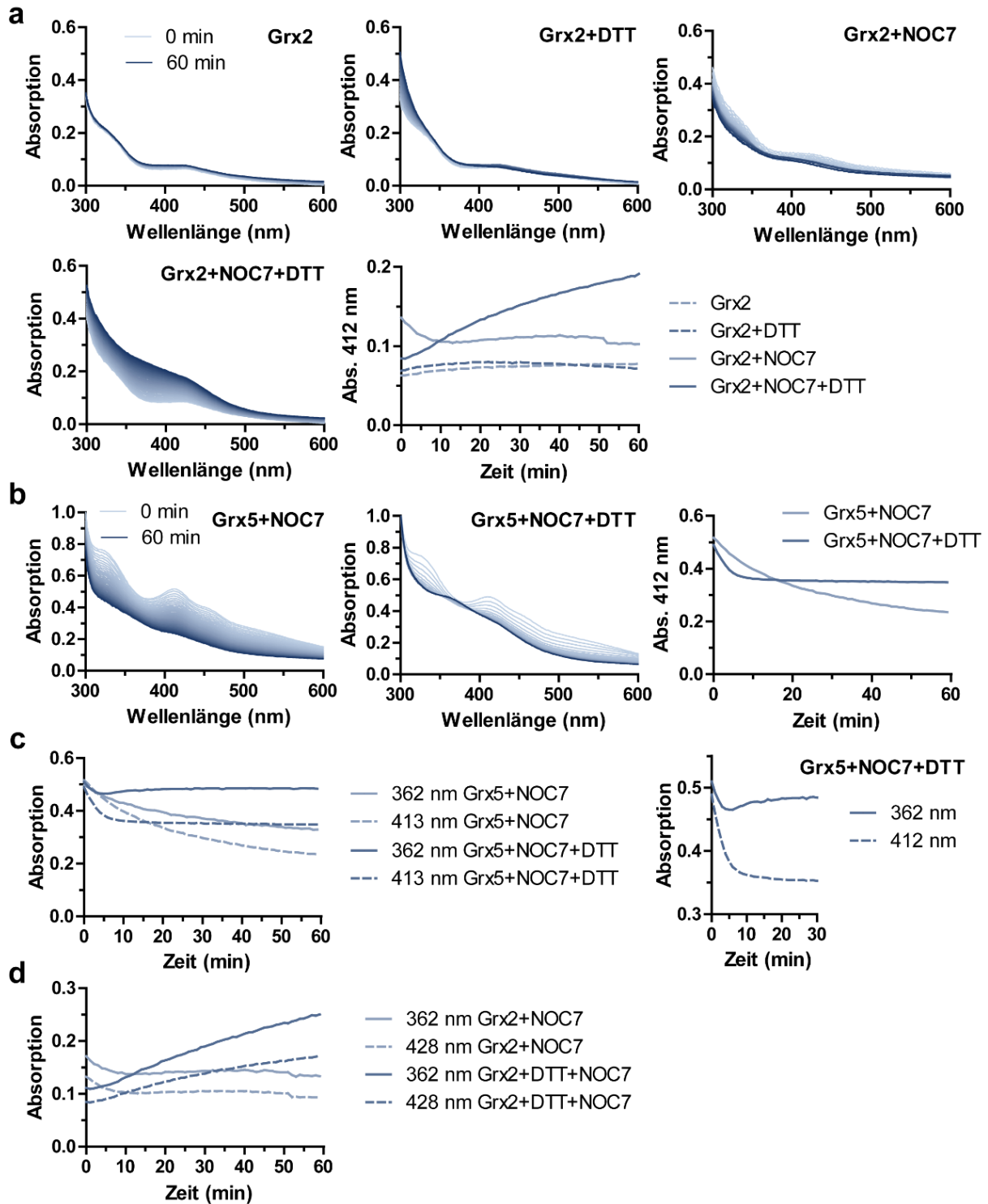
WSP1 reagiert mit Schwefelwasserstoff zu einem Fluorophor, dessen Emission bei 520 nm detektiert wurde. Fluoreszenzemission der Reaktion von 36-200 µM Grx2 mit oder ohne 500 µM GSNO in An- und Abwesenheit von 50 µM WSP1. 1, 10 und 100 µM Na<sub>2</sub>S wurde als Referenz eingesetzt. Dargestellt ist die detektierte Emission 22 min (a) bzw. 24 min (b) nach dem Reaktionsstart mit 36 µM (a, c) oder 100 µM (b, d) holo-Grx2 oder die Fluoreszenzentwicklung über den gesamten Zeitraum (c, d).



Zusammenfassend kann eine geringfügige Sulfidbildung bei der Zerstörung des FeS-Zentrums gezeigt werden. Jedoch stellt Sulfid nicht das Hauptprodukt dieser Reaktion dar. Möglicherweise reagiert entstehendes Sulfid direkt in einem Überschuss an  $\cdot\text{NO}$  weiter zu anderen bioaktiven Verbindungen, wie beispielsweise Nitrosopersulfiden ( $\text{SSNO}^-$ ), Polysulfiden oder Dinitrososulfiten<sup>157</sup>.

### ***4.2.2.2 Nitrosopersulfide ( $\text{SSNO}^-$ ) oder Polysulfide ( $\text{HS}_x^-$ ) als potenzielle Produkte der Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$***

$\text{NO}$ - und  $\text{H}_2\text{S}$ -Signalwege können miteinander wechselwirken und haben Einfluss auf das kardiovaskuläre System<sup>158</sup>. Unter physiologischen Bedingungen können  $\cdot\text{NO}$  und  $\text{H}_2\text{S}$  eine Kaskade an chemischen Reaktionen unter der Bildung neuer bioaktiver Substanzen initiieren. Zu den Hauptprodukten dieser Interaktion gehören Nitrosopersulfide ( $\text{SSNO}^-$ ), Polysulfide ( $\text{HS}_x^-$ ) und Dinitrososulfite (N-Nitrosohydroxylamin-N-Sulfonat)<sup>157</sup>. Nitrosopersulfide stellen dabei eine relativ stabile Verbindung mit einer Halbwertszeit von einer Stunde dar, welche resistent gegenüber der Reduktion durch beispielsweise DTT sind und ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweisen<sup>157,159</sup>. Zur Untersuchung einer  $\text{SSNO}^-$ -Bildung bei der Reaktion von rekombinanten FeS-Glutaredoxin mit  $\cdot\text{NO}$  wurden zeitaufgelöst UV/Vis-Spektren in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Péter Nagy (Budapest) aufgenommen (Abbildung 17). Die Absorptionswerte bei 412 nm sinken und zeigen keinen Anstieg innerhalb einer Stunde für Grx2 und Grx5 unter NOC7-Behandlung. Aufgrund der FeS-Zentrum-Absorptionsbanden bei 413 nm für Grx5 und 428 nm für Grx2 könnte ein entstehender  $\text{SSNO}^-$ -Peak überlagert werden. Potenziell entstehendes  $\text{SSNO}^-$  könnte während des FeS-Zentrum-Zerfalls in  $\text{HS}_x^-$  und  $\cdot\text{NO}$  zerfallen. Um dennoch  $\text{SSNO}^-$  in der Reaktion detektieren zu können, wurde DTT zu der Reaktion zugegeben. DTT lässt  $\text{HS}_x^-$  in  $\text{H}_2\text{S}$  zerfallen, welches in Anwesenheit von  $\cdot\text{NO}$  wieder zu  $\text{SSNO}^-$  reagieren könnte und dadurch in einem Absorptionsanstieg bei 412 nm detektiert werden könnte. Zugabe von DTT zur Reaktion von holo-Grx5 mit NOC7 führt zu keinem Anstieg der Absorption bei 412 nm und somit zu keiner  $\text{SSNO}^-$ -Bildung. Die Reaktion von holo-Grx5 mit NOC7 und DTT führt jedoch zur Bildung eines Chromophors mit einem Absorptionsmaximum bei  $\sim 360$  nm, nachdem das FeS-Zentrum zerfallen ist (Abbildung 17 c). Die Absorption von holo-Grx2 mit NOC7 und DTT steigt zwischen 300 nm und 600 nm, was darauf hinweist, dass der entstehende Chromophor einen höheren Extinktionskoeffizienten als FeS-Grx2 ( $\text{FeS-Grx2 } \epsilon_{430 \text{ nm}} = 3260 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\text{Grx2 } \epsilon_{280 \text{ nm}} = 7700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und einen niedrigeren Extinktionskoeffizienten als FeS-Grx5 ( $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 11585 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) hat<sup>154</sup>.



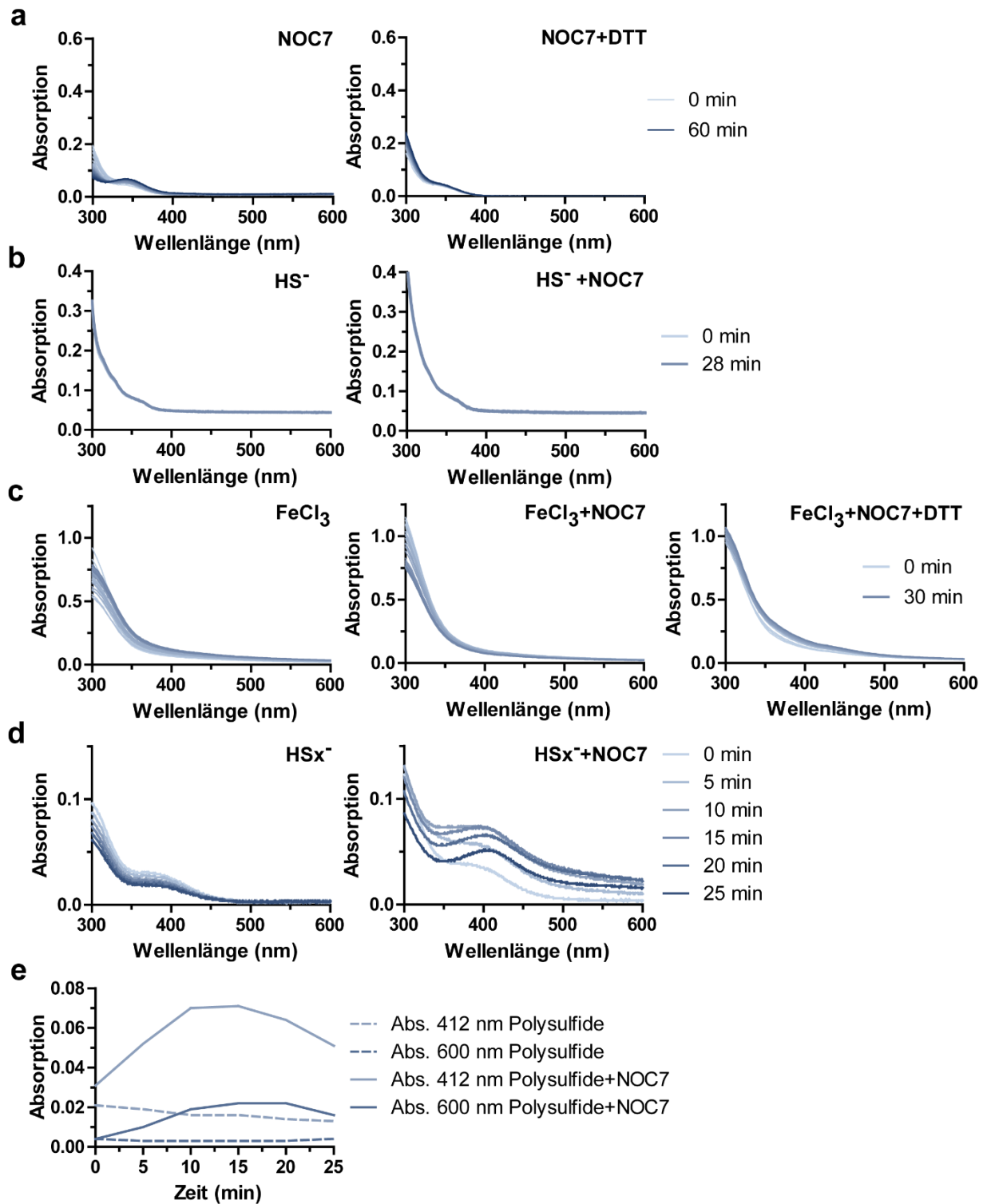
**Abbildung 17:** UV/Vis-Absorptionsspektren mit zeitlicher Auflösung der Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit dem NO-Donor NOC7.

(a) 300  $\mu$ M FeS-Grx2 wurde in An- und Abwesenheit von 600  $\mu$ M NOC7 oder 3 mM DTT inkubiert. (b) 800  $\mu$ M FeS-Grx5 wurde mit 2 mM NOC7 in An- und Abwesenheit von 8 mM DTT bei Raumtemperatur spektrometrisch analysiert. Für eine Stunde wurde jede Minute ein Absorptionsspektrum aufgenommen, dessen zeitlicher Verlauf hier farblich von hellblau (0 min) nach dunkelblau (60 min) dargestellt wird. Die dargestellten Spektren konnten in einer zweiten Messung reproduziert werden. (c, d) Verlauf der Absorption über die Zeit bei den Wellenlängen des Chromophors bei 362 nm und bei der Nitrosopersulfide (SSNO)-spezifischen Wellenlänge von 412 nm. Außerdem wurde die Absorption bei den FeS-Zentren-spezifischen Wellenlängen (428 nm Grx2 und 413 nm Grx5) aufgeführt.

Zur Identifikation des unbekanntes Chromophors wurden UV/Vis-Spektren von potenziellen Produkten der Reaktion von Eisen und Schwefel-Verbindungen in An- und Abwesenheit von

NOC7 und DTT analysiert (Abbildung 18). Die Reaktionen führten zu keinem Anstieg der Absorption bei  $\sim 360$  nm und damit zu keiner Identifikation des entstehenden Chromophors. Polysulfide und NOC7 zeigten eine Zu- bzw. Abnahme der Absorption bei 412 nm, was auf  $\text{SSNO}^-$  hindeutet (Abbildung 18 d). Dimere DNIC-Spezies weisen Absorptionsmaxima bei 310 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $9650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und 362 nm mit  $8529 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  auf<sup>160</sup>. Der neu gebildete Chromophor bei  $\sim 360$  nm könnte auf die Bildung eines dimeren DNIC-Komplexes hinweisen. Monomere DNIC-Komplexe gehen eine reversible Konversion zu einem dimeren DNIC ein, wenn die Liganden nicht im Überschuss vorliegen<sup>161</sup>.

Die Bildung von Polysulfiden in der Reaktion von holo-Grx2 oder holo-Grx5 mit NO-Verbindungen wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Miriam M. Cortese-Krott (Düsseldorf) untersucht. Polysulfide haben ein Absorptionsmaximum bei 290-350 nm<sup>157</sup>, welches von der 320 nm Bande des FeS-Zentrums und der Proteinabsorption bei 280 nm im UV/Vis-Spektrum überlagert wurde (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Absorptionsüberlagerungen konnte die Fragestellung zur Bildung von Polysulfiden oder  $\text{SSNO}^-$  in der Reaktion von FeS-Grx2 oder FeS-Grx5 mit NO-Verbindungen nicht eindeutig beantwortet werden.

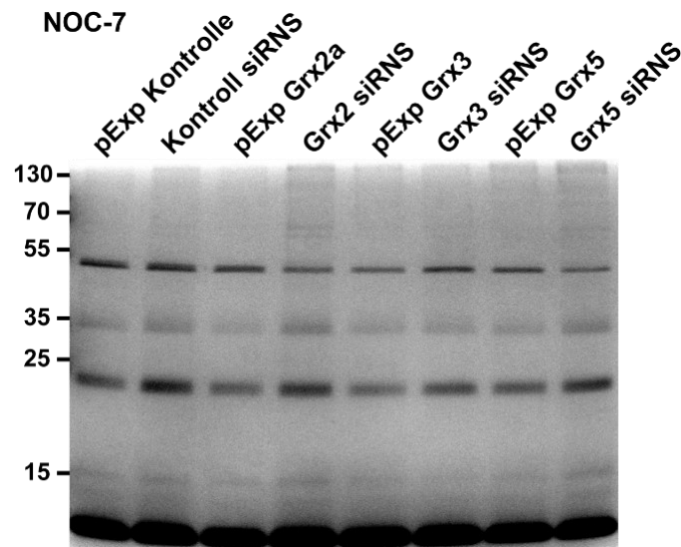


**Abbildung 18:** Absorptionsspektren zur Bestimmung potenzieller Produkte oder Nebenprodukte bei der Reaktion von FeS-Grx mit NOC7.

(a) Absorptionsspektrum von 2 mM NOC7 und 2 mM NOC7 mit 8 mM DTT. (b) 10 mM Sulfid (HS<sup>-</sup>) wurde in An- und Abwesenheit von 1 mM NOC7 spektroskopisch untersucht. Die Werte sind ohne Abzug der Absorption des Puffers dargestellt. (c) Absorptionsspektren der Reaktion von 0,5 mM FeCl<sub>3</sub> in An- und Abwesenheit von 0,6 mM NOC7 und 3 mM DTT. (d, e) Absorption der Reaktion von 0,1 mM Polysulfiden (HS<sub>x</sub><sup>-</sup>) aus Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> und 0,2 mM NOC7 (d) und der zeitliche Verlauf der Absorption bei 412 nm (e).

### 4.2.2.3 *Persulfidierung als potenzielles Produkt der Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$*

Ein potenzielles Produkt der Reaktion von FeS-Grx mit  $\cdot\text{NO}$  könnten Persulfidierungen an Proteinen sein. Zur Untersuchung einer verstärkten Persulfidierung als posttranslationale Modifikation an Proteinen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Péter Nagy (Budapest) die Protein-Persulfid-Detektions-Methode durchgeführt, erlernt und in Düsseldorf etabliert, siehe 3.7<sup>153</sup>. Dabei werden Proteine mit freien Thiolen und persulfidierte Proteine mit dem Biotin-markierten Alkylierungsreagenz EZ-link Iodoacetyl-PEG2 Biotin (IAB) inkubiert und diese Proteine mithilfe von magnetischen Streptavidin-konjugierten *Beads* präzipitiert. Die spezifische Abtrennung der persulfidierten Proteine von den *Beads* erfolgte durch Reduktion mit TCEP, welches die Thioetherbindungen nicht trennt. Die so separierten persulfidierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert. Die Proteinexpression der FeS-Glutaredoxine wurde in HeLa-Zellen moduliert (siehe Abschnitte 3.6.3 und 3.6.4) und die Zellen anschließend mit dem  $\cdot\text{NO}$ -Donor NOC7 behandelt. Entgegen der aufgestellten Hypothese führte eine verminderte Grx2 Proteinexpression zu mehr persulfidierten Proteinen und eine Überexpression von Grx2 führte zu weniger persulfidierten Proteinen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19). Anhand dieses Ergebnisses wurde eine neue Hypothese aufgestellt, dass Glutaredoxin 2 mithilfe seiner Oxidoreduktasefunktion persulfidierte Proteine reduzieren könnte. Diese Fragestellung wurde weiter untersucht und wird im nächsten Abschnitt weiter erläutert. Überexpression des zytosolischen Grx3, welches zwei FeS-Zentren koordiniert, zeigte keine erhöhte Persulfidierung bei  $\cdot\text{NO}$ -Behandlung. Eine verminderte Grx5-Expression führte ebenfalls zu einer leichten Anreicherung von persulfidierten Proteinen. Die Überexpression von Grx5 hatte keinen Einfluss auf die Menge persulfidierter Proteine.



**Abbildung 19: Detektion von persulfidierten Proteinen in HeLa-Zellen mit modulierten FeS-Grx-Expressionen nach  $\text{NO}$ -Behandlung.**

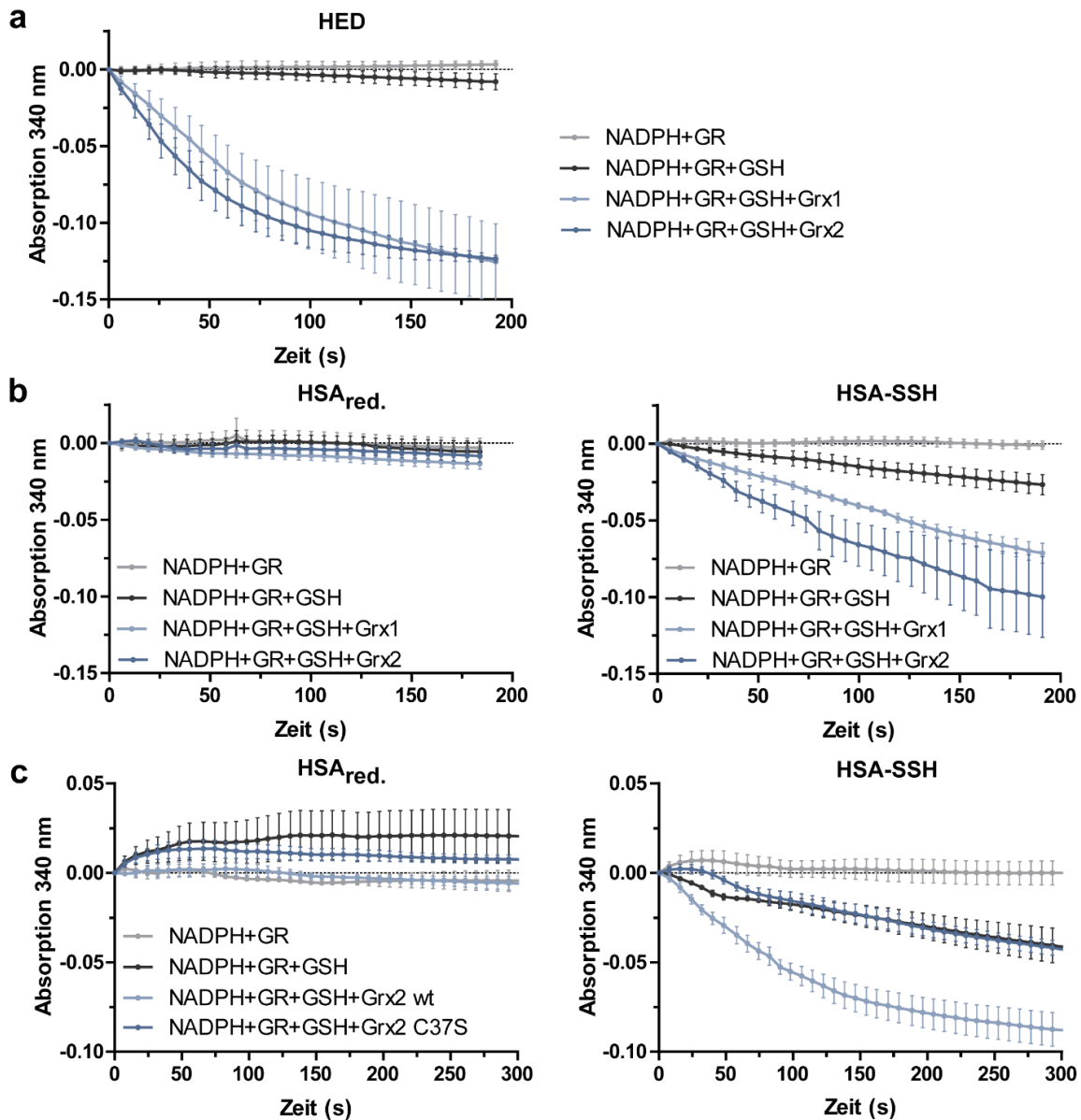
Protein-Persulfid-Detektions-Methode nach Dóka et al.<sup>153</sup> zur Detektion von persulfidierten Proteinen in einem silbergefärbten SDS-Gel. Aufgetragen sind die Fraktionen mit persulfidierten Proteinen von HeLa-Zellen mit modulierten FeS-Grx-Expressionen und  $\text{NO}$ -Behandlung (1 mM NOC7, 25 min). pExp steht für den pExpress-Überexpressionsvektor.

### 4.3 Funktion der FeS-Glutaredoxine und der Einfluss der FeS-Zentrum-Koordination auf Persulfidierungen

Die zuvor beschriebene Untersuchung in Abschnitt 4.2.2.3 ergab eine verstärkte Persulfidierung an Proteinen bei einer  $\text{NO}$ -Behandlung von HeLa-Zellen mit verminderter Grx2-Expression. Aus dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass Grx2 mithilfe seiner Oxidoreduktaseaktivität neben Glutathionylierungen und Disulfidbrücken auch Persulfide reduzieren könnte. Zur Untersuchung der Funktion der FeS-Glutaredoxine in Persulfidierungen wurden *in vitro* Experimente mit persulfidiertem humanem Serumalbumin (HSA) als Substrat und rekombinanten Glutaredoxinen durchgeführt. Die Grx-Aktivität wurde durch den NADPH-Verbrauch mithilfe der Absorptionsabnahme bei 340 nm detektiert. Für Glutaredoxin 1 (Grx1) wurde *in vitro* bereits eine Aktivität in der Reduktion von Persulfiden nachgewiesen und es diente als Kontrolle<sup>153</sup>. Der etablierte Glutaredoxin-Aktivitätstest mit dem artifiziellen Substrat 2-Hydroxyethyl-disulfid (HED) zeigte, dass die eingesetzten rekombinanten Proteine enzymatisch aktiv waren (Abbildung 20 a). HSA wurde reduziert, entsalzt und anschließend durch Polysulfidbehandlung persulfidiert. Das reduzierte HSA diente als Kontrolle für unspezifische NADPH-Reduktionsquellen. Die Inkubation von persulfidiertem HSA mit NADPH, Glutathion-Reduktase (GR) und GSH genügte für eine geringfügige NADPH-Reduktion von 9  $\mu\text{M}$  NADPH nach drei Minuten, Abbildung 20 b. Das GSH-System zeigte das Potenzial einer Reduktion der Persulfid-Spezien, welches durch Zugabe von katalytischen Mengen an Grx1 und Grx2 deutlich erhöht wurde. Grx2 führte nach drei Minuten zu einem Umsatz von 27  $\mu\text{M}$  NADPH und Grx1 zu einem Umsatz von 19  $\mu\text{M}$

## 4. Ergebnisse

NADPH nach drei Minuten. Damit zeigte sich für Grx2 eine schnellere Reduktion von Persulfidspezien als für Grx1. Die redox-inaktive Grx2-Mutante mit einer C37S-Mutation zeigt im Gegensatz zum Wildtyp keinen erhöhten NADPH-Verbrauch und weist dadurch eine Abhängigkeit von der Oxidoreduktase-Aktivität auf, Abbildung 20 c.

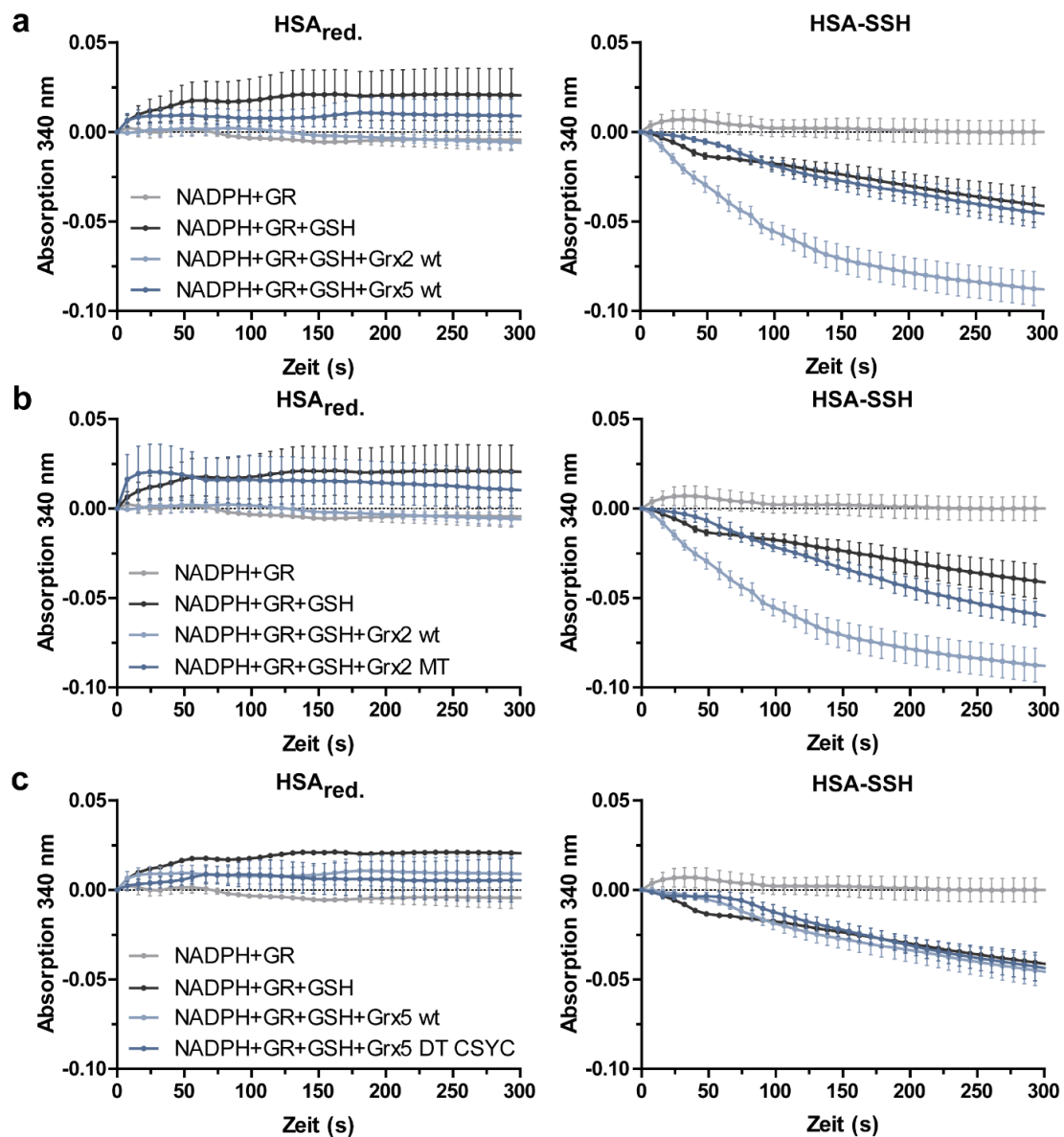


**Abbildung 20: Glutaredoxin-Aktivitätstest von dithiol Glutaredoxinen mit persulfidiertem Serumalbumin als Substrat.** 150  $\mu\text{M}$  NADPH wurde mit 1 mM GSH, 6  $\mu\text{g/ml}$  Glutathion-Reduktase (GR) und 1  $\mu\text{M}$  rekombinanten Grx inkubiert und die NADPH-Reduktion mithilfe der Absorptionsmessung bei 340 nm bestimmt. **(a)** Als artifizielles Substrat diente 0,7 mM Hydroxyethylidisulfid (HED). Es sind die Mittelwerte aus zwei Messwerten mit der absoluten Abweichung als Fehlerbalken dargestellt. **(b)** Reduziertes humanes Serumalbumin (HSA) diente als Kontrolle. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  SEM aus fünf Messwerten. 160  $\mu\text{M}$  persulfidiertes HSA wurde mit 1  $\mu\text{M}$  Grx1 oder Grx2 inkubiert und die Absorption gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM aus sechs Messwerten. **(c)** NADPH-Abnahme bei Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Grx2 wt oder der redox-inaktiven Mutante Grx2 C37S. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Messwerten dargestellt. Initiale Ergebnisse wurden unter meiner Aufsicht von Leonie Thewes durchgeführt und sind Teil ihrer Bachelorarbeit.

