



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



Collegium Sciences et Technologies
Ecole Doctorale SESAMES

UNIVERSITE DE LORRAINE

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE
Spécialité Physique

Présentée par
Thomas RORET

Thèse dirigée par Claude DIDIERJEAN

**Caractérisation structurale d'états oligomériques de
protéines impliquées dans l'homéostasie du fer :
les protéines BOLA et les glutarédoxines**

Soutenance publique prévue le 28 Novembre 2014,
devant le jury composé de :

Rapporteurs

David PIGNOL – Directeur de recherche CEA, Université Aix-Marseille
Olivier WALKER – Maître de Conférences HDR, Université Claude Bernard Lyon 1

Examineur

Nicolas ROUHIER – Professeur, Université de Lorraine – Président du jury

Directeur de Thèse

Claude DIDIERJEAN – Maître de Conférences HDR, Université de Lorraine

Invités

Claude SAUTER – Chargé de Recherche, Université de Strasbourg
Pascale TSAN – Maître de Conférences, Université de Lorraine

CRM2 (UMR UL-CNRS 7036)
Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine
BP 70239, Boulevard des Aiguillettes
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy CEDEX

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Claude DIDIERJEAN ainsi que Pascale TSAN pour leur présence à mon mariage, leur gentillesse, leur disponibilité et sans qui tout ce travail n'aurait pas été réalisé. Donc un grand merci à vous pour m'avoir fait découvrir la cristallographie et la résonance magnétique nucléaire appliquées aux protéines.

Merci également à Frédérique, Guillermo, Manu et Sandrine qui m'ont aidé de près ou de loin durant toutes ces années. Merci à Abou, Fred et Jérémy ces stagiaires que j'ai encadrés et avec qui j'ai pu voir d'autres sujets que celui de ma thèse. Je remercie également tout le personnel du CRM2 pour m'avoir accueilli.

Je souhaite remercier tout particulièrement le professeur Nicolas Rouhier du laboratoire IAM pour les discussions très enrichissantes et le travail réalisé. Merci également à Anne, Éric, Henri, Jérémy, Jonathan, Mélanie et Paul pour leur apport personnel et scientifique.

Les Etats-Unis, quelle belle opportunité et expérience. Alors merci au professeur Michael K. Johnson qui nous a accueilli au sein de son laboratoire. Merci à ses thésardes qui nous ont montré les différentes expériences possibles sur les protéines-FeS et les bons endroits où manger.

Merci à Flo, G2 et Stef mes amis d'enfance pour être restés après toutes ces années. Même si cela devient difficile de se voir, j'apprécie toujours nos soirées !!!

Pour finir je tiens à remercier mes parents que j'aime tant. Je remercie aussi mes beaux-parents pour leur gentillesse et pour avoir fait d'une personne un être exceptionnel. Cette personne qui partage ma vie depuis 4 ans et qui est devenue ma femme l'été dernier. Et comme on garde toujours le meilleur pour la fin, je te remercie Chahrazed pour partager ma vie, pour m'avoir aidé, encouragé et fait de moi ce que je suis maintenant. Sans ton aide et ton amour inconditionnel tout ceci n'aurait jamais été possible.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	7
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. LES PROTEINES DE LA FAMILLE « BOLA »	16
I.A. UN NOUVEAU MORPHOGENE	18
I.A.1. DECOUVERTE ET ETYMOLOGIE	18
I.A.2. CLASSIFICATION	19
I.B. IMPORTANCE AU NIVEAU CELLULAIRE	21
I.B.1. UN PROCESSUS FTSZ-DEPENDANT	21
I.B.2. INTERVENTION SUR LA SYNTHSE DU PEPTIDOGLYCANE CHEZ E. COLI	21
I.B.3. IMPACT SUR LA VIE DE LA CELLULE	22
I.C. BOLA : UN GROUPE DE PROTEINES STRESS-INDUCTIBLE	24
I.C.1. UN GENE SOUS-CONTROLE	24
I.C.1.a. Spécificités d'expression	24
I.C.1.b. Régulation de l'expression génique	25
I.C.1.c. Régulation post-transcriptionnelle	27
I.C.1.d. Régulation environnementale	28
I.C.2. MISE EN PLACE D'UN SYSTEME DE DEFENSE	30
I.D. ACTIVATEUR/REPRESSEUR DE TRANSCRIPTION	31
I.D.1. STRUCTURE DES BOLA_H ET DES BOLA_C	31
I.D.2. IMPLICATION DES BOLA_H LORS DE LA DIVISION CELLULAIRE	35
I.E. BOLA ET GLUTAREDOXINES, DEUX PARTENAIRES ETROITEMENT LIES	39
I.E.1. INTERACTION BOLA-GLUTAREDOXINES	39
I.E.2. LES HETERODIMERES BOLA_C - GLUTAREDOXINES	41
I.E.3. QUELLE(S) IMPLICATION(S) DANS LE METABOLISME DU FER ?	43
II. LES GLUTAREDOXINES	50
II.A. DESCRIPTION DES GLUTAREDOXINES	50
II.A.1. CLASSIFICATION	50
II.A.2. LES GLUTAREDOXINES SOUS FORME « APO »	52
II.A.2.a. Structure des glutarédoxines sous forme monomérique	52

II.A.2.b. Les différents états des glutarédoxines sous-forme apo	53
II.A.3. STRUCTURE DES GLUTAREDOXINES SOUS FORME « HOLO »	54
II.A.3.a. Les dimères	54
II.A.3.b. Les tétramères	56
II.B. FONCTION ENZYMATIQUE DES GLUTAREDOXINES	57
II.B.1. LES GLUTAREDOXINES DANS LE STRESS OXYDANT	58
II.B.2. LES GLUTAREDOXINES DANS L'HOMÉOSTASIE DU FER	60
II.C. REGULATION DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION	63
II.C.1. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION TGA ET LES GLUTAREDOXINES DE CLASSE III	63
II.C.2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AFT ET LE COUPLE BOLA-GRX DE CLASSE II	64
III. LES CYSTEINE DESULFURASES	68
III.A. CLASSIFICATION	68
III.A.1. LA CYSTEINE DESULFURASE DE L'OPÉRON NIF	69
III.A.2. LA CYSTEINE DESULFURASE DE L'OPÉRON ISC	70
III.A.3. LA CYSTEINE DESULFURASE DE L'OPÉRON SUF	71
III.A.4. LA CYSTEINE DESULFURASE DE L'OPÉRON CSD	72
III.B. PROPRIÉTÉS DES CYSTEINE DESULFURASES	73
III.B.1. STRUCTURE	73
III.B.2. MÉCANISME ENZYMATIQUE	74
III.B.3. LES CYSTEINE DESULFURASES DE PLANTES	75
III.B.3.a. Identification chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
III.B.3.b. Implications biologiques	76
OBJECTIFS	79
RESULTATS ET DISCUSSION	83
I. CHAPITRE N°1 : LES DIFFÉRENTS PARTENAIRES DE LA PROTÉINE BOLA	89
I.A. APO/HOLO-DIMERISATION GRX-BOLA	89
I.A.1. INTRODUCTION	89
I.A.2. RESULTATS ET DISCUSSION	90
I.A.3. ARTICLE	93
I.B. HOMODIMERISATION DES BOLA	111
I.B.1. INTRODUCTION	111

I.B.2. RESULTATS ET DISCUSSION	112
I.B.2.a. Cristallisation et affinement de la structure	112
I.B.2.b. Description de la structure	114
I.B.2.c. Le dimère covalent des BolA_C	116
I.B.2.d. Le dimère non-covalent	118
I.C. LES PROTEINES BOLA ET LES METAUX	121
I.C.1. INTRODUCTION	121
I.C.2. RESULTATS ET DISCUSSION	122
I.C.2.a. Cristallisation et affinement de la structure	122
I.C.2.b. Description de la structure	128
I.C.2.c. Les BolA et les métaux	132
II. CHAPITRE N°2 : PARTENAIRES BIOLOGIQUES DE BOLA, LES GRX	137
II.A. IMPLICATION DANS L'HOMEOSTASIE DU FER	137
II.A.1. INTRODUCTION	137
II.A.2. REVUE	137
II.B. LA SIGNATURE CATALYTIQUE N'IMPOSE PAS LE TYPE DE DIMERISATION	155
II.B.1. LA GLUTAREDOXINE C5 D'ARABIDOPSIS THALIANA	155
II.B.1.a. Introduction	155
II.B.1.b. Résultats et discussion	156
II.B.1.c. Article	158
II.B.2. LA GLUTAREDOXINE 2 DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII	183
II.B.2.a. Introduction	183
II.B.2.b. Résultats et discussion	184
III. CHAPITRE N°3 : LA CYSTEINE DESULFURASE ATNFS2	193
III.A.1. INTRODUCTION	193
III.A.2. RESULTATS ET DISCUSSION	194
III.A.3. ARTICLE	196
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	215

Liste des abréviations

A. thaliana ou At : *Arabidopsis thaliana*

A. vinelandii : *Azotobacter vinelandii*

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

B. bovis ou Bb : *Babesia bovis*

BolA_C : BolA possédant une cystéine conservée

BolA_H : BolA possédant une histidine conservée

bolap1 : promoteur P1 de la BolA d'*Escherichia coli*

bolap2 : promoteur P2 de la BolA d'*Escherichia coli*

C. burnetii ou Cb : *Coxiella burnetii*

C. reinhardtii ou Cr : *Chlamydomonas reinhardtii*

CC : coefficient de corrélation

CD : cystéine désulfurase

CSD : Cysteine Sulfinatase Desulfinase

DHAR : déhydroascorbate réductase

E. chaffeensis : *Ehrlichia chaffeensis*

E. coli ou Ec : *Escherichia coli*

ESRF : European Synchrotron Radiation Facility

FOM : Figure of merit

Fra2 : Fe repressor of activation 2

FtsZ : Filamenting temperature-sensitive mutant Z

Grx : glutarédoxine

GSH : glutathion

HED : β -hydroxyethyl disulfide

Hs : *Homo sapiens*

HTH : helix-turn-helix

IAM : Interactions Arbres-Microorganismes

ISC : Iron–Sulfur Clusters

KH : hnRNP K homology

MAD : Multiple-wavelength Anomalous Diffraction

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NIF : NItrogen-Fixation

P. falciparum : *Plasmodium falciparum*

PBP : Penicillin Binding Protein

PDB : Protein Data Bank

PICOT : PKC-Interacting Cousin Of Thioredoxin

PLP : pyridoxal-5'-phosphate

PPI : interaction protéine-protéine

Pt : *Populus tremula x populus tremuloides*

RMN : résonance magnétique nucléaire

RMSD : Root-mean-square deviation

S. cerevisiae ou Sc : *Saccharomyces cerevisiae*

S. meliloti ou Sm : *Sinorhizobium meliloti*

SAD : Single-wavelength Anomalous Diffraction

SUF : SUIFur-mobilization

T. brucei ou Tp : *Trypanosoma brucei*

σ S (σ 38 ou RpoS) ou σ D (σ 70 ou RpoD) : sous-unité de l'ARN polymérase

Introduction

Au sein des cellules, le génome contient les informations nécessaires à la production de protéines qui permettent notamment de réguler la vie cellulaire en réponse à une multitude de stimuli internes ou externes. Ainsi l'expression des protéines est un processus dynamique qui s'explique par le fait que les protéines utilisées pour effectuer des tâches spécifiques ne doivent pas toujours être exprimées ou activées mais parfois réprimées afin d'avoir des effets synergiques ou même antagonistes. Ces caractéristiques de base des protéines suggèrent une complexité qui peut être difficile à étudier, surtout lorsque l'on tente de comprendre la fonction des protéines dans le contexte biologique approprié. Comme la majorité des protéines interagissent avec d'autres protéines pour le bon fonctionnement des cellules, l'identification des interactions protéine-protéine (PPI) est de plus en plus étudiée afin de comprendre pleinement leur fonction biologique. Les PPI peuvent être classées en deux groupes selon que le complexe formé entre les différents partenaires est stable ou transitoire indépendamment de l'affinité. Les interactions dites stables sont celles qui sont associées à des protéines que l'on peut purifier sous forme de complexes multi-sous-unités, et les sous-unités de ces complexes peuvent être identiques (homo) ou différentes (hétéro). A l'opposé les interactions dites transitoires servent à contrôler de nombreux processus cellulaires. Comme son nom l'indique, ces interactions transitoires sont de nature temporaire et nécessitent généralement un ensemble de conditions favorisant l'interaction. Ces interactions s'effectuent le plus souvent au niveau d'un domaine dit de fixation ou de reconnaissance. Dans certains cas, la mise en évidence de PPI est une étape critique pour identifier et comprendre la fonction de certaines protéines.

