

## Redoxregulation

# Glutaredoxine und Eisen-Schwefel-Zentren

CHRISTOPH HUDEMANN<sup>1</sup>, CARSTEN BERNDT<sup>1,2</sup> UND CHRISTOPHER HORST LILLIG<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>THE MEDICAL NOBEL INSTITUTE FOR BIOCHEMISTRY, KAROLINSKA INSTITUTET, STOCKHOLM, UND <sup>2</sup>INSTITUT FÜR KLINISCHE ZYTOBIOLOGIE UND ZYTOPATHOLOGIE DER PHILIPPS UNIVERSITÄT MARBURG

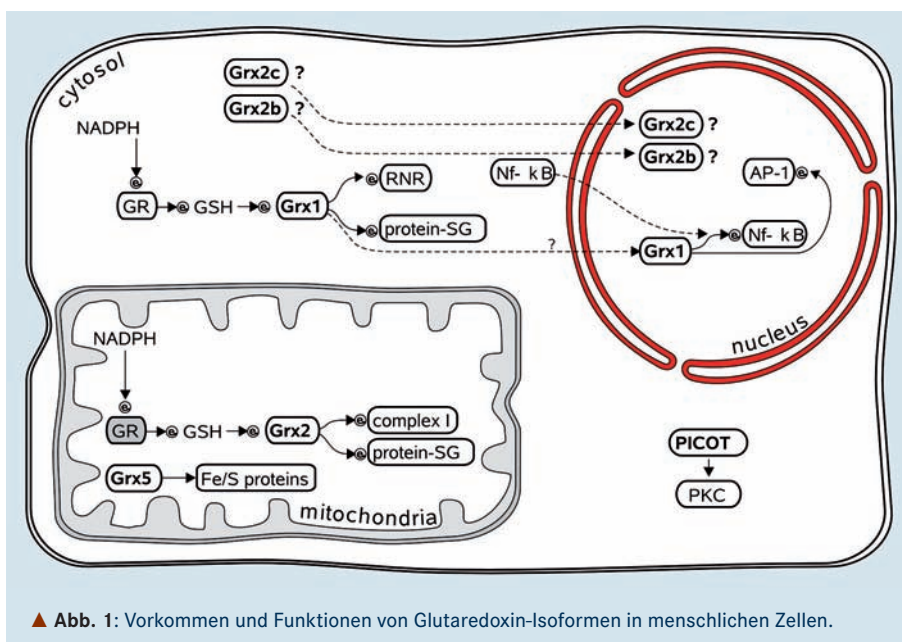
**Verschiedene Glutathion-abhängige Oxidoreduktasen (Glutaredoxine) binden Fe/S-Zentren oder sind an deren Bildung beteiligt. Diese Erkenntnisse deuten auf bislang unbekannte Funktionen hin.**

Glutaredoxins have been described as crucial for Fe homeostasis and biosynthesis of Fe/S clusters, and as Fe/S proteins.

### Glutaredoxine

Glutaredoxine sind eine relativ heterogene Gruppe von 9–18 kDa großen Oxidoreduktasen, welche zum ersten Mal 1976 als Wasserstoffdonatoren für die Ribonukleotid-Reduktase beschrieben wurden<sup>[1]</sup>. Als Mitglieder der Thioredoxin-Proteinfamilie katalysieren sie mithilfe von zwei Cysteinen in einem Cys-X-X-Cys-Motiv Thiol-Disulfid-Oxidoreduktionen. Von den übrigen Mitgliedern der Thioredoxinfamilie heben sich die Glutaredoxine durch ihre Abhängigkeit vom universellen Tripeptid Glutathion (Gamma-Glu-

tamyl-Cysteinyl-Glycin, GSH) als Kofaktor ab. GSH oxidiert dabei selbst zum Glutathion-Disulfid (GSSG), welches NADPH-abhängig durch die Glutathion-Reduktase regeneriert wird. Das intrazellulär in millimolaren Konzentrationen vorliegende GSH/GSSG-Redoxpaar bestimmt das zelluläre Redoxgleichgewicht, Glutathion kann unter oxidierenden Bedingungen aber auch direkt mit Proteinthiolgruppen reagieren. Diese Reaktion der reversiblen S-Glutathionylierung wird sehr effizient von Glutaredoxinen katalysiert.