In der Protein-Persulfid-Detektions-Methode wurde bei verminderten Grx5-Expressionen eine leicht erhöhte Menge an persulfidierten Proteinen im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abbildung 19). Daher wurde auch an dieser Funktion der Einfluss des Loops untersucht.

## 4. Ergebnisse

Zunächst wurde die Redoxaktivität von Grx5 in der Reduktion von Persulfidspezies an HSA untersucht (Abbildung 21 a). Zugabe von Grx5 zu dem GSH-System führte zu einem Umsatz von 8,7  $\mu\text{M}$  NADPH in drei Minuten und damit zu keiner deutlich beschleunigten Reduktion von NADPH im Vergleich zu GSH mit 7,6  $\mu\text{M}$  NADPH-Verbrauch in drei Minuten. Damit wurde die Redoxaktivität von monothiol-Glutaredoxin 5 bestätigt. Glutaredoxin 2 mit monothiol-Loop (Grx2 MT) zeigte mit einem Umsatz von 11  $\mu\text{M}$  NADPH in drei Minuten eine deutliche Verminderung der Aktivität im Vergleich zu Grx2 wt (21  $\mu\text{M}$  NADPH in drei Minuten) auf (Abbildung 21 b). Die Glutaredoxin 5-Mutante mit dithiol-Loop und dem aktiven Zentrum von Grx2 (CSYC) führte hier zu keiner katalytischen Aktivität.



**Abbildung 21: Der Einfluss des Loops auf die Depersulfidierungsaktivität.**

NADPH-Absorptionsabnahme bei 340 nm mit 160  $\mu\text{M}$  reduziertem oder persulfidierten humanem Serumalbumin (HSA) als Substrat und 1  $\mu\text{M}$  Grx2 wt (a, b), Grx2 mit monothiol-Loop (MT) (b), Grx5 wt (a, c) und Grx5 mit dem dithiol-Loop und dem aktiven Zentrum von Grx2 (DT CSYC) (c). Es sind die Mittelwerte aus drei bis vier Messwerten  $\pm$  SEM dargestellt. GR steht für Glutathion-Reduktase.



#### 4.4 Einfluss von monothiol-Glutaredoxinen auf Differenzierung und Myelinisierung

Die Differenzierung von Oligodendrozyten und die Myelinisierung von Axonen sind eisenabhängige Prozesse<sup>162</sup>. Das zytosolische monothiol-FeS-Grx3 und das mitochondriale FeS-Grx5 haben wichtige Aufgaben in der Eisenhomöostase bzw. der FeS-Zentrum-Biosynthese und führen bei einer verminderten Expression zu dem Aktivitätsverlust von FeS-Zentrum-abhängigen Enzymen<sup>36,37,69</sup>.

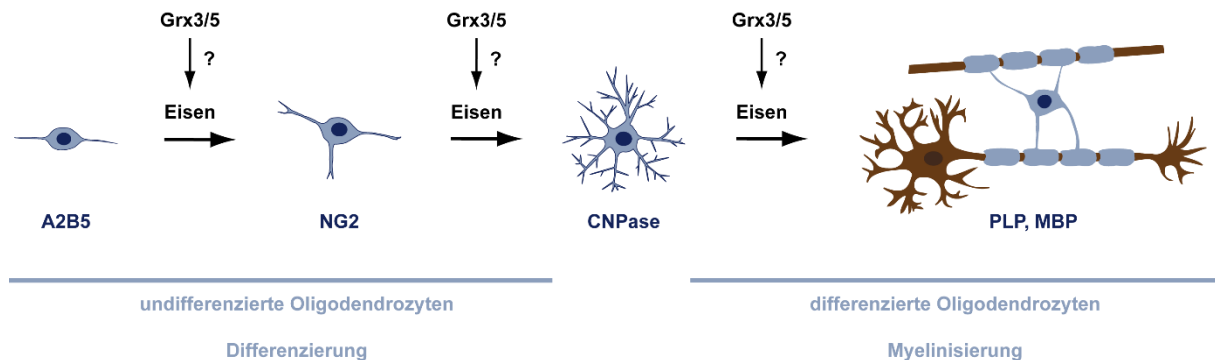
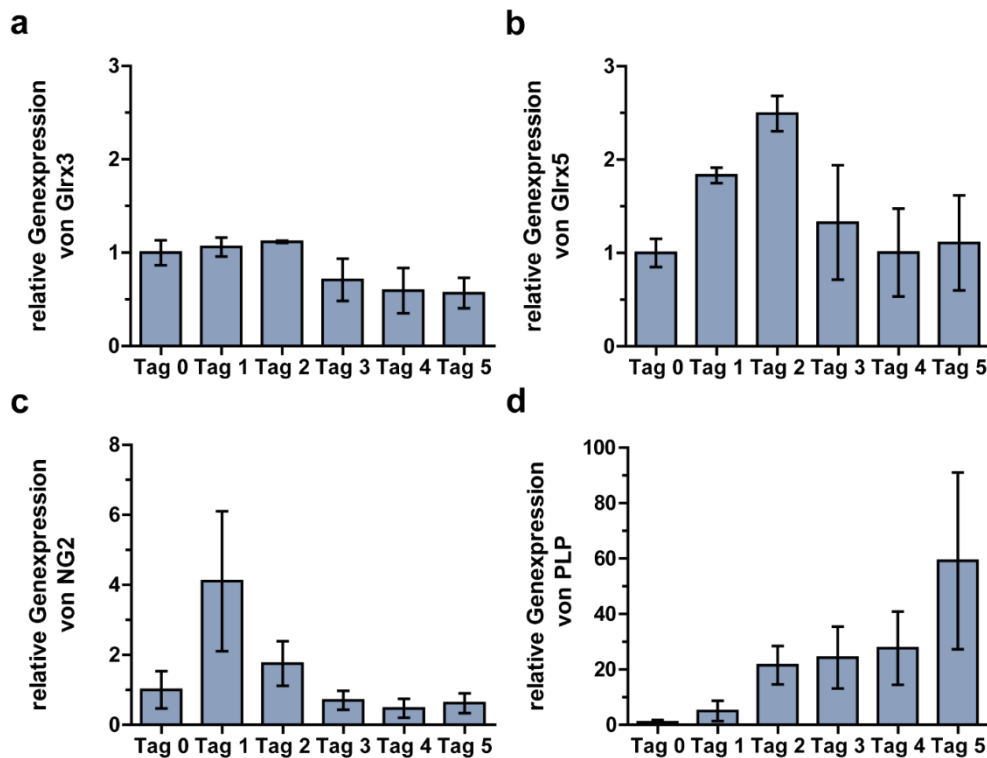


Abbildung 22: Potenzielle Rolle der FeS-Glutaredoxine in der Differenzierung und Myelinisierung.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die monothiol-Glutaredoxine über ihre Funktion in der Eisenhomöostase einen Effekt auf die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen haben könnten. Zur Untersuchung einer potenziellen Funktion von monothiol-Glutaredoxinen in der eisenabhängigen Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurde NG2-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in Proliferationsmedium kultiviert und durch einen Wechsel auf Differenzierungsmedium mit den Hormonen T3 und T4 differenziert (3.6.1). Zunächst wurde die Genexpression von GLRX3 und GLRX5 mittels quantitativer RT-PCR (3.10) analysiert (Abbildung 23). Die Analyse ergab eine Tendenz zur verminderten Grx3-Expression in späteren Differenzierungsstadien mit erhöhter PLP-Expression wohingegen die Grx5-Expression in der frühen Differenzierung, besonders an Tag 2, mehr als verdoppelt ist.



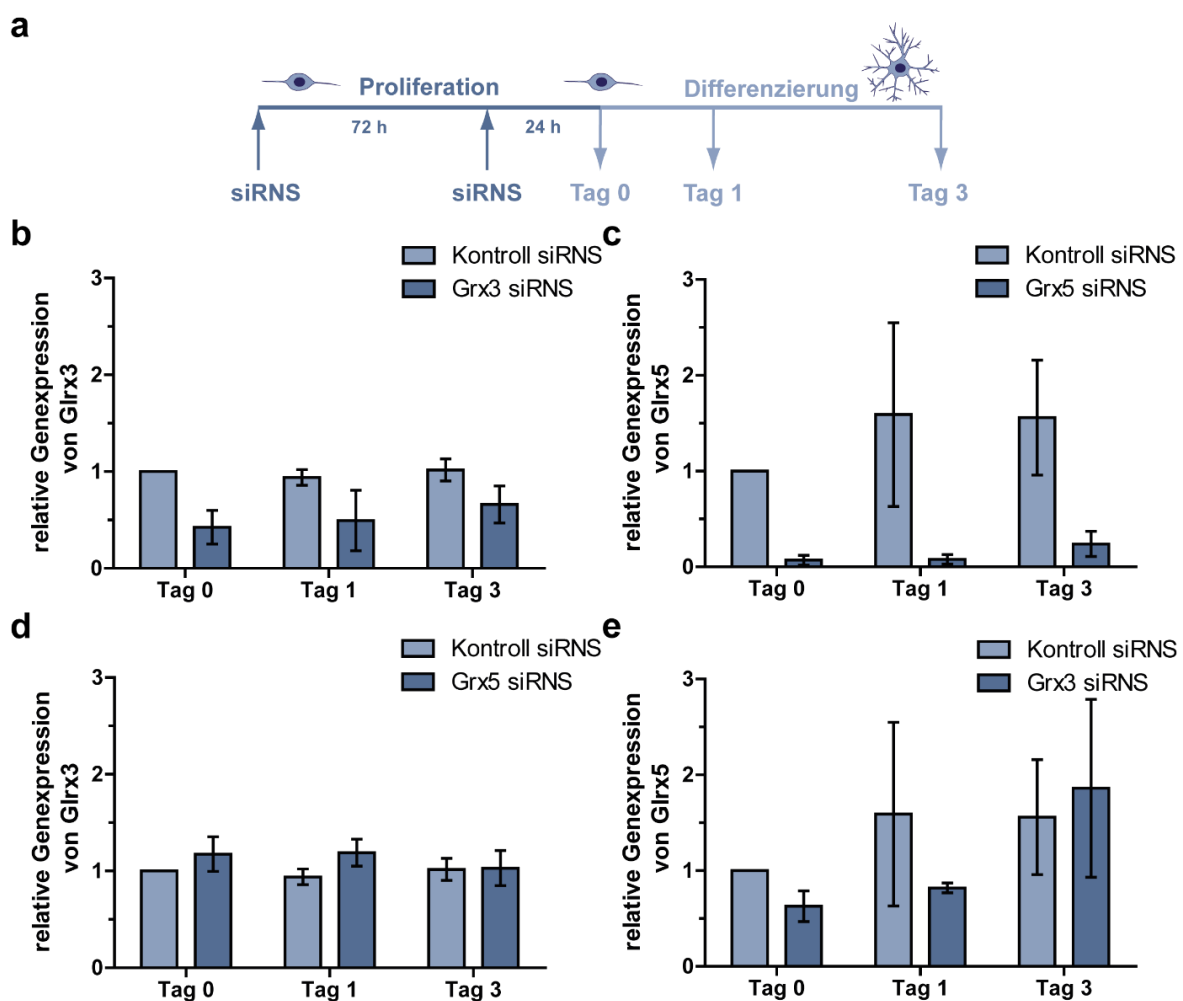
**Abbildung 23: Die Genexpression von Grx3 und Grx5 während der Differenzierung von primären NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.**

Die Differenzierung von primären NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurde durch Zugabe von den Hormonen T3 und T4, sowie von Retinsäure induziert (Tag 0) und es wurden täglich Proben für die qRT-PCR-Analyse generiert. NG2 und PLP wurden zur Kontrolle der Differenzierung untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. Ein Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunns Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Abweichungen der Genexpression an den verschiedenen Differenzierungstagen.

#### 4.4.1 Modulation der Proteinexpression von monothiol-FeS-Glutaredoxinen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Da die Expressionsstärke von Grx3 und Grx5 Unterschiede in den verschiedenen Differenzierungsstadien erkennen ließ, wurde der Einfluss modulierter Proteinexpressionen der monothiol-Glutaredoxine auf die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen untersucht. Zur Hemmung der Proteinexpression wurde mithilfe der RNS-Interferenz und Grx3- bzw. Grx5-spezifischer siRNS die Menge der mRNA, kodierend für Grx3 bzw. Grx5, vermindert. Diese Genexpressionshemmung wird nachfolgend Knockdown genannt und wurde in A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen etabliert (Abbildung 24). Die A2B5-positiven Zellen wurden für vier Tage in Proliferationsmedium mit siRNS kultiviert und durch einen Wechsel auf siRNS-freies Differenzierungsmedium (Tag 0) *in vitro* zur Differenzierung angeregt. Quantitative RT-PCR-Analyse zeigt eine Verminderung der Grx3-kodierenden mRNS auf 42 % und der Grx5-kodierenden mRNS auf 13 % nach der siRNS-Behandlung an Tag 0. Während der Differenzierung steigt die Genexpression von Grx3 wieder auf 66 % an Tag 3, wohingegen die Grx5-Knockdowneffizienz auf 24 % steigt. Ebenso wie in NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in Abbildung 23 ist die Expression von Grx3 in

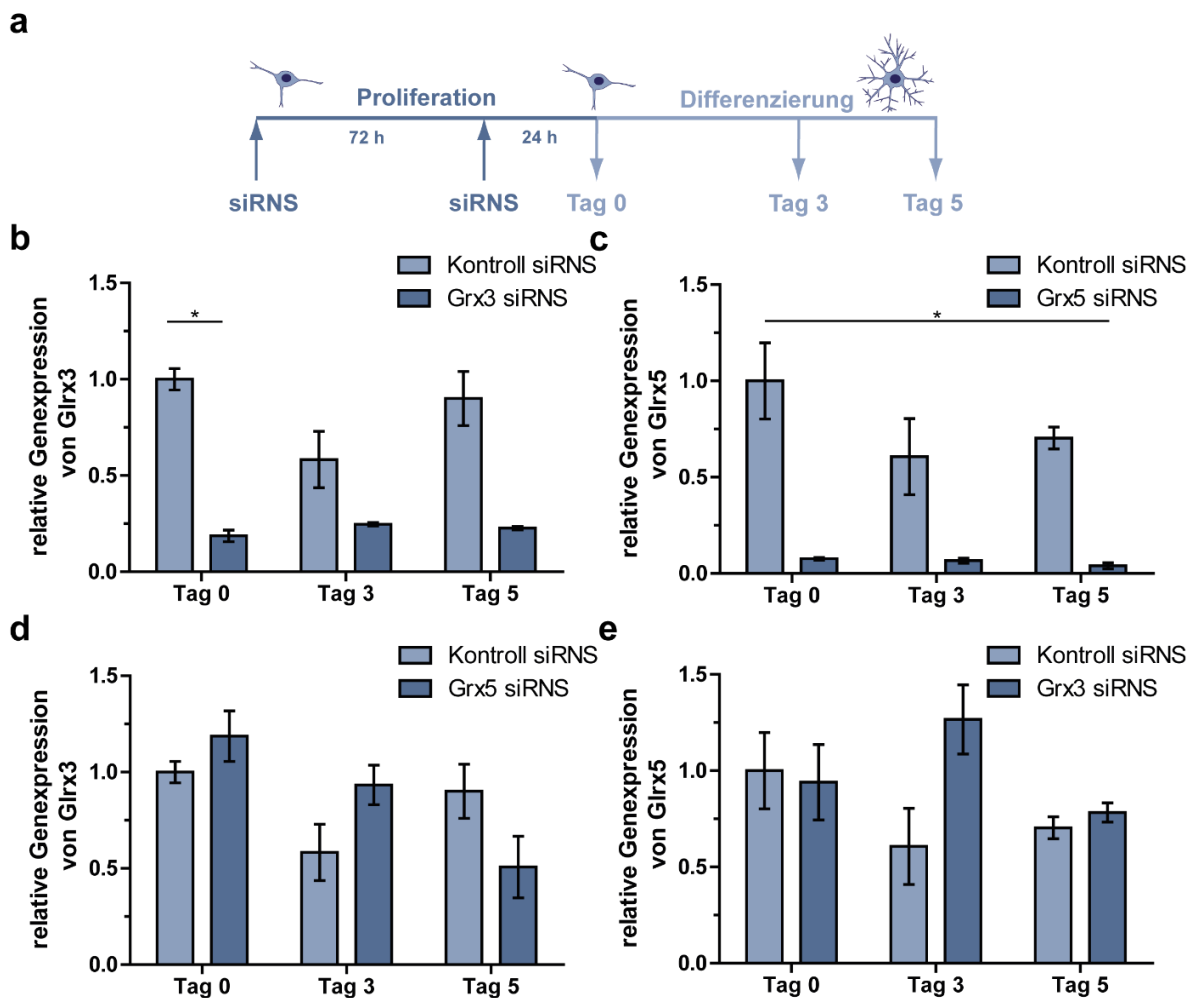
diesen frühen Differenzierungsstadien in den Kontrollproben nicht reguliert. Die Grx5-kodierende mRNA in den Kontrollproben steigt auch in A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in den ersten Differenzierungstagen leicht an. Die monothiol-Glutaredoxine haben Funktionen in der Eisenhomöostase, weshalb der Mangel eines Grx möglicherweise durch die erhöhte Expression des anderen kompensiert werden könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die Genexpression des Grx5 bei Grx3-Knockdown untersucht und vice versa (Abbildung 24 d, e). Der Mangel des einen monothiol-Glutaredoxins hat keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression des anderen monothiol-Glutaredoxins innerhalb von drei Differenzierungstagen.



**Abbildung 24: Etablierung eines Grx3- und Grx5-Knockdowns in A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.** (a) Primäre A2B5-positiv Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden für vier Tage in Proliferationsmedium mit siRNS kodierend für Grx3, Grx5 oder einer Kontroll-siRNS behandelt. Anschließend wurde das Medium mit Differenzierungsmedium ersetzt (Tag 0). Die Knockdowneffizienz wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mithilfe einer qRT-PCR quantifiziert und auf Tag 0 der Kontroll-siRNS bezogen. Zur Analyse der Knockdowneffizienz wurde Grx3 (b) und Grx5 (c) untersucht. (d, e) Zur Untersuchung einer möglichen Kompensation wurde auch die Genexpression des jeweils anderen Grx nach dem Knockdown bestimmt. (b, d) Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n \geq 3$  dargestellt. (c, e) Dargestellt sind die Mittelwerte für Tag 0 und Tag 3  $\pm$  SD bei  $n = 4$  und für Tag 1 mit absoluter Abweichung bei  $n = 2$ . Ein Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunns Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Abweichungen der Genexpression bei Kontroll-siRNS- und Grx-siRNS-behandelten Zellen.

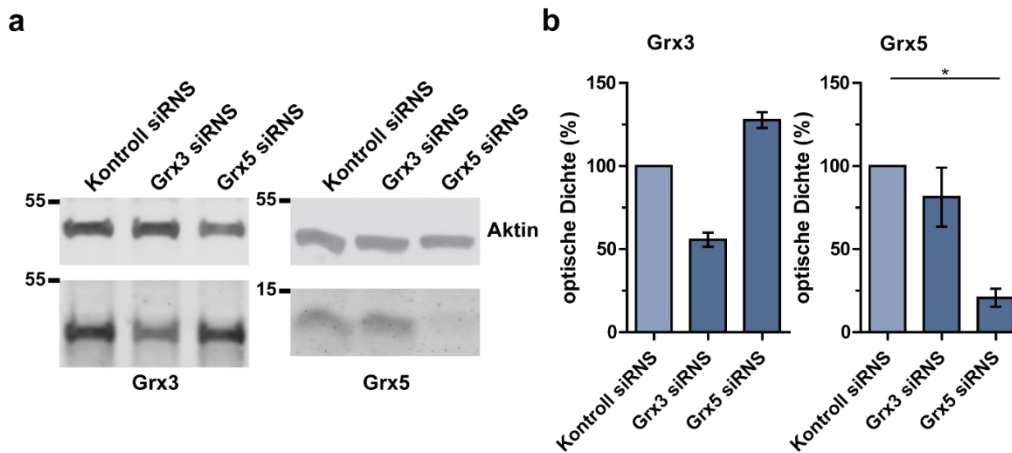
## 4. Ergebnisse

Zudem wurde der Knockdown von Grx3 und Grx5 in NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen etabliert, wodurch eine effizienter und länger andauernde Verminderung der Grx-Genexpression erreicht werden konnte (Abbildung 25). Die Grx-Genexpression liegt während der Differenzierung von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zwischen 19 % und 25 % für Grx3 und 4 % bis 9 % für Grx5. Der Mangel eines monothiol-Glutaredoxins hat keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression des anderen monothiol-Glutaredoxins in einem Zeitraum von fünf Differenzierungstagen. (Abbildung 25 d, e).



**Abbildung 25: Etablierung eines Grx3- und Grx5-Knockdowns in NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.** (a) Primäre NG2-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden für vier Tage in Proliferationsmedium mit siRNS kodierend für Grx3, Grx5 oder einer Kontroll-siRNS behandelt. Anschließend wurde das Medium mit Differenzierungsmedium ersetzt (Tag 0) und die Knockdowneffizienz mithilfe einer qRT-PCR quantifiziert und auf Tag 0 der Kontroll-siRNS bezogen. Zur Analyse der Knockdowneffizienz wurde Grx3 (b) und Grx5 (c) untersucht, ebenso wie die mRNA-Mengen des jeweils anderen Grx (d, e). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$  dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zum Vergleich von Kontroll-siRNS-Proben mit Grx-siRNS-Proben durchgeführt. Die Sterne markieren einen p-Wert mit  $*p < 0,05$ .

Western Blot-Analyse (3.11) von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit Grx3 siRNS-Behandlung weisen 55,7 % Grx3 auf Proteinebene auf, während die Proteinexpression von Grx5 auf 127,7 % erhöht ist. Auf Proteinebene führt der Knockdown von Grx5 zu 20,7 % Grx5, während auch Grx3 auf Proteinebene auf 81,3 % verringert ist (Abbildung 26).

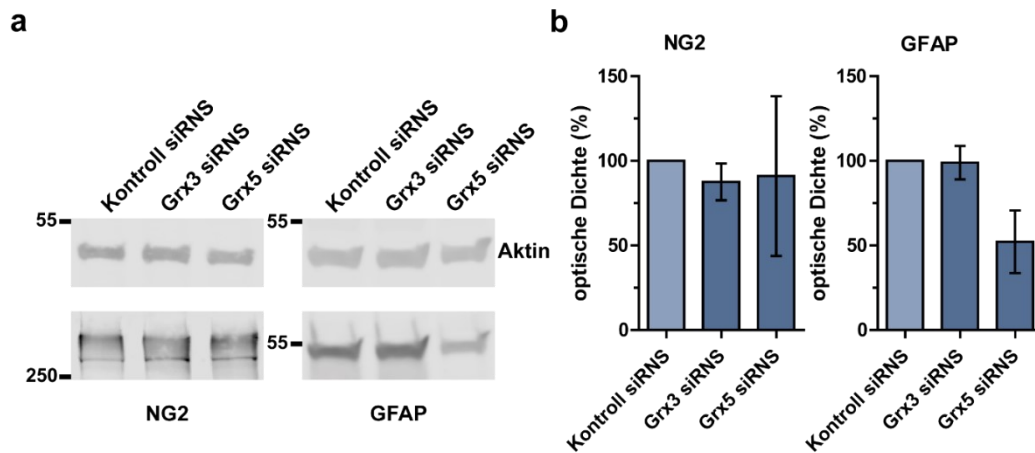


**Abbildung 26: Western Blot-Analyse von primären NG2-positiven Zellsaten zur Untersuchung der Knockdowneffizienz und kompensatorischer Effekte der monothiol-Glutaredoxine.**

(a) Western Blot-Analyse der Proteinmenge an Grx3 und Grx5 in NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach siRNS-Behandlung. (b) Quantifizierung des Knockdowns an Tag 0 anhand einer densitometrischen Analyse der Western Blot-Signale. Die jeweiligen Grx-Signale wurden auf die Aktin-Signale bezogen und als Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$  dargestellt. Ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zum Vergleich der Grx-siRNS-Proben mit den Kontroll-siRNS-Proben zeigt eine signifikante Abweichung, welche mit einem Stern  $*p < 0,05$  markiert ist.

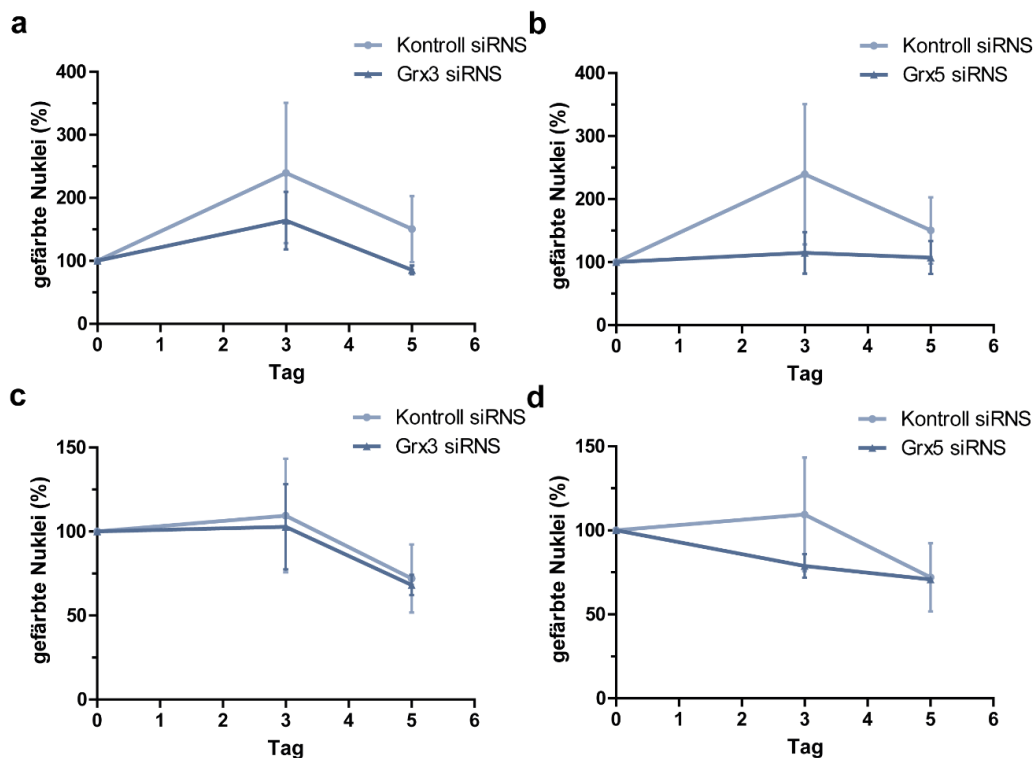
#### 4.4.2 Einfluss eines monothiol-Glutaredoxin-Mangels auf die weitere Entwicklung der Vorläuferzellen

Nach erfolgreicher Herabsetzung der Glutaredoxin-Proteinmengen, wurde untersucht, ob dieser Mangel einen Einfluss auf das Überleben und die weitere Entwicklung der Vorläuferzellen hat. Western Blot-Analysen von siRNS-behandelten NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen an Tag 0 zeigten keine Veränderung der NG2-Proteinmengen (Abbildung 27). Immunozytochemische Untersuchungen ergaben 30 % NG2-positiv gefärbte Zellen in den Kontroll-siRNS-behandelten Zellen an Tag 0, während die Grx3- und Grx5-siRNS-Behandlung zu 37 % bzw. 32 % NG2-positiv gefärbter Zellen führte. NG2-positive Zellen sind in der Lage zu Astrozyten zu differenzieren<sup>163</sup>. Eine Western Blot-Analyse zeigte keine Veränderungen des Astrozytenmarkerproteins GFAP bei einem Grx3-Knockdown, während ein Grx5-Mangel reproduzierbar weniger GFAP-Proteine in den Zellen aufwies (Abbildung 27 b).