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de doctorat qui concerne la compréhension de PPI entre différents partenaires biologiques impliquant les protéines BolA, les glutarédoxines (Grx) et les cystéine désulfurases (CD). L'un des objectifs était de caractériser structuralement les

différents modes d'interaction de ces partenaires biologiques entre eux dont les hétérocomplexes Grx-BolA pouvant se former en présence ou en absence de fer. Le but étant de faciliter la compréhension des différents mécanismes impliqués notamment dans l'homéostasie du fer.

Ces travaux de thèse se sont déroulés au sein du laboratoire CRM2 (Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, UMR UL-CNRS 7036) et plus particulièrement au niveau de l'équipe BIOMOD (Biostructures et Modélisation). Les résultats structuraux mis en avant durant cette thèse ont été obtenus par des approches expérimentales très variées incluant la cristallographie des rayons X sous la direction de Claude Didierjean, la résonance magnétique nucléaire (RMN) sous la direction de Pascale Tsan et d'autres méthodes spectroscopiques en collaboration avec les professeurs Nicolas Rouhier du laboratoire IAM (Interactions Arbres-Microorganismes, UMR UL-INRA 1136) et Michael K. Johnson (Department of Chemistry and Center for Metalloenzyme Studies, University of Georgia, USA).

Le manuscrit se présente sous la forme de deux grandes parties où la première retrace les connaissances actuelles sur les familles de protéines étudiées et la seconde partie quant à elle, rassemble et discute les résultats obtenus durant cette thèse.

- La première famille de protéines décrite dans la synthèse bibliographique porte sur les protéines BolA initialement définies comme des régulateurs de la transcription induits lors d'un stress (Guinote et al, 2011).
- La deuxième famille de protéines à être abordée est celle des Grx qui sont de petites oxydoréductases fonctionnant avec le glutathion (GSH) (Fernandes & Holmgren, 2004). Cependant elles sont aussi impliquées dans la régulation de facteurs de transcription, dans l'homéostasie du fer et nécessitent la présence de BolA pour réguler l'entrée et le stockage du fer dans les cellules (Li et al, 2009a).

- La troisième et dernière famille de protéines décrite est celle des cystéine désulfurases qui sont impliquées dans la biosynthèse des centres Fe-S (Johnson et al, 2005). Certaines CD présentent une forte activité sélénocystéine lyase et une faible activité cystéine désulfurase nécessitant alors la présence d'une sulfurtransférase (Outten et al, 2003). Les CD de plantes (Nfs) ont notamment comme partenaire la sulfurtransférase SufE1 qui possède un domaine C-terminal BolA pouvant interagir avec les Grx de classe II (Ye et al, 2006).

A la suite de la synthèse bibliographique les caractérisations structurales de différents complexes BolA/BolA, BolA/Grx (apo et holo), Grx/Grx (holo) et Nfs2/SufE1 sont présentés (Figure n°1).

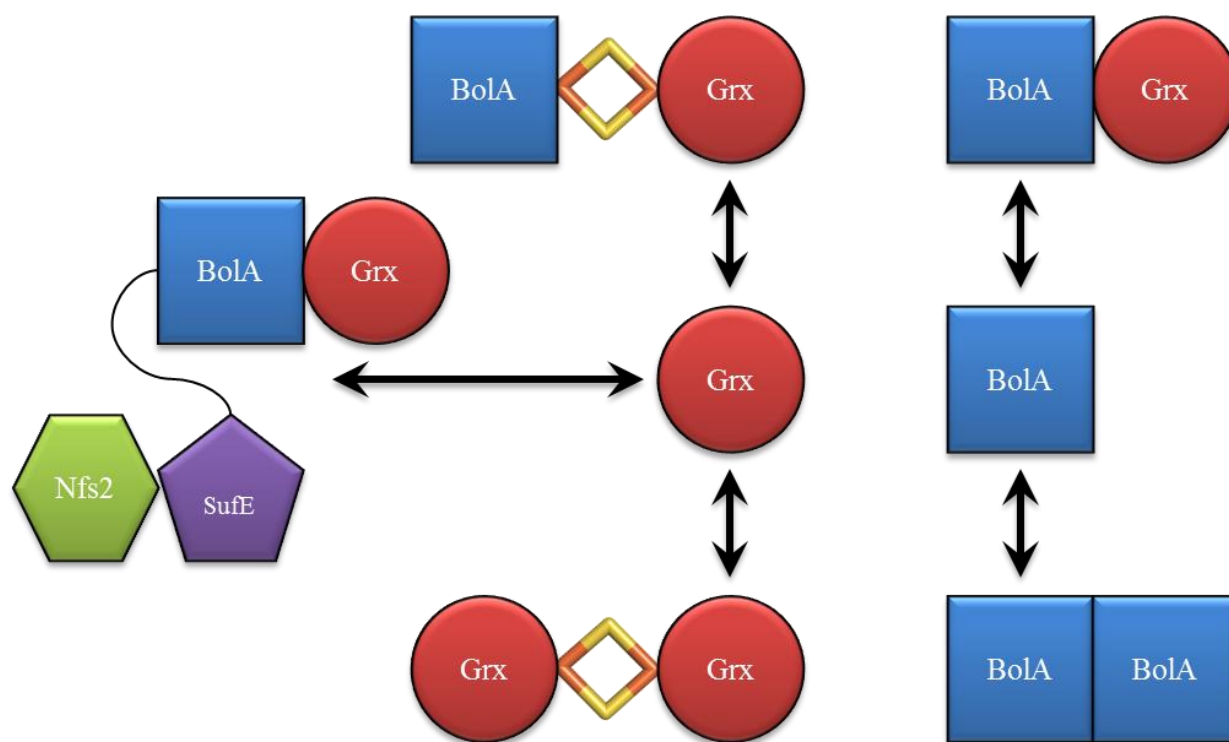
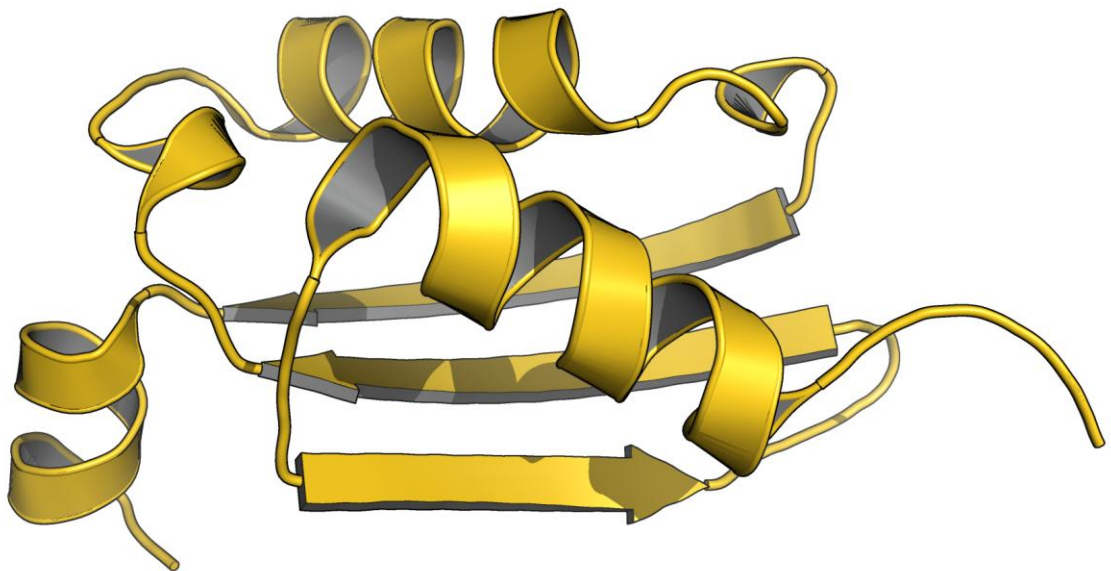


Figure n°1 Représentation schématique des différents états oligomériques des protéines BolA et glutarédoxines. La plupart de ces états ont été étudiés et/ou caractérisés structuralement durant ma thèse.

*Synthèse
bibliographique*

Les protéines de la famille « Bola »



I. Les protéines de la famille « BOLA »

Les organismes multicellulaires sont composés de cellules spécialisées vis-à-vis des fonctions qu'elles assument et interagissent entre elles de façon à assurer le bon fonctionnement de l'ensemble. Chaque cellule contrôle les informations qu'elle reçoit de son environnement qui est composé soit d'autres cellules, soit du milieu extracellulaire. L'harmonie de ces cellules entre elles ainsi que leur survie dépend des nombreux échanges permanents d'informations et de composés avec l'environnement. Ces échanges et l'équilibre qui en résultent sont à la base de la vie. Quand le signal extérieur perçu par la cellule révèle un danger, un système d'alerte plus ou moins complexe se met en place. Afin de se défendre et de se protéger, les cellules ont mis en place un contrôle dynamique s'adaptant aux différents stress environnementaux et visant à proposer des solutions adéquates permettant de réguler l'expression génique. Dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes de défense cellulaire envers les stress ainsi que les voies métaboliques de certains composés essentiels à la vie, de grands projets scientifiques ont été menés durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle et se poursuivent toujours à l'heure actuelle. L'exposé ci-dessous a pour objectif de présenter une famille de petites protéines (BOLA) découvertes à la fin des années 1980 et impliquées dans de nombreuses voies biologiques telles que la régulation du cycle cellulaire, le maintien de l'intégrité cellulaire et le métabolisme du fer via son interaction avec des Grx de classe II aussi nommées « Grx-CGFS ». Au-delà même de ces différentes implications à différents endroits et à différents moments de la vie d'une cellule, les protéines de la famille BOLA (Figure n°2) sont impliquées dans des interactions qui peuvent être très différentes (interaction avec des acides nucléiques ou des protéines) mais aussi très spécifiques (en réponse à différents stress). Cependant à l'heure actuelle, le mécanisme moléculaire par lequel les protéines BOLA jouent un rôle dans la cellule reste à être élucidé.