▲ **Abb. 1:** Vorkommen und Funktionen von Glutaredoxin-Isoformen in menschlichen Zellen.

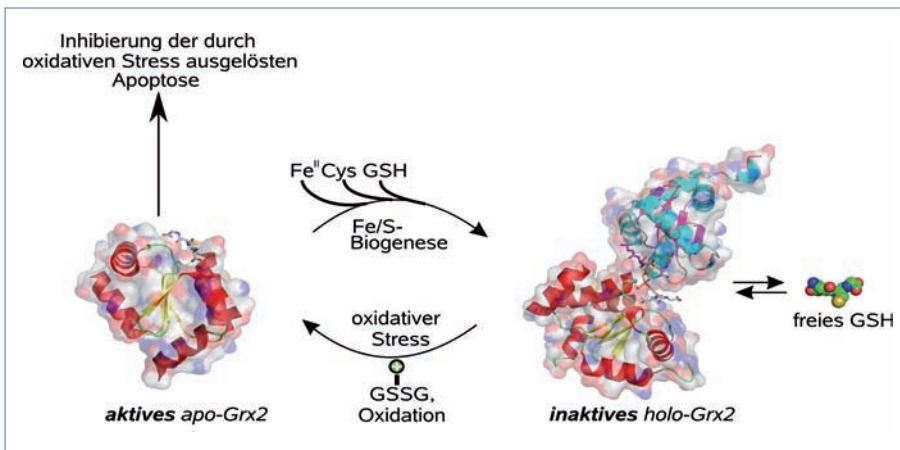
Mit Ausnahme einiger Bakteriengruppen wurden Glutaredoxin-Isoformen in nahezu allen Lebensformen nachgewiesen, d. h. in Prokaryoten, Pilzen, Pflanzen und Tieren. Auch zahlreiche Viren enthalten Erbinformationen, die für Glutaredoxine codieren. Die Familie der Glutaredoxine spaltet sich in zwei Hauptäste auf. Zum einen die Dithiol-Glutaredoxine mit einem Cys-Pro-Tyr-Cys-Motiv im aktiven Zentrum, zum anderen in die Monothiol-Glutaredoxine, die ein charakteristisches Cys-Gly-Phe-Ser-Motiv auszeichnet<sup>[2]</sup>.

In Humanzellen konnten bisher vier Glutaredoxine nachgewiesen werden (**Abb. 1**):

- (1) Grx1, ein zytosolisches Dithiol-Glutaredoxin, das an zahlreichen Redox-regulierten Prozessen beteiligt ist<sup>[2]</sup>.
- (2) Grx2, ein Dithiol-Glutaredoxin mit einem ungewöhnlichen Cys-Ser-Tyr-Cys-Motiv im aktiven Zentrum und einer herausragenden Rolle in der zellulären Antwort auf durch oxidativen Stress ausgelöste Apoptose<sup>[3]</sup>. Kürzlich konnten wir drei Isoformen des humanen Grx2 charakterisieren: Das ubiquitär exprimierte mitochondriale Grx2a sowie die zytosolisch/nukleären Varianten Grx2b und Grx2c, deren Expression sich auf Hoden und zahlreiche Krebszelllinien beschränkt<sup>[4]</sup>.
- (3) Grx5, ein mitochondriales Monothiol-Glutaredoxin.
- (4) Proteinkinase C-interagierender Cousin von Thioredoxin (PICOT), der sich aus einer rudimentären N-terminalen Thioredoxin- und zwei nachfolgenden Monothiol-Glutaredoxin-Domänen zusammensetzt. Seine Hauptfunktion wird in der Rolle eines endogenen Inhibitors der Proteinkinase C vermutet<sup>[2]</sup>.