**Abbildung 27: Vergleich von NG2- und GFAP-Mengen in primären NG2-positiven Zellen nach siRNS-Behandlung.** (a) Western Blot-Analyse der Proteine NG2 und GFAP in NG2-positiven Zellen mit siRNS-Behandlung an Tag 0. (b) Die Signale wurden mithilfe einer densitometrischen Analyse quantifiziert und auf die Aktin-Signale bezogen. Für NG2 sind die Mittelwerte bei  $n = 2$  mit absoluter Abweichung angegeben. Bei den normierten GFAP-Signalen sind die Mittelwerte bei  $n = 3 \pm \text{SEM}$  dargestellt. Ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zum Vergleich der Grx-siRNS-Proben mit denen der Kontroll-siRNS zeigt keine signifikanten Abweichungen.

Als Kontrolle für das Überleben der Vorläuferzellen während der Differenzierung und nach der siRNS-Behandlung wurde die Anzahl gefärbter Nuklei bestimmt und auf Tag 0 bezogen (Abbildung 28). Die Anzahl gefärbter Nuklei in A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellkulturen steigt während der Kultivierung in Differenzierungsmedium, was auf eine Proliferation der Zellen hinweist (Abbildung 28 a, b). Bei einer herabgesetzten Expression der monothiol-Glutaredoxine ist die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle verringert. NG2-positive Zellen befinden sich in einem reiferen Oligodendrozyten-Differenzierungsstadium und weisen in diesem *in vitro* Modell keine signifikante Zellproliferation auf (Abbildung 28 c, d). Ein Grx5-Knockdown in NG2-positiven Zellen führt während der Differenzierung zu einer früheren Abnahme der Zellzahl. Die Zellanzahl sinkt in der Kontrolle und den Grx siRNS-behandelten Zellen auf 70 % an Tag 5.



**Abbildung 28: Relative Zellanzahl in primären Oligodendrozyten-Vorläuferzellkulturen mit verminderter Expression von monothiol-Glutaredoxinen während der Differenzierung.**

Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden mit einer Zelldichte von 14000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf PLL-beschichteten Gläschen ausgesät und über vier Tage zweimal mit siRNS behandelt bevor sie durch Zugabe von Differenzierungsmedium differenziert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst gefärbt. Die relative Anzahl gefärbter Nuklei in A2B5-positiven (a, b) oder NG2-positiven (c, d) Oligodendrozyten-Vorläuferzellkulturen wurde auf Tag 0 bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 4$  (a, b) oder  $n = 3$  (c, d). Ein Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunns Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Abweichungen der relativen Zellzahl bei Kontroll-siRNS- und Grx-siRNS-behandelten Zellen.

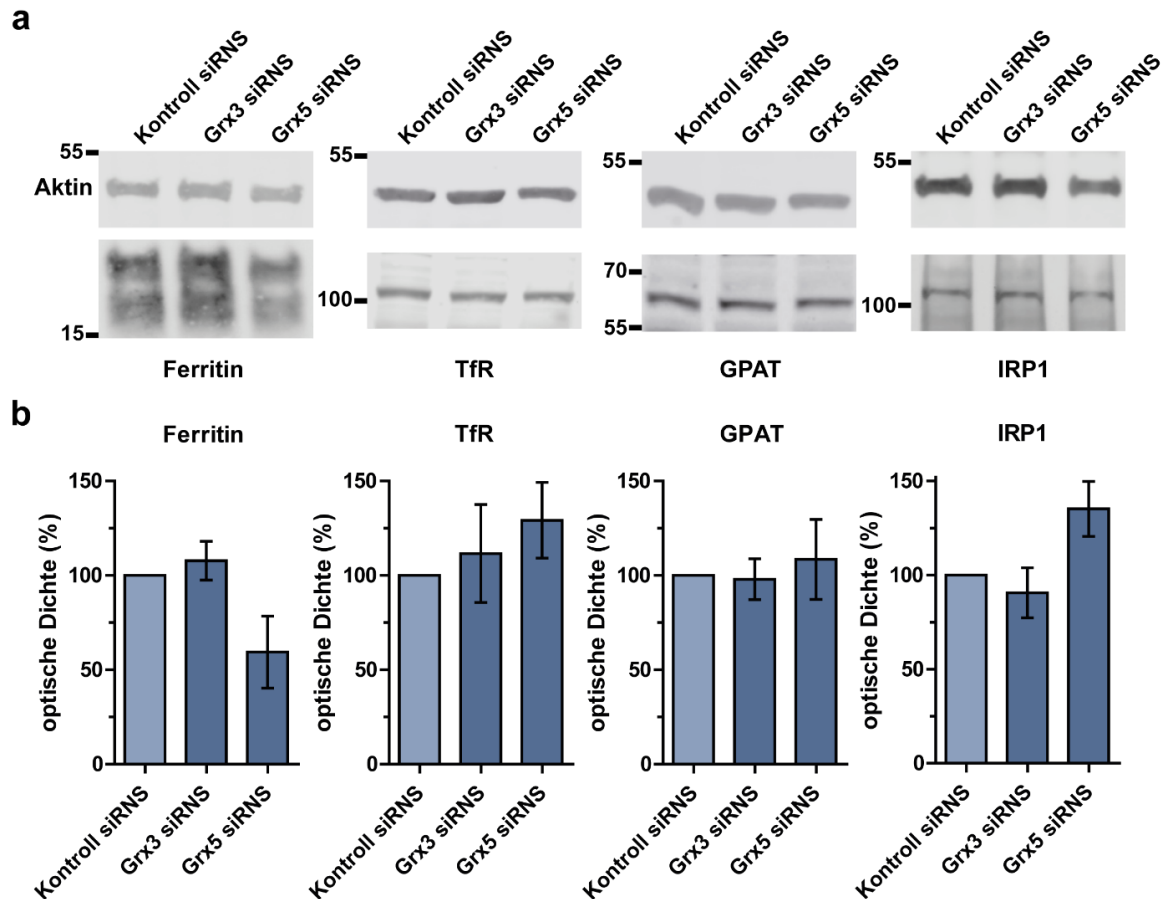
#### 4.4.3 Einfluss verminderter monothiol-Glutaredoxin-Expressionen auf die Eisenhomöostase in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von monothiol-Glutaredoxinen auf die Eisenhomöostase in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden die Grx-Expressionslevel mittels RNS-Interferenz vermindert und verschiedene eisenregulierte Proteine mithilfe einer Western Blot-Analyse (3.11.3) betrachtet.

Ferritin ist ein Eisen-speicherndes Protein, welches bei Eisenmangel der Zelle zur Freisetzung des Eisens proteasomal degradiert wird und der Transferrin-Rezeptor (TfR) ist wichtig für die Eisenaufnahme in die Zelle<sup>101</sup>. Ferritin und der TfR sind posttranskriptional reguliert durch IRP1. Eine Aktivierung von IRP1 durch einen Eisenmangel führt zur Bindung des IRP1 an IREs, wodurch es zu einer Erhöhung der TfR-Level und einer Erniedrigung der Ferritin-Level kommt<sup>101,102</sup>. Mit einer Western Blot-Analyse kann gezeigt werden, dass die Proteinlevel an Ferritin und IRP1 bei einem Grx3-Mangel nicht beeinflusst sind, während die TfR-Expression

## 4. Ergebnisse

leicht erhöht ist (Abbildung 29). Eine verminderte Grx5-Expression führt zu einer Abnahme des Ferritins auf 59 % und einer Zunahme des TfR auf 129 %, was auf einen Eisenmangel in der Zelle hindeutet. Das zytosolische FeS-Zentrum-Protein Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT) wird in seiner apo-Form abgebaut und dient daher als Marker für die Funktionalität der FeS-Zentrum-Biosynthese<sup>164</sup>. GPAT zeigt in der Western Blot-Analyse bei verringerten monothiol-Grx-Expressionen keine Degradierung (Abbildung 29).



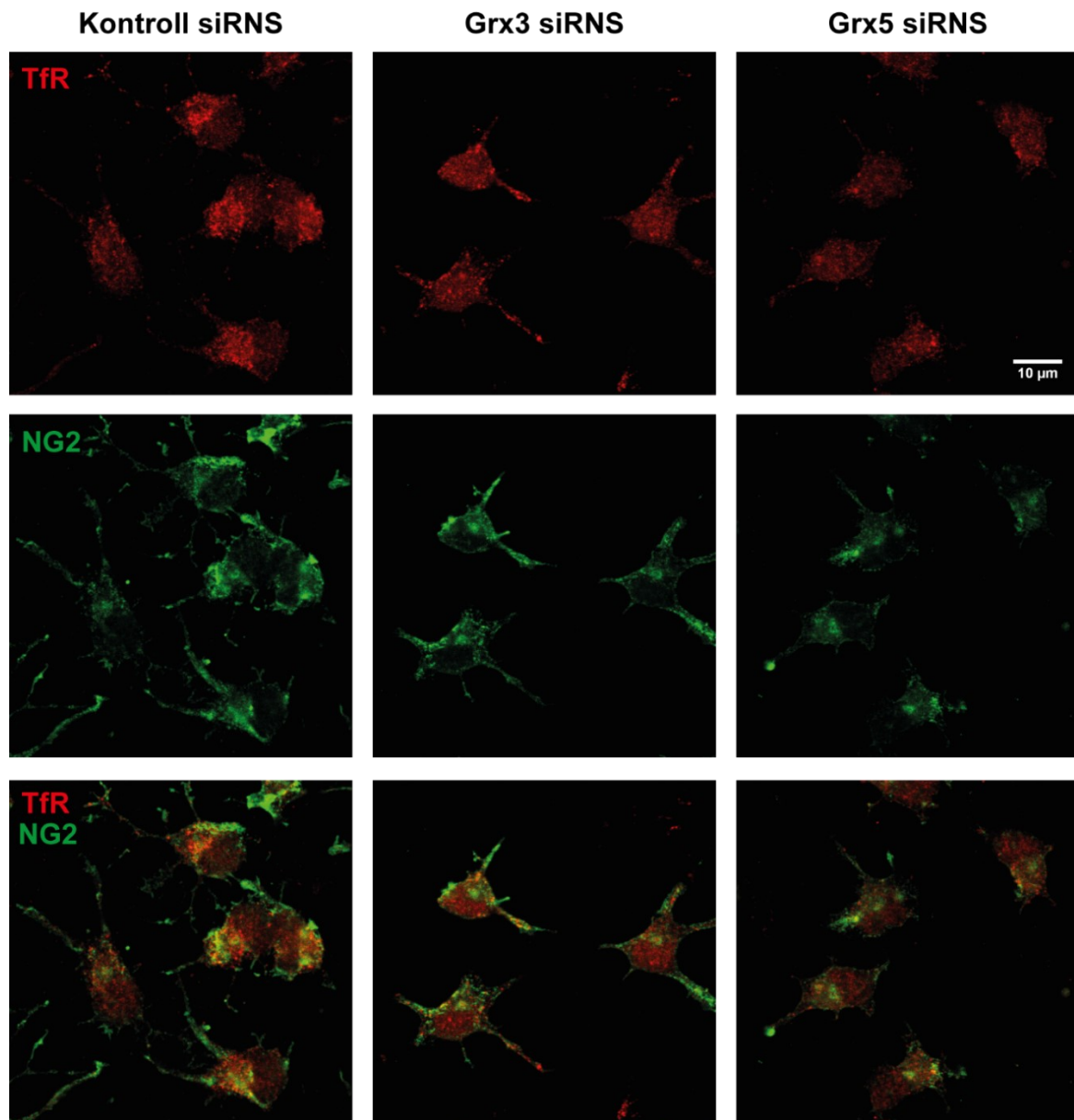
**Abbildung 29: Western Blot-Analyse von Markerproteinen der Eisenhomöostase in primären NG2-positiven Zelllysaten mit verminderter Expression der monothiol-Glutaredoxine.**

(a) Western Blot-Analyse der Proteine Ferritin, Transferrin-Rezeptor (TfR), GPAT und IRP1 in NG2-positiven Zellen nach siRNS-Behandlung. (b) Die Signale des Western Blots wurden mithilfe einer densitometrischen Analyse quantifiziert. Die Signale wurden auf die Aktin-Signale bezogen und als Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$  dargestellt. Ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zum Vergleich der Grx-siRNS-Proben mit den Kontroll-siRNS-Proben zeigt keine signifikanten Abweichungen.

Der TfR bindet an der Plasmamembran Transferrin, woraufhin der Transferrin-TfR-Komplex endozytiert wird. Das Eisen wird in den Endosomen von dem Komplex freigesetzt und der TfR wird recycelt an die Plasmamembran transportiert<sup>165</sup>. Verminderte Expressionen des monothiol-Glutaredoxin 3 führt in HeLa-Zellen zu einer Verlagerung der TfR-Lokalisation von den Endosomen zur Plasmamembran, was auf eine beeinträchtigte Eisenhomöostase hinweist<sup>37</sup>. Die Lokalisation des TfR deutet in NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit



verminderten monothiol-Grx-Expressionen auch auf eine geringfügige Verlagerung der Lokalisation in konfokalen Mikroskopaufnahmen hin (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Transferrin-Rezeptor Lokalisation in NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit herabgesetzter Expression von monothiol-Glutaredoxinen.**

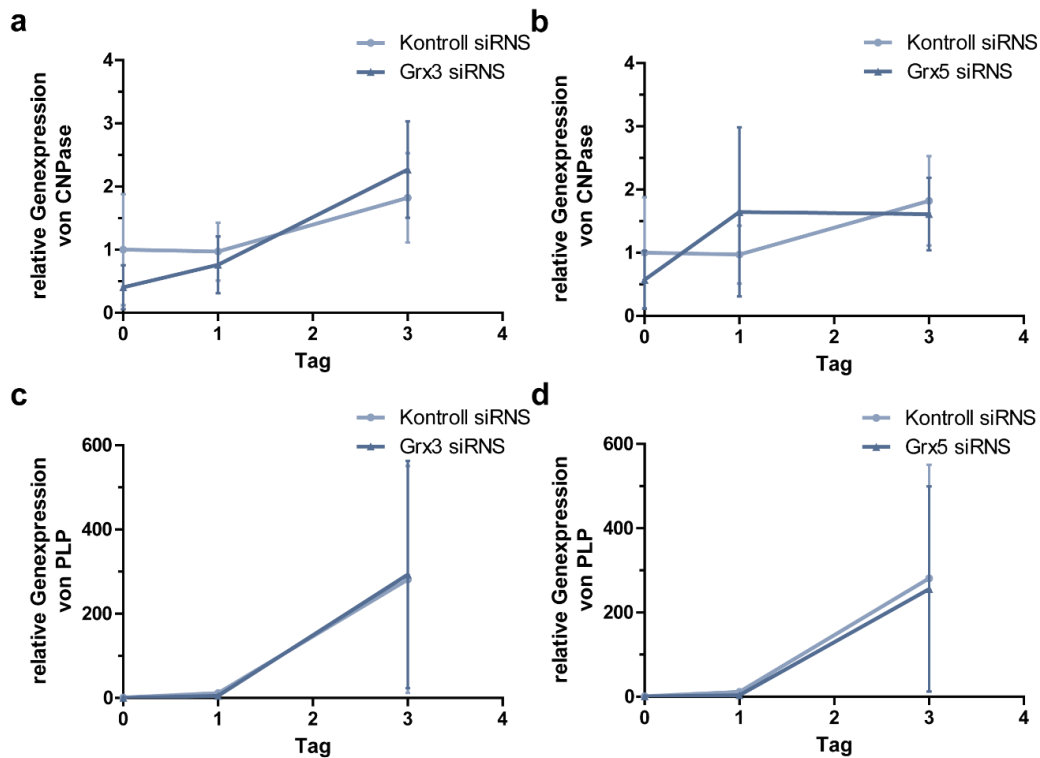
NG2-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden mit einer Zelldichte von 14000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf PLL-beschichteten Gläschen ausgesät und für vier Tage zweimal mit siRNS behandelt. Fixierte Zellen wurden mit anti-NG2 und anti-Transferrin-Rezeptor (TfR)-Antikörper inkubiert. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend zeigt sich eine erhöhte Expression und eine geringe Verlagerung der Lokalisation des TfR zur Aufnahme von Eisen, sowie verminderte Mengen des Eisenspeicherproteins Ferritin bei herunterregulierter Grx5-Expression. Ein Grx3-Knockdown führt zu einer gering veränderten Lokalisation und erhöhten Expression des TfR. Die FeS-Zentrum-Biosynthese ist unbeeinflusst von der verminderten monothiol-Grx-Expression in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.

### **4.4.4 Herabgesetzte Proteinexpressionen von monothiol-Glutaredoxinen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beeinflussen die Differenzierung**

Verringerte Proteinexpressionen der monothiol-Glutaredoxine zeigten in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen keine signifikante Beeinträchtigung der FeS-Zentrum-Biosynthese. Eine erhöhte Transferrin-Rezeptorexpression und eine geringfügig verlagerte Lokalisation geben einen Hinweis auf eine gestörte Eisenhomöostase (Abschnitt 4.4.3). Zur Bestimmung eines Einflusses der verminderten Grx-Expression auf die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, wurde die Differenzierung der Zellen nach der siRNS-Behandlung induziert. Zum Vergleich der Differenzierungsgeschwindigkeiten wurden die mRNA-Mengen von zwei Differenzierungsmarkern (CNPase und PLP) an drei Zeitpunkten mithilfe einer qRT-PCR (3.10) analysiert. Zusätzlich wurde immunozytochemisch (3.12.2) der Anteil NG2-, CNPase-, und MBP-positiver Zellen in der Kultur an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. NG2 stellt einen Marker für frühe, migrierende Vorläuferzellen dar, CNPase-positive Zellen sind vorreife Oligodendrozyten und MBP-positive Zellen sind differenzierte, reife Oligodendrozyten (Abbildung 22).

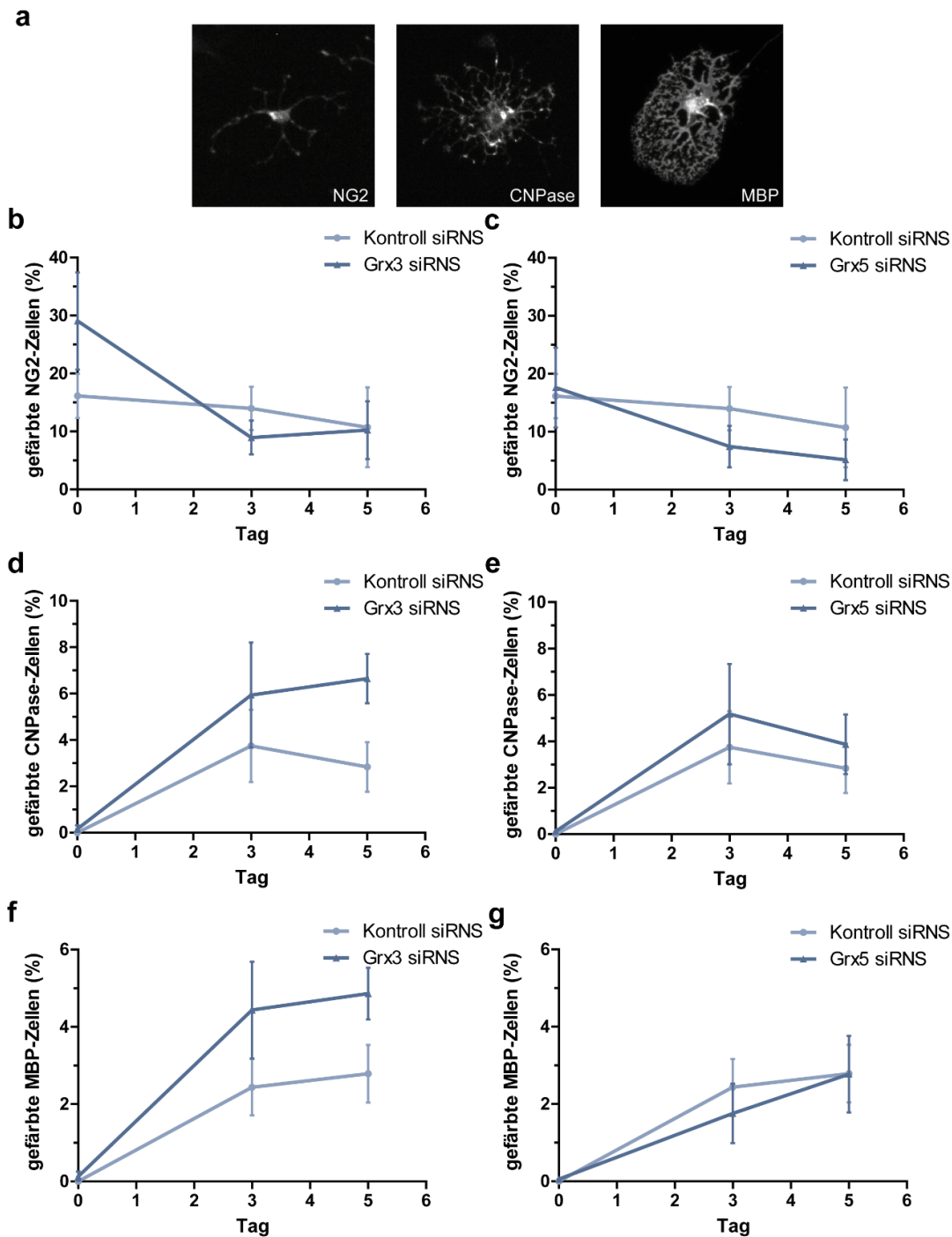
Zunächst wurden A2B5-positive Zellen als undifferenzierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen untersucht. Die verminderten Grx-Expressionen zeigen innerhalb von drei Differenzierungstagen keinen Einfluss auf die Genexpression von CNPase und PLP (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Differenzierung von A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der quantitativen RT-PCR.**

Quantitative RT-PCR zur Analyse der CNPase und PLP-Transkripte an den angegebenen Zeitpunkten während der Differenzierung von A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach viertägiger Behandlung mit siRNS kodierend für Grx3 (a, c) oder Grx5 (b, d). (a, b) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n \geq 3$ . (c, d) Die Genexpressionen sind für Tag 0 und Tag 3 als Mittelwerte  $\pm$  SD bei  $n = 4$  dargestellt. An Tag 1 ist der Mittelwert bei  $n = 2$  mit der absoluten Differenz angegeben. Ein Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunns Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Abweichungen der Genexpression bei Kontroll-siRNS- und Grx-siRNS-behandelten Zellen.

Die immunocytochemische Untersuchung zeigte eine schnellere Abnahme der Prozentzahl NG2-positiver Zellen und eine schnellere Zunahme an CNPase-positiven Zellen nach Grx3 und Grx5-Knockdown (Abbildung 32 b-e). Der Anteil an MBP-Zellen steigt nach verminderter Grx3-Expression mit 4,9 % MBP-positiver Zellen schneller an als in der Kontrolle mit 2,8 % MBP-positiver Zellen (Abbildung 32 f). Die Daten geben Anzeichen dafür, dass verminderte Grx3-Expressionen die Bildung von CNPase- und MBP-positiven Zellen begünstigt. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung nimmt die Anzahl an NG2-Zellen schneller ab. Für verminderte Grx5-Expressionen kann kein Unterschied in der Zunahme an CNPase- oder MBP-positiver Zellen beobachtet werden, während die Anzahl NG2-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit 11 % NG2-positiver Zellen auf 5 % abnimmt.



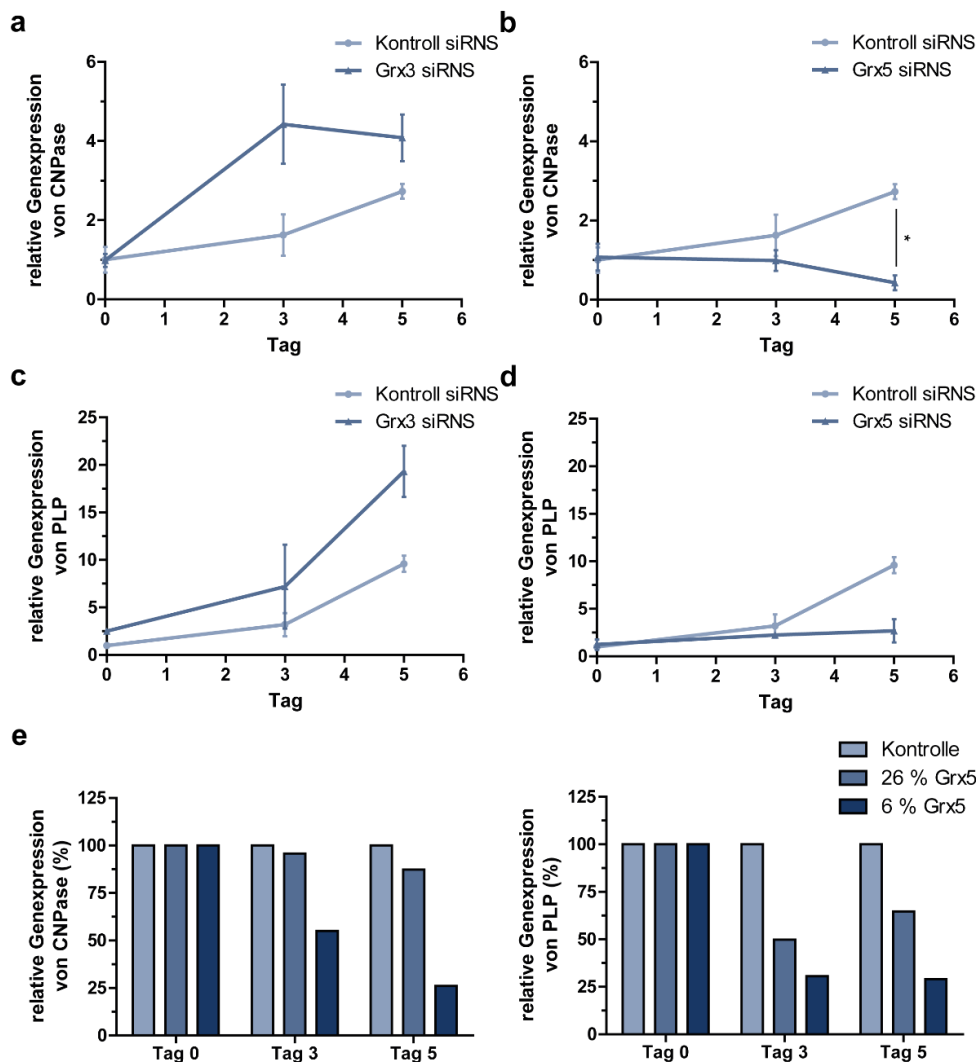
**Abbildung 32: Differenzierung von A2B5-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der immunocytochemischen Analyse.**

A2B5-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden mit einer Zelldichte von 14000 Zellen pro cm<sup>2</sup> auf PLL-beschichteten Gläschen ausgesät und über vier Tage zweimal mit siRNS behandelt, bevor sie durch Zugabe von Differenzierungsmedium differenziert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und anschließend mit anti-NG2, anti-CNPase oder anti-MBP-Antikörpern inkubiert. **(a)** Mikroskopische Aufnahmen visualisieren die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Zellen. **(b-g)** Die prozentuale Anzahl der jeweils positiven Zellen an den angegebenen Zeitpunkten wurde gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n = 4. Ein Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunns Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll-siRNS- und Grx-siRNS-behandelten Zellen.

NG2-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden ebenso wie die A2B5-positiven Zellen mit siRNS behandelt und anschließend durch Zugabe von Differenzierungsmedium mit den Hormonen T3 und T4 differenziert. Quantitative RT-PCR von NG2-Zellen bestätigt eine

## 4. Ergebnisse

beschleunigte Differenzierung bei Grx3-Mangel durch eine stärkere Zunahme der relativen Genexpression von CNPase und PLP (Abbildung 33 a, c). Andererseits führt eine verminderte Grx5-Expression zu einer signifikanten Abnahme der CNPase-Genexpression ( $p = 0,0245$ ) und zu einer Abnahme der PLP-Genexpression. Übereinstimmend zu dieser Untersuchung korreliert die Genexpression von CNPase und PLP mit der Genexpression von Grx5 (Abbildung 33 e, f). Die Genexpression von CNPase und PLP nimmt zusammen mit der Genexpression von Grx5 ab.