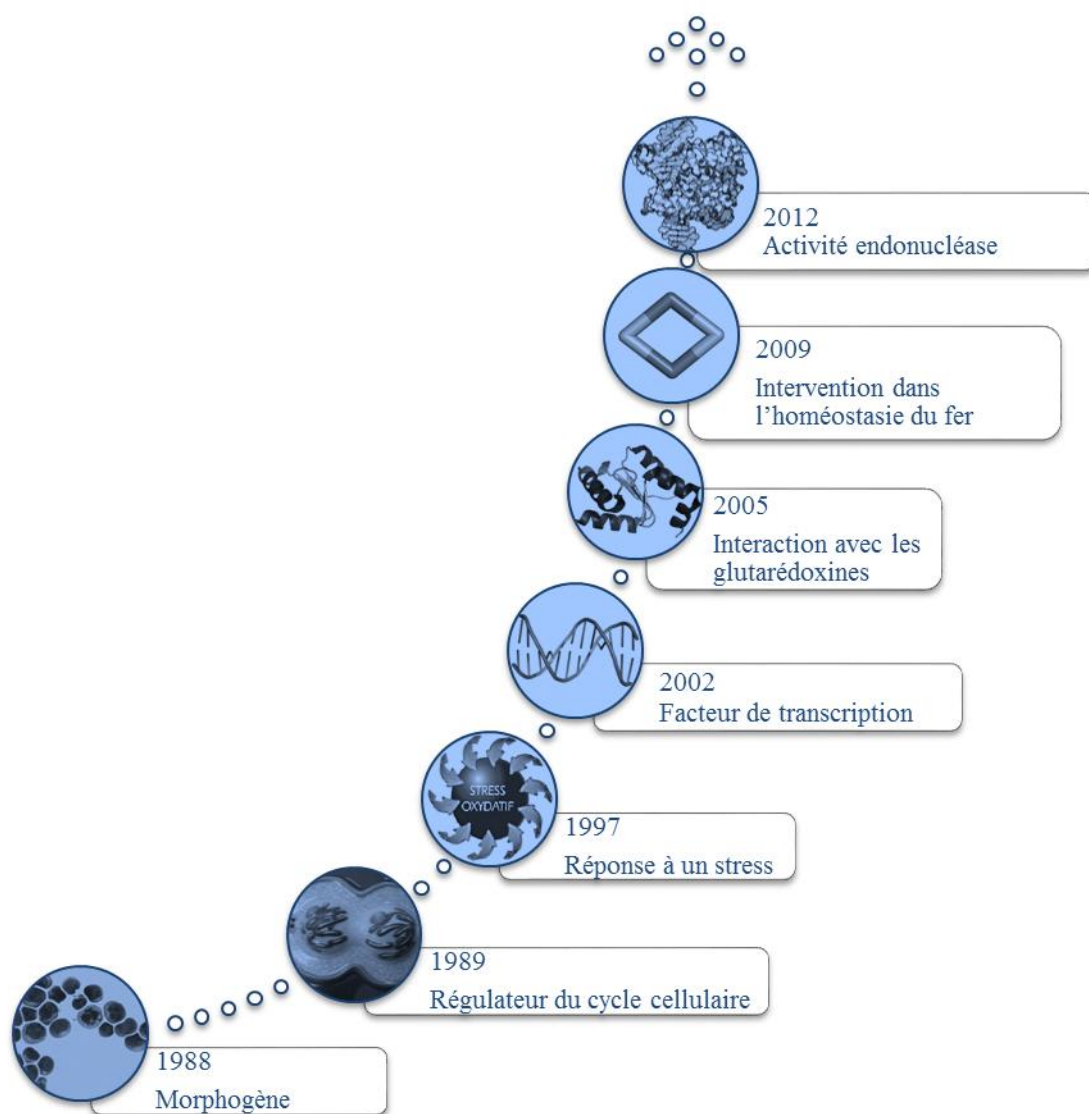


Figure n°2 Schéma récapitulatif des différentes fonctions mises en évidence pour les protéines de la famille « BOLA » (Aldea et al, 1989; Aldea et al, 1988; Huynen et al, 2005; Kim et al, 1997; Li et al, 2009a; Santos et al, 2002; Shukla et al, 2012).

I.A. Un nouveau morphogène

I.A.1. Découverte et étymologie

Escherichia coli est une bactérie intestinale à gram négatif retrouvée principalement chez les mammifères et utilisée entre autres en biologie moléculaire pour la production de protéines recombinantes. Pendant les années 1980 de nombreuses expériences ont été entreprises chez *E. coli* afin de mieux connaître les régulations cellulaires et les phénomènes mis en jeu lors du changement de morphologie au cours de la division cellulaire. Ce changement brutal de la forme de la cellule peut être apparenté à un stress dont la cellule devra répondre pour assurer son bon fonctionnement. En effet, lors de la division cellulaire les cellules d'*E. coli* adoptent suite à un stress donné une morphologie ronde en dépit d'une forme allongée classique. C'est en 1988, suite à des expériences chez *E. coli* qu'a été découverte une nouvelle petite protéine de 105 acides aminés suite à sa surexpression (Aldea et al, 1988). En effet, il s'avère que durant la surexpression et l'accumulation de cette protéine, le passage d'une forme allongée classique à une forme ronde osmotiquement stable fut observé (Figure n°3) (Lange & Hengge-Aronis, 1991).

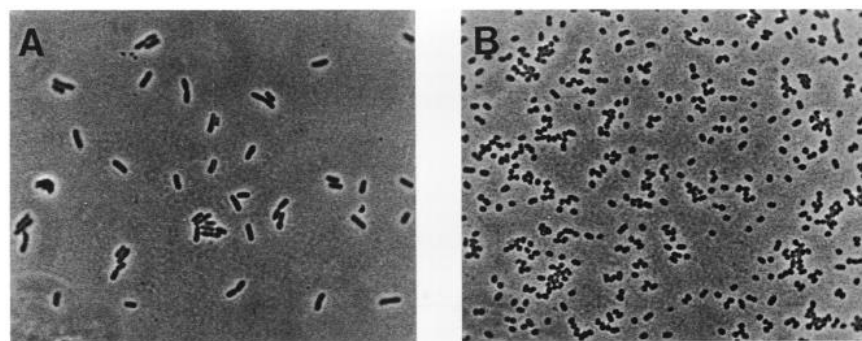


Figure n°3 Micrographie des cellules d'*Escherichia coli* à différents moments du cycle cellulaire. (A) photo prise très rapidement après le début de la culture cellulaire. (B) photo prise pendant la phase stationnaire. La protéine BolA va influencer l'expression de gènes pendant la phase stationnaire ce qui aura pour effet de conduire à la formation de cellules rondes au lieu de la forme allongée classique, adapté de (Lange & Hengge-Aronis, 1991).

Ainsi pour faire référence à cette particularité, la protéine nouvellement découverte par un groupe espagnol fut baptisée BolA qui signifie « boule » en espagnol. C'est ainsi que la première fonction de BolA fut définie de par sa capacité à induire un changement de morphologie des cellules d'*E. coli*. Dans le cas de la protéine BolA on parle alors d'un rôle de morphogène puisque cette protéine induit un changement de la morphologie cellulaire selon sa concentration (Aldea et al, 1988). Bien que les protéines BolA soient connues pour avoir un rôle de morphogène, elles sont également impliquées dans de nombreux mécanismes indépendants de la morphologie cellulaire ce qui rend la compréhension globale de leur fonction difficile.

I.A.2. Classification

Une toute première classification avait été établie sur la base des deux isoformes retrouvés chez *E. coli*. Ainsi les deux isoformes étaient appelés BolA et YrbA (Aldea et al, 1988; Blattner et al, 1997). A l'heure actuelle les protéines « BolA » sont généralement séparées en deux grands groupes selon la nature d'un des deux résidus potentiellement impliqués dans la coordination des centres Fe-S (Willems et al, 2013). Le premier est une histidine invariante et le second (une cystéine ou une autre histidine) permet de distinguer les BolA à cystéine (BolA_C) des BolA à histidine (BolA_H). De manière générale les BolA_H sont ubiquitaires alors que les BolA_C sont très majoritairement retrouvées au sein des organismes eucaryotes. Cependant une autre classification existe basée sur la séquence des BolA mais aussi selon leur localisation cellulaire. Les différents représentants des BolA eucaryotes sont alors nommés BolA1, BolA2, BolA3 et BolA4 (Figure n°4). Le sous-groupe BolA1 est composé de protéines BolA_H dont la localisation cellulaire est plutôt mitochondriale chez l'humain (Willems et al, 2013) et chloroplastique chez les plantes (Couturier et al, 2014). Contrairement à son homologue bactérien, la surexpression de BolA1 n'engendre pas de changement morphologique au niveau de

la mitochondrie (Willems et al, 2013). Bien que les sous-groupes BolA2 et BolA3 soient composés de BolA_C, ils se distinguent par leur localisation cellulaire. BolA2 est plutôt nucléocytoplasmique alors que BolA3 est plutôt mitochondriale (Willems et al, 2013). Le sous-groupe BolA4 composé de BolA_H a une localisation cellulaire qui peut être soit mitochondriale soit chloroplastique (Couturier et al, 2014). Chez les plantes seules les isoformes BolA1, BolA2 et BolA4 sont retrouvés. Le sous-groupe BolA4 est également le seul à être retrouvé chez les archées et les cyanobactéries.

```

302E -MVTTHDIKQWIETGLSE-----SRVISAEGDGHFFEAVVLCPTFEGQTALTRHRL 50
1V60 AGPVEAAIRAKLEQALSPEVLELRNESGGHAVPAGSETHFRVAVVSSRFEGMSPLQRHRL 60
3TR3 -MVSKSIVEERLRSMSPQFLKVT-DNS-----GGCGAAFNAYIVSQQFEGKLLDRQRL 53
1V9J MELSADYLRKLRQDLEAEHVEVEDTTL-----NRCATSFRLVVSASFEGKPLLQRHRL 55

```

```

302E VYNALGSHMQSDIHIALSLKTYTPDEYER----- 79
1V60 VHEALSEELAGPVHALAIQAKTPAQWRENQOLDISPPCLGGSKKTRGTS 109
3TR3 VNSAIAAEMP-QIHAFATMKCLTPGEWEAKNRPEE----- 86
1V9J VNECLAEELP-HIHAFEQTLTPEQWTRQRE----- 86

```

Figure n°4 Alignement structural des protéines BolA. Sur cet alignement structural, les deux résidus invariants des BolA sont surlignés en noir (Phe39 et His64), la cystéine des BolA_C et l'histidine des BolA_H sont surlignées en jaune. 3TR3 : BolA de *Coxiella burnetii* ; 1V9J et 1V60 : BolAs de *Mus musculus* ; 3O2E : BolA de *Babesia bovis*.

Au sein de certains organismes, la protéine « BolA » est remplacée par un équivalent plus spécifique, dépendant alors du milieu extracellulaire et du type de réponse tel qu'Uvi31⁺ par exemple qui est impliqué dans la défense cellulaire contre la lumière UV (Kim et al, 2002). Pour toutes ces protéines on parle alors de la grande famille « BolA » regroupant la première BolA d'*E. coli* découverte ainsi que tous ses homologues retrouvés dans tous les organismes et indépendamment de leur localisation cellulaire.

I.B. Importance au niveau cellulaire

I.B.1. Un processus FtsZ-dépendant

Lors de la division cellulaire les différents composants de la cellule sont séparés par la formation du septum amenant à l'étape de cloisonnement. Cette étape qui se déroule au milieu de la cellule débute par la formation d'un anneau composé majoritairement de nombreuses protéines FtsZ (Filamenting temperature-sensitive mutant Z) au niveau du futur septum (Margolin, 2005). Les effets du couple BolA-FtsZ sur la forme des cellules d'*E. coli* peuvent être supprimés en l'absence de l'une de ces deux protéines. Dans ces cas précis les cellules d'*E. coli* conservent leur forme allongée classique. Ainsi des relations possibles entre la protéine BolA et des gènes impliqués dans la morphogénèse de la cellule suggèrent l'existence d'un processus FtsZ-dépendant. Ce processus pourrait intervenir dans les étapes précoces de la formation du septum en assurant ainsi une protection mécanique et physique par altération de la conformation du peptidoglycane qui est le principal composant des parois cellulaires bactériennes. En outre, chez les procaryotes le gène *ftsZ* est impliqué dans le système de survie des bactéries en réponse à des dommages importants causés sur l'ADN appelé « réponse SOS » alors que BolA ne fait pas parti de ce système (Jerman et al, 2005; Kim et al, 1997).

I.B.2. Intervention sur la synthèse du peptidoglycane chez E. coli

Les changements observés lors du cycle de division cellulaire étant nombreux, une régulation fine des différents acteurs impliqués dans ce processus est nécessaire. La protéine PBP5 (Penicillin Binding Protein 5) déjà identifiée à la fin des années 1970, joue un rôle important dans le processus conférant une morphologie différente à ces cellules. La surexpression de PBP5 joue un rôle avec PBP6 (possédant une activité carboxypeptidase) et d'autres PBP dans les étapes finales de la biosynthèse du peptidoglycane chez *E. coli* (Santos et al, 2002). Cette

synthèse est essentielle à la croissance, à la division cellulaire (reproduction) et au maintien de la structure cellulaire des bactéries. Afin de vérifier la fonction de la BolA d'*E. coli* et son implication en tant que morphogène, de nombreuses expériences ont été entreprises dans le but de savoir si un lien entre BolA et les PBP existe. Ainsi des expériences ont été réalisées sur des souches d'*E. coli* en présence d'antibiotique contre toutes les PBP (excepté PBP2 qui est responsable de l'extension latérale du peptidoglycane) pour voir l'impact de BolA sur la cellule (Freire et al, 2009). Il s'avère que la surexpression de BolA est incapable d'inverser la morphologie en filament lorsque l'étape de cloisonnement (fin de télophase et étape précédant la division cellulaire) est bloquée. De plus les cellules sont incapables d'avoir une forme allongée si BolA est surexprimée avant l'inhibition du cloisonnement. Bien qu'aucune relation n'ait été trouvée entre les effets morphologiques de la surexpression de BolA et des gènes impliqués dans l'élongation de la cellule, des observations suggèrent que la protéine BolA pourrait être impliquée dans la commutation entre l'élongation cellulaire et les systèmes de cloisonnement au cours du cycle de division cellulaire. Pour renforcer l'idée que BolA joue un rôle majeur au niveau du cycle cellulaire, il s'avère que la réalisation d'un mutant $\Delta b o l a$ entraîne la diminution de synthèse de PBP5 et/ou de PBP6.