### Glutaredoxin 5 und die Biogenese von Eisen-Schwefel-Zentren

Früher wurden Glutaredoxine in erster Linie wegen ihrer Aktivität als Reduktasen gemischter Disulfide zwischen Proteinthiolen und GSH wahrgenommen. Dies änderte sich gravierend in den Jahren 2002/2003



▲ **Abb. 2:** Vorgeschlagerener Mechanismus der Regulation des humanen Glutaredoxin 2 in Mitochondrien. Aktives Apo-Grx2 kann zu 2Fe/2S-gebundenem Holo-Grx2 transformiert werden, in welchem GSH in ständigem Austausch mit freiem zellulären GSH steht. Oxidation des GSH zum GSSG destabilisiert die inaktive Holoform.

durch Untersuchungen in den Arbeitsgruppen von E. Herrero (Lleida) und R. Lill (Marburg). Wie menschliche Zellen enthält die Bäckerhefe ein mitochondriales Monothiol-Glutaredoxin (Grx5). Mutanten, denen dieses Protein fehlte, zeigten deutliche Defekte in der Synthese von Eisen-Schwefel (Fe/S)-Zentren<sup>[5, 6]</sup>.

Fe/S-Zentren sind entwicklungs-geschichtlich sehr alte Kofaktoren bestehend aus anorganischem Sulfid und Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>. Die Funktionen dieser Kofaktoren sind vielfältig. Neben Elektronen-Übertragungsreaktionen dienen sie unter anderem auch als Sensoren von zellulärem oxidativen Stress und Eisen-gehalt<sup>[7]</sup>. Die Synthese von Fe/S-Zentren ist

eine essenzielle Funktion der Mitochondrien und erfordert unter anderem ein Gerüstprotein, in der Regel das Isu/IscU-Protein, an dem die Fe/S-Cluster synthetisiert werden. Für die Übertragung der neu gebildeten Zentren auf die Zielproteine ist unter anderem ein Chaperon-Paar aus der DnaJ/Dank-Familie verantwortlich<sup>[6]</sup>. Der Verlust von Grx5 führt in Hefe zu einer Anreicherung von Fe/S-Zentren auf Isu, sodass vermutet wird, dass Grx5 eine Funktion beim Transfer der Fe/S-Zentren vom Gerüstprotein auf die Zielproteine hat<sup>[6]</sup>. Mittlerweile konnte mithilfe einer Zebrafisch-Mutante (Shiraz) geklärt werden, dass diese Funktion auch in höheren Eukaryoten konserviert ist<sup>[8]</sup>. Der vollständige Ver-

lust des Grx in dieser Mutante ist letal. Die Beeinträchtigung der Fe/S-Biogenese in diesen Fischen wirkt sich auf die gesamte Eisenhomöostase aus, was sich aufgrund des fehlenden Hämoglobins im Phänotyp der hypochromischen Anämie manifestiert. In einer sehr interessanten Fallbeschreibung konnten Camschella *et al.*<sup>[9]</sup> einen Patienten im mittleren Lebensalter beschreiben, der auf Grund einer die Spleiseseffizienz betreffenden Mutation nur verminderte Mengen an Grx5 bilden kann. In Übereinstimmung mit der angenommenen Funktion des Grx5 zeigt dieser Patient hypochromische Anämie und Eisen-Dysregulation.