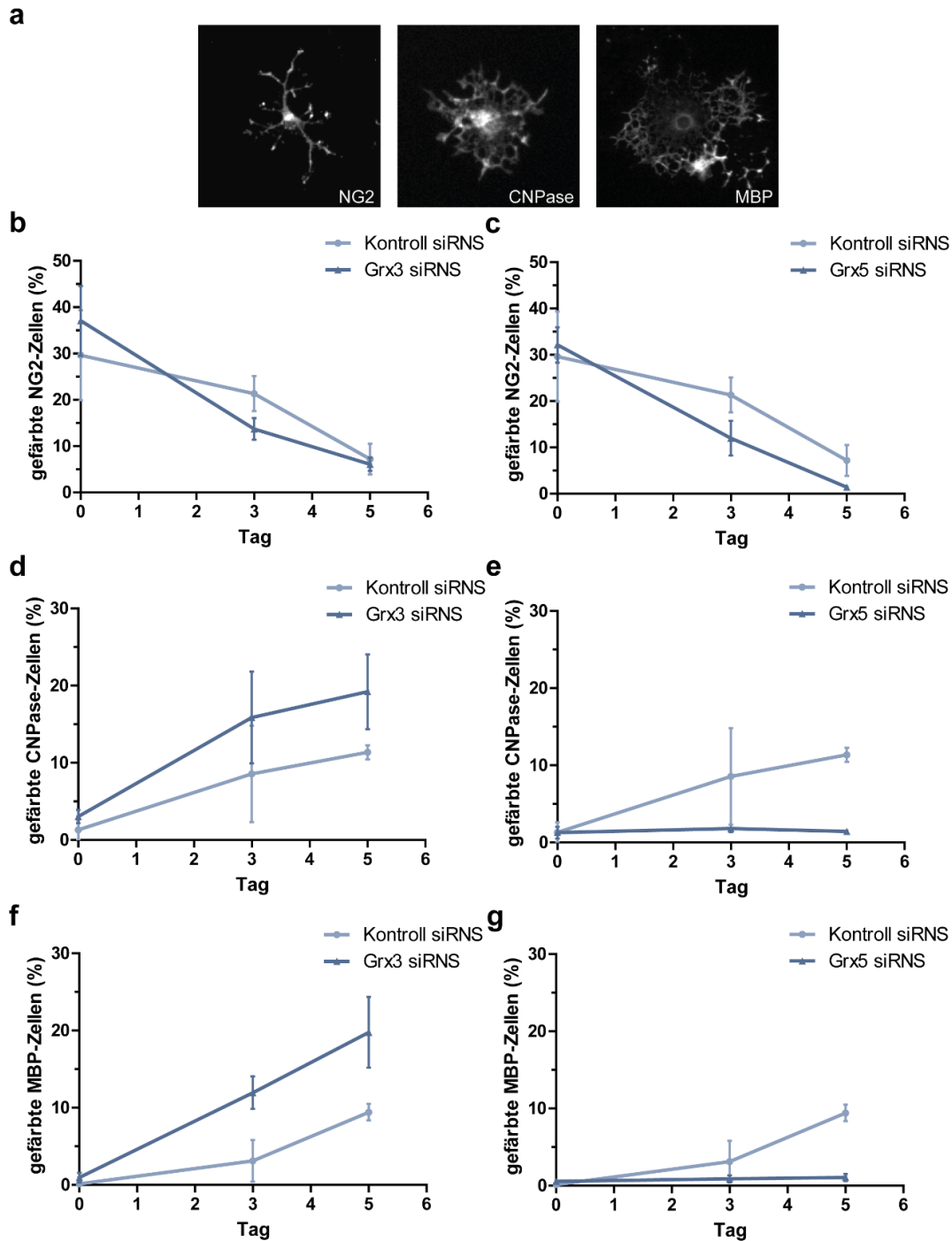
**Abbildung 33: Differenzierung von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der quantitativen RT-PCR.**

Quantitative RT-PCR zur Analyse der CNPase und PLP-Transkripte an den angegebenen Zeitpunkten während der Differenzierung von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach viertägiger Behandlung mit siRNS kodierend für Grx3 (**a, c**) oder Grx5 (**b, d**). (**a-d**) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ . Ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zeigt signifikante Abweichungen zwischen Kontroll-siRNS- und Grx-siRNS-behandelten Zellen. Ein Stern markiert einen p-Wert mit  $* p < 0,05$ . (**e**) Quantitative RT-PCR-Analyse von CNPase und PLP bei unterschiedlichen Grx5-Knockdowneffizienzen. Die Genexpression wurde auf Tag 0 und an dem jeweiligen Tag auf die Kontrolle bezogen.

Die Quantifizierung der immunozytochemischen Färbungen zeigt reproduzierbar eine schnellere Differenzierung von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach verminderter Grx3-Expression (Abbildung 34 b, d, f). Während der Anteil an NG2-gefärbten

Zellen schneller abnimmt als in der Kontrolle, nimmt die Prozentzahl an CNPase- und MBP-gefärbten Zellen schneller zu. Geringere Grx5-mRNS-Mengen führen zu einer schnelleren Abnahme von NG2-gefärbten Zellen, jedoch zu keiner Differenzierung zu CNPase- oder MBP-positiver Zellen (Abbildung 34 c, e, g). Dies deutet auf eine gehemmte Differenzierung von Grx5-siRNS-behandelter Oligodendrozyten-Vorläuferzellen hin.

Zusammenfassend zeigen die quantitative RT-PCR und die phänotypische Quantifizierung, dass verringerte Transkriptmengen von Grx3 die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beschleunigt, während niedrige Grx5-mRNS-Mengen die Differenzierung hemmen.

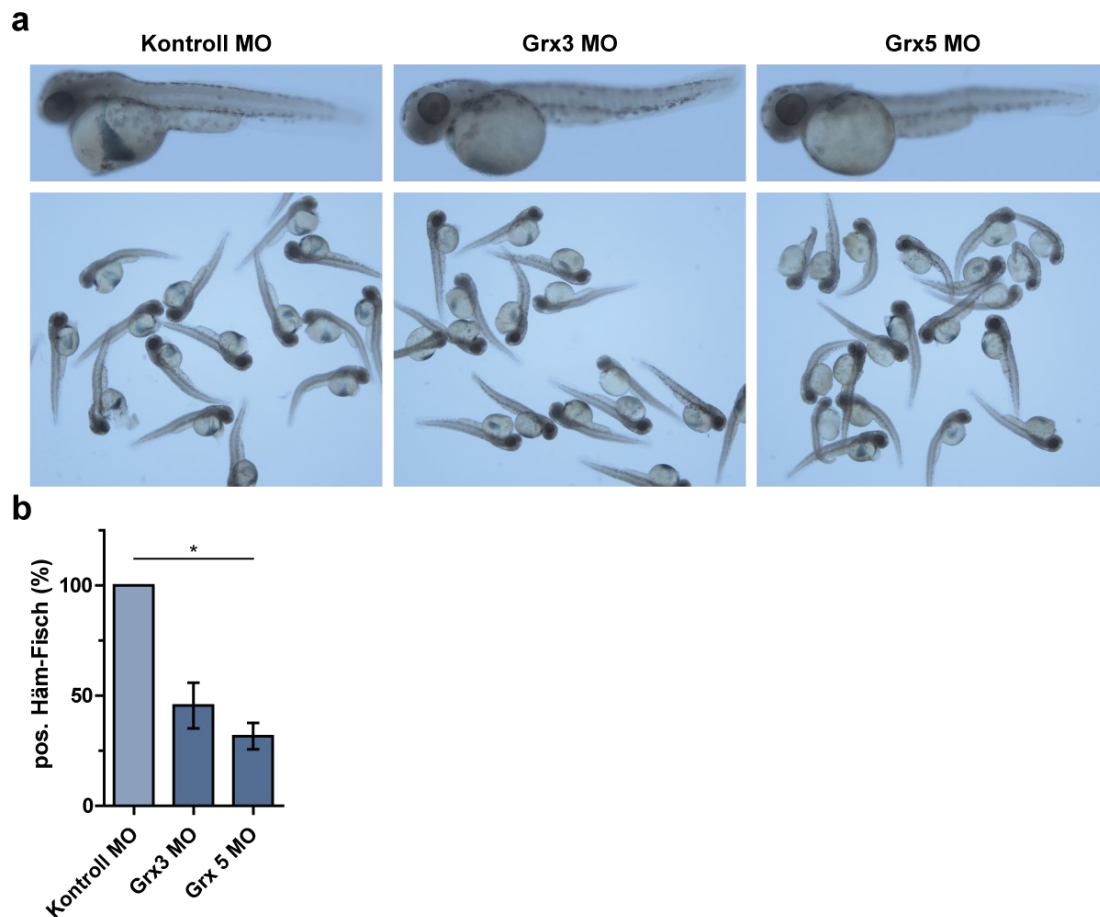


**Abbildung 34: Differenzierung von NG2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit monothiol-Grx-Knockdown in der immunozytochemischen Analyse.**

NG2-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden mit einer Zelldichte von 14000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf PLL-beschichteten Gläschen ausgesät und über vier Tage zweimal mit siRNS behandelt, bevor sie durch Zugabe von Differenzierungsmedium differenziert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und anschließend mit anti-NG2, anti-CNPase oder anti-MBP-Antikörpern inkubiert. **(a)** Mikroskopische Aufnahmen visualisieren die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Zellen. **(b-g)** Die prozentuale Anzahl der jeweils positiven Zellen wurde gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n = 3$ . Ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Abweichungen bei Kontroll-siRNS- und Grx-siRNS-behandelten Zellen.

#### 4.4.5 Einfluss von herabgesetzten Proteinexpressionen der monothiol-Glutaredoxine auf die Oligodendrozytendifferenzierung im Zebrafisch

Der Einfluss von verringerten Expressionen der monothiol-Glutaredoxine auf Oligodendrozyten und Myelinisierung wurde in einem *in vivo* Modell, dem Modellorganismus *Danio rerio*, untersucht. Dafür wurden Zebrafischeiern im Einzellstadium Grx3- oder Grx5-spezifische Morpholinos injiziert. Die Zebrafischexperimente wurden in der Core Facility Bonn unter Prof. Dr. Benjamin Odermatt durchgeführt. Haunhorst et al. und Wingert et al. zeigten, dass verringerte Grx3- und Grx5-Expressionen zu einem Verlust von Häm im Zebrafisch führt<sup>36,37</sup>. Als Kontrolle für die erfolgreiche Blockade der Translation wurde eine Häm-Färbung (3.4) der Fische 48 Stunden nach der Befruchtung durchgeführt (Abbildung 35). Die Quantifizierung der Häm-gefärbten Fische zeigte eine Abnahme auf 46 % nach Grx3-Morpholino Injektion und auf 32 % nach Grx5-Morpholino Injektion.

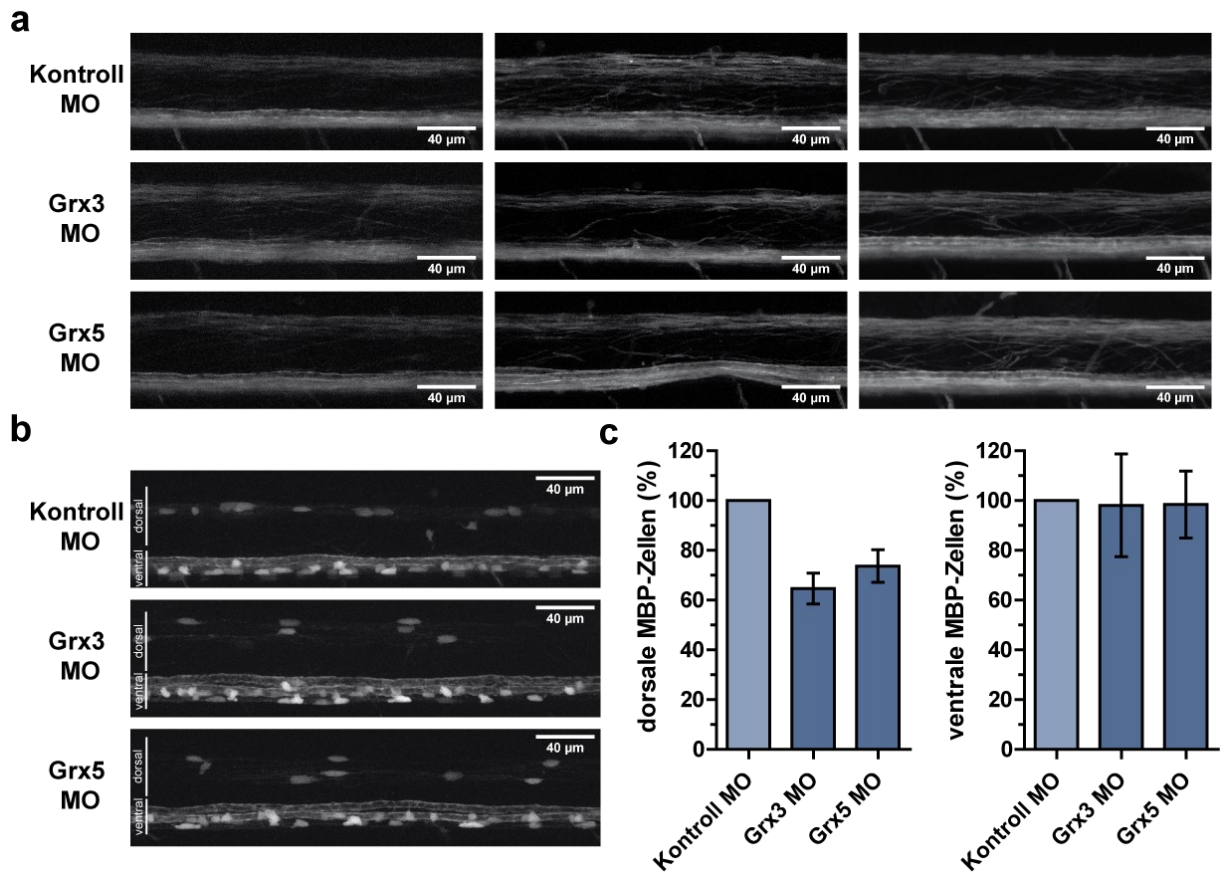


**Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahmen der Häm-Färbung von Zebrafischembryonen nach Grx3- oder Grx5-Morpholino Injektion.**

(a) Häm-Färbung von Zebrafischembryonen zwei Tage nach der Befruchtung mit Kontroll-, Grx3- oder Grx5-Morpholino (MO)-Behandlung mittels 2,7-Diaminofluorene-Färbung. (b) Prozentuale Anzahl an Fischen mit positiver Häm-Färbung zwei Tage nach der Befruchtung. Die verminderte Anzahl an Häm-positiven Fischen lässt auf eine effiziente Reduktion von Grx3 und Grx5 im Zebrafisch schließen. Dargestellt sind die Mittelwerte bei  $n = 3 \pm \text{SEM}$  von insgesamt 30-35 Fischlarven pro Bedingung. Ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns Post-Hoc-Test zum Vergleich der Kontroll-MO injizierten Fische mit den jeweiligen Grx-MO injizierten Fischen zeigt signifikante Unterschiede in der prozentualen Anzahl Häm-positiver Fische. Der Stern markiert einen p-Wert mit  $* p < 0,05$ .



Zur Untersuchung des Einflusses von monothiol-Glutaredoxinen auf die Myelinisierung in *Danio rerio* wurden transgenen Tg(cldk:Gal4;UAS:GFP-caax)- oder Tg(cldK:Gal4;UAS:tdTomato-caax)-Zebrafischeiern Grx3- oder Grx5-Morpholino injiziert. ClaudinK ist ein Myelin-assoziiertes Protein und wird in den verwendeten transgenen Fischlinien mit membrangebundenen, fluoreszierenden Proteinen wie GFP oder tdTomato exprimiert<sup>152</sup>. Fünf Tage nach der Befruchtung wurden Fluoreszenzaufnahmen des Rückenmarks aufgenommen und keine Veränderungen in der Menge oder Integrität des Myelins im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abbildung 36 a). Des Weiteren wurden Tg(mbp:GFP)-Zebrafischeiern Grx-Morpholinos injiziert. Diese transgenen Zebrafischlarven exprimieren MBP:GFP in Oligodendrozyten, wodurch die einzelnen Oligodendrozyten ausgezählt und damit quantifiziert werden können. Es wurde die Anzahl MBP-positiver Zellen im dorsalen und ventralen Rückenmark bestimmt. (Abbildung 36 b, c). Oligodendrozyten-Vorläuferzellen migrieren von der ventralen Region zur dorsalen Region<sup>166,167</sup>. Eine Verminderung der Anzahl dorsaler MBP-positiver Zellen würde Aufschluss über eine verspätete Differenzierung geben. Die prozentuale Anzahl ventraler MBP-positiver Zellen ist unbeeinflusst, wohingegen die Anzahl dorsaler MBP-positiver Zellen bei verminderten Grx3- und Grx5-mRNS-Mengen erniedrigt ist und damit Hinweis auf eine langsamere Differenzierung gibt.



**Abbildung 36: Einfluss verminderter Expressionen von monothiol-Glutaredoxinen auf die Integrität des Myelins und auf die Anzahl an MBP-positiven Zellen in Zebrafischembryonen.**

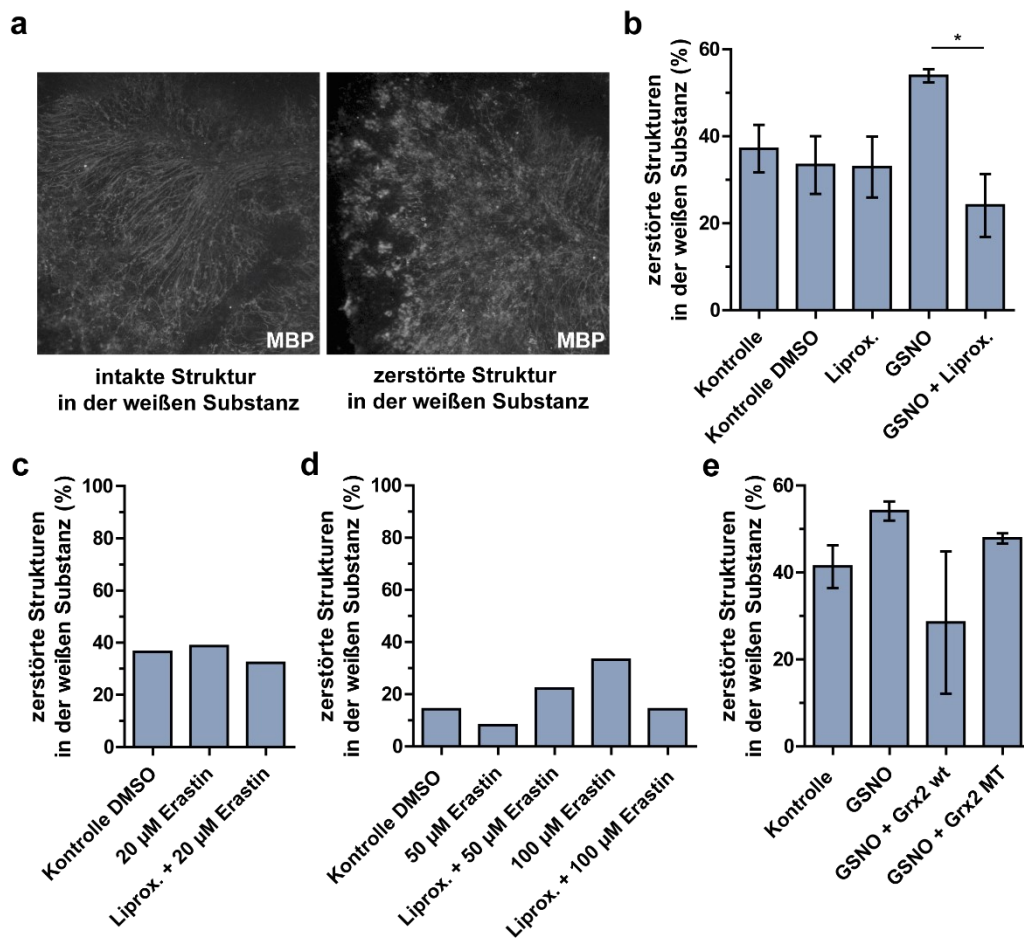
(a) Exemplarische Aufnahmen mit einer lateralen Ansicht auf das Rückenmark von Tg(cldk:Gal4;UAS:GFP-caax)- oder Tg(cldk:Gal4;UAS:tdTomato-caax)-Zebrafischen fünf Tag nach der Befruchtung mit Kontroll-, Grx3- und Grx5-Morpholino (MO)-Behandlung. Jede Abbildung repräsentiert einen Fisch aus einem Experiment mit  $\geq 3$  Fischen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. (b) Exemplarische Aufnahmen der lateralen Ansicht des Rückenmarks von Tg(mbp:GFP)-Fischen fünf Tage nach der Befruchtung mit Injektionen von Kontroll-, Grx3- oder Grx5-Morpholino. (c) Prozentuale Anzahl an dorsalen oder ventralen MBP-positiven Zellen in Tg(mbp:GFP)-Fischen. Es sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt sechs Fischen und der absoluten Abweichung dargestellt.

### 4.5 Rolle der FeS-Glutaredoxine in der Ferroptose von Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind aufgrund ihrer hohen intrazellulären Eisenkonzentrationen und der hohen Konzentration an ungesättigten Fettsäuren sensitiv gegenüber Peroxiden, welche Lipidperoxidation begünstigen könnten<sup>126,129,168</sup>. Ein Zelltodmechanismus, der auf dem Zusammenspiel von Eisen und Peroxiden besteht, ist Ferroptose<sup>169,170</sup>. Daher wurde dieser Mechanismus im Folgenden in zerebellären, organotypischen Schnittkulturen (OSCs) genauer untersucht. BODIPY™ 581/591 C11 (Invitrogen) stellt einen fluoreszenz-basierten Sensor für Lipidperoxidation dar und wird als Marker für Ferroptose verwendet<sup>171</sup>. Es wurde versucht, die BODIPY™ 581/591 C11-Färbung immunozytochemisch und quantitativ über Fluoreszenzmessungen in OSCs zu etablieren. Dies führte jedoch zu keinen validen Ergebnissen. Es wurde ebenfalls die immunozytochemische Färbung von 4-Hydroxynonenal, einem Nebenprodukt der Ferroptose, in OSCs untersucht, woraus jedoch keine eindeutigen, quantifizierbaren Ergebnisse abgeleitet werden konnten. Des Weiteren wurde untersucht, ob der Ferroptoseinhibitor Liproxstatin einen protektiven Einfluss auf die Myelinstruktur zeigt. OSCs wurden für vier Stunden mit 200 nM Liproxstatin vorbehandelt und anschließend 24 Stunden mit GSNO behandelt. Die Integrität der Myelinstruktur wurde durch immunozytochemische Färbungen des im Myelin enthaltenen Proteins MBP visualisiert (Abbildung 37 a) und die zerstörten Strukturen in der weißen Substanz prozentual quantifiziert (Abbildung 37 b). Die alleinige Behandlung mit GSNO führte zu 54 % zerstörte Strukturen in der weißen Substanz, während eine Liproxstatin-Vorbehandlung mit 24 % zerstörter Strukturen zu einem signifikanten Schutz der Myelinstruktur in OSCs unter GSNO-Behandlung führt.

Die Ferroptose-induzierende Substanz Erastin inhibiert das  $x_c^-$ -System, wodurch die intrazelluläre Cysteinkonzentration abnimmt und als Folge daraus kein GSH gebildet werden kann. GSH-abhängige Enzyme wie Glutathion-Peroxidasen werden inaktiv und die Ferroptose ist eingeleitet<sup>169</sup>. Die Behandlung von OSCs mit Erastin deutet in sehr hohen Konzentrationen eine geringe Erhöhung der Myelinschäden an und eine Liproxstatinvorbehandlung weist bei einer Erastinbehandlung leicht verringerte Schäden in der Myelinstruktur auf (Abbildung 37 c, d).

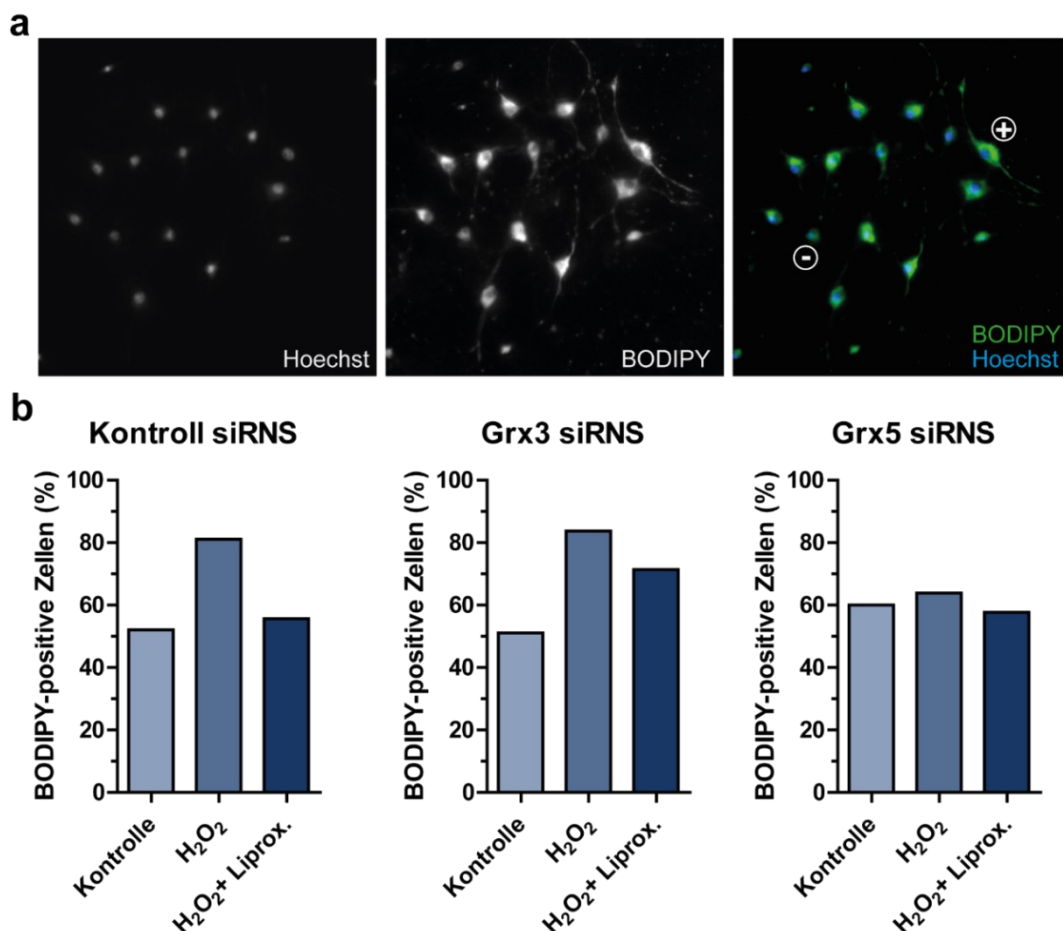
Zur Untersuchung des Einflusses der FeS-Grx auf die Ferroptose in Oligodendrozyten wurden sowohl die monothiol Grx mit ihren Funktionen in Eisenhomöostase und FeS-Zentrum-Biosynthese als auch Grx2 mit seiner bereits zuvor beschriebenen Loop-Mutation untersucht.



**Abbildung 37: Untersuchungen von Ferroptose in Oligodendrozyten in zerebellären, organotypischen Schnittkulturen.** Zerebelläre, organotypische Schnittkulturen (OSC) wurden mit verschiedenen Substanzen inkubiert und anschließend mit PFA fixiert. Mittels immunocytochemischer Färbung des im Myelin enthaltenen MBPs wurden intakte und zerstörte Strukturen in der weißen Substanz visualisiert (a) und quantifiziert (b-e). (b) OSCs wurden für vier Stunden mit 200 nM Liproxstatin (Liprox.) vorbehandelt und mit 750 µM GSNO versetzt. 24 Stunden nach der GSNO-Behandlung wurden die OSCs fixiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt 13-15 OSCs pro untersuchte Bedingung. Ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Dunn zum Vergleich von GSNO mit GSNO + Liproxstatin zeigte signifikante Unterschiede, wobei ein Stern einen p-Wert mit  $p < 0,05$  markiert. (c, d) OSCs wurden vier Stunden mit dem Ferroptoseinhibitor Liproxstatin vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit 10, 20, 50 oder 100 µM Erastin inkubiert. Dargestellt ist jeweils ein unabhängiges Experiment mit 1-5 OSCs pro Bedingung. (e) OSCs wurden mit rekombinanten Grx2 zwei Stunden vor und vier Stunden nach GSNO-Zugabe in einer Konzentration von 2 µM zum Medium gegeben. 24 Stunden nach der GSNO-Behandlung (750 µM) wurden die OSCs fixiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 10-12 OSCs pro untersuchter Bedingung.