I.B.3. Impact sur la vie de la cellule

La surexpression des protéines BolA n'est pas létale en soi pour la cellule mais elle la rend beaucoup plus sensible à un antibiotique de la classe β -lactame, l'ampicilline qui inhibe la troisième et dernière étape de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne (Santos et al, 2002). L'implication des protéines BolA dans de nombreux processus reliés à la morphologie des cellules n'entraîne pas une diminution de la durée de vie de celles-ci. Bien que sa fonction exacte à ce niveau ne soit pas encore très bien connue, il a été montré que les gènes codant pour les

protéines BolA sont le plus souvent surexprimés suite à l'application d'un stress. Ceci engendre une morphologie ronde des cellules d'*E. coli* ce qui est plutôt un point positif (Aldea et al, 1988). En effet, l'adaptabilité des cellules contre le milieu environnant plutôt agressif dans certains cas permet à celles-ci de survivre. Cette réponse serait alors un moyen de défense pour la cellule en réduisant la surface exposée à l'environnement néfaste ou défavorable.

Dans le cas de la bactérie *Ehrlichia chaffeensis* la protéine BolA participe à la surexpression de protéines de surface lorsque la bactérie se retrouve sous forme dense. Cette modification chez *E. chaffeensis* rend la bactérie beaucoup plus résistante au stress oxydant et la rend également beaucoup plus virulente (Cheng et al, 2011).

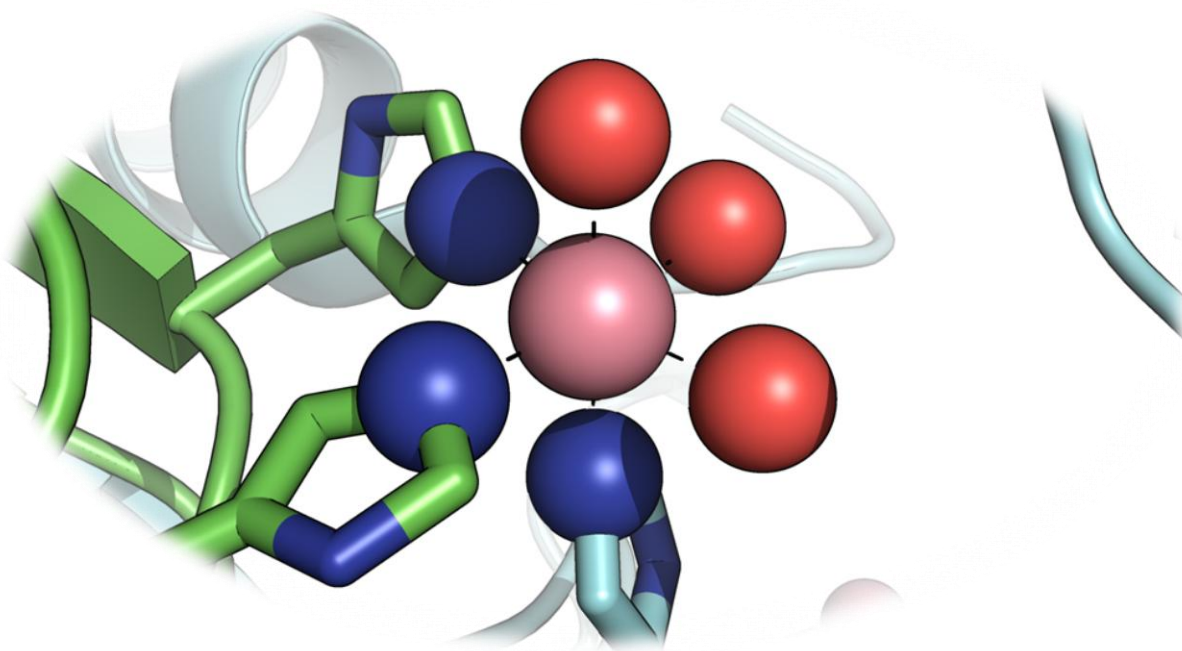


Figure n°5 Représentation de la protéine BolA de *Coxiella burnetii* en complexe avec du cobalt (sphère rose). La coordination du métal s'effectue par les histidines des BolA_H (atomes d'azote représentés par des sphères bleues) et par des molécules d'eau (atomes d'oxygène représentés par des sphères rouges).

Les protéines de la famille « BolA » semblent donc être impliquées au niveau de la vie cellulaire. Il a été montré récemment que BolA confère une résistance aux métaux lourds tels que le zinc, le cobalt, le cadmium et le manganèse (Figure n°5) en interférant avec l'homéostasie du fer chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lehembre et al, 2013). Au-delà de leur impact sur la division cellulaire elles jouent également un rôle lors de la prolifération cellulaire (Guinote et al, 2011). Ces rôles pourraient être assurés par la capacité des protéines BolA à réguler certains gènes par des interactions protéine-acides nucléiques (ADN ou ARN) (Guinote et al, 2011) ou par des PPI (Li & Outten, 2012).

I.C. BolA : un groupe de protéines stress-inductible

I.C.1. Un gène sous-contrôle

I.C.1.a. Spécificités d'expression

Chez *E. coli*, *bola* possède deux promoteurs (Figure n°6) ce qui est assez atypique mais peut être expliqué par son rôle de réponse à un stress. La présence de deux promoteurs pour un seul gène atteste de la finesse de la régulation du gène en question (Freire et al, 2006a). En effet, le promoteur P1 inductible (noté *bolap1*) est sous le contrôle de la sous-unité σS ($\sigma 38$ ou RpoS) de l'ARN polymérase mais également de la sous-unité σD ($\sigma 70$ ou RpoD) avec une plus faible affinité (Adnan et al, 2010; Hengge-Aronis, 2002; Santos et al, 2006). Ce promoteur P1 est le promoteur qui permet la production de BolA à la fin de la phase exponentielle de croissance. L'expression de *bola* est également sous le contrôle de répresseurs de la transcription tels qu'OmpR et H-NS (Atlung & Ingmer, 1997; Yamamoto et al, 2000). Ainsi, dans le cas du promoteur *bolap1* le gène codant pour la protéine BolA peut être soit surexprimé au moment où l'effet est désiré, soit réprimé pour éviter de prolonger les effets de la protéine qui à long terme pourrait être néfaste.

Le promoteur P2 (noté *bolap2*) constitutif, sous contrôle de RpoD ($\sigma 70$), permet la transcription de *bola* de façon constitutive durant la phase exponentielle de croissance et celui-ci est ensuite réprimé quand la culture atteint la phase stationnaire (Santos et al, 1999).

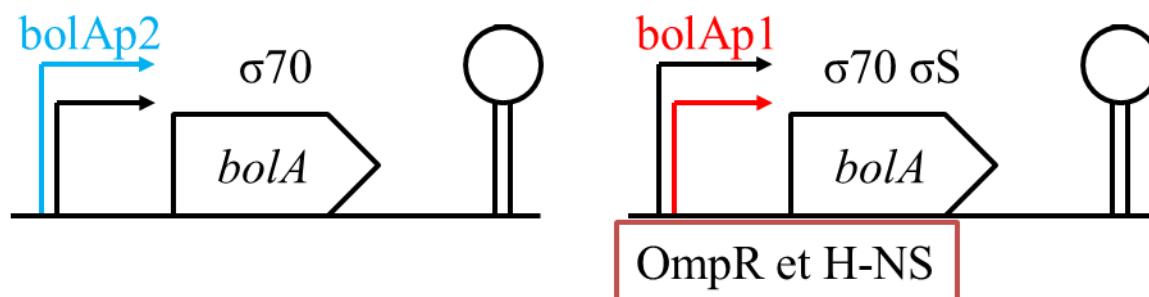


Figure n°6 Représentation schématique de la région génomique de *Bola* chez *Escherichia coli*. Sont également représentés les facteurs sigma 70 et S de l'ARN polymérase ainsi que les répresseurs de la transcription de *Bola* *OmpR* et *H-NS*.

I.C.1.b. Régulation de l'expression génique

Au-delà de leur rôle au niveau cellulaire (division cellulaire et morphologie), les protéines *Bola* sont également capables d'avoir un impact en réponse à un stress (Santos et al, 1999). Il est donc nécessaire que l'expression du gène *bola* soit régulée de façon fine. Il a été montré que les protéines *Bola* ne sont pas en mesure de s'autoréguler (Aldea et al, 1989) et que certains facteurs de transcription en réponse à différents types de stress peuvent intervenir dans la modulation de l'expression de *bola*. A l'heure actuelle trois principaux facteurs de transcription (activateur ou répresseur) ont été identifiés comme impliqués dans la régulation de *bola*. La protéine RpoS joue un rôle d'activateur de la transcription alors que les protéines *H-NS* et *OmpR* sont des répresseurs de la transcription de *bola*.

La protéine RpoS, qui est fortement induit dans des conditions de stress, est le facteur de transcription majeur de réponse au stress chez *E. coli* (Hengge-Aronis, 2002). Il fait partie de

l'ARN polymérase en tant que sous-unité σS et est dépendant d'une voie de régulation très complexe responsable de l'induction d'une importante réponse en cascade face au stress (Hengge-Aronis, 2002). Il permet notamment de contrôler l'expression de gènes de façon positive ou négative au cours de l'entrée en phase stationnaire et en réponse à différents stress. C'est ainsi qu'il a été montré que durant l'entrée en phase stationnaire la protéine RpoS permet l'expression du gène *bola* (Cao & Sarkar, 1997) chez *E. coli* (ceci n'est pas vrai chez *Pseudomonas aeruginosa* (Koch & Nybroe, 2006)).

La protéine H-NS (Atlung & Ingmer, 1997) permet de réprimer l'expression de *bola* afin de répondre aux changements environnementaux (Moreira et al, 2011). H-NS a de multiples fonctions dont une qui lui permet en se fixant à certains promoteurs de réguler l'expression de nombreux gènes qui pour la plupart sont impliqués dans la réponse aux stress de la bactérie. La poly (A) polymérase I peut également affecter l'expression de *bola* à plusieurs niveaux (Santos et al, 2006).

En amont du promoteur P1 il y a la présence d'éléments permettant une induction en réponse à un stress. Cette induction peut être réalisée par le facteur de transcription OmpR. Mais une fois que celui-ci est phosphorylé, par une kinase senseur de l'osmolarité au niveau de la membrane cytoplasmique (EnvZ), il régule de façon négative l'expression de *bolap1* à l'entrée en phase stationnaire de croissance (Yamamoto et al, 2000).

La régulation de *bola* semble la plupart du temps être mise en place en tant que système de défense mais dans certains cas cette régulation peut servir à infecter d'autres organismes. En effet, ceci a été observé au niveau de la bactérie *E. chaffeensis* qui peut causer des maladies telles que l'ehrlichiose humaine (Anderson et al, 1991). Cette bactérie intracellulaire peut exister sous deux formes distinctes, une forme plutôt allongée et une forme dense plus infectieuse et plus

résistante aux stress. La modification morphologique de cette bactérie est provoquée par un régulateur CtrA, appartenant à la famille du facteur de transcription OmpR, qui se fixe en amont du gène *bola* sur des séquences spécifiques et permet sa surexpression (Cheng et al, 2011; Hallez et al, 2004).