### Eisen-Schwefel-Zentren koordinierende Glutaredoxine

Die geschilderten Befunde stellten zweifelsfrei einen direkten Zusammenhang zwischen der Biogenese von Fe/S-Zentren und Glutaredoxinen her. Dennoch war es eine große Überraschung, als wir 2005 im humanen Grx2 einen Chromophor entdeckten, der sich als Fe/S-Zentrum entpuppte. Dieses 2Fe/2S-Zentrum wird in einem dimeren Holo-Komplex von den N-terminalen Cysteinresten der aktiven Zentren der beiden Glutaredoxin-Monomere koordiniert. Zwei nicht-kovalent gebundene GSH-Moleküle vervollständigen die Koordination dieses Fe/S-Zentrums<sup>[11]</sup>. Der Holo-Grx2-Komplex ist durch die Blockierung der aktiven Zentren enzymatisch inaktiv. Das im Holo-Komplex gebundene GSH steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit freiem GSH. Oxidation des GSH zum Glutathion-Disulfid (GSSG), wie z. B. in Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, führt zu einer Dissoziation des Komplexes. Dies führt zur Freisetzung der Grx2-Monomere und zu ihrer enzymatischen Aktivierung. Daher haben wir für den Fe/S-Cluster die Funktion eines Redoxensors für die Aktivierung des Grx2 durch oxidativen Stress vorgeschlagen<sup>[10, 11]</sup> (**Abb. 2**). Neben dem mitochondrialen Grx2a kann auch die zytosolische Isoform Grx2c den Holo-Komplex ausbilden. Die dritte Grx-Isoform, Grx2b, ist dazu nicht in der Lage<sup>[4]</sup>. Über die Funktion von einer regulierbaren und einer konstitutiv aktiven Grx-Isoform im Zytosol und Nukleus von Spermatozyten und Krebszellen kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

Mittlerweile konnte von der Arbeitsgruppe um J.-P. Jacquot (Nancy) ein sehr ähnlicher Holo-Komplex auch für das Grx-C1 (aktives Zentrum: Cys-Gly-Tyr-Cys) aus der Pappel nachgewiesen werden<sup>[12]</sup>. Was ermöglicht die-

**Tab. 1:** Eigenschaften und Charakteristika humaner Glutaredoxine.

	Aktives Zentrum	Disulfid-Reduktase-Aktivität	Fe/S-Zentrum	Lokalisation/Expression	Angenommene Funktionen
Grx1	Cys-Pro-Tyr-Cys	Ja	Nein	Zytosol/ ubiquitär	Redox-Regulation durch reversible Glutathionylierung
Grx2a	Cys-Ser-Tyr-Cys	Ja	Ja	Mitochondrien/ ubiquitär	Abwehr der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose
Grx2b	Cys-Ser-Tyr-Cys	Ja	Nein	Zytosol und Nukleus/ Hoden und Krebszellen	?
Grx2c	Cys-Ser-Tyr-Cys	Ja	Ja	Zytosol und Nukleus / Hoden und Krebszellen	?
Grx5	Cys-Gly-Phe-Ser	Nein	Ja	Mitochondrien/ ubiquitär	Fe/S-Biosynthese
PICOT	Cys-Gly-Phe-Ser	Nein	?	Zytosol/ubiquitär	Regulation der Proteinkinase C

sen beiden besonderen Dithiol-Glutaredoxinen ein Fe/S-Zentrum zu komplexieren? Mutationsanalysen von uns und der Arbeitsgruppe um J.-P. Jacquot zeigen eindeutig, dass der Austausch des Prolins im aktiven Cys-Pro-Tyr-Cys-Zentrum durch ein Serin oder Glycin ausreichend ist, anderen Dithiol-Glutaredoxinen die Fähigkeit zur Fe/S-Clusterbindung zu verleihen<sup>[11, 12]</sup>. Unsere vorläufigen Ergebnisse, wie auch die anderer, deuten darauf hin, dass auch diese Glutaredoxine mit ihrem Cys-Gly-Phe-Ser-Motiv im aktiven Zentrum Fe/S-Zentren binden können. Dies könnte auch ein weiterer Hinweis auf die mögliche Funktion der Monothiol-Glutaredoxine in der Fe/S-Cluster-Biogenese sein. Ohne Zweifel verspricht die Forschung rund um die Glutaredoxine eine spannende Zukunft.

### Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, den Karolinska Institutet Research Foundations und der Schwedischen Kinderkrebs Gesellschaft (Barncancerfonden) für Ihre finanzielle Unterstützung. ■

### Literatur

- [1] Holmgren, A. (1976): Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2275–2279.
- [2] Lillig, C. H., Holmgren, A. (2007): Thioredoxin and related molecules - from biology to health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 25–47.
- [3] Lillig, C. H., Lönn, M. E., Enoksson, M., Potamitou Fernandes, A., Holmgren, A. (2004): Short interfering RNA-mediated silencing of glutaredoxin 2 increases the sensitivity of HeLa cells towards doxorubicin and phenylarsine oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13227–13232.
- [4] Lönn, M. E., Hudemann, C., Berndt, C., Cherkasov, V., Capani, F., Holmgren, A., Lillig, C. H. (2008): Expression pattern of human Glutaredoxin 2 isoforms: Identification and characterization of two testis/cancer cell-specific isoforms. *Antioxid. Redox Signal.* (ahead of print. doi:10.1089/ars.2007.1821).
- [5] Rodriguez-Manzanique, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., Herrero, E. (2002): Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* 13: 1109–1121.
- [6] Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., Lill, R. (2003): Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 22: 4815–4825.
- [7] Lill, R., Mühlenhoff, U. (2006): Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 457–486.
- [8] Wingert, R. A., Galloway, J. L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J. L., Weber, G. J., Dooley, K., Davidson, A. J., Schmid, B., Paw, B. H., Shaw, G. C., Kingsley, P., Palis, J., Schubert, H., Chen, O., Kaplan, J., Tübingen Screen Consortium, Zon, L. I. (2005): Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436: 1035–1039.
- [9] Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., Iolascon, A. (2007): The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110: 1353–1358.
- [10] Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., Holmgren, A. (2005): Characterization of human glutaredoxin 2 as new iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8168–8173.
- [11] Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E. M., Axelsson, R., Holmgren, A., Lillig, C. H. (2007): How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid. Redox Signal.* 9: 151–157.
- [12] Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S. K., Hirasawa, M., Gualberto, J. M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D. B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M. K., Jacquot, J. P. (2007): Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 7379–7378.

### Korrespondenzadresse:

Dipl.-Biol. Christoph Hudemann  
The Medical Nobel Institute for Biochemistry  
Dep. of Medial Biochemistry and Biophysics  
Karolinska Institutet  
Scheeles väg 2  
SE-17177 Stockholm  
Tel.: +46-8-52487725  
Fax: +46-8-7284716  
christoph.hudemann@ki.se

### AUTOREN



#### Christoph Hudemann

Jahrgang 1979. 1999–2004 Studium der Biologie an der Universität Kassel. Seit 2005 Doktorand in der Arbeitsgruppe Lillig am Medical Nobel Institute for Biochemistry, Karolinska Institutet, Stockholm.



#### Carsten Berndt

Jahrgang 1974. 2000 Diplom-Biologe und 2004 Promotion (Dr. rer. nat.), Ruhr-Universität Bochum. Seit 2004 Postdoc/Gruppenleiter am Medical Nobel Institute for Biochemistry, Karolinska Institutet, Stockholm. 2007 Gastwissenschaftler am Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps Universität Marburg.



#### Christopher Horst Lillig

Jahrgang 1972. 1998 Diplom-Biologe und 2001 Promotion (Dr. rer. nat.), Ruhr-Universität Bochum. Seit 2001 Postdoc/Gruppenleiter am Medical Nobel Institute for Biochemistry, Karolinska Institutet, Stockholm. Seit 2006 unabhängiger Nachwuchsgruppenleiter im Sonderforschungsbereich 593, Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps Universität Marburg.