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die jeweilige FeS-Zentrum-Stabilität Auswirkungen auf den protektiven Effekt von FeS-Grx2 gegenüber hoher  $\cdot\text{NO}$ -Werte hat, wurden die OSCs mit rekombinanten Grx2 wt und der Grx2 monothiol-Loop-Mutante behandelt (Abbildung 37 e). Rekombinantes Grx2 wurde zwei Stunden vor und vier Stunden nach GSNO-Behandlung in das Medium der OSCs gegeben. Die OSCs wurden 24 Stunden mit GSNO behandelt. Die Loop-Mutation in Grx2 führt mit 48 % zerstörten Myelinstrukturen zu einer verringerten protektiven Funktion im Vergleich zum Wildtyp mit 29 % zerstörten Strukturen. Möglicherweise führt die veränderte FeS-Zentrum-Stabilität zu einer verringerten DNIC-Bildung und dadurch zu einem Verlust der Protektion.

Zur Untersuchung der monothiol-FeS-Grx wurden die Expressionen von Grx3 und Grx5 in primären Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mittels RNA-Interferenz vermindert (Etablierung siehe Abschnitt 4.4.1) und die Zellen mit und ohne Liproxstatin-Vorbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Die Lipidperoxidation konnte im Gegensatz zu den organotypischen Schnittkulturen in vereinzelt Zellen auf PLL-beschichteten Gläschen mithilfe von BODIPY™ 581/591 C11 (Invitrogen) gefärbt werden. BODIPY-positive Zellen wurden am Mikroskop detektiert (Abbildung 38 a) und quantifiziert (Abbildung 38 b). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung führte zu einer Induktion der Lipidperoxidation auf 80 % BODIPY-positiver Zellen. Bei einer verminderten Grx5-Expression lagen unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung lediglich 64 % BODIPY-positiver Zellen vor, was einen Schutz der Zelle vor Lipidperoxidation indiziert. Die erniedrigte Grx3-Expression führt zu einer verminderten Ferroptoseinhibition bei Liproxstatin-Behandlung auf 71 % BODIPY-positiver Zellen im Vergleich zu 51 % bei der Kontrolle und 84 % bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung.



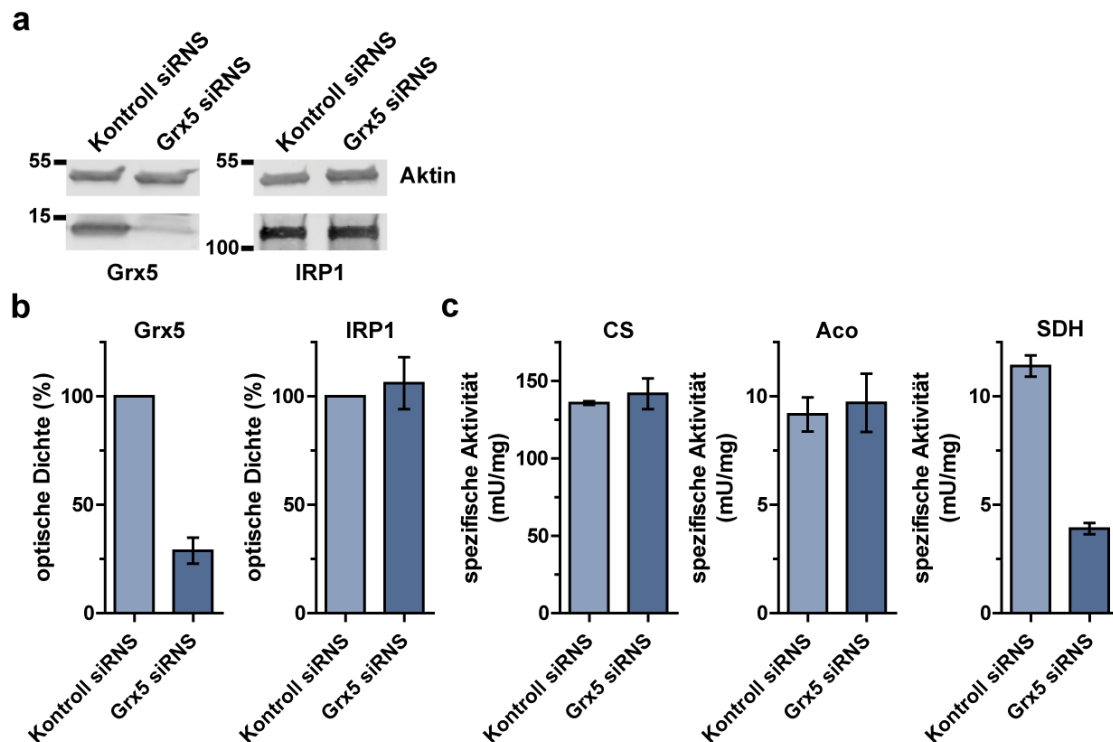
**Abbildung 38: Einfluss vermindert monothiol-Glutaredoxin-Expressionen auf die Lipidperoxidation in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.**

A2B5-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurden auf PLL-beschichteten Gläschen in Proliferationsmedium kultiviert und mit Glutaredoxin-spezifischer siRNS zur Verminderung der Expression behandelt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit oder ohne zweistündige Vorbehandlung mit 100 nM Liproxstatin inkubiert. Lipidperoxidation wurde durch 30-minütige Inkubation mit 1 µM BODIPY 581/591 C11 am Mikroskop visualisiert (a) und die Anzahl BODIPY-positiver Zellen (+) auf die Anzahl Hoechst-gefärbter Zellkerne bezogen (b).

### **4.6 Einfluss von monothiol-Glutaredoxinen auf die Molybdän-Kofaktor (MoCo)-Biosynthese**

Eisenhomöostase und FeS-Zentrum-Biosynthese sind nicht nur wichtig für Differenzierungsprozesse, sondern auch für die Synthese anderer metallischer Kofaktoren<sup>113</sup>. Zur Untersuchung des Einflusses von monothiol-Glutaredoxinen auf die Molybdän-Kofaktor (MoCo)-Biosynthese wurden Grx-depletierte *E.coli*-Zellen, HeLa-Zellen mit mittels RNS-Interferenz verminderter Grx5-Expression und HeLa-Zellen mit stabiler Grx3-Depletion, die von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christopher H. Lillig (Greifswald) zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Als Kontrolle wurde zunächst die Funktionalität der FeS-Zentrum-Biosynthese gemessen. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Oliver Stehling (Marburg) in HeLa-Zellen mit auf 28 % herabgesetzten Grx5-Mengen (Abbildung 39 a, b) die Aktivität verschiedener Enzyme gemessen. Aconitase stellt die holo-Form des IRP1 dar, welches im TCA-Zyklus die Umsetzung von Citrat in Isocitrat mit dem Intermediat *cis*-Aconitat katalysiert. Während die Aconitaseaktivität von den Grx5-Expressionen unbeeinflusst ist, zeigt die Succinat-Dehydrogenase eine deutliche Reduktion in ihrer Aktivität (Abbildung 39 c). Succinat-Dehydrogenase koordiniert mehrere FeS-Zentren und katalysiert die Reaktion von Succinat zu Fumarat in Komplex II der Atmungskette und im Citrat-Zyklus. Als Kontrolle dient die Enzymaktivität der mitochondrialen Citrat-Synthase, welche Kofaktor-unabhängig im TCA-Zyklus Citrat aus Acetyl-Coenzym A und Oxalacetat synthetisiert. Es wurden keine generellen Beeinträchtigungen der Enzymaktivität beobachtet, was auf funktionale Enzyme im Lysat schließen lässt.

Der Einfluss verminderter Expressionen des zytosolischen monothiol-Grx3 in HeLa-Zellen auf die Aktivität FeS-Zentrum-koordinierender Zellen wurde bereits in der Dissertation von Dr. Petra Haunhorst untersucht und zeigte Defekte in der Aktivität mitochondrialer FeS-koordinierender Enzyme an<sup>37</sup>.



**Abbildung 39: Einfluss verminderter Grx5-Expressionen auf Enzymaktivitäten in HeLa-Zellen.**

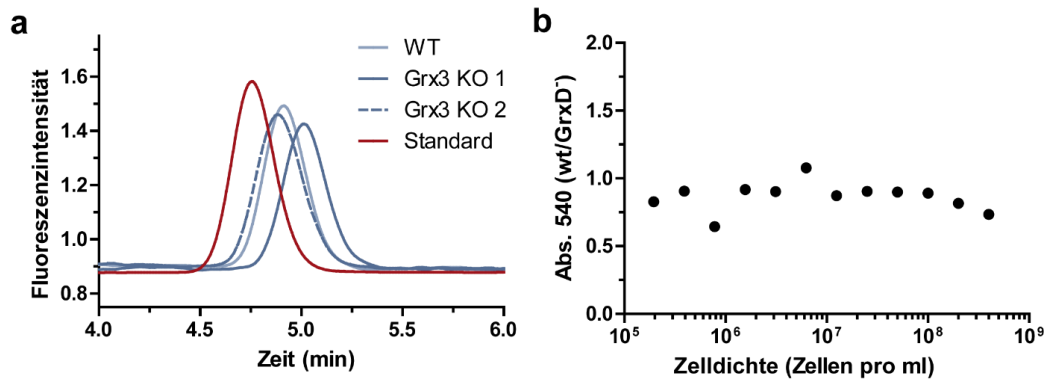
HeLa-Zellen wurden für sechs Tage zur Verminderung der Grx5-Expression mit siRNS behandelt. **(a)** Die Zelllysate wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht und Grx5 und IRP1 mit anti-Grx5- und anti-IRP1-Antikörpern detektiert. **(b)** Die Grx5- und IRP1-Signale wurden densitometrisch quantifiziert und auf das Aktinsignal bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert mit absoluter Abweichung von  $n = 2$  für Grx5 und  $n = 3$  für IRP1. **(c)** Aconitase (Aco) und Succinat-Dehydrogenase (SDH) sind FeS-Zentrum-abhängige Enzyme deren Aktivität in HeLa-Lysaten mit verringerten Grx5-Expressionen gemessen wurden. Citrat-Synthase (CS) ist ein Referenzenzym für generelle enzymatische Defekte. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$ . Ein Mann-Whitney-U-Test zeigt keine Signifikanzen.

Nach der Bestätigung der Defekte in der Aktivität von FeS-Zentrum-kordinierenden Enzymen wurde der Einfluss von monothiol-FeS-Glutaredoxinen auf die eisenabhängige Molybdän-Kofaktor-Biosynthese untersucht. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Günter Schwarz (Köln) wurde der Molybdopterin-Gehalt, eine Vorstufe des MoCo, in Grx3-depletierten HeLa-Zellen untersucht. Dazu wurde das Derivat des Molybdopterin (Form A) nach dessen Oxidation mittels HPLC detektiert. Es kann kein Einfluss der Grx3-Expression auf die Form A-Menge gezeigt werden (Abbildung 40 a). Zusätzlich wurde die Aktivität des MoCo-abhängigen Enzyms Sulfitoxidase in HeLa- und HEK-Zellen mit regulierten monothiol-Grx-Expressionen untersucht, jedoch war die Aktivität der Sulfitoxidase bereits in den Kontrollproben zu gering für valide Ergebnisse.

Desweiteren wurde der Einfluss der Glutaredoxine in *E.coli* auf die MoCo-abhängige Nitrat-Reduktase untersucht. Ein Grx4-depletierter *E. coli*-Stamm, sowie der dazugehörige Wildtyp wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Alexios Vlamis-Gardikas (Patras, Griechenland) zur Verfügung gestellt. In dem Grx4-depletierten Stamm kann eine Nitrat-Reduktaseaktivität gezeigt werden (Abbildung 40 b). Das Verhältnis des Wildtyp *E.coli*-Stamms zum GrxD-

## 4. Ergebnisse

Stamm zeigt mit verschiedenen Zelldichten keinen Unterschied in der Nitrat-Reduktaseaktivität. Die dargestellten Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die monothiol-Glutaredoxine überraschenderweise keinen Einfluss auf die MoCo-Biosynthese haben. Zur Bestätigung dieser Aussage sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.



**Abbildung 40: Einfluss von herabgesetzten monothiol-Grx-Expressionen auf die MoCo-Biosynthese.**

(a) HPLC-Chromatogramm des FormA, welches ein oxidiertes Derivat des Molybdopterin darstellt. Grx3-depletierte HeLa-Zellextrakte wurden oxidiert und mittels HPLC FormA detektiert. (b) In *E. coli Grx D* wurde die Nitrat-Reduktase-Aktivität untersucht. Es wurde die Umsetzung von Nitrat zu Nitrit durch dessen Reaktion mit Sulfanilsäure und  $\alpha$ -Naphthylamin zu einem roten Azofarbstoff photometrisch gemessen. Es ist das Verhältnis der in *E. coli wt* und *E. coli Grx D* gemessenen Absorptionen bei 540 nm dargestellt.



## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist die FeS-Zentrum-Koordination und -Stabilität in monothiol- und dithiol-Glutaredoxinen zu vergleichen und ihren Einfluss auf die Proteinfunktionen zu untersuchen. Dafür wurden dithiol-Grx2 und monothiol-Grx5, sowie Glutaredoxin-Mutanten mit veränderter FeS-Zentrum-Koordination zunächst spektroskopisch und anhand ihrer bekannten Funktionen und anschließend der Einfluss dieser Proteine auf physiologische Prozesse untersucht.

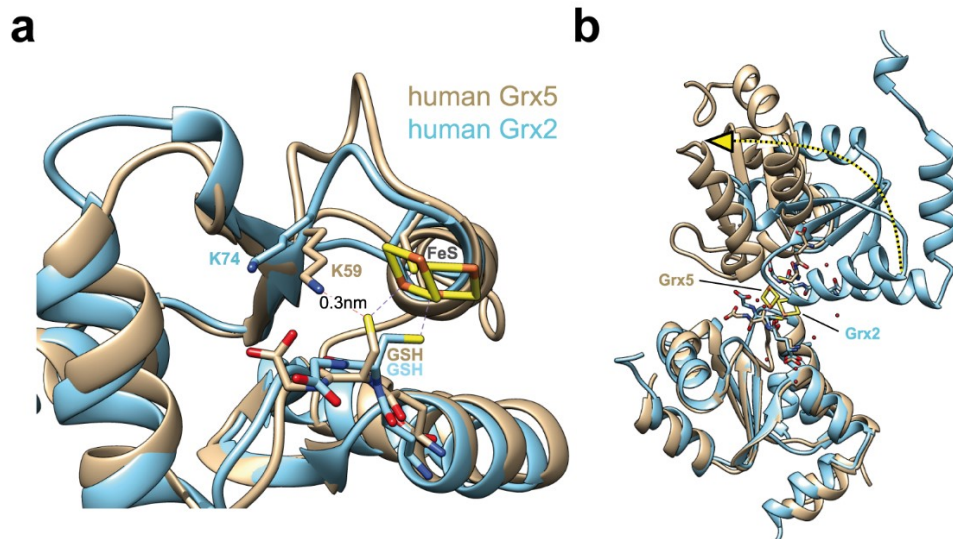
### 5.1 Der Loop vor dem aktiven Zentrum der Glutaredoxine beeinflusst die Koordination des FeS-Zentrums und ist ein Schlüsselement für die Funktionen der Glutaredoxine

Die FeS-Zentrum-Liganden in monothiol- und dithiol-Glutaredoxinen sind je ein Cystein des aktiven Zentrums im Dimer und die Cysteine von zwei Glutathionmolekülen (GSH)<sup>115,118</sup>. Die nicht-kovalente Bindung des GSH erfolgt mit den gleichen Bindungsmotiven für monothiol- und dithiol-Grx<sup>42</sup>. Trotz dieser Ähnlichkeiten zeigen dithiol-Grx Funktionen als Redoxsensor und in der Redox-Signalgebung auf, während monothiol-Grx redoxinaktiv sind und Funktionen in der FeS-Biosynthese oder im Transfer von FeS-Zentren haben<sup>114,172</sup>.

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die FeS-Zentrum-Koordination in monothiol- und dithiol-Glutaredoxinen von Säugetieren unterschiedlich ist und dass die Größe eines Loops vor dem aktiven Zentrum einen maßgeblichen Einfluss auf die Koordination hat. Die veränderte FeS-Koordination äußerte sich in einer Verschiebung der Absorptionsbanden der holo-Grx in UV/Vis-Spektren. Die UV/Vis-Spektren wiesen ein Absorptionsmaximum für humanes monothiol-Grx5 bei 413 nm und für humanes dithiol-Grx2 bei einer größeren Wellenlänge von 428 nm auf. Der Austausch des Loops im rekombinanten Grx5 führt zu einer Verschiebung der Absorptionsbande in die Richtung des Absorptionsmaximums von dithiol-Grx2, während der Austausch des aktiven Zentrums keinen Einfluss auf die Umgebung des FeS-Zentrums hat. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigten Bandyopadhyay et al. ebenfalls eine Verschiebung der ~420 nm-FeS-Zentrum-Absorptionsbande bei Klasse I und Klasse II-Glutaredoxinen aus Pflanzen<sup>173</sup>. In höheren Pflanzen werden die Glutaredoxine in Klassen unterteilt, wobei Klasse I den dithiol-Glutaredoxinen der Säugetiere (Grx1 und Grx2) entspricht und Klasse II allen Glutaredoxine mit CGFS-Motiv<sup>174</sup>. Bandyopadhyay et al. zeigten eine Verschiebung des FeS-Zentrum-Absorptionsmaximums der Klasse I GrxC1 aus der Pappel zu

größeren Wellenlängen im Vergleich zu den Absorptionsmaxima der Klasse II Glutaredoxine GrxS14 aus Pappel oder GrxS16 aus *Arabidopsis thaliana*.

Übereinstimmend mit Johansson et al. konnte eine schwächere FeS-Zentrum-Stabilität in Grx5 im Vergleich zu Grx2 gezeigt werden<sup>118</sup>. In Pflanzen wird ebenfalls von einer stabileren FeS-Zentrum-Koordination in Klasse I-Glutaredoxinen ausgegangen<sup>175</sup>. Die verminderte FeS-Zentrum-Stabilität der monothiol-Grx passt zu der Funktion des Grx5 im Transfer von FeS-Zentren auf apo-Zielproteine in der FeS-Biosynthese<sup>172,173</sup>. Der Austausch des monothiol-Loops mit dem dithiol-Loop in Grx5 führte zu einer Stabilisierung des FeS-Zentrums auf ein vergleichbares Niveau mit dem stabileren holo-Grx2 Wildtyp. Eine mögliche Erklärung für die schwächere FeS-Bindung in monothiol-Grx5 liegt in der Interaktion des konservierten Lysins am N-terminalen Rand des monothiol-Loops mit dem Thiol des Glutathions, wodurch sich die Orientierung des FeS-Zentrums ändern könnte. Der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen und eine Molekulardynamik (MD)-Simulation zeigten unterschiedliche Interaktionsmuster<sup>154</sup>. Die Aminogruppe des konservierten Lysins interagiert in dithiol-Grx mit der Carboxygruppe des GSH-Glycins. In Anwesenheit des größeren monothiol-Loops kommt es zu einer Umorientierung des Lysins, wodurch die Aminogruppe mit dem Thiol des GSH interagiert. Nach der *Induced-Fit*-Theorie kommt es zu einer Umorientierung des GSH-Thiols in die Richtung der Aminogruppe des Lysins. Diese Interaktion führt zu einer Verschiebung und Rotation des FeS-Zentrums und als Folge daraus zu der Rotation eines Monomers in Grx5, siehe Abbildung 41. Circular dichroismus-Spektroskopie bestätigte den Orientierungsunterschied der Monomere in dithiol- und monothiol-Grx<sup>154</sup>.



**Abbildung 41: Vergrößerte Loop-Struktur vor dem aktiven Zentrum der Glutaredoxine beeinflusst FeS-Zentrum-Koordination und die holo-Grx-Konformation.**

(a) Dreidimensionale Struktur von humanem Grx2 (blau, PDB: 2HT9) und humanem Grx5 (braun, PDB: 2WUL) visualisieren die Ausrichtung des konservierten Lysins (K74 für Grx2 und K59 für Grx5) zum Glutathion in holo-Grx. (b) Überlagerte Strukturen von humanem Grx2 (blau, PDB: 2HT9) und humanem Grx5 (braun, PDB: 2WUL) zeigen eine Rotation eines Monomers in der Dimerkonformation, welches durch eine Verschiebung des FeS-Zentrums induziert wird. Abbildungen aus Trnka, Engelke, Gellert et al.<sup>154</sup>.

Folglich hat der Loop einen Einfluss auf die FeS-Koordination und -Stabilität, welcher sich auch in den Funktionen der monothiol- und dithiol-Grx widerspiegelt. Grx5 mit dithiol-Loop zeigte einen Aktivitätsverlust in der FeS-Transferase-Aktivität, während Grx2 mit monothiol-Loop diese Aktivität, die Grx2 Wildtyp fehlt, aufwies. Des Weiteren konnte der Gewinn einer Transferase-Funktion von Grx2 mit monothiol-Loop *in vivo* im Zebrafisch gezeigt werden. Übereinstimmend mit Komplementationsexperimenten in *S. cerevisiae*<sup>133,173</sup> konnte die Überlebensrate von Grx5-defizienten Zebrafischen nicht mit der Expression von dithiol-Glutaredoxinen erhöht werden. Die in dieser Arbeit erzielten Rettungseffizienzen durch Zugabe von Grx-kodierender mRNS waren jedoch niedriger als die von Wingert et al. publizierten Rettungseffizienzen. Dies könnte zum einen an der Speziesbarriere liegen, da bereits Wingert et al. bei Komplementierungsversuchen im Zebrafisch eine verringerte Rettungseffizienz für humanes Grx5 von 88 % zeigte<sup>36</sup>. Die Komplementierung eines Grx5-Mangels mit den orthologen Glutaredoxinen im Zebrafisch wurde ausgeschlossen, weil die FeS-Zentrum-Koordination von Grx2 im Zebrafisch sich von allen anderen beschriebenen FeS-Zentrum-Koordinationen in Glutaredoxinen unterscheidet. Grx2 aus Zebrafischen koordiniert ein 2Fe2S-Zentrum im Monomer über vier intramolekulare Cysteine im Gegensatz zu zwei Glutathionen und zwei Cysteinen in humanen FeS-Glutaredoxinen<sup>176</sup>. Aus diesen Gründen und zur Vergleichbarkeit mit den *in vitro* durchgeführten Experimenten wurden humanes Grx2 und Grx5 gewählt und ebenso wie deren Loop-Mutanten mit der identischen mitochondrialen Transitsequenz aus *Neurospora crassa* modifiziert, um einen gleichmäßigen Import in die

Mitochondrien zu ermöglichen. Diese notwendigen Veränderungen könnten einen weiteren Einfluss auf die Rettungseffizienz gehabt haben. Dennoch zeigten sich in mehreren Experimenten die gleichen Tendenzen in der Rettungseffizienz. Es konnte deutlich mit zunehmendem Alter der synthetisierten mRNA eine abnehmende Rettungseffizienz beobachtet werden, was trotz der Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf die Degradierung der mRNA hinweist und was ein weiterer Grund für niedrige Rettungseffizienzen sein könnte.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Loops auf die Redoxaktivität der dithiol-Glutaredoxine untersucht. Der Austausch des dithiol-Loops zum monothiol-Loop in Grx2 führte zu einer niedrigeren Redoxaktivität in der Reduktion des artifiziellen Substrats Glutathion-Mercaptoethanol im Glutaredoxin-Aktivitätsassay. Grx5 Wildtyp zeigte keine deutliche Aktivität im Glutaredoxin-Aktivitätstest. Eine Erhöhung der Redox-Aktivität durch das Einfügen des dithiol-Loops in Grx5 konnte nicht, bzw. nur zu einem sehr geringen Teil im Glutaredoxin-Aktivitätsassay beobachtet werden. Bei dem Glutaredoxin-Aktivitätsassay mit Glutathion-Mercaptoethanol müssen für die katalytische Funktion oxidative und die reduktive Halbreaktion ablaufen. Der Assay gibt keinen Aufschluss über die Aktivität der Glutaredoxine in den einzelnen Halbreaktionen. Die Bestimmung der Aktivitäten in den jeweiligen Halbreaktionen kann mit dem Redoxsensor roGFP2 untersucht werden und ist in Trnka et al. gezeigt<sup>154</sup>. Dort zeigte Grx5 Wildtyp eine leichte Aktivität in der Oxidation und eine Inaktivität in der Reduktion von roGFP2<sup>154</sup>. Dies lässt auf eine Präferenz von Grx5 gegenüber der Oxidationsreaktion schließen. Der Austausch des aktiven Zentrums von CGFS zu CSYC oder des Loops in Grx5 führte zu einem Aktivitätsgewinn in der Reduktion und Oxidation von roGFP2, wobei im Vergleich die Doppelmutante die höchste Aktivität der Grx5-Mutanten hatte<sup>154</sup>. Die Reduktion und Oxidation von roGFP2 verläuft in drei reversiblen Schritten über die Glutathionierung eines Proteins (Abbildung 42).

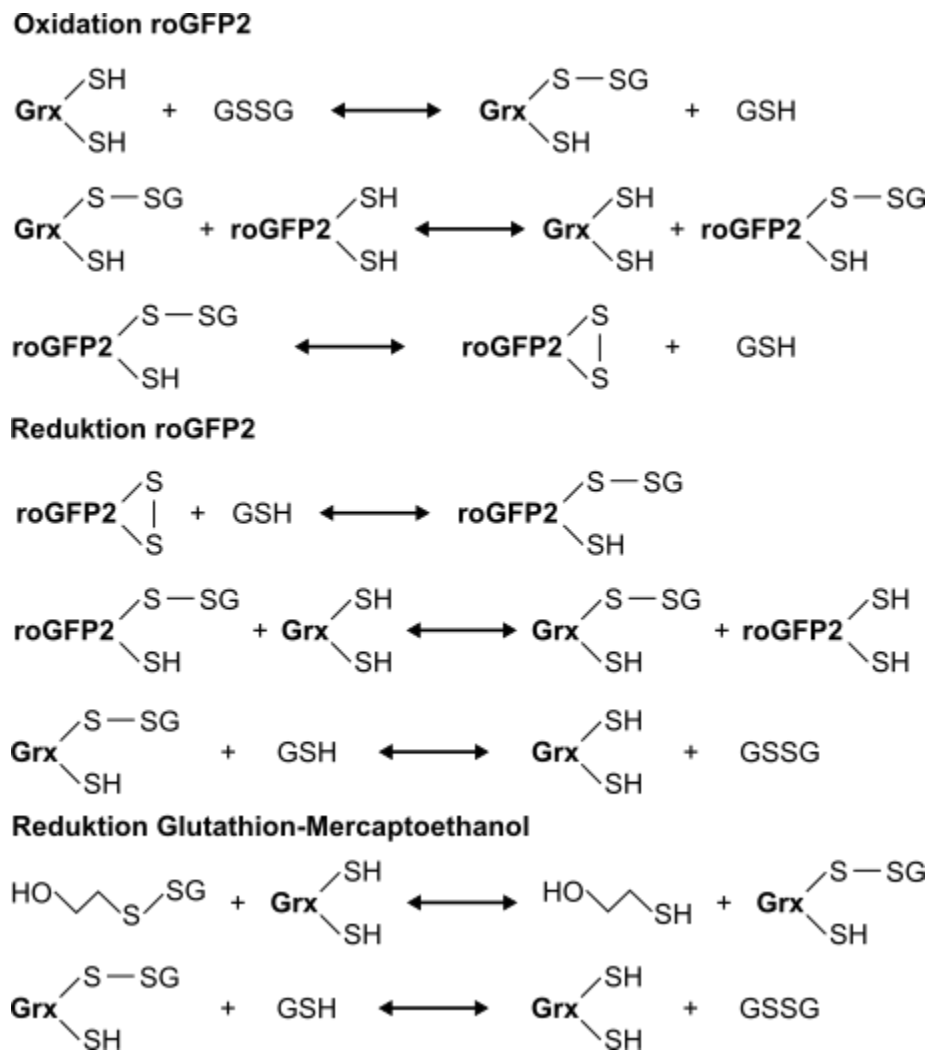


Abbildung 42: Halbreaktionen der Oxidation und Reduktion von roGFP2, sowie der Reduktion von Glutathion-Mercaptoethanol durch Glutaredoxin.