I.C.1.c. Régulation post-transcriptionnelle

La synthèse de la protéine BolA peut être finement modulée par l'intervention de facteurs en amont de la transcription mais également par la mise en place d'une régulation post-transcriptionnelle afin de contrôler au mieux l'effet de BolA sur les cellules (Freire et al, 2006b). Cette régulation a été montrée avec différentes protéines et machineries dont la ribonucléase III. En effet, la ribonucléase III joue un rôle important dans le « processing » (pré-ARNr et ARNm) et la maturation de certains ARN (ARNr et ARNt). Cette enzyme influence donc l'expression des gènes en se liant ou en clivant spécifiquement des molécules d'ARNm double brin ce qui peut donc induire la stabilité et/ou l'altération de la conformation de la molécule (MacRae & Doudna, 2007).

Des expériences ont montré chez *E. coli* un effet positif sur les niveaux d'ARNm de *bolap1* dans des conditions de privation de carbone en présence de la ribonucléase III (Freire et al, 2006a) et ceci par l'intermédiaire du facteur σ S. La ribonucléase III pourrait donc jouer un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm codant pour BolA.

Plus récemment il a été supposé que l'état d'oxydation de la cystéine de BolA2 (BolA_C) chez *Arabidopsis thaliana* (AtBolA2) pourrait également être un moyen de régulation. En effet, cette cystéine peut soit être glutathionylée soit servir de point d'homodimérisation (Couturier et al, 2014). L'homodimérisation des BolA_C est un phénomène récemment identifié et n'a pas été sujet à étude jusqu'à présent. Ces modifications ressemblent à celles observées au niveau de

certaines facteurs de transcription dont l'état d'oxydation d'une cystéine spécifique sert de moyen de régulation. De plus il s'avère que son partenaire biologique, la glutarédoxine S17, a la capacité de réduire cette cystéine ce qui imposerait une forme de régulation redox pour AtBolA2 (Couturier et al, 2014).

I.C.1.d. Régulation environnementale

Un autre type de contrôle peut être imposé par l'environnement afin de permettre à la cellule de s'adapter le plus efficacement possible (Figure n°7). Des résultats indiquent que l'augmentation des niveaux d'expression de *bola* est activée par un stress provoqué par l'épuisement des éléments nutritifs qui se déroule pendant la transition vers la phase stationnaire de croissance lors du cycle cellulaire (Aldea et al, 1989), ce qui suggère que ses promoteurs pourraient en fait être régulés de façon inversement proportionnelle au taux de croissance (Aldea et al, 1990). Suite à une privation de carbone, les cellules vont changer de morphologie pour former une population composée de cellules sous forme de tiges courtes ou de cellules rondes (Santos et al, 1999). Il s'avère que le changement de la morphologie de la cellule n'engendre pas de modification au niveau de la composition en peptidoglycane (Santos et al, 2002). Dans ces conditions, BolA favorise les changements de morphologie nécessaires pour faire face aux conditions défavorables de l'environnement. La réalisation d'un mutant $\Delta RpoS$ montre que la dépendance du promoteur *bolap1* envers RpoS est beaucoup plus grande suite à un stress osmotique qu'à une privation de carbone (Santos et al, 1999). Ainsi la privation de carbone (milieu sans glucose pour la croissance de la cellule) et l'augmentation de l'osmolarité engendrent une augmentation de l'ARNm *bola* de 17 fois et 20 fois respectivement une heure après le stress (Santos et al, 1999). Suite à un choc osmotique les cellules vont changer de forme et il sera observé une population de cellules hétérogènes avec deux morphologies distinctes. Il y

aura des cellules sous la forme de bâtonnets plus courts que les cellules non stressées ainsi que des cellules dans une morphologie ovoïde (Santos et al, 1999).

D'autres stress ont montré des résultats similaires au niveau de l'expression de BolA tels qu'un choc thermique, un stress acide ou encore un stress oxydatif (Guinote et al, 2012; Santos et al, 1999). Tous ces éléments montrent que l'expression de *bola* n'est pas confinée à la phase stationnaire du cycle cellulaire mais qu'elle peut jouer un rôle important en réponse à un stress. Des protéines BolA plus spécifiques sont alors utilisées par certains organismes afin de conduire à une réponse adaptée à certains types de stress. Ainsi les protéines de la famille BolA ont été dénommées suivant un stress spécifique : YrbA (Couturier et al, 2009a) rebaptisée par la suite IbaG (Guinote et al, 2012) (influenced by acid gene) retrouvée chez *E. coli*, Uvi31⁺ (Kim et al, 1997) (UV-induced protein) chez *Schizosaccharomyces pombe*, Fra2 (Li et al, 2009a) (Fe repressor of activation) chez *S. cerevisiae*.

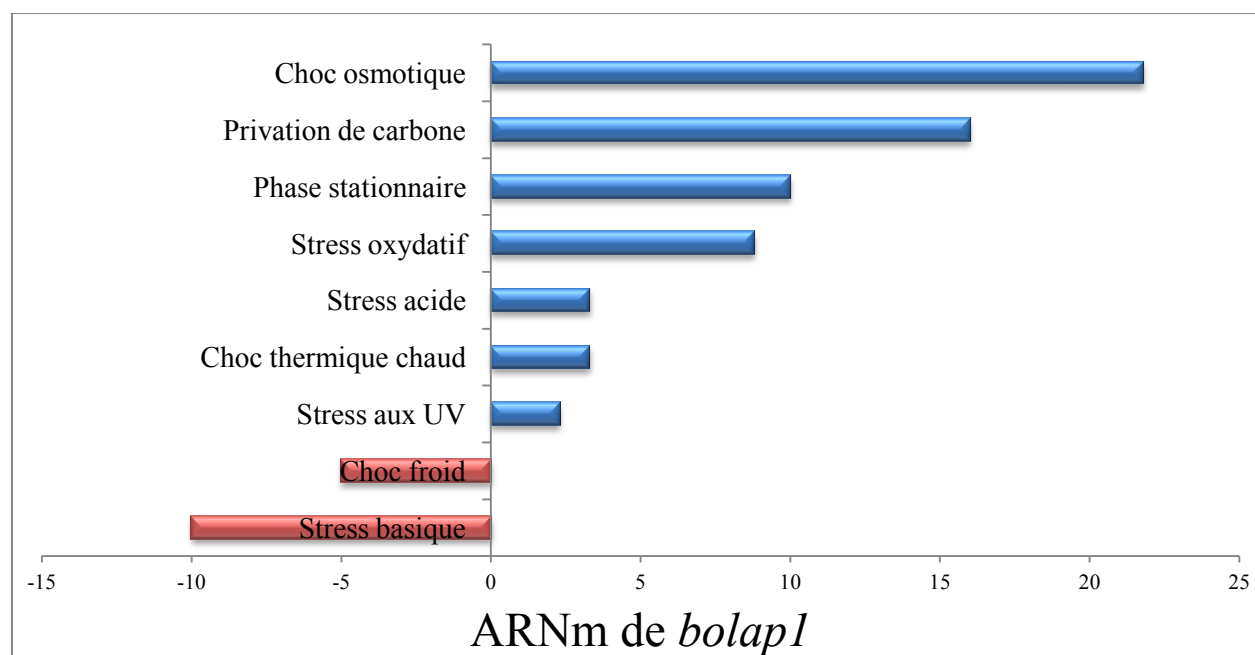


Figure n°7 Effet de différents types de stress sur le niveau d'expression de l'ARNm *bolap1*. Adapté de (Adnan et al, 2011; Kim et al, 1997; Santos et al, 1999; Vieira et al, 2004; White-Ziegler et al, 2008).

I.C.2. Mise en place d'un système de défense

En plus des réponses spécifiques apportées par BolA suite à l'application d'un stress, la protéine BolA a de nombreux effets et peut engendrer des réponses adaptées à la situation au niveau de la cellule. La protéine BolA peut aussi jouer un rôle dans le système de défense au niveau de la membrane externe des bactéries à gram négatif (Freire et al, 2006b). Ainsi par l'intermédiaire de la phosphorylase EnvZ qui peut interagir avec OmpR en modifiant son activité par phosphorylation (Russo & Silhavy, 1991), BolA contrôle la balance OmpC/OmpF (Freire et al, 2006b). OmpC et OmpF sont les porines majeures de la membrane externe des cellules d'*E. coli* (Nikaido, 2003). OmpF a une plus grande perméabilité et une meilleure diffusion pour les agents toxiques qu'OmpC. Lors de condition défavorable tel qu'un stress oxydant il y a une plus grande production d'OmpC alors que dans des conditions favorables de croissance chez *E. coli* OmpF facilite la prise de nutriments (Freire et al, 2006b).

RpoS induit une réponse à un stress par le biais de la surexpression de gènes dont *bola* (Ito et al, 2008). Le gène *bola* est surexprimé dans différentes conditions de stress et sa surexpression induit le développement d'un biofilm. L'ARNm *bola* sous contrôle de RpoS a donc un impact sur ce système de défense que les organismes unicellulaires ont mis en place. Ceci suggère que la formation du biofilm est un mode d'action par lequel les bactéries se protègent contre l'environnement et qui est une étape normale de la vie de la plupart des bactéries (Adnan et al, 2011; Vieira et al, 2004). La formation du biofilm permet ainsi aux bactéries d'avoir un comportement coopératif et donc de mieux réagir suite à un stress. Un biofilm peut être composé d'une ou plusieurs espèces bactériennes qui vont interagir entre elles afin d'améliorer la résistance globale à un facteur de stress tel qu'un antibiotique par exemple. Cependant les biofilms ne servent pas seulement comme moyen de protection aux bactéries. En effet, ils

peuvent également être utilisés comme moyen invasif, par exemple *Xanthomonas campestris* l'utilise pour infecter les plantes (Chin et al, 2005).

Un équivalent de la protéine BolA est retrouvé chez la levure *S. pombe* du nom d'Uvi31⁺. Ce gène *uvi31*⁺ est requis pour le mécanisme de défense cellulaire contre le rayonnement UV (Kim et al, 2002) et permet ainsi à la levure de donner une réponse adaptée suite à ce type de stress. Le gène *uvi31*⁺ a également été montré jouer un rôle au niveau de la division cellulaire et de la formation du septum (Kim et al, 2002). Il permet également d'inhiber la prolifération cellulaire et d'arrêter la progression du cycle cellulaire pendant la mitose. Le niveau d'expression d'*uvi31*⁺ tout comme celui de *bola* est bien régulé. En effet, l'expression d'*uvi31*⁺ dépend du cycle cellulaire et de la phase de croissance (Kim et al, 1997). En amont de ce gène *uvi31*⁺ différents éléments sont retrouvés tels que les boîtes MCB (MluI cell cycle box) et SCB (SWI4/6-dependent cell cycle box). Ces boîtes sont connues chez *S. pombe* pour jouer un rôle au niveau d'une transcription périodique de gènes au cours du cycle cellulaire atteignant un maximum à la frontière entre G1 (croissance de la cellule) et G1/S (réplication de l'ADN) bien que le niveau de l'ARNm d'Uvi31⁺ continue d'augmenter après l'arrêt de la phase S. Il y a également la présence en amont du gène *uvi31*⁺ d'un élément DRE (damage responsive element) qui est requis pour de nombreux gènes inductibles suite à des dommages causés à l'ADN et d'une séquence CGGCAAGTG essentielle pour l'expression d'*uvi31*⁺ (Kim et al, 1997).

I.D. Activateur/répresseur de transcription

I.D.1. Structure des Bola_H et des Bola_C

Les protéines de la famille « BolA » sont de petites protéines d'une centaine d'acides aminés relativement bien structurées dont les structures ont été majoritairement résolues par RMN. Bien que ces protéines soient de petite taille et de repliement bien conservé, la présence au

niveau N-terminal et/ou C-terminal de régions très flexibles rend leur détermination difficile par une autre méthode que la RMN. La première structure de cette famille à avoir été résolue, est BolA2 de la souris qui est une BolA_C (Kasai et al, 2004). La première structure résolue d'une protéine de la famille « BolA » a permis de mettre en évidence un repliement typique qui avait été prédit en 1989 (Aldea et al, 1989). La structure de cette BolA comprend un feuillet β composé de trois brins β et quatre hélices suivant la topologie $\alpha_1\beta_1\beta_2\eta_2\alpha_3\beta_3\alpha_4$. Le brin β_1 , situé sur un bord du feuillet, est antiparallèle aux deux autres. Une face du feuillet est composée essentiellement de résidus non polaires, sur laquelle s'accroche les hélices α_1 , η_2 et α_3 . L'autre face du feuillet essentiellement polaire est exposée au solvant. Bien que la structure entière soit globalement identique selon le type de BolA il subsiste néanmoins une différence qui réside dans la position du résidu (cystéine ou histidine) définissant les classes BolA_C et BolA_H (Figure n°8).

La topologie du repliement de cette protéine est identique à celle retrouvée au sein du repliement du domaine KH (hnRNP K homology) de classe II. Le repliement KH (Figure n°9) est retrouvé dans de nombreuses protéines pouvant fixer les acides nucléiques (ADN ou ARN) et consiste en deux classes distinctes de topologie différente (Grishin, 2001). Cette interaction entre la protéine et les acides nucléiques est majoritairement une interaction de charges (Valverde et al, 2008). La classe I (par exemple la Poly(C)-Binding Protein-2 de code pdb 2py9 (Du et al, 2007)) est du type **$\beta\alpha\alpha\beta$** $\beta\alpha$ alors que la classe II (par exemple la GTPase Era de code pdb 3r9w (Tu et al, 2011)) est du type $\alpha\beta$ **$\beta\alpha\alpha\beta$** . La différence majeure entre ces deux repliements réside dans l'enchaînement des brins du feuillet β et la position du premier brin du motif **$\beta\alpha\alpha\beta$** (Figure n°9). Dans ces deux classes cette fixation d'acides nucléiques s'effectue au niveau d'une séquence conservée GxxG. Cette séquence qui sert de point d'ancrage à la fixation des acides nucléiques se

située dans la boucle entre les deux hélices α consécutives formant ainsi un motif « helix-turn-helix » (HTH) qui correspondrait au niveau des protéines BOLA à la région des hélices $\eta_2\alpha_3$.

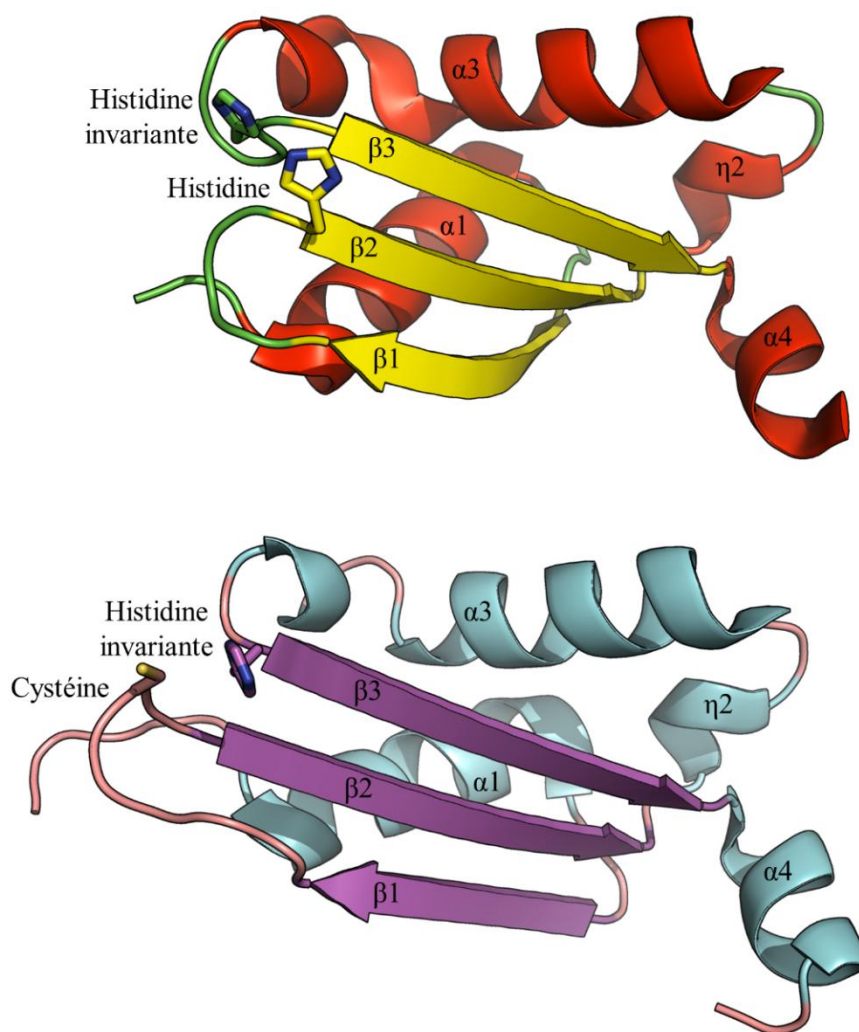


Figure n°8 Représentation en mode ruban et flèche de la structure des BOLA avec en haut la BOLA à histidine de *Coxiella burnetii* (code pdb 3TR3) et en bas la BOLA à cystéine de *Babesia bovis* (code pdb 3O2E). La position de l'histidine invariante est identique dans les BOLA_H et les BOLA_C. Par contre, la position de la deuxième histidine conservée des BOLA_H et celle de la cystéine conservée des BOLA_C ne sont pas identiques.

Au niveau des protéines BOLA la séquence clé GxxG est absente. Néanmoins de nombreux tests biologiques ont montré que les protéines BOLA pouvaient interagir avec de l'ADN pour

exercer soit un rôle de facteur de transcription impliqué dans la réponse à différents types de stress (Guinote et al, 2011; Shukla et al, 2012) soit un rôle d'endonucléase (Shukla et al, 2012; Singh et al, 2014a; Singh et al, 2013b; Singh et al, 2014b). L'activité endonucléase des BolA a été montrée récemment pour la protéine Uvi31⁺ (BolA_H) de *Chlamydomonas reinhardtii* qui a la capacité de fixer deux ions magnésium et également de former un dimère.

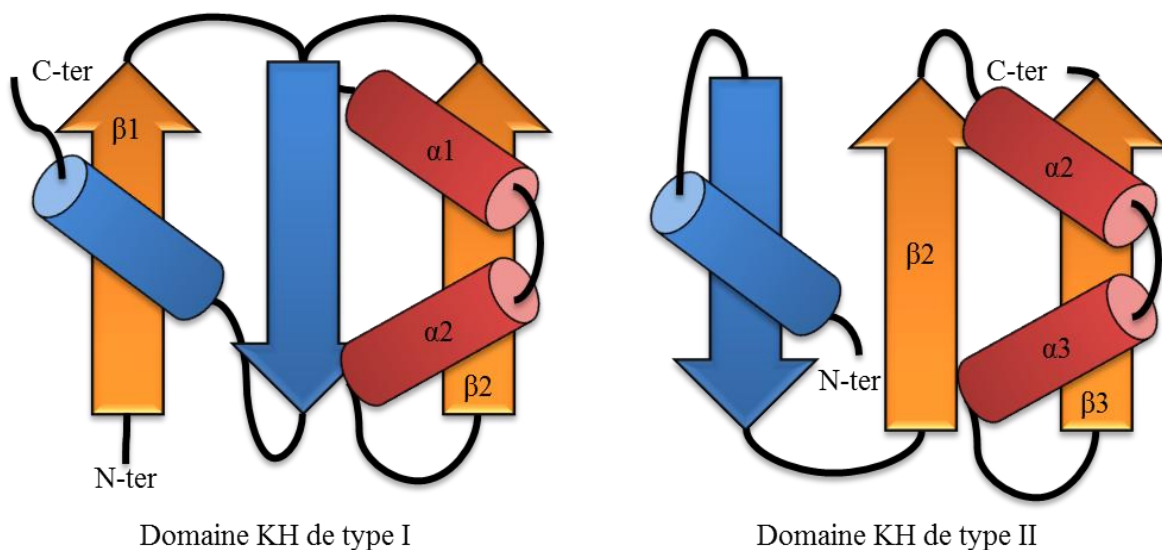


Figure n°9 Représentation des deux différents types de repliement du domaine KH. Dans un type I le motif du repliement KH est $\beta1\alpha1\alpha2\beta2$ et dans le type II $\beta2\alpha2\alpha3\beta3$. D'une manière générale les protéines de la famille « BolA » adoptent le repliement de type II.

La plupart des résidus conservés au sein de la famille « BolA » se trouvent justement au niveau du motif HTH (Kasai et al, 2004) (Figure n°10) et sont regroupés sur une face de la protéine. Cette face conservée des protéines BolA consiste en une région électriquement neutre avec un patch positif localisé au niveau de l'hélice $\alpha3$ alors que l'autre face de la protéine est plutôt chargée négativement.

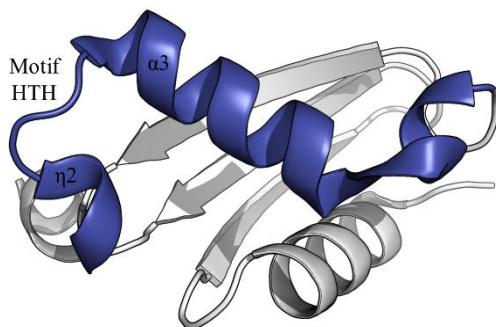


Figure n°10 Représentation en mode ruban et flèche de la protéine BolA de *Coxiella burnetii* (code pdb 3TR3). Est représenté en bleu le motif HTH composé des hélices $\eta 2$ et $\alpha 3$.

I.D.2. Implication des BolA_H lors de la division cellulaire

Les protéines de la famille « BolA » qui sont impliquées dans l'interaction avec de l'ADN peuvent jouer un rôle d'activateur de la transcription dans certains cas afin d'induire des réponses adaptées en cas de stress. De plus il s'avère que dans chaque compartiment cellulaire contenant de l'ADN il y a la présence d'au moins un représentant de la famille BolA (Couturier et al, 2014). Les protéines de la famille « BolA », prédites comme interagissant avec de l'ADN de par leur repliement particulier, contrôlent l'expression de PBP5 et PBP6 au niveau de la transcription (Santos et al, 2002). Il a été montré que BolA joue le rôle de régulateur de la transcription en induisant un plus haut taux de synthèse pour *dacA* (PBP5) et *dacC* (PBP6) au début de la phase exponentielle (Freire et al, 2009). Les constantes de dissociation de BolA, avec les régions promotrices des gènes *dacA* (1,8nM) et *dacC* (5,3nM) ont été obtenues par résonance plasmonique de surface montrant pour la première fois l'interaction directe de BolA (Figure n°11) avec de l'ADN (Guinote et al, 2011). Comme attendu, les résultats montrent que BolA contrôle les niveaux de transcription de *dacA* et *dacC* indépendamment l'une de l'autre et de façon plus surprenante *ampC* (Santos et al, 2002), une β -lactamase de classe C, reliant ainsi pour la première fois des PBP et les β -lactamases au niveau de la régulation de gènes. Ces résultats confirment le

fait que les protéines de la famille « BolA » peuvent jouer un rôle d'activateur de la transcription en régulant des enzymes impliquées dans différentes étapes de la synthèse de la paroi cellulaire.

Pendant le cycle de division cellulaire chez *E. coli* en milieu non renouvelé et en absence de stress le gène *bola* doit être étroitement régulé car le niveau de transcription reste constant pendant la phase exponentielle. De manière générale la protéine BolA est naturellement exprimée durant la transition de la phase exponentielle vers la phase stationnaire, de manière concomitante avec une multitude de changements métaboliques et morphologiques dans la cellule. Par contre, sa surexpression dès l'entrée en phase stationnaire de croissance va influencer sur le taux d'expression de *dacC* et donc de production de PBP6. C'est par le biais de la carboxypeptidase PBP6 que BolA va induire un changement de morphologie des cellules d'*E. coli* (Aldea et al, 1989; Santos et al, 1999). Cette surexpression peut être considérée comme une réponse à une privation de ressources due au trop grand nombre de cellules par rapport aux nutriments disponibles et semble être suffisante pour retarder le taux de croissance des cellules et donc empêcher leur élongation (Freire et al, 2009).