Im Gegensatz zur Oxidation des roGFP2 setzt die Reduktion von roGFP2 und der Glutaredoxin-Aktivitätsassay mit Glutathion-Mercaptoethanol die reduktive Halbreaktion zur Reduktion von glutathionyliertem Grx mit einem zweiten GSH voraus. Der Angriff des glutathionylierten Grx durch ein zweites GSH setzt die Bindung des angreifenden GSH an eine zweite GSH-Bindetasche in Grx voraus<sup>44</sup>. Da Grx5 Wildtyp die Oxidationsreaktion bevorzugt und der Austausch des aktiven Zentrums zu einem Aktivitätsgewinn führt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zusammensetzung des aktiven Zentrums in Grx5 Wildtyp die reduktive Halbreaktion zur Reduktion von Grx-S-SG mit GSH beeinträchtigt. Die Reaktion des zweiten GSH mit dem glutathionylierten Cystein des Grx erfolgt in einem trigonal bipyramidalen Übergangszustand, weshalb der nukleophile Angriff in einem 180°-Winkel zur Abgangsgruppe erfolgen muss<sup>177,178</sup>. Das Glycin und Phenylalanin des CGFS-aktiven Zentrums könnten den Zugang des GSH an das Grx-S-SG beeinträchtigen. An der oxidativen Halbreaktion ist das zweite GSH nicht beteiligt, weshalb das CGFS-aktive Zentrum die Reaktion hier womöglich weniger beeinträchtigt. Außerdem konnte in dieser Arbeit die Aktivität der Grx5-Mutanten in

der Deglutathionylierung von verschiedenen glutathionylierten Proteinen gezeigt werden. Der Austausch des Loops und des aktiven Zentrums von CGFS zu CSYC in Grx5 zeigte die höchste Deglutathionylierungsaktivität, welche ebenfalls die reduktive Halbreaktion voraussetzt.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Inaktivität der monothiol Glutaredoxine mit CGFS-aktivem Zentrum in der beeinträchtigten Reduktion von Grx-S-SG begründet sein könnte. Würde das FeS-Zentrum-koordinierende Cystein des aktiven Zentrums glutathionyliert vorliegen, stünde dies in einem Konflikt mit der Funktion der monothiol-Glutaredoxine im Transfer der FeS-Zentren. Daher ist es wahrscheinlicher, dass sich im Verlauf der Evolution die Vermeidung eines glutathionylierten Cysteins im aktiven Zentrum bewährte. Im Gegensatz dazu zeigten Johansson et al. in einer massenspektrometrischen Untersuchung, dass Cystein 67 in humanem apo-Grx5 als gemischtes Disulfid mit GSH *in vitro* vorliegt. Außerdem schlussfolgerten sie, dass die Glutathionylierung als Schutz vor weiterer Oxidation dienen könnte<sup>118</sup>.

Außerdem zeigte der Austausch des Loops bei den roGFP2-Aktivitätsmessungen eine Aktivitätserhöhung in Grx5<sup>154</sup>, weshalb dieser und wahrscheinlich weitere Strukturelemente der monothiol Grx einen Einfluss auf die Aktivierung und Bindung des zweiten GSH haben<sup>44,179</sup>. Neben den geometrischen Voraussetzungen für eine Reaktion, ist eine elektrostatische Komplementarität und Interaktion von Enzym und Substrat notwendig<sup>16</sup>. Wahrscheinlich sind weitere strukturelle Elemente in den Glutaredoxinen für die Substraterkennung und Substratinteraktion erforderlich.

Abschließend konnten die Erkenntnisse zu Struktur-Funktionsbeziehungen von FeS-Glutaredoxinen hinsichtlich der strukturellen Voraussetzungen für ihre unterschiedlichen Funktionalitäten erweitert werden. Bisher waren die Bindungsmotive für die Glutathionbindungsstellen im Hinblick auf die Katalyse und die FeS-Zentrum-Bindung bekannt<sup>42,44</sup>. Nun wurden auch die Loop-Strukturen als Determinanten zur FeS-Zentrum-Koordination und zur Funktion der Glutaredoxine identifiziert<sup>154</sup>. Außerdem ist vielfach beschrieben, dass die Anwesenheit eines Prolins an der C-terminalen Seite des katalytischen Cysteins ein Hindernis für die FeS-Zentrum-Koordination ist, wie beispielsweise in humanem Grx1<sup>115,116,119,120</sup>. Die Auswirkungen der Zusammensetzung des aktiven Zentrums konnte um die Erkenntnis erweitert werden, dass das CGFS-Motiv die Reduktion des glutathionylierten Grx durch das zweite GSH teilweise verhindert. Liedgens et al. konnten neben der Loop-Struktur und der Sequenz des aktiven Zentrums weitere Strukturelemente wie Helix 3 als Teil der ersten GSH-Bindetasche und einem konservierten WP-Motiv identifizieren, welche die

enzymatische Aktivität der Glutaredoxine regulieren<sup>179</sup>. Durch systematische Kombination entsprechender Mutationen konnten sie auch den jeweiligen Einfluss quantifizieren<sup>179</sup>. Danach hat der Loop an dem aktiven Zentrum den größten Einfluss. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Loop in der Nachbarschaft zum aktiven Zentrum eine strukturelle Schlüsselkomponente für die Funktion von redoxaktiven und FeS-transferierenden Glutaredoxinen ist und zusätzlich die Koordination und Stabilität des FeS-Zentrums beeinflusst.

### **5.2 Monothiol-Grx5 zeigt verminderten Schutz gegenüber $\cdot$ NO-Behandlungen im Vergleich zu dithiol-Grx2**

Lepka et al. zeigten eine  $\cdot$ NO-Entgiftungsfunktion für FeS-Grx2 durch die Reaktion von dessen FeS-Zentrum mit  $\cdot$ NO unter der Bildung eines freien Dinitrosyl-Diglutathionyl-Eisen-Komplexes (DGDNIC) in Oligodendrozyten. Diese Reaktion stellt einen Schutz vor inflammationsinduzierten Myelinschäden dar<sup>124</sup>. Die Reaktion eines FeS-Zentrum-koordinierenden Proteins oder anderen Metall-Kofaktoren mit  $\cdot$ NO unter Bildung eines Dinitrosyl-Eisen-Komplexes (DNIC) wurde mehrfach beschrieben, wobei FeS-Zentrum-Proteine die Hauptquelle für DNIC darstellen<sup>160,180-183</sup>. DNIC werden als  $\cdot$ NO-Speicher und -Stabilisator in der Zelle angesehen, die  $\cdot$ NO transportieren können und über S-Nitrosylierungen von Aminosäuren physiologische und pathologische Auswirkungen in Zellen haben können<sup>184-187</sup>. DNIC sind in einem Komplex mit GSH stabiler<sup>184</sup>. DNIC mit GSH (DGDNIC) wurden bisher als protektive Nitrosyl-Eisen-Komplexe beschrieben, da sie die Wundheilung beschleunigen, die Zellvitalität in Kardiomyocyten während der Hypoxie-Reoxygenierung erhöhen und Apoptose inhibieren<sup>188-190</sup>. Außerdem wurden DGDNIC in klinischen Studien als hypotensiver Wirkstoff erfolgreich getestet<sup>191</sup>. DGDNIC binden an Glutathion-S-Transferasen (GST) und können mithilfe des GSH-Konjugat-transportierenden *Multidrug resistance protein 1* (MRP1) aktiv aus der Zelle transportiert werden<sup>192,193</sup>. Die  $\cdot$ NO-Speicherung und der  $\cdot$ NO-Transport werden über die DGDNIC-bindenden GST P1-1 und dem MRP1 gesteuert<sup>193</sup>.

FeS-Grx2 ist durch seine besondere FeS-Zentrum-Koordination mit Glutathion als FeS-Zentrum-Liganden möglicherweise in der Bildung von freien GSH-koordinierten Dinitrosyl-Eisen-Komplexen begünstigt<sup>124</sup>. Da auch die anderen FeS-Grx das FeS-Zentrum mit zwei nicht kovalent gebundenen GSH koordinieren, stellte sich zunächst die Frage, ob die Reaktion der FeS-Zentren in Grx mit  $\cdot$ NO zu einem DGDNIC spezifisch für Grx2 ist oder ob die Reaktion ebenso bei monothiol-Glutaredoxinen abläuft. Es konnte mithilfe der  $\cdot$ NO-Donatoren NOC7 und GSNO in dieser Arbeit in Absorptionsmessungen gezeigt werden, dass  $\cdot$ NO das FeS-

Zentrum in Grx5 zerstört. Haunhorst et al. zeigte eine Absorptionsabnahme bei der FeS-Zentrum-spezifischen Wellenlänge von 420 nm von rekombinanten, humanem Grx3 mit GSNO<sup>62</sup>. Folglich reagieren alle humanen FeS-Grx mit  $\cdot\text{NO}$  unter dem Zerfall des FeS-Zentrums.

Nachdem in dieser Arbeit bereits unter aeroben Bedingungen eine stabilere FeS-Koordination bei FeS-Grx2 als bei FeS-Grx5 nachgewiesen werden konnte, zeigte sich dieser Stabilitätsunterschied auch unter GSNO-Behandlung. Die Loop-Grx5-Mutante und die Grx5-Mutante mit CSYC-aktivem Zentrum zeigte jedoch keine erhöhte Stabilität mit GSNO. Die Doppelmutante zeigte eine leichte Erhöhung der Stabilität. Die Reaktion von  $\cdot\text{NO}$  mit den unterschiedlich stabilen FeS-Zentren könnte Einfluss auf die Reaktionsprodukte und damit auf die  $\cdot\text{NO}$ -Entgiftungsfunktion haben. Die FeS-Zentrum-Umgebung im Protein hat Einfluss auf dessen Stabilität und Reaktivität, beispielsweise reagieren FeS-Zentren in Proteinen der Wbl-Proteinfamilie deutlich schneller mit  $\cdot\text{NO}$  als mit Sauerstoff<sup>194</sup>. Außerdem sind die Cysteine des Peptidrückrats von großer Wichtigkeit für die Stabilität der DNICs<sup>195</sup>. Der genaue Reaktionsmechanismus und die Intermediate von  $\cdot\text{NO}$  mit 2Fe2S-Zentren sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, zeigen aber die Bildung von DNICs<sup>194,196–198</sup>. Um den Einfluss der unterschiedlichen FeS-Zentrum-Koordinationen auf die Reaktion mit  $\cdot\text{NO}$  zu untersuchen, wurde die Reaktion von holo-Grx2 oder holo-Grx5 mit  $\cdot\text{NO}$  funktional im zellulären Kontext untersucht. In Zellvitalitätsexperimenten von HeLa-Zellen mit transient modulierten Grx2- oder Grx5-Expressionen konnte kein Einfluss auf die Zellvitalität beobachtet werden. Der Mangel an Grx2 zeigte ebenfalls keinen Effekt, während herunterregulierte Grx5-Expressionen eine leichte Erhöhung der Zellvitalität andeuteten. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zur erhöhten Zellvitalität von permanent überexprimierenden HeLa-Zellen unter GSNO-Behandlung<sup>124</sup>. Das Verhältnis von apo- und holo-Form von Grx2 und Grx5 könnte einen Einfluss auf den hier beobachteten Effekt haben. Grx2 liegt intrazellulär hauptsächlich in seiner holo-Form vor<sup>114,123</sup>. Das intrazelluläre Verhältnis von holo- zu apo-Grx5 ist aktuell nicht bekannt. Möglicherweise liegt die Begründung dieser unterschiedlichen Beobachtungen in einer verringerten FeS-Insertion in Grx bei der transienten Expression. Eine permanente Überexpression von Grx2 könnte im Gegensatz zur transienten Expression zu einem höheren Anteil an holo-Grx2 führen. Weitere Untersuchungen zum Einfluss der FeS-Koordination auf die Reaktion mit  $\cdot\text{NO}$  wären notwendig. In organotypischen Schnittkulturen konnte jedoch eine Verminderung der protektiven Funktion von Grx2 durch den Austausch des Loops beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für einen verminderten Schutz vor  $\cdot\text{NO}$  durch eine monothiol-FeS-Koordination könnte durch die Ergebnisse einer MD-Simulation gegeben



werden. Eine MD-Simulation durch Trnka et al. zeigte die Umorientierung des konservierten Lysins am N-terminalen Ende des vergrößerten Loops in monothiol-Grx5 in die Richtung des Glutathion-Thiols, welches eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung ermöglicht, wodurch das GSH in Grx5 stärker bindet als in Grx2<sup>154</sup>. Außerdem zeigte die MD-Simulation in der mittleren quadratischen Abweichung der Atompositionen (*root mean square deviation*, RMSD) von dem Grx2-GSH-Komplex eine Dissoziation des GSH gegen Ende einer 100 ns langen Simulation<sup>154</sup>. Des Weiteren zeigte Berndt et al., dass Grx2-gebundenes GSH in einem ständigen Austausch mit dem GSH in der Umgebung ist<sup>115</sup>. Möglicherweise konnte ein verringerter Schutz vor  $\cdot\text{NO}$  bei monothiol-FeS-Koordination beobachtet werden, weil das GSH in monothiol-Grx stärker gebunden ist. Durch die stärkere GSH-Bindung in Grx5 bildet sich möglicherweise kein protektiver DGDNIC sondern ein proteingebundener DNIC, wodurch  $\cdot\text{NO}$  länger in der Zelle vorliegen könnte und toxische Wirkungen haben könnte. Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese könnte die DGDNIC-spezifische Inhibition der GST-Aktivität und die DNIC-Menge bei MRP1-Inhibition untersucht werden.

### **5.3 Identifikation der Reaktionsprodukte von FeS-Glutaredoxinen mit $\cdot\text{NO}$ und ihre physiologische Bedeutung**

Die Reaktion von FeS-Zentren in Grx2 mit  $\cdot\text{NO}$  führt zu der Bildung von DGDNIC<sup>124</sup>. Der genaue Reaktionsmechanismus und mögliche Zwischenprodukte dieser Reaktion sind jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt. Es ist unklar, ob ein vollständiger Umsatz des Eisens in DGDNIC erfolgt und in welcher Form der Schwefel des FeS-Zentrums nach der Reaktion vorliegt. Sowohl das Eisen als auch potenziell entstehender Schwefelwasserstoff könnten Einfluss auf weitere Signalwege haben. Zunächst wurde der Verbleib des Eisens in der Reaktion von FeS-Grx mit  $\cdot\text{NO}$  genauer betrachtet. Für die Analyse der Intermediate und der Komplexbildung wurde eine zeitaufgelöste Resonanz-Raman-Spektroskopie von FeS-Grx2 mit GSNO durchgeführt, welche jedoch kein auswertbares Spektrum ergab, da keine Fe-NO-Verbindungen zu sehen sind.

Außerdem wurde der Einfluss der unterschiedlichen FeS-Zentrum-Koordination auf weitere Reaktionsprodukte von FeS-Grx mit  $\cdot\text{NO}$  untersucht. Synthetische Modellierungen der Nitrosylierung eines 2Fe2S-Zentrums ergaben eine Sulfidfreisetzung und die Bildung eines DNIC mit zwei weiteren Liganden<sup>196,199</sup>. Neben der Bildung von Sulfid wäre die Bildung anderer schwefelhaltiger, bioaktiver Substanzen und die Induktion von H<sub>2</sub>S-Signalwegen möglich. Die Untersuchung von biologischen Funktionen von Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) ist seit den letzten beiden Jahrzehnten von großem Interesse. H<sub>2</sub>S ist ein gasförmiger, sekundärer

Botenstoff wie NO und könnte mit den NO-Signalwegen interagieren<sup>157,200</sup>. Bei der Entstehung von H<sub>2</sub>S wäre ein Wechsel von NO zum H<sub>2</sub>S-Signalweg mit FeS-Grx2 als redoxsensiblen Schalter denkbar. Die H<sub>2</sub>S-Bildung während der Reaktion von FeS-Grx mit <sup>•</sup>NO wurde mithilfe von zwei verschiedenen Methoden in dieser Arbeit untersucht, wobei lediglich die Bildung einer geringen Menge an H<sub>2</sub>S beobachtet werden konnte. Folglich entsteht H<sub>2</sub>S nur als Nebenprodukt dieser Reaktion. Auch das NO/H<sub>2</sub>S-Intermediat SSNO<sup>-</sup> konnte mittels UV/Vis-Spektroskopie nicht nachgewiesen und damit keine Wechselwirkung von NO- und H<sub>2</sub>S-Signalweg gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen daher nicht die Hypothese, dass FeS-Zentren eine Schnittstelle für eine Wechselwirkung zwischen NO- und H<sub>2</sub>S-Signalweg seien<sup>199</sup>. Die Bildung von Polysulfiden konnte aufgrund von Absorptionsüberlagerungen nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion von FeS-Grx mit <sup>•</sup>NO in Anwesenheit von DTT führt zur Bildung eines Chromophors bei ~360 nm, was auf die Bildung eines dimeren DNIC-Komplexes hinweist<sup>160</sup>. Dieser Chromophor kann jedoch nicht der DGDNIC sein, da dieser ein Absorptionsmaximum bei ~400 nm aufweist<sup>201</sup>. Die Bildung von monomeren DNIC mit Cystein-Liganden konnte nicht anhand dessen Absorptionsbande beobachtet werden, was auf die geringe Halbwertszeit von wenigen Minuten bei Konzentrationen im niedrigen, mikromolaren Bereich zurückgeführt werden könnte<sup>185</sup>.

Möglicherweise entstehen auch Persulfid-Modifikationen an Thiolen von Proteinen. Die FeS-Zentrum-koordinierenden Cysteine sind in ihren apo-Proteinen besonders empfänglich für oxidative Modifikationen. Christ et al. zeigte, dass diese Cysteine zunächst persulfidiert und danach oxidiert werden und zyklische Polythiol-Modifikationen bilden<sup>202</sup>. Die Protein-Persulfid-Detektions-Methode zeigte bei GSNO-behandelten HeLa-Zellen keine erhöhte Menge an persulfidierten Proteinen bei einer FeS-Grx-Überexpression. Dies deutet auf keine erhöhte Persulfidbildung durch die Reaktion von monothiol-FeS-Grx mit <sup>•</sup>NO hin. Dahingegen konnte bei einem Grx2-Mangel eine Anreicherung persulfidierter Proteine beobachtet werden. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass apo-Grx2 eine Funktion in der Reduktion von Persulfidmodifikationen an Proteinen hat.

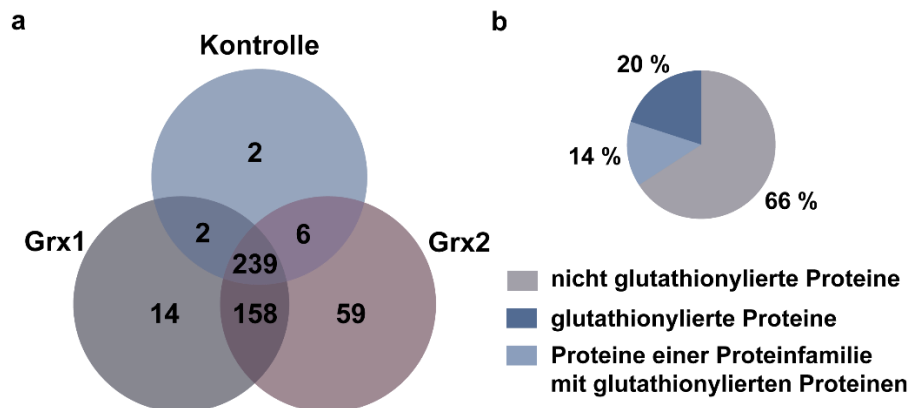
### 5.4 Glutaredoxine in der Reduktion von Persulfidierungen

Die dithiol-Glutaredoxine Grx1 und Grx2 katalysieren die Reduktion von Disulfidbrücken und gemischten Disulfiden. Für Grx1 wurde *in vitro* gezeigt, dass es Persulfide reduzieren kann<sup>153</sup>. Daher war naheliegend, dass auch Grx2 in der Lage ist, Persulfide zu reduzieren. Zum Vergleich der Enzymaktivitäten wurde die Reduktion von persulfidiertem HSA *in vitro* untersucht. Es zeigte sich eine effizientere Reduktion des Persulfids durch Grx2 im Vergleich

zu Grx1. Bei Deglutathionylierungsreaktionen ist Grx2 im Vergleich zu Grx1 ebenfalls ein leicht effizienterer Katalysator<sup>45</sup>. Bezüglich der Substratspezifität von Grx1 und Grx2 zeigten diese in einem Vergleich potenzieller Interaktionspartner lediglich ein gemeinsames Substrat<sup>15</sup>. Folglich haben Grx1 und Grx2 sehr unterschiedliche Substrate, was in ihrer elektrostatischen Komplementarität und möglicherweise teilweise in ihrer Lokalisation begründet sein könnte, da Grx2 hauptsächlich in seiner mitochondrialen Isoform vorliegt<sup>16</sup>. Ob diese definierte Substratabgrenzung auch für die Funktion von Grx1 und Grx2 in der Reduktion von persulfidierten Proteinen gilt, wurde in der von mir experimentell betreuten Bachelorarbeit von Leonie Thewes anhand einer massenspektrometrischen Identifikation der persulfidierten Proteine bei regulierter dithiol-Grx-Expression untersucht. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der identifizierten Proteine in den Zellextrakten mit herunterregulierter dithiol-Grx-Expression sind in Abbildung 43 dargestellt. Von den insgesamt identifizierten, persulfidierten Proteinen sind 33 % Substrate von sowohl Grx1 als auch von Grx2. Diese große Substratübereinstimmung für Grx1 und Grx2 widerspricht den oben dargestellten Erkenntnissen der Literatur. Eine Gemeinsamkeit der beiden Proteine ist ihre Affinität zu GSH, welches intrazellulär in hohen Konzentrationen von bis zu 10 mM vorliegt und damit das vorherrschende Thiol in der Zelle ist<sup>203</sup>. Persulfidiertes GSH (GSSH) liegt ebenfalls in einer hohen Konzentration in einem Bereich von 100  $\mu$ M im zellulären System vor und stellt einen Effektor für die Sulfid-assoziierte Signalgebung dar<sup>204</sup>. Folglich könnten die dithiol-Grx über ihre hohe Affinität zu Glutathion und ihre Oxidoreduktaseaktivität die Menge an GSSH durch Reduktion des GSSH senken und darüber zu weniger persulfidierten Proteinen führen. Damit wäre keine Substratspezifität für persulfidierte Proteine nötig, was den hohen Anteil an Überlappung der persulfidierten Proteine erklären könnte. Weiterführend wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Persulfidierung möglicherweise über eine Bindung von GSSH erfolgt, da 34 % der insgesamt 198 massenspektrometrisch identifizierten, persulfidierten Proteine in der Literatur auch bereits als glutathionyliert oder als ein Mitglied einer Proteinfamilie mit glutathionylierten Proteinen beschrieben wurden. Der Einfluss der Loop-Struktur auf die Oxidoreduktasefunktion wurde auch anhand dieser Depersulfidierungsfunktion von Grx2 untersucht. Es konnte die Redoxinaktivität von Grx5 Wildtyp bestätigt werden und eine verminderte Depersulfidierung für Grx2 mit monothiol-Loop gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte eine neue Funktion von Grx2 in der Depersulfidierung von Proteinen gezeigt werden. Persulfidmodifikationen an Cysteinen können sowohl eine enzymaktivierende als auch -inhibierende Funktion haben<sup>12</sup>, weshalb Grx2 als Regulator von Persulfidierungen vielfältige Auswirkungen auf physiologische und pathologische Prozesse haben könnte. Dóka

et al. zeigten, dass das Glutaredoxin-System ohne Glutaredoxin und das Thioredoxin-System Persulfide (-SSH) und Perthiosulfonsäure (-SSO<sub>3</sub>H) an Cysteinen reduzieren können und dass die Zugabe von Grx1 die Reduktionsrate von Persulfiden weiter erhöht<sup>153,205</sup>. Zudem stellen Persulfide einen Schutz der Cysteine vor irreversiblen oxidativen Modifikationen durch die Bildung der reversiblen Perthiosulfonsäuren dar<sup>205</sup>. Nitrosopersulfide (SSNO<sup>-</sup>) sind jedoch resistent gegenüber einer Reduktion durch das Thioredoxin- oder Glutaredoxin-System, wobei letzteres ohne Zugabe von Glutaredoxinen getestet wurde<sup>159</sup>.



**Abbildung 43: Unterschiede und Gemeinsamkeiten der persulfidierten Proteine bei regulierter dithiol-Grx-Expression und der Anteil an glutathionylierten Proteinen.**

(a) Venn-Diagramm der Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Proteine in siRNS-behandelten HeLa-Extrakten nach der Immunopräzipitation von persulfidierten Proteinen (Protein Persulfid Detektions-Methode). (b) Von den insgesamt identifizierten, persulfidierten Proteinen einer massenspektrometrischen Analyse wurde der prozentuale Anteil an Proteinen, die in der Literatur als glutathionyliert beschrieben wurden oder einer Proteinfamilie mit glutathionylierten Proteinen angehören, dargestellt. Daten von Leonie Thewes und massenspektrometrische Analyse durchgeführt von Dr. Gereon Poschmann (Düsseldorf).

## 5.5 Monothiol-Glutaredoxine in der Differenzierung und Myelinisierung

Demyelinisierte Läsionen sind histopathologische Charakteristika für die neuroinflammatorische Erkrankung Multiple Sklerose (MS)<sup>126</sup>. Die Regeneration einer demyelinisierten Läsion erfolgt über die Migration, Differenzierung und Myelinisierung der Axone von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen<sup>206</sup>. Außerdem zeigen MS-Patienten eine gestörte Eisenhomöostase und pathologische Eisenablagerungen<sup>207,208</sup>. Oligodendrozyten sind die eisenreichsten Zellen im ZNS<sup>129</sup> und die Differenzierung und Myelinisierung sind eisenabhängige Prozesse, weshalb ein Einfluss der monothiol-Grx nahe liegt, da diese wichtige Funktionen in der Eisenhomöostase einnehmen. Zur Untersuchung einer Rolle der monothiol-Grx in der Differenzierung und Myelinisierung wurden zunächst die Expressionslevel der monothiol-Grx in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen untersucht. Für Grx5 konnte eine erhöhte Expression an den ersten beiden Differenzierungstagen gezeigt werden. Diese erhöhte Expression wurde von Prof. Dr. Sten Linnarsson und Kollegen nicht gezeigt, denn sie zeigten eine homogene Expression von Grx3 und Grx5 in Oligodendrozyten verschiedener

Differenzierungsstadien<sup>209,210</sup>. Die in dieser Arbeit etablierte Herabsetzung der Grx5-Expression in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zur Untersuchung der Funktionen von monothiol-Grx führte zu erhöhten TfR-Expressionen und verminderten Ferritin-Expressionen, was auf einen Eisenmangel in der Zelle hindeutet. Außerdem ergab eine immunozytochemische Analyse des Transferrin-Rezeptors eine geringfügig unterschiedliche Lokalisation was ein Hinweis für eine gestörte Eisenhomöostase sein kann. Die ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführte Western Blot-Analyse des FeS-Zentrum-Proteins GPAT zeigte jedoch keine Defekte in der FeS-Zentrum-Biosynthese auf. Möglicherweise hat der Grx5-Knockdown noch keinen Einfluss auf FeS-Zentrum-Proteine, aber zeigt erste Anzeichen eines Eisenmangels durch die Regulation der Expression von TfR und Ferritin an. Ein länger andauernder Knockdown könnte einen Einfluss auf FeS-Zentrum-Proteine zeigen, hätte aber wahrscheinlich auch einen deutlichen Einfluss auf die Zellvitalität, da bereits nach fünf Differenzierungstagen nur noch 70 % der ursprünglichen Zellzahl beobachtet werden konnte. Zu Gunsten der Zellvitalität wurde die siRNS-Behandlung und Differenzierung deshalb nicht verlängert. Ein Grx5-Knockdown führte zu einer erhöhten Expression von Grx3, was darauf hindeutet, dass die Zelle einen Eisenmangel wahrnimmt und möglicherweise diesen durch einen erhöhten Eisen-Transport zu den Mitochondrien kompensieren will, da zytosolisches monothiol-Grx3 in *S. cerevisiae* an dem Transport von Eisen zu den Mitochondrien beteiligt ist<sup>39</sup>. Der durchgeführte Grx3-Knockdown in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zeigte einen weniger ausgeprägten Eisenmangel als bei einem Grx5-Knockdown und hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das FeS-Protein GPAT. Die herunterregulierte Expression der monothiol-Grx in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zeigte entgegengesetzte Effekte auf die Differenzierung. Der Grx3-Mangel beschleunigte die Differenzierung, während der Grx5-Mangel sie beeinträchtigte. Der Einfluss der monothiol-Glutaredoxine auf die Myelinisierung wurde auch *in vivo* im Zebrafisch untersucht und zeigte keinen eindeutigen Unterschied in der Menge und Integrität des Myelins bei geringen monothiol-Grx-Expressionen. Zusammenfassend konnte kein Effekt in der Myelinisierung bei veränderten Expressionen der monothiol-Grx erkannt werden. Übereinstimmend damit zeigte ein Grx5-defizienter Patient neben der Eisenüberladung eine Anämie und keine neurologischen Symptome, woraus die Autoren auf eine ausreichende Eisenversorgung in Zellen außer erythroiden Zellen schließen<sup>71</sup>. Patienten mit einer Grx5-Mutation, die zur Deletion eines Lysins (K51) führt, weisen dahingegen eine nichtketotische Hyperglycinämie und Befunde wie bei einer Leukodystrophie mit Läsionen im zentralen Nervensystem auf<sup>73</sup>.

In dieser Arbeit konnte eine beschleunigte Differenzierung bei einem Grx3-Knockdown in murinen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen beobachtet werden, weshalb ein Grx3-Mangel einen positiven Effekt auf die Remyelinisierung in demyelinisierenden Krankheiten wie der MS haben könnte. Die vorliegenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen könnten dadurch schneller differenzieren und die Remyelinisierung begünstigen. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung zeigte eine Massenspektrometrie-Analyse von HeLa-Zellen mit verringerter Grx3-Expression unter anderem eine regulierte Expression von Proteinen, die in der Differenzierung und Migration eine Funktion haben<sup>1</sup>. Außerdem zeigte Dr. Petra Haunhorst in ihrer Dissertation, dass eine verminderte Grx3-Expression in HeLa-Zellen zu einer schnelleren Zellmigration führt, was eine Remyelinisierung begünstigen könnte<sup>211</sup>. Die verringerte Anzahl dorsal migrierender Zellen mit blockierter monothiol-Grx Translation im Zebrafisch, deutet jedoch im Gegensatz zu der Beobachtung in murinen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen auf eine langsamere Entwicklung der Vorläuferzellen hin.