Il est donc intéressant de noter que la protéine BolA a un impact sur la cellule même en absence de certaines PBP. PBP2 est incapable, seule, d'inverser les effets de BolA ce qui suggère que BolA intervient dans un autre mécanisme impliquant sans doute MreB (homologue à l'actine) qui est nécessaire pour l'élongation de la cellule et son maintien sous forme allongée. La protéine MreB se polymérise pour former une structure en spirale à l'intérieur de la paroi cellulaire, qui est clairement visible lorsque BolA n'est pas surexprimée, et permet la formation du cytosquelette (Freire et al, 2009). Par contre en augmentant les niveaux d'expression de BolA aucun filament de MreB ne peut être détecté. Cette modification au niveau de MreB suggère par conséquent que la surexpression de BolA affecte l'organisation spatiale des filaments de MreB ou

inhibe sa transcription. D'autres expériences montrent que la perte de la localisation de MreB suite à la surexpression de BolA n'est pas due à la modification de la morphologie de la cellule mais qu'il s'agirait réellement d'un effet de BolA sur la transcription du gène codant pour MreB (Freire et al, 2009). Les protéines BolA qui agissent comme un activateur de la transcription dans le cas de *dacA* et *dacC*, jouent également un rôle de répresseur de la transcription dans le cas de *mreB*. Il a ainsi été montré que la protéine BolA chez *E. coli* pouvait inhiber de façon significative le niveau de transcription de *mreB* (Freire et al, 2009). Cette répression réalisée par la protéine BolA s'effectue par fixation directe sur la région promotrice de l'opéron *mreBCD* avec un Kd de 6.9 ± 2.4 nM. BolA est ainsi capable de se lier directement avec une forte affinité à la séquence promotrice de *mreB* et agit donc comme un nouveau répresseur de la transcription du niveau d'expression de *mreB*. L'induction des carboxypeptidases PBP5 et PBP6 et la réduction des niveaux de MreB par la surexpression de BolA converge dans le même sens, une inhibition de l'élongation cellulaire et une induction de la morphologie ronde (Figure n°11).

En parallèle, il a également été montré chez *E. chaffeensis* que BolA était capable de se fixer à l'ADN et d'induire la transcription de certains gènes. Cette surexpression s'effectue par fixation directe de l'ordre du nM sur les promoteurs de TRP120 (120kDa tandem repeat protein) et ECH_1038 codant pour des protéines de surface (Cheng et al, 2011). Ces régulations effectuées par BolA au niveau des promoteurs plus celles mises en évidence chez *E. coli* font de BolA un nouveau facteur de transcription qui peut induire ou réprimer la transcription de certains gènes.

A l'heure actuelle, l'interaction BolA-ADN a uniquement été montrée chez des organismes procaryotes et par conséquent qu'avec des représentants du groupe BolA_H. Les

représentants du groupe BolA_C possèdent des propriétés structurales similaires aux BolA_H et devraient aussi interagir avec des acides nucléiques.

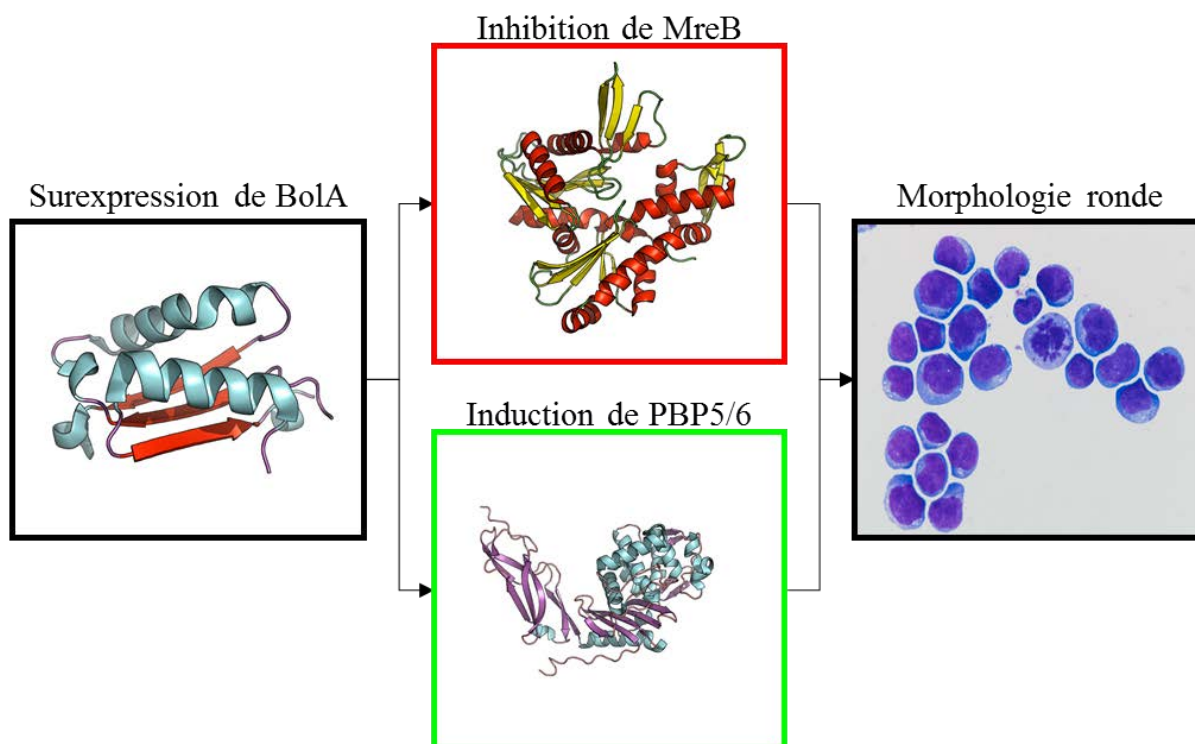


Figure n°11 Schéma représentant l'action de BolA sur la morphologie des cellules d'E. coli. Suite à sa surexpression BolA inhibe la production de MreB et active la production des protéines PBP5 et PBP6. Tous ces effets ont pour conséquence l'induction d'une morphologie ronde des cellules.

I.E. BolA et glutarédoxines, deux partenaires étroitement liés

I.E.1. Interaction BolA-glutarédoxines

Il a été montré que les protéines BolA et les glutarédoxines ayant une signature catalytique CGFS (Grx-CGFS, glutarédoxines de classe II, voir partie II.) étaient capables d'interagir ensemble par la technique de double hybride (Y2H) chez *S. cerevisiae* (Ito et al, 2000) et *Drosophila melanogaster* (Giot et al, 2003), par la méthode de purification par immunoprécipitation TAP-TAG chez *S. cerevisiae* (Krogan et al, 2006) et *E. coli* (Butland et al, 2005). Toutes ces interactions montrant l'interaction entre ces deux partenaires sont renforcées par le fait que des analyses génomiques montrent la co-occurrence (Figure n°12) des gènes *bola* et *grx* de classe II (Couturier et al, 2009a; Couturier et al, 2014; Huynen et al, 2005).

Dans un premier temps, il avait été supposé que les protéines BolA_C étaient des homologues de la peroxyrédoxine OsmC (Osmotically-inducible protein C) (Huynen et al, 2005) possédant elle aussi le repliement du domaine KH de classe II (Valverde et al, 2008). Ces données semblaient indiquer un nouveau rôle de réductase pour les BolA_C qui avec les Grx CGFS fonctionneraient comme une peroxyrédoxine à deux thiols (Huynen et al, 2005). Cependant à l'heure actuelle cette hypothèse n'a toujours pas été vérifiée. Récemment la réactivité de la cystéine d'AtBolA2 (BolA_C) a été démontrée et cette cystéine oxydée peut être réduite par la GrxS17 (Grx-CGFS) de ce même organisme (Couturier et al, 2014).

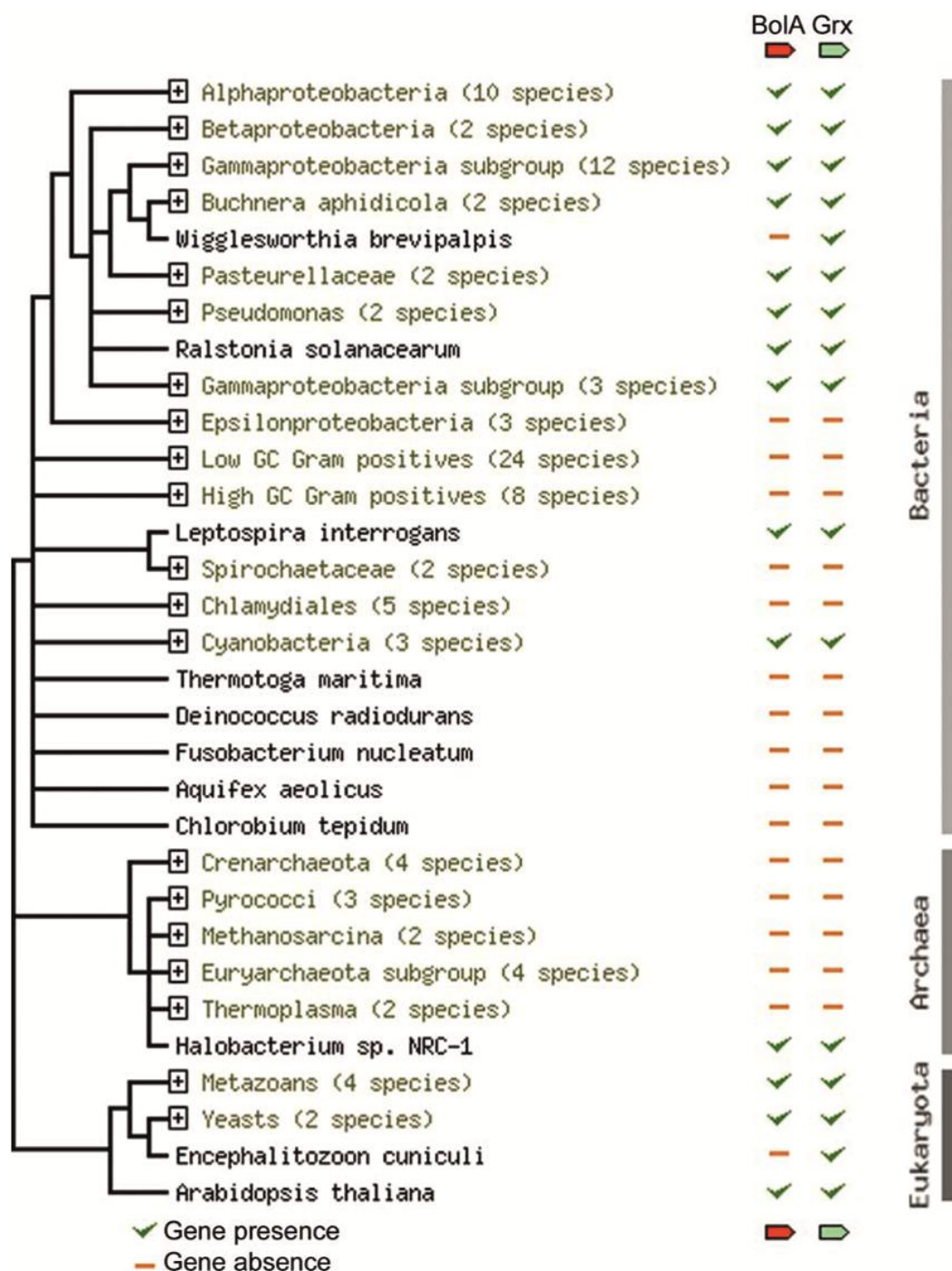


Figure n°12 Distribution phylogénétique des BOLA et des Grx-CGFS adapté de Huynen et al, 2005. Sont représentés la présence ou l'absence des gènes bola et grx en fonction des différents organismes.