Der durch verminderte Grx5-Expressionen induzierte Eisenmangel beeinträchtigt möglicherweise die eisenabhängigen Enzyme während der Differenzierung, wohingegen der Eisenmangel bei verminderter Grx3-Expression weniger ausgeprägt war. Außerdem ist der Zeitraum der Eisenverfügbarkeit eine wichtige Komponente während der Differenzierung und Myelinisierung<sup>162</sup>. Der Zusammenhang von der hochregulierten Grx3-Expression in Kardiomyozyten bei kardialer Hypertrophie über den zytosolischen Eisentransport ist bisher unbekannt und wird in der Bindung von Grx3 an Proteinkinase C gesehen<sup>68</sup>. Grx3 könnte möglicherweise in der Differenzierung von Oligodendrozyten nicht über seine Eisen-transportierende Funktion sondern über seine Interaktion zu der Proteinkinase C die Differenzierung beschleunigen<sup>61</sup>. Die Aktivierung der Proteinkinase C verhindert die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen<sup>212</sup>. Die verringerte Grx3-Expression könnte die Aktivierung der Proteinkinase C regulieren und damit die Differenzierung begünstigen.

### **5.6 FeS-Glutaredoxine in der Ferroptose**

Bei der Reaktion von FeS-Glutaredoxinen mit  $\cdot\text{NO}$  könnte neben den DGDNIC auch freies Eisen entstehen. Freies Eisen begünstigt Lipidperoxidation und damit Ferroptose. Scalcon et al. postulierten, dass die Freisetzung von freiem Eisen nach dem FeS-Zentrum-Zerfall von holo-Grx2 zu Lipidperoxidation und Zelltod führt<sup>213</sup>. Dabei ist zu bedenken, dass die Menge an holo-Grx2 in Zellen sehr niedrig ist. Zudem stehen die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und dieser Arbeit im Gegensatz zu dieser Hypothese. Hier konnte bestätigt werden, dass holo-Grx2

zellprotektiv ist. Erhöhte Grx2-Mengen in zerebellären organotypischen Schnittkulturen (OSC) zeigten einen protektiven Effekt auf Oligodendrozyten, was einen Hinweis darauf gibt, dass es zu keiner dominierenden Ferroptoseinduktion in Oligodendrozyten kommen konnte<sup>124</sup>. Die Detektion von Ferroptosemarkern in OSCs war nicht eindeutig und erbrachte kein Ergebnis. Auch an dieser Stelle wurde der Einfluss des Loops auf die protektive Funktion von Grx2 auf Oligodendrozyten in OSCs unter GSNO-Behandlung untersucht und mit der Grx2-Loop-Mutante verglichen. Im Vergleich zur Wirkung von Grx2 zeigte Grx2 mit monothiol-Loop einen verminderten protektiven Effekt und die Mutante konnte die Myelinstruktur nicht in dem Ausmaß wie der Wildtyp schützen.

Ferroptose scheint in Oligodendrozyten nahe zu liegen, da diese hohe intrazelluläre Konzentrationen an ungesättigten Fettsäuren und Eisen aufweisen<sup>126,168</sup>. Direkte Ferroptoseinduktion mit Erastin, einem Inhibitor des Cystin/Glutamat-Transporters<sup>170</sup>, hatte nur einen geringen Einfluss in hohen Konzentrationen auf die Integrität des Myelins in zerebellären, organotypischen Schnittkulturen (OSC). Hoshino et al. zeigten dass reife Oligodendrozyten im Gegensatz zu unreifen Oligodendrozyten, resistent gegenüber Erastin sind, weil sie eine erhöhte Expression des Cystin/Glutamat-Transporters und erhöhte GSH-Konzentrationen aufweisen<sup>214</sup>. Die Simulation inflammatorischer Bedingungen durch GSNO-Behandlung in OSCs mit gleichzeitiger Liproxstatin-basierter Ferroptoseinhibition zeigte einen signifikanten, protektiven Effekt auf die Myelinstruktur. In inflammatorischen, demyelinisierenden Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) und dem Tiermodell der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), ist die Expression von Glutathion-Peroxidase 4 (GPx4), dem entscheidenden Enzym zum Abwenden der Ferroptose, vermindert, während sie in den Oligodendrozyten unbeeinflusst ist<sup>215</sup>. Außerdem wurden reduzierte Mengen an Glutamatcysteinligase, Cystin/Glutamat-Transporter und GSH in der EAE detektiert, welche zusammen mit akkumulierter Lipidperoxidation auf Ferroptose deuten<sup>215</sup>. Möglicherweise sind diese Beobachtungen auf die Neurone zurückzuführen, welche eine verminderte GPx4-Expression in der EAE aufweisen und in konditionellen GPx4-Knockout-Mäusen sterben<sup>215,216</sup>. Zusammengefasst deuten diese Erkenntnisse auf eine Resistenz der reifen Oligodendrozyten gegenüber Ferroptose hin. Im Gegensatz dazu zeigt eine  $\gamma$ -NO-Behandlung einen toxischen Effekt auf Oligodendrozyten, welches sich in einer zerstörten Myelinstruktur äußert. Der protektive Effekt eines Ferroptoseinhibitors auf Oligodendrozyten unter  $\gamma$ -NO-Behandlung lässt sich möglicherweise mit dem Radikal-einfangenden Reaktionsmechanismus des Liproxstatin erklären, welcher jedoch im Detail unbekannt ist<sup>217</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten Kapralov et al. eine Ferroptose-inhibierende Wirkung von erhöhten

NO-Konzentrationen in Mikroglia und Makrophagen<sup>218</sup>. NO könnte die Lipoxygenase (LOX)-Aktivität inhibieren oder mit den Intermediaten der LOX-katalysierten Reaktion reagieren was einen anderen Redox-Mechanismus zur Ferroptoseregulation darstellt.

Der Einfluss der FeS-Grx auf die Ferroptose in OSCs wurde nicht weiter untersucht, weil sich die Ferroptose in Oligodendrozyten nicht ausreichend mit Erastin induzieren ließ, um eine protektive Wirkung von FeS-Grx untersuchen zu können. Jedoch konnten initiale Ergebnisse zur Lipidperoxidation in isolierten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit verminderter monothiol-Grx-Expression generiert werden. Herunterregulierte Grx5-Expressionen zeigten weniger Lipidperoxidation in Zellen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung. Folglich sorgt der Knockdown für einen gewissen Schutz vor Lipidperoxidation. Im Gegensatz dazu zeigten Lee et al. in Kopf- und Halskrebszellen mit verminderten Grx5-Expressionen eine erhöhte intrazelluläre Eisenkonzentrationen, was die Lipidperoxidation begünstigte<sup>219</sup>. Um aus diesen Ergebnissen eine eindeutige Schlussfolgerung hinsichtlich der Ferroptose in Oligodendrozyten und der Rolle der FeS-Grx in der Ferroptose ziehen zu können, werden weitere Versuche benötigt.

### **5.7 Einfluss der monothiol-Glutaredoxine auf die Molybdän-Kofaktor-Biosynthese**

Eine Molybdän-Kofaktor-Defizienz ist eine genetische Erkrankung, die in der frühen Kindheit lethal ist<sup>82</sup>. Die resultierende Inaktivität MoCo-abhängiger Enzyme, wie der Sulfitoxidase, führt zur Anreicherung von toxischem Sulfit und als Folge daraus zur Neurodegeneration<sup>81</sup>. Der Molybdän-Metabolismus und die Molybdän-Kofaktor-Biosynthese sind abhängig von FeS-Zentrum-koordinierenden Enzymen<sup>80</sup>. Außerdem zeigte eine Gencluster-Analyse der Genome von Mikroorganismen eine Nähe von monothiol-Grx-Genen zu MoCo-verwandten Genen, was auf einen funktionalen Zusammenhang hindeutet<sup>172</sup>. Verminderte Expressionen der monothiol-Grx in HeLa-Zellen führte zu einer gestörten Eisenhomöostase und FeS-Zentrum-Biosynthese. Der Molybdopterin-Gehalt war überraschenderweise in Grx3-depletierten HeLa-Zellen jedoch nicht beeinflusst. Die Depletion des monothiol-Grx in *E. coli* zeigte ebenfalls keinen Aktivitätsverlust der MoCo- und FeS-abhängigen Nitrat-Reduktase. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurden für Grx5-defiziente Patienten keine Symptome der MoCo-Defizienz beschrieben<sup>71,130,220</sup>. Dennoch würde die Analyse MoCo-abhängiger Enzyme in Grx5-defizienten Patienten einen Hinweis auf die Abhängigkeit der MoCo-Biosynthese von der FeS-Zentrum-Biosynthese geben. Für ein abschließendes Fazit sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.



### 6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der vergrößerte Loop in monothiol-Glutaredoxinen die FeS-Zentrum-Koordination beeinflusst, was zu einer verminderten FeS-Zentrum-Stabilität in monothiol-Grx führt. Letzteres scheint eine Voraussetzung für die FeS-Transferfunktion der monothiol-Grx zu sein, da Grx2 im FeS-Transfer inaktiv ist. Für eine nachweisbare Oxidoreduktasefunktion in Grx5 ist neben dem Loop-Austausch der zusätzliche Austausch des aktiven Zentrums notwendig. Folglich haben fünf Aminosäuren, die einen vergrößerten Loop bilden, einen bedeutenden Einfluss auf die Wechselwirkungen des Proteins mit seinen Kofaktoren und definieren damit die Funktionen von monothiol- und dithiol-Grx.

Außerdem konnte in dieser Arbeit eine neue Funktion von Grx2 identifiziert werden. Grx2 kann als Regulator für Persulfidierungen agieren und dadurch möglicherweise Signalübertragungen modifizieren. Eine große Substratschnittmenge von Grx1 und Grx2 deutet auf eine geringe Substratspezifität hin und führt zur Hypothese, dass aufgrund der gemeinsamen Affinität zu GSH persulfidiertes GSH (GSSH) von den Grx reduziert werden könnte und als Folge daraus weniger persulfidierte Proteine vorliegen. Weiterführende Analysen könnten den Zusammenhang von GSSH und persulfidierten Proteinen herausstellen, zumal 34 % der identifizierten persulfidierten Proteine auch als glutathionyliert beschrieben wurden oder zu einer Proteinfamilie mit glutathionylierten Proteinen gehören. Zudem sollte das Ziel zukünftiger Analysen die Validierung von persulfidierten Substraten der Glutaredoxine und die Charakterisierung einer Grx-vermittelten Regulation in Signalübertragungen mit persulfidierten Thiolschaltern sein.

Obwohl die FeS-Zentrum-abhängige Molybdän-Kofaktor (MoCo)-Biosynthese einen Zusammenhang zu den monothiol-Grx nahelegt, zeigte ein monothiol-Grx-Mangel keinen Einfluss auf die MoCo-Biosynthese. Die MoCo-Defizienz ist unbehandelt eine lethale, neurodegenerative Erkrankung, weshalb möglicherweise Bypass-Mechanismen für die Eisenversorgung zur MoCo-Biosynthese vorliegen könnten. Die Untersuchung von MoCo-abhängigen Enzymen in Patienten mit Grx5-Defizienz könnte Informationen zu der Verbindung von FeS-Zentrum-Biosynthese und MoCo-Biosynthese geben.

Außerdem konnte in dieser Arbeit eine beschleunigte Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mit verminderten Grx3-Expressionen beobachtet werden. Grx3 könnte möglicherweise über seine Interaktion mit der Proteinkinase C diese regulieren und damit die

Differenzierung begünstigen. Möglicherweise könnte Grx3 einen neuen therapeutischen Angriffspunkt für die beschleunigte Oligodendrozyten-Differenzierung zur Remyelinisierung in demyelinisierenden Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C. & Lillig, C. H. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: From cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants Redox Signal.* **19**, 1539–1605 (2013).
2. Lillig, C. H. & Holmgren, A. Thioredoxin and related molecules - From biology to health and disease. *Antioxidants Redox Signal.* **9**, 25–47 (2007).
3. Lillig, C. H., Berndt, C. & Holmgren, A. Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1780**, 1304–1317 (2008).
4. Nordberg, J. & Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1287–1312 (2001).
5. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**, 913–922 (2007).
6. Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189 (2004).
7. Hughes, M. N., Centelles, M. N. & Moore, K. P. Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1346–1353 (2009).
8. D'Autréaux, B. & Toledano, M. B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 813–824 (2007).
9. Mieyal, J. J., Gallogly, M. M., Qanungo, S., Sabens, E. A. & Shelton, M. D. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxidants Redox Signal.* **10**, 1941–1988 (2008).
10. Forman, H. J., Maiorino, M. & Ursini, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**, 835–842 (2010).
11. Marozkina, N. & Gaston, B. An update on thiol signaling: S-nitrosothiols, hydrogen sulfide and a putative role for thionitrous acid. *Antioxidants* **9**, 1–11 (2020).
12. Nagy, P. Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling. *Methods Enzymol.* **554**, 3–29 (2015).
13. Ren, X. *et al.* Redox signaling mediated by Thioredoxin and Glutathione systems in the central nervous system. *Antioxidants Redox Signal.* **27**, 989–1010 (2017).
14. Gravina, S. A. & Mieyal, J. J. Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase. *Biochemistry* **32**, 3368–3376 (1993).
15. Gellert, M. *et al.* Substrate specificity of thioredoxins and glutaredoxins – towards a functional classification. *Heliyon* **5**, (2019).
16. Berndt, C., Schwenn, J.-D. & Lillig, C. H. The specificity of thioredoxins and glutaredoxins is determined by electrostatic and geometric complementarity. *Chem. Sci.* **6**, 7049–7058 (2015).

17. Eklund, H. *et al.* Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* **3**, 1443–1449 (1984).
18. Martin, J. L. Thioredoxin -a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245–250 (1995).
19. Holmgren, A., Söderberg, B. O., Eklund, H. & Brändén, C. I. Three dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 2305–2309 (1975).
20. Hirotsu, S. *et al.* Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12333–12338 (1999).
21. Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R. & Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40 (2003).
22. Reinemer, P. *et al.* The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *EMBO J.* **10**, 1997–2005 (1991).
23. Epp, O., Ladenstein, R. & Wendel, A. The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution. *Eur. J. Biochem.* **133**, 51–69 (1983).
24. Atkinson, H. J. & Babbitt, P. C. An Atlas of the Thioredoxin Fold Class Reveals the Complexity of Function-Enabling Adaptations. *PLOS Comput. Biol.* **5**, (2009).
25. Holmgren, A. Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2275–2279 (1976).
26. Holmgren, A. Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides - Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli Glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **254**, 3672–3678 (1979).
27. Herrero, E. & De La Torre-Ruiz, M. A. Monothiol glutaredoxins: A common domain for multiple functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1518–1530 (2007).
28. Padilla, C. A., Martínez-Galisteo, E., Bárcena, J. A., Spyrou, G. & Holmgren, A. Purification from placenta, amino acid sequence, structure comparisons and cDNA cloning of human glutaredoxin. *Eur. J. Biochem.* **227**, 27–34 (1995).
29. Lundberg, M. *et al.* Cloning and Expression of a Novel Human Glutaredoxin (Grx2) with Mitochondrial and Nuclear Isoforms. *J. Biol. Chem.* **276**, 26269–26275 (2001).
30. Axelsson, K., Eriksson, S. & Mannervik, B. Purification and characterization of cytoplasmic thioltransferase (Glutathione:Disulfide Oxidoreductase) from rat liver. *Biochemistry* **17**, 2978–2984 (1978).
31. Fernandes, A. P. *et al.* A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from Escherichia coli can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **280**, 24544–24552 (2005).
32. Tamarit, J., Bellí, G., Cabiscol, E., Herrero, E. & Ros, J. Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **278**, 25745–25751 (2003).

33. Deponte, M., Becker, K. & Rahlfs, S. Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins. *Biol. Chem.* **386**, 33–40 (2005).
34. Rodríguez-Manzanares, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J. & Herrero, E. Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109–1121 (2002).
35. Ojeda, L. *et al.* Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**, 17661–17669 (2006).
36. Wingert, R. A. *et al.* Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**, 1035–1039 (2005).
37. Haunhorst, P. *et al.* Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1895–1903 (2013).
38. Moseler, A. *et al.* The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 13735–13740 (2015).
39. Mühlenhoff, U. *et al.* Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* **12**, 373–385 (2010).
40. Gallogly, M. M., Starke, D. W., Leonberg, A. K., Ospina, S. M. E. & Mieyal, J. J. Kinetic and mechanistic characterization and versatile catalytic properties of mammalian Glutaredoxin 2: Implications for intracellular roles. *Biochemistry* **47**, 11144–11157 (2008).
41. Mieyal, J. J., Starke, D. W., Gravina, S. A. & Hocevar, B. A. Thioltransferase in Human Red Blood Cells: Kinetics and equilibrium. *Biochemistry* **30**, 8883–8891 (1991).
42. Berndt, C. & Lillig, C. H. Glutathione, Glutaredoxins, and Iron. *Antioxidants Redox Signal.* **27**, 1235–1251 (2017).
43. Berndt, C., Lillig, C. H. & Holmgren, A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: Implications for diseases in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **292**, H1227–H1236 (2007).
44. Begas, P., Liedgens, L., Moseler, A., Meyer, A. J. & Deponte, M. Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
45. Johansson, C., Lillig, C. H. & Holmgren, A. Human Mitochondrial Glutaredoxin Reduces S-Glutathionylated Proteins with High Affinity Accepting Electrons from Either Glutathione or Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Chem.* **279**, 7537–7543 (2004).
46. Bender, K. W. *et al.* Glutaredoxin AtGRXC2 catalyses inhibitory glutathionylation of *Arabidopsis* BRI1-associated receptor-like kinase 1 (BAK1) in vitro. *Biochem. J.* **467**, 399–413 (2015).
47. Ruoppolo, M., Lundström-Ljung, J., Talamo, F., Pucci, P. & Marino, G. Effect of glutaredoxin and protein disulfide isomerase on the glutathione-dependent folding of ribonuclease A. *Biochemistry* **36**, 12259–12267 (1997).

48. Beer, S. M. *et al.* Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: Implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* **279**, 47939–47951 (2004).
49. Pan, S. & Berk, B. C. Glutathionylation regulates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced Caspase-3 Cleavage and Apoptosis Key Role for Glutaredoxin in the Death Pathway. *Circ. Res.* **100**, 213–219 (2007).
50. Ho, Y.-S. *et al.* Targeted disruption of the glutaredoxin 1 gene does not sensitize adult mice to tissue injury induced by ischemia/reperfusion and hyperoxia. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 1299–1312 (2007).
51. Gladyshev, V. N. *et al.* Identification and Characterization of a New Mammalian Glutaredoxin (Thioltransferase), Grx2. *J. Biol. Chem.* **276**, 30374–30380 (2001).
52. Lönn, M. E. *et al.* Expression Pattern of Human Glutaredoxin 2 Isoforms: Identification and Characterization of Two Testis/Cancer Cell-Specific Isoforms. *Antioxidants Redox Signal.* **10**, 547–557 (2008).
53. Lillig, C. H., Lönn, M. E., Enoksson, M., Fernandes, A. P. & Holmgren, A. Short interfering RNA-mediated silencing of glutaredoxin 2 increases the sensitivity of HeLa cells toward doxorubicin and phenylarsine oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13227–13232 (2004).
54. Enoksson, M. *et al.* Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 774–779 (2005).
55. Bräutigam, L. *et al.* Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20532–20537 (2011).
56. Bräutigam, L. *et al.* Glutaredoxin regulates vascular development by reversible glutathionylation of sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20057–20062 (2013).
57. Berndt, C., Poschmann, G., Stühler, K., Holmgren, A. & Bräutigam, L. Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells. *Redox Biol.* **2**, 673–678 (2014).
58. Gellert, M. *et al.* Identification of a dithiol-disulfide switch in collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) that is toggled in a model of neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **288**, 35117–35125 (2013).
59. Gellert, M., Hanschmann, E.-M., Lepka, K., Berndt, C. & Lillig, C. H. Redox regulation of cytoskeletal dynamics during differentiation and de-differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 1575–1587 (2015).
60. Gellert, M. *et al.* The cytosolic isoform of glutaredoxin 2 promotes cell migration and invasion. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1864**, (2020).
61. Witte, S. *et al.* Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF- $\kappa$ B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 1902–1909 (2000).
62. Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J. R. & Lillig, C. H. Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 372–376 (2010).

63. Cha, H. *et al.* PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**, 796–803 (2008).
64. Cheng, N. H. *et al.* A mammalian monothiol glutaredoxin, Grx3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis. *FEBS J.* **278**, 2525–2539 (2011).
65. Qu, Y. *et al.* Thioredoxin-like 2 regulates human cancer cell growth and metastasis via redox homeostasis and NF- $\kappa$ B signaling. *J. Clin. Invest.* **121**, 212–225 (2011).
66. He, F. *et al.* Glutaredoxin 3 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis via EGFR/Akt pathway and independent of ROS. *Oncotarget* **7**, 37000–37012 (2016).
67. Pandya, P. *et al.* PICOT binding to chromatin-associated EED negatively regulates cyclin D2 expression by increasing H3K27me3 at the CCND2 gene promoter. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
68. Jeong, D. *et al.* PICOT inhibits cardiac hypertrophy and enhances ventricular function and cardiomyocyte contractility. *Circ. Res.* **99**, 307–314 (2006).
69. Ye, H. *et al.* Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J. Clin. Invest.* **120**, 1749–1761 (2010).
70. Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. & Lill, R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **22**, 4815–4825 (2003).
71. Camaschella, C. *et al.* The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* **110**, 1353–1358 (2007).
72. Molina-Navarro, M. M., Casas, C., Piedrafita, L., Bellí, G. & Herrero, E. Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett.* **580**, 2273–2280 (2006).
73. Baker, P. R. *et al.* Variant non-ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5. *Brain* **137**, 366–379 (2014).
74. Berndt, C., Christ, L., Rouhier, N. & Mühlenhoff, U. Glutaredoxins with iron-sulphur clusters in eukaryotes - Structure , function and impact on disease. *BBA - Bioenerg.* **1862**, 148317 (2021).
75. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 247–281 (2005).
76. Beinert, H. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 2–15 (2000).
77. Beinert, H., Holm, R. H. & Münck, E. Iron-sulfur clusters: Nature’s modular, multipurpose structures. *Science (80-. )*. **277**, 653–659 (1997).
78. Chan, M. K., Kim, J. & Rees, D. C. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science (80-. )*. **260**, 792–794 (1993).
79. Ragsdale, S. W. & Kumar, M. Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase. *Chem. Rev.* **96**, 2515–2540 (1996).

80. Mendel, R. R. The molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.* **288**, 13165–13172 (2013).
81. Schwarz, G., Mendel, R. R. & Ribbe, M. W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**, 839–847 (2009).
82. Schwarz, G. & Mendel, R. R. Molybdenum Cofactor Biosynthesis and Molybdenum Enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 623–647 (2006).
83. Lill, R. & Mühlenhoff, U. Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 669–700 (2008).
84. Rouault, T. A. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: New insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 155–164 (2012).
85. Ciofi-Baffoni, S., Nasta, V. & Banci, L. Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. *Metallomics* **10**, 49–72 (2018).
86. Schmucker, S. & Puccio, H. Understanding the molecular mechanisms of Friedreich’s ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R103–110 (2010).
87. Uzarska, M. A., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Lill, R. & Mühlenhoff, U. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1830–1841 (2013).
88. Weiler, B. D. *et al.* Mitochondrial [4Fe4S] protein assembly involves reductive [2Fe2S] cluster fusion on ISCA1-ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 20555–20565 (2020).
89. Kim, K. S., Maio, N., Singh, A. & Rouault, T. A. Cytosolic HSC20 integrates de novo iron-sulfur cluster biogenesis with the CIAO1-mediated transfer to recipients. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 837–852 (2018).
90. Rouault, T. A. The indispensable role of mammalian iron sulfur proteins in function and regulation of multiple diverse metabolic pathways. *Biometals* **32**, 343–353 (2019).
91. Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838 (2009).
92. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981–3989 (1999).
93. Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Mühlenhoff, U. & Lill, R. The Yeast Scaffold Proteins Isu1p and Isu2p Are Required inside Mitochondria for Maturation of Cytosolic Fe/S Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4848–4857 (2004).
94. Frey, A. G., Palenchar, D. J., Wildemann, J. D. & Philpott, C. C. A glutaredoxin-BolA complex serves as an iron-sulfur cluster chaperone for the cytosolic cluster assembly machinery. *J. Biol. Chem.* **291**, 22344–22356 (2016).
95. Banci, L., Camponeschi, F., Ciofi-Baffoni, S. & Muzzioli, R. Elucidating the Molecular Function of Human BOLA2 in GRX3-Dependent Anamorsin Maturation Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 16133–16143 (2015).
96. Prousek, J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* **79**, 2325–2338 (2007).



97. Campuzano, V. *et al.* Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science (80-. )*. **271**, 1423–1427 (1996).
98. Koepfen, A. H. Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* **303**, 1–12 (2011).
99. Pietrangelo, A. Iron and the liver. *Liver Int.* **36**, 116–123 (2016).
100. Mochizuki, H., Choong, C.-J. & Baba, K. Parkinson's disease and iron. *J. Neural Transm.* **127**, 181–187 (2020).
101. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Camaschella, C. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* **142**, 24–38 (2010).
102. Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W. & Galy, B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* **168**, 344–361 (2017).
103. Walden, W. E. *et al.* Structure of Dual Function Iron Regulatory Protein 1 Complexed with Ferritin IRE-RNA. *Science (80-. )*. **314**, 1903–1908 (2006).
104. Salahudeen, A. A. *et al.* An E3 Ligase Possessing an Iron-Responsive Hemerythrin Domain Is a Regulator of Iron Homeostasis. *Science (80-. )*. **326**, 722–726 (2009).
105. Vashisht, A. A. *et al.* Control of Iron Homeostasis by an Iron-Regulated Ubiquitin Ligase. *Science (80-. )*. **326**, 718–721 (2009).
106. Wu, C.-K. *et al.* The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 156–160 (2001).
107. Lange, H., Mühlenhoff, U., Denzel, M., Kispal, G. & Lill, R. The heme synthesis defect of mutants impaired in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis is caused by reversible inhibition of ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **279**, 29101–29108 (2004).
108. Brandt, U. Energy converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 69–92 (2006).
109. Beinert, H., Kennedy, M. C. & Stout, C. D. Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chem. Rev.* **96**, 2335–2374 (1996).
110. Hentze, M. W. & Kühn, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8175–8182 (1996).
111. Beinert, H. & Kiley, P. J. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 152–157 (1999).
112. Grandoni, J. A., Switzer, R. L., Makaroff, C. A. & Zalkin, H. Evidence that the iron-sulfur cluster of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase determines stability of the enzyme to degradation in vivo. *J. Biol. Chem.* **264**, 6058–6064 (1989).
113. Hänzelmann, P. *et al.* Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 34721–34732 (2004).

114. Lillig, C. H. *et al.* Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: A possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8168–8173 (2005).
115. Berndt, C. *et al.* How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human Glutaredoxin 2. *Antioxidants Redox Signal.* **9**, 151–157 (2007).
116. Johansson, C., Kavanagh, K. L., Gileadi, O. & Oppermann, U. Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**, 3077–3082 (2007).
117. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
118. Johansson, C. *et al.* The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster coordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem. J.* **433**, 303–311 (2011).
119. Feng, Y. *et al.* Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site. *Biochemistry* **45**, 7998–8008 (2006).
120. Rouhier, N. *et al.* Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7379–7384 (2007).
121. Su, D., Berndt, C., Fomenko, D. E., Holmgren, A. & Gladyshev, V. N. A conserved cis-proline precludes metal binding by the active site thiolates in members of the thioredoxin family of proteins. *Biochemistry* **46**, 6903–6910 (2007).
122. Yang, Y. *et al.* Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry* **37**, 17145–17156 (1998).
123. Hoff, K. G. *et al.* In vivo fluorescent detection of Fe-S clusters coordinated by human GRX2. *Chem. Biol.* **16**, 1299–1308 (2009).
124. Lepka, K. *et al.* Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia. *Glia* **65**, 1521–1534 (2017).
125. Zipp, F. & Aktas, O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **29**, 518–527 (2006).
126. van Horssen, J., Witte, M. E., Schreiber, G. & de Vries, H. E. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 141–150 (2011).
127. Jack, C., Antel, J., Brück, W. & Kuhlmann, T. Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis. *Glia* **55**, 926–934 (2007).
128. Li, J., Baud, O., Vartanian, T., Volpe, J. J. & Rosenberg, P. A. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9936–9941 (2005).
129. Connor, J. R. & Menzies, S. L. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* **17**, 83–93 (1996).