I.E.2. Les hétérodimères BolA_C - glutarédoxines

Deux types de dimères BolA-Grx ont été identifiés : l'apo-hétérodimère et l'holo-hétérodimère où ce dernier incorpore un centre [2Fe-2S] (Li et al, 2011a; Li et al, 2009a; Li et al, 2012; Li & Outten, 2012; Yeung et al, 2011). A l'heure actuelle, seuls les complexes mettant en jeu une BolA_C (en particulier Fra2 de *S. cerevisiae*) ont été étudiés et aucun de ces deux complexes n'a été caractérisé structuralement bien que des études spectroscopiques ont été entreprises sur la forme Grx-BolA holo-hétérodimérique. Afin de vérifier si le complexe est métal dépendant ou non un traitement « lourd » (à l'éthylène diamine tétra acétique et au dithiothréitol en anaérobiose pendant 1h à 4°C) a été réalisé sur la forme holo. Après une colonne de gel filtration analytique il y a toujours co-élution des deux partenaires montrant la non dépendance du métal dans la formation d'un dimère (Li et al, 2009a). Ce résultat est cohérent avec les études *in vivo* de co-immunoprécipitation démontrant que Fra2 (BolA_C) et les Grx3 ou 4 (Grx-CGFS) peuvent interagir dans des conditions de faible ou de forte concentration en fer chez la levure (Li et al, 2009a). Il est également intéressant de noter que la forme Grx-BolA holo-hétérodimérique est en principe beaucoup plus stable que la forme homodimérique Grx-Grx. Il a également été mis en évidence que BolA est capable de convertir un homodimère de Grx-CGFS en un hétérodimère BolA-Grx (Li et al, 2011a; Yeung et al, 2011).

L'identification des résidus impliqués dans la coordination des atomes de fer du centre [2Fe-2S] a été étudiée par spectroscopie. Ainsi par spectroscopie Mössbauer et résonance Raman, il a été montré que les atomes de fer d'un centre [2Fe-2S] sont coordonnés par la cystéine catalytique de la Grx et la cystéine du GSH (Figure n°13) du côté Grx et par une histidine et peut être une cystéine du côté BolA_C (Li et al, 2009a). La présence de cette 3^{ème} cystéine a été confirmée par spectroscopie EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) qui a permis

de mettre en évidence un ratio de 3,5 atomes de soufre pour 0,5 atome d'azote dans la coordination des atomes de fer du centre [2Fe-2S] (Li et al, 2009a). Ces analyses spectroscopiques proposent pour le Fe n°1 situé du côté de la Grx3/4 une coordination à 4 atomes de soufre (2 inorganiques provenant du centre et 2 organiques venant du GSH et de la cystéine catalytique) et pour le Fe n°2 situé du côté Fra2 on a les 2 sulfures inorganiques, 1 azote venant sans doute de l'histidine invariante et un dernier atome qui pourrait être un atome de soufre provenant de Fra2 (Figure n°14).

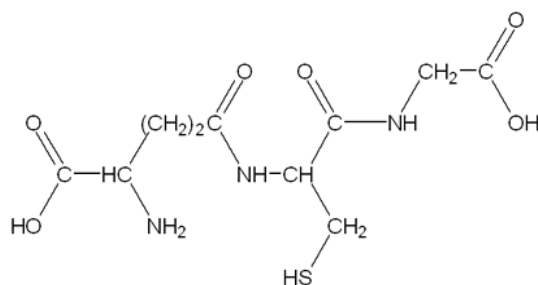


Figure n°13 Le glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyl-glycine) est un tripeptide particulier où le groupement amine de la cystéine se condense avec la fonction acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide glutamique. Pour se défendre des radicaux libres en excès et de nombreux produits toxiques circulant, l'organisme utilise comme antioxydant majeur le glutathion.

La caractérisation avec certitude des résidus impliqués dans la coordination du centre du côté Fra2 s'avère difficile puisque la réalisation de simples mutants au niveau de l'histidine invariante H103 ou de la cystéine C66 permet toujours la coordination d'un centre Fe-S. Seule la réalisation d'un double mutant permet d'abolir définitivement la formation du complexe holo (Li et al, 2011a).

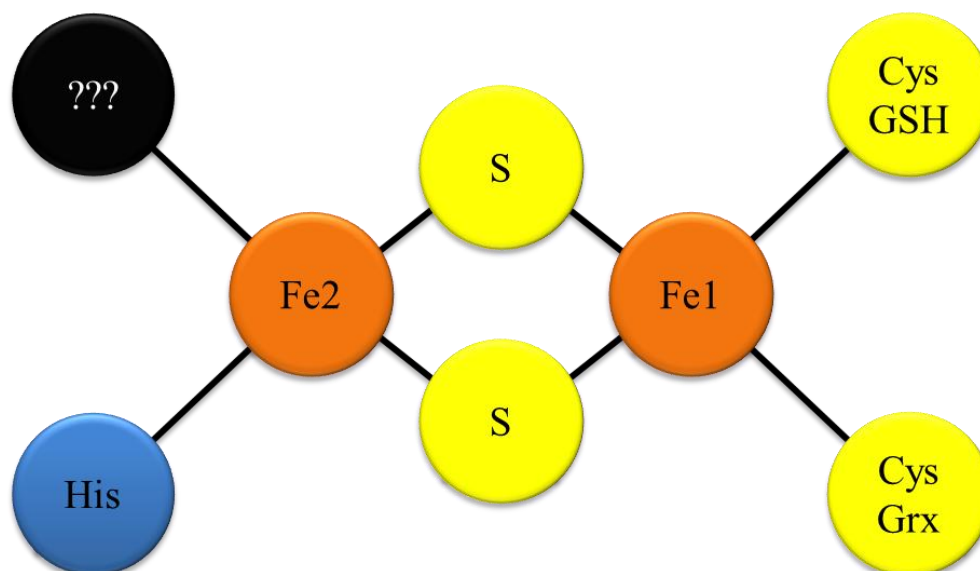


Figure n°14 Représentation schématique de la coordination d'un centre $[2Fe-2S]$ au sein d'un complexe Grx-BolA holo. Les différents atomes et résidus impliqués sont représentés ainsi que le couple putatif Cys/His (???) définissant la différence entre les classes BolA_C et BolA_H.

I.E.3. Quelle(s) implication(s) dans le métabolisme du fer ?

Une mutation du gène codant pour la protéine BolA3 (BolA_C) humaine (localisée dans la mitochondrie) peut avoir de graves conséquences et peut engendrer des défauts dans les enzymes à centres Fe-S mitochondriaux. Ceci suggère que la protéine BolA3 doit jouer un rôle dans la maturation de ce type de protéines (Figure n°15). Comme les autres membres de la famille « BolA » la protéine BolA3 peut interagir avec une Grx-CGFS qui est la Grx5. La Grx5 est impliquée dans le mécanisme global de synthèse et transport des centres $[2Fe-2S]$ (Cameron et al, 2011).

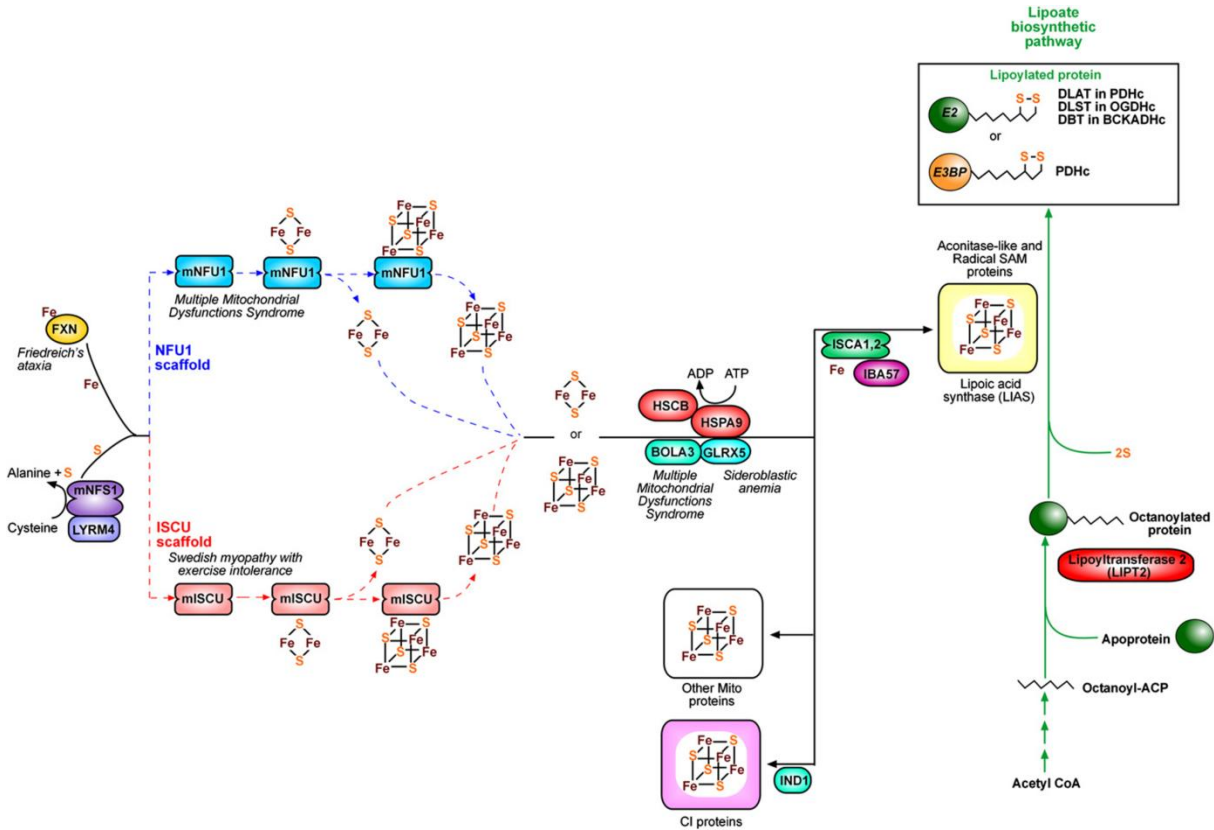


Figure n°15 Schéma proposé pour la machinerie de synthèse et de transport des centres Fe-S au niveau de la mitochondrie chez l'humain (Cameron et al, 2011). **E2** et **E3BP** sont des sous-unités qui fixe l'acide lipoiqne ; **FXN** correspond à la frataxine ; **GLRX5** est la glutarédoxine 5 humaine ; **HSCB** et **HSPA9** sont des protéines se fixant à IscU et favorisant le transfert de centres [2Fe-2S] vers des protéines acceptrices ; **IBA57** et **ISCA1, 2** sont des protéines requises pour la maturation de l'aconitase et pour l'activation catalytique des enzymes à radicaux S-adenosylméthionine ; **IND1** est impliqué dans l'assemblage des centres Fe-S; **LYRM4** est une protéine requise pour la stabilisation de la cystéine désulfurase NFS1 ; **mISCU** est la protéine échafaudage mitochondriale qui interagit avec Nfs1 ; **mNFS1** est la cystéine désulfurase Nfs1 mitochondriale humaine ; **mNFU1** est une protéine échafaudage mitochondriale alternative à IscU.

Au sein du mécanisme de synthèse et de transport des centres Fe-S, on retrouve souvent une protéine BolA selon deux formes possibles dépendant de l'organisme et de la localisation cellulaire. La protéine peut être sous la forme d'un mono-domaine ce qui est le cas de la protéine BolA3 chez les mammifères qui va interagir avec la Grx5 au niveau de la récupération du centre Fe-S après la synthèse (Cameron et al, 2011). Elle peut également se présenter sous la forme d'un domaine, comme dans la protéine SufE1 chez les plantes (domaine SufE classique suivi d'un domaine BolA) (Ye et al, 2006). Le rôle de SufE au sein de SufE1 dans le métabolisme des centres Fe-S est d'activer la cystéine désulfurase et d'amener l'atome de soufre au lieu de synthèse des centres Fe-S (Figure n°16) (Outten et al, 2003).

La famille de protéines regroupant SufE1 et tous les équivalents de SufE est plutôt bien conservée et les seules régions variables sont l'extrémité N-terminale et le *linker* entre les domaines. Le domaine BolA présente une conservation de 72% entre les différentes SufE1 ce qui suggère un rôle important pour ce domaine au sein de la protéine SufE1. Le fait que ce domaine soit présent au sein de ce type de protéines et que les Grx ont la capacité d'incorporer des centres Fe-S laisse à