130. Liu, G. *et al.* Heterozygous missense mutations in the GLRX5 gene cause sideroblastic anemia in a Chinese patient. *Blood* **124**, 2750–2751 (2014).
131. Liu, G. *et al.* Functional Analysis of GLRX5 Mutants Reveals Distinct Functionalities of GLRX5 Protein. *J. Cell. Biochem.* **117**, 207–217 (2016).
132. Banci, L. *et al.* [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 6203–6208 (2014).
133. Molina, M. M., Bellí, G., De La Torre, M. A., Rodríguez-Manzanque, M. T. & Herrero, E. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* **279**, 51923–51930 (2004).
134. Banci, L. *et al.* N-terminal domains mediate [2Fe-2S] cluster transfer from glutaredoxin-3 to anamorsin. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 772–778 (2015).
135. Vlamis-Gardikas, A., Potamitou, A., Zarivach, R., Hochman, A. & Holmgren, A. Characterization of *Escherichia coli* null mutants for glutaredoxin 2. *J. Biol. Chem.* **277**, 10861–10868 (2002).
136. Arakawa, H., Lodygin, D. & Buerstedde, J.-M. Mutants loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnol.* **1**, (2001).
137. Mendl, N. *et al.* Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene WHI2. *J. Cell Sci.* **124**, 1339–1350 (2011).
138. Westermann, B. & Neupert, W. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1421–1427 (2000).
139. Godoy, J. R. *et al.* Redox atlas of the mouse: Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1810**, 2–92 (2011).
140. Artimo, P. *et al.* ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **40**, 597–603 (2012).
141. Schindelin, J. *et al.* Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
142. Fish, W. W. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol.* **158**, 357–364 (1988).
143. Ditrói, T. *et al.* Comprehensive analysis of how experimental parameters affect H<sub>2</sub>S measurements by the monobromobimane method. *Free Radic. Biol. Med.* **136**, 146–158 (2019).
144. Luthman, M. & Holmgren, A. Glutaredoxin from calf thymus. Purification to homogeneity. *J. Biol. Chem.* **257**, 6686–6690 (1982).
145. Biederbick, A. *et al.* Role of Human Mitochondrial Nfs1 in Cytosolic Iron-Sulfur Protein Biogenesis and Iron Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5675–5687 (2006).
146. Srere, P. A., Brazil, H. & Gonen, L. The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle. *Acta Chemica Scandinavica* **17** ., 129–134 (1963).

147. Stehling, O., Elsässer, H.-P., Brückel, B., Mühlenhoff, U. & Lill, R. Iron-sulfur protein maturation in human cells: Evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 3007–3015 (2004).
148. Mayr, S. J. *et al.* A mild case of molybdenum cofactor deficiency defines an alternative route of MOCS1 protein maturation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **41**, 187–196 (2018).
149. Leimkühler, S., Freuer, A., Santamaria-Araujo, J. A., Rajagopalan, K. V. & Mendel, R. R. Mechanistic studies of human molybdopterin synthase reaction and characterization of mutants identified in group B patients of molybdenum cofactor deficiency. *J. Biol. Chem.* **278**, 26127–26134 (2003).
150. Leimkühler, S., Wuebbens, M. M. & Rajagopalan, K. V. The history of the discovery of the Molybdenum Cofactor and novel aspects of its biosynthesis in bacteria. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 1129–1144 (2011).
151. Almeida, R. G., Czopka, T., Ffrench-Constant, C. & Lyons, D. A. Individual axons regulate the myelinating potential of single oligodendrocytes in vivo. *Development* **138**, 4443–4450 (2011).
152. Münzel, E. J. *et al.* Claudin k is specifically expressed in cells that form myelin during development of the nervous system and regeneration of the optic nerve in adult zebrafish. *Glia* **60**, 253–270 (2012).
153. Dóka, É. *et al.* A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci. Adv.* **2**, 1–14 (2016).
154. Trnka, D. *et al.* Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins. *Nat. Commun.* **11**, 1–12 (2020). Springer US
155. Setterdahl, A. T. *et al.* Oxidation - Reduction properties of disulfide-containing proteins of the *Rhodobacter capsulatus* cytochrome c biogenesis system. *Biochemistry* **39**, 10172–10176 (2000).
156. Peng, H. *et al.* Thiol reactive probes and chemosensors. *Sensors (Switzerland)* **12**, 15907–15946 (2012).
157. Cortese-Krott, M. M. *et al.* Key bioactive reaction products of the NO/H<sub>2</sub>S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4651–E4660 (2015).
158. Wu, D., Hu, Q. & Zhu, D. An update on hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in the cardiovascular system. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, (2018).
159. Bogdándi, V. *et al.* Nitrosopersulfide (SSNO-) Is a Unique Cysteine Polysulfidating Agent with Reduction-Resistant Bioactivity. *Antioxid. Redox Signal.* **00**, 1–18 (2020).
160. Cruz-Ramos, H. *et al.* NO sensing by FNR: Regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* **21**, 3235–3244 (2002).
161. Lewandowska, H. *et al.* Nitrosyl iron complexes - synthesis, structure and biology. *Dalt. Trans.* **40**, 8273–8289 (2011).
162. Todorich, B., Pasquini, J. M., Garcia, C. I., Paez, P. M. & Connor, J. R. Oligodendrocytes

- and myelination: The role of iron. *Glia* **57**, 467–478 (2009).
163. Kettenmann, H. & Verkhratsky, A. Neuroglia, der lebende Nerven Kitt. *Fortschritte der Neurol. Psychiatr.* **79**, 588–597 (2011).
164. Martelli, A. *et al.* Frataxin is essential for extramitochondrial Fe - S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2651–2658 (2007).
165. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. & Andrews, N. C. Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* **117**, 285–297 (2004).
166. Ravanelli, A. M. & Appel, B. Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment. *Genes Dev.* **29**, 2504–2515 (2015).
167. Nagarajan, B. *et al.* CNS myelin protein 36K regulates oligodendrocyte differentiation through Notch. *Glia* **68**, 509–527 (2020).
168. Connor, J. R. Iron regulation in the brain at the cell and molecular level. *Adv. Exp. Med. Biol.* **356**, 229–238 (1994).
169. Yang, W. S. & Stockwell, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* **26**, 165–176 (2016).
170. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
171. Friedmann Angeli, J. P. *et al.* Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.* **16**, 1180–1191 (2014).
172. Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M. K. & Jacquot, J.-P. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 43–52 (2010).
173. Bandyopadhyay, S. *et al.* Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* **27**, 1122–1133 (2008).
174. Rouhier, N., Gelhaye, E. & Jacquot, J. P. Plant glutaredoxins: Still mysterious reducing systems. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1266–1277 (2004).
175. Couturier, J., Przybyla-Toscano, J., Roret, T., Didierjean, C. & Rouhier, N. The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 1513–1527 (2015).
176. Bräutigam, L. *et al.* An unusual mode of iron-sulfur-cluster coordination in a teleost glutaredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436**, 491–496 (2013).
177. Deponte, M. & Lillig, C. H. Enzymatic control of cysteinyl thiol switches in proteins. *Biol. Chem.* **396**, 401–413 (2015).
178. Perez-Jimenez, R. *et al.* Diversity of chemical mechanisms in thioredoxin catalysis revealed by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 890–896 (2009).
179. Liedgens, L. *et al.* Quantitative assessment of the determinant structural differences between redox-active and inactive glutaredoxins. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
180. Kennedy, M. C., Antholine, W. E. & Beinert, H. An EPR Investigation of the Products

- of the Reaction of Cytosolic and Mitochondrial Aconitases with Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* **272**, 20340–20347 (1997).
181. Rogers, P. A. & Ding, H. L-Cysteine-mediated Destabilization of Dinitrosyl Iron Complexes in Proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 30980–30986 (2001).
182. Crack, J. C., Green, J., Thomson, A. J. & Le Brun, N. E. Iron-sulfur clusters as biological sensors: The chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *Acc. Chem. Res.* **47**, 3196–3205 (2014).
183. Landry, A. P., Duan, X., Huang, H. & Ding, H. Iron-sulfur proteins are the major source of protein-bound dinitrosyl iron complexes formed in *Escherichia coli* cells under nitric oxide stress. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1582–1590 (2011).
184. Vanin, A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **21**, 1–13 (2009).
185. Boese, M., Mordvintcev, P. I., Vanin, A. F., Busse, R. & Mülsch, A. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 29244–29249 (1995).
186. Vanin, A. F. . Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a ‘working form’ of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **54**, 15–26 (2016).
187. Tsai, M.-L., Tsou, C.-C. & Liaw, W.-F. Dinitrosyl Iron Complexes (DNICs): From biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs. *Acc. Chem. Res.* **48**, 1184–1193 (2015).
188. Shekhter, A. B. *et al.* Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing. *Eur. J. Pharm. Sci.* **78**, 8–18 (2015).
189. Kapelko, V. I. *et al.* Protective Effects of Dinitrosyl Iron Complexes under Oxidative Stress in the Heart. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, (2017).
190. Kim, Y.-M., Chung, H.-T., Simmons, R. L. & Billiar, T. R. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* **275**, 10954–10961 (2000).
191. Chazov, E. I. . *et al.* Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: Animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **26**, 148–156 (2012).
192. Cesareo, E. *et al.* Nitrosylation of human glutathione transferase P1-1 with dinitrosyl diglutathionyl iron complex in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 42172–42180 (2005).
193. Lok, H. C. *et al.* Nitric oxide storage and transport in cells are mediated by glutathione S-transferase P1-1 and multidrug resistance protein 1 via dinitrosyl iron complexes. *J. Biol. Chem.* **287**, 607–618 (2012).
194. Crack, J. C. *et al.* Mechanistic insight into the nitrosylation of the [4Fe-4S] cluster of WhiB-like proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1112–1121 (2011).
195. Lin, Z.-S. *et al.* Peptide-bound dinitrosyliron complexes (DNICs) and neutral/reduced-form Roussin’s red esters (RREs/rRREs): Understanding nitrosylation of [Fe-S] clusters
-

- leading to the formation of DNICs and RREs using a de novo design strategy. *Inorg. Chem.* **50**, 10417–10431 (2011).
196. Fitzpatrick, J. & Kim, E. Synthetic Modeling Chemistry of Iron-Sulfur Clusters in Nitric Oxide Signaling. *Acc. Chem. Res.* **48**, 2453–2461 (2015).
197. Harrop, T. C., Tonzetich, Z. J., Reisner, E. & Lippard, S. J. Reactions of synthetic [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters with nitric oxide and nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15602–15610 (2008).
198. Fujikawa, M., Kobayashi, K. & Kozawa, T. Mechanistic studies on formation of the dinitrosyl iron complex of the [2Fe-2S] cluster of SoxR protein. *J. Biochem.* **156**, 163–172 (2014).
199. Tran, C. T., Williard, P. G. & Kim, E. Nitric oxide reactivity of [2Fe-2S] clusters leading to H<sub>2</sub>S generation. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 11874–11877 (2014).
200. Whiteman, M. & Moore, P. K. Hydrogen sulfide and the vasculature: A novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 488–507 (2009).
201. Lo Bello, M. *et al.* Human Glutathione Transferase P1-1 and Nitric Oxide Carriers. *J. Biol. Chem.* **276**, 42138–42145 (2001).
202. Christ, S., Leichert, L. I., Willms, A., Roland, L. & Mühlhoff, U. Defects in Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Assembly Induce Cysteine S-Polythiolation on Iron-Sulfur Apoproteins. *Antioxidants Redox Signal.* **25**, 28–40 (2016).
203. Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* **263**, 17205–17208 (1988).
204. Ida, T. *et al.* Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7606–7611 (2014).
205. Dóka, É. *et al.* Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci. Adv.* **6**, 1–20 (2020).
206. Franklin, R. J. M. & Gallo, V. The translational biology of remyelination: Past, present, and future. *Glia* **62**, 1905–1915 (2014).
207. Craelius, W., Migdal, M. W., Luessenhop, C. P., Sugar, A. & Mihalakis, I. Iron deposits surrounding multiple sclerosis plaques. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **106**, 397–399 (1982).
208. Raz, E. *et al.* Relationship between iron accumulation and white matter injury in multiple sclerosis: a case–control study. *J. Neurol.* **262**, 402–409 (2015).
209. Marques, S. *et al.* Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science (80-. )*. **352**, 1326–1329 (2016).
210. Linnarsson, S. & Castelo-Branco, G. Oligodendrocyte lineage. (2020). Available at: <http://linnarssonlab.org/oligodendrocytes/>. (Accessed: 6th November 2020)
211. Haunhorst, P. Eigenschaften und Funktionen des humanen monothiol Glutaredoxin 3. (2010).

212. Baron, W., De Jonge, J. C., De Vries, H. & Hoekstra, D. Regulation of oligodendrocyte differentiation: Protein kinase C activation prevents differentiation of O2A progenitor cells toward oligodendrocytes. *Glia* **22**, 121–129 (1998).
213. Scalcon, V., Tonolo, F., Folda, A., Bindoli, A. & Rigobello, M. P. Dimers of glutaredoxin 2 as mitochondrial redox sensors in selenite-induced oxidative stress. *Metallomics* **11**, 1241–1251 (2019).
214. Hoshino, T., Yamakado, H., Takahashi, R. & Matsuzawa, S. Susceptibility to erastin-induced ferroptosis decreases during maturation in a human oligodendrocyte cell line. *FEBS Open Bio* 1–7 (2020). doi:10.1002/2211-5463.12923
215. Hu, C.-L. *et al.* Reduced expression of the ferroptosis inhibitor glutathione peroxidase-4 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* **148**, 426–439 (2019).
216. Yoo, S.-E. *et al.* Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1820–1827 (2012).
217. Zilka, O. *et al.* On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent. Sci.* **3**, 232–243 (2017).
218. Kapralov, A. A. *et al.* Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 278–290 (2020).
219. Lee, J., You, J. H., Shin, D. & Roh, J.-L. Inhibition of Glutaredoxin 5 predisposes Cisplatin-resistant Head and Neck Cancer Cells to Ferroptosis. *Theranostics* **10**, 7775–7786 (2020).
220. Daher, R. *et al.* GLRX5 mutations impair heme biosynthetic enzymes ALA synthase 2 and ferrochelatase in Human congenital sideroblastic anemia. *Mol. Genet. Metab.* **128**, 342–351 (2019).



## 8 Publikationen und Konferenzbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Trnka\*, D., **Engelke\***, A. D., Gellert\*, M., Moseler, A., Hossain, Md F., Lindenberg, T. T., Pedroletti, L., Odermatt, B., de Souza, J. V., Bronowska, A. K., Dick, T. P., Mühlenhoff, U., Meyer, A. J., Berndt, C., Lillig, C. H., Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins, *Nat. Commun.* (2020)

Weitere Publikationen, deren Ergebnisse nicht Teil dieser Arbeit sind:

- Sangeetham\*, S. B., **Engelke\***, A.D., Fodor, E., Krausz, S. L., Tatzelt, J., Welker, E., The G127V variant of the prion protein interferes with dimer formation *in vitro* but not *in cellulo*, *Sci Rep.* (2021)
- **Engelke\***, A. D., Gonsberg\*, A., Thapa\*, S., Jung, S., Ulbrich, S., Seidel, R., Basu, S., Multhaup, G., Baier, M., Engelhard, M., Schätzl, H.M., Winklhofer, K. F., Tatzelt, J., Dimerization of the cellular prion protein inhibits propagation of scrapie prions, *J. Biol. Chem.* (2018)
- Ingwersen\*, J., De Santi\*, L., Wingerath, B., Graf, J., Koop, B., Schneider, R., Hecker, C., Schröter, F., Bayer, M., **Engelke, A. D.**, Dietrich, M., Albrecht, P., Hartung, H.-P., Annunziata, P., Aktas, O., Prozorovski, T., Nimodipine confers clinical improvement in two models of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neurochem.* (2018)
- Berndt, C., **Engelke, A.D.**, Bräutigam, L., and Lepka, K., Glutaredoxins in the brain, in: „Glutathione Systems in Health and Disease“, Flohé, L., Ed., CRC Press (2018)

\*: gleichberechtigte Autoren

### Posterbeiträge:

- **Engelke, A. D.**, Trnka, D., Mayr, S.J., Schwarz, G., Odermatt, B., Aktas, O., Lillig, C.H., Berndt, C., FeS-Glutaredoxins: Structure-function relationship and new functions. Steenbock Symposium, Iron-Sulfur Proteins – Biogenesis, Regulation and Function, Madison, Wisconsin, USA (2018)
- **Engelke, A. D.**, Lepka, K.M., Trnka, D., Odermatt, B., Bill, E., Aktas, O., Lillig, C.H., Berndt, C., FeS-cluster stability and functionality of mammalian FeS-Glutaredoxins. Congress of the International BioIron Society, Heidelberg (2019)
- **Engelke, A. D.**, Trnka, D., Moseler, A., Gellert, M., Odermatt, B., Meyer, A., Lillig, C.H., Berndt, C., Exchange of the structural determinant defines different functions of monothiol and dithiol Glutaredoxins. SPP1710 Conference, Thiol-based switches and redox regulation – from microbes to men, Sant Feliu de Guixols, Spanien (2019)

### Wissenschaftliche Vorträge:

- FeS-Glutaredoxins: What determines their function, for instance during molybdenum cofactor biosynthesis? SPP1927-Meeting (DFG), Potsdam (2018)
- Monothiol Glutaredoxins – structure-function relationship. Wissenschaftliches Treffen mit Arbeitsgruppen der Università Vita-Salute San Raffaele, Mailand, Italien (2018)
- The role of FeS-Glutaredoxins and their cofactors in diseases. Wissenschaftliches Treffen mit Arbeitsgruppen der Université de Lorraine, Nancy, Frankreich (2017)

## 9 Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| ACN            | Acetonitril  |
| ALAS2          | $\delta$ -Aminolävulinatsynthase                                 |
| Amp            | Ampicillin   |
| APS            | Ammoniumperoxodisulfat   |
| BCA            | Bicinchoninsäure-Assay   |
| Bp             | Basenpaare   |
| BSA            | Bovines Serumalbumin   |
| CNPase         | 2'3'-Cyclic-nucleotide 3'phosphodiesterase                       |
| Da             | Dalton   |
| DGDNIC         | Dinitrosyl-Diglutathionyl-Eisen-Komplex                          |
| DMEM           | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                          |
| DNA            | <i>Deoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonukleinsäure            |
| dNTP           | 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate                           |
| DNIC           | Dinitrosyl-Eisen-Komplex   |
| DTT            | Dithiothreitol   |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| HSA            | Humanes Serumalbumin   |
| HED            | 2-Hydroxyethyldisulfid   |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                                     |
| FCS            | Fötales bovines Serum  |
| FGF            | Fibroblasten-Wachstumsfaktor                                     |
| Fw             | <i>Forward</i>   |
| GAPDH          | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                         |
| GFAP           | <i>Glial fibrillary acidic protein</i> – Saures Gliafaserprotein |
| GPAT           | Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase             |
| GR             | Glutathion-Reduktase   |

## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

|               |  |
|---------------|--|
| Grx           | Glutaredoxin   |
| GSH           | Glutathion   |
| GSNO          | S-Nitrosoglutathion  |
| GSSG          | Glutathiondisulfid   |
| HBSS          | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>                               |
| Hif2 $\alpha$ | Hypoxie-induzierter Faktor 2 $\alpha$                              |
| IAB           | EZ-link iodoacetyl-PEG2 biotin                                     |
| IPTG          | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid                         |
| IRE           | <i>iron regulatory elements</i> – Eisen regulierendes Element      |
| IRP           | <i>iron regulatory protein</i> – Eisen-regulierendes Protein       |
| ISC           | <i>iron sulfur cluster</i> – Eisen-Schwefel-Zentrum                |
| MBP           | Basisches Myelinprotein  |
| MoCo          | Molybdän-Kofaktor  |
| NAD(P)H       | Nicotinamidadenindinukleotid (phosphate)                           |
| NG2           | Neural/Glial Antigen 2   |
| NO            | Stickstoffmonoxid  |
| OD            | Optische Dichte  |
| OSC           | <i>Organotypic slice cultures</i> – organotypische Schnittkulturen |
| PBS           | <i>Phosphate-Buffered Saline</i>                                   |
| PCR           | <i>polymerase chain reaction</i> – Polymerase-Kettenreaktion       |
| PDGF $\alpha$ | <i>Platelet-derived growth factor <math>\alpha</math></i>          |
| PFA           | Paraformaldehyd  |
| PICOT         | Proteinkinase C-interagierender Cousin von Thioredoxin             |
| PLL           | Poly-L-Lysin   |
| PLP           | Proteolipid-Protein  |
| rpm           | <i>rounds per minute</i> - Runden pro Minute                       |
| ProPerDP      | Protein Persulfide Detektions Protokol                             |

## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

|          |   |
|----------|---|
| P/S      | Penicillin/Streptavidin                                       |
| Rev      | <i>Reverse</i>  |
| RNA      | <i>ribonucleic acid</i> – Ribonukleinsäure                    |
| RNS      | <i>reactive nitrogen species</i> – reaktive Stickstoffspezien |
| ROS      | <i>reactive oxygen species</i> – reaktive Sauerstoffspezien   |
| RSS      | <i>reactive sulfur species</i> – reaktive Schwefelspezien     |
| RT       | Reverse Transkription   |
| SD       | <i>standard deviation</i> – Standardabweichung                |
| SDS      | Sodiumdodecylsulfat - Natriumdodecylsulfat                    |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese                            |
| SEM      | <i>standard error of the mean</i> – Standardfehler            |
| T4       | L-Thyroxine   |
| T3       | Triiodo-L-Thyronine   |
| TCA      | Trichloressigsäure  |
| TCEP     | Tris-(2-carboxyethyl)phosphin                                 |
| TFA      | Trifluoressigsäure  |
| TfR      | Transferrin-Rezeptor  |
| Trx      | Thioredoxin   |
| TrxR     | Thioredoxin-Reduktase   |
| UTR      | untranslatierter Bereich                                      |
| wt       | Wildtyp   |

Einheiten wurde nach dem SI-System angegeben und Aminosäuren im Buchstabencode nach der IUPAC Nomenklatur.

## 10 Anhang

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Trnka\*, D., **Engelke\***, A. D., Gellert\*, M., Moseler, A., Hossain, Md F., Lindenberg, T. T., Pedroletti, L., Odermatt, B., de Souza, J. V., Bronowska, A. K., Dick, T. P., Mühlhoff, U., Meyer, A. J., Berndt, C., Lillig, C. H., Molecular basis for the distinct functions of redox-active and FeS-transferring glutaredoxins, Nat. Commun. (2020)

Meine Beiträge zu dieser Publikation sind folgende:

- Proteinexpression und -aufreinigung und *in vitro*-Rekonstitutionen
- UV/Vis-Spektroskopie-Messungen
- Kolorimetrische Messung des FeS-Zentrum Gehalts
- Deglutathionylierungsexperimente
- Klonierung der cDNA, RNA-Synthese, Injektionen und Häm-Färbungen der Zebrafische
- Datenanalyse, Abbildungen

### Humanes Grx2 Wildtyp

124 AS; 14127 Da

                  10                  20                  30                  40                  50                  60  
MESNTSSSLE  NLATAPVNI  QETISDNCVV  IFS**KTSCSYC**  TMAKKLFHDM  NVNYKVVELD  
  
                  70                  80                  90                  100                  110                  120  
LLEYGNQFQD  ALYKMTGERT  VPRIFVNGTF  IGGATDTHRL  HKEGKLLPLV  HQCYLKKSQR

KEFQ

### Humanes Grx5 Wildtyp

126 AS; 13740 Da

                  10                  20                  30                  40                  50                  60  
MGSGAGGGGS  AEQLDALVKK  DKVVVFLK**GTPEQP**CGFSN  AVVQILRLHG  VRDYAAYNVL  
  
                  70                  80                  90                  100                  110                  120  
DDPELRQGIK  DYSNWPTIPQ  VYLNGEFVGG  CDILLQMHQN  GDLVEELKKL  GIHSALLDEK

KDQDSK

### Humanes Grx2 mit monothiol-Loop

129 AS, 14640 Da

10 20 30 40 50 60  
MESNTSSSLE NLATAPVNQI QETISDNCVV IFSK**GTPEQT** SCSYCTMAKK LFHDMNVNYK  
70 80 90 100 110 120  
VVELDLLEYG NQFDALYKM TGERTVPRIF VNGTFIGGAT DTHRLHKEGK LLPLVHQCYL

KKSKRKEFQ

### Humanes Grx5 mit dithiol-Loop

121 AS; 13227 Da

10 20 30 40 50 60  
MGSGAGGGGS AEQLDALVKK DKVVVFL**KPQ** CGFSNAVVQI LRLHGVRDYA AYNVLDDPEL  
70 80 90 100 110 120  
RQGIKDYSNW PTIPQVYLNQ EFGGCDILL QMHQNGDLVE ELKKLGIHSA LLDEKQDQS

K

### Humanes Grx5 mit aktivem Zentrum von Grx2

126 AS; 13802 Da

10 20 30 40 50 60  
MGSGAGGGGS AEQLDALVKK DKVVVFL**GTPEQ**PQCSYCN AVVQILRLHG VRDYAAYNVL  
70 80 90 100 110 120  
DDPELRQGIK DYSNWPTIPQ VYLNQEFVGG CDILLQMHQN GDLVEELKKL GIHSALLDEK

KDQDSK

### Humanes Grx5 mit dithiol-Loop und aktivem Zentrum von Grx2

121 AS; 13289 Da

10 20 30 40 50 60  
MGSGAGGGGS AEQLDALVKK DKVVVFL**KPQ** CSYCNNAVQI LRLHGVRDYA AYNVLDDPEL  
70 80 90 100 110 120  
RQGIKDYSNW PTIPQVYLNQ EFGGCDILL QMHQNGDLVE ELKKLGIHSA LLDEKQDQS

K

### 11 Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei PD Dr. Carsten Berndt für die Betreuung und Unterstützung, sowie für die vielen Freiheiten und Möglichkeiten zur Erstellung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Ich danke Prof. Dr. Andreas Reichert für die Unterstützung und die Übernahme des Zweitgutachtens. Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Orhan Aktas für die konstruktiven Vorschläge und für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit in der Klinik für Neurologie anfertigen zu können.

Ein großer Dank geht an alle Kooperationspartner, in deren Laboren ich viel lernen konnte und die mir mit Ihren Blickwinkeln auf biochemische Zusammenhänge eine Inspiration waren. Ich möchte mich bei PD Dr. Christopher H. Lillig, Dr. Daniel Trnka, Dr. Manuela Gellert, Md Faruq Hossain und Laura Jordt für die Zusammenarbeit und die Möglichkeit Teil des großartigen Projekts sein zu können, bedanken. A big thanks for Prof. Dr. Péter Nagy, Dr. Evá Dóka and Dr. Tamás Ditrói for having a great time in their lab and for their support for the sulfide und persulfide experiments. Ich danke Prof. Dr. Benjamin Odermatt, Dr. Felix Häberlein, Tobias Lindenberg und Öznur Yilmaz für die großartige Unterstützung bei den Zebrafischexperimenten. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Miriam M. Cortese-Krott und ihrer Arbeitsgruppe für die Hilfe bei den Schwefelwasserstoff- und Stickoxid-Messungen. Prof. Dr. Roland Lill, Prof. Dr. Ulrich Mühlenhoff, Dr. Oliver Stehling sowie Isabell Kothe danke ich für die Unterstützung mit den Enzymaktivitätsmessungen. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Günter Schwarz und Dr. Simon Mayr für die Unterstützung bei den MoCo-Experimenten. Ich danke Dr. Ingo Zebger und Dr. Anke Keidel für die Bereitstellung der Resonanz-Raman-Spektroskopie. Ein weiterer Dank geht an Dr. Gereon Poschmann für die massenspektrometrischen Untersuchungen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) mit dem Schwerpunktprogramm 1927 Iron-Sulfur for Life und der Graduiertenschule iBrain von der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), die es mir ermöglichten meine Ergebnisse auf Konferenzen und Tagungen zu präsentieren und diese in wissenschaftlichen Gesprächen zu erläutern.

Ein großes Dankeschön geht an die aktuellen und früheren Mitarbeiter/innen der Arbeitsgruppe Thiology und der Arbeitsgruppe Aktas, sowie an die aktuellen und früheren Kolleg/innen des Life Science Centers. Ich danke Klaudia für viele gute Techniken und Tipps im und auch außerhalb des Labors. Danke Rike, für die gemeinsame Zeit und dafür, dass du immer offen für



Fragen und Ideen an meiner Seite warst. Christina danke ich für die Unterstützung und Begleitung auf dem Weg zur Promotion. Ein Dank geht an alle Bachelor- und Masterstudierenden und insbesondere an Leonie für die Unterstützung in der Etablierung der Persulfidexperimente in Düsseldorf. Mary und Andrea danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei technischen Anliegen im Labor. Außerdem danke ich der Klinik für Neurologie und ihren Mitgliedern für ihre Unterstützung. Dank an alle die Korrektur gelesen haben oder auf andere Weise diese Arbeit optimiert haben.

Ich möchte mich bei meiner Familie und meinen Freund/innen bedanken, die mich während meiner Ausbildung begleitet und unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Jan, der mich mit seiner unendlichen Geduld und seinem Händchen fürs Technische stets bedingungslos unterstützt hat und in allen Lebenslagen für mich da war und ist.

## **12 Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Anna Dorothee Engelke, versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde weder in dieser noch in einer abgewandelten Form bereits einer anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bis jetzt keine erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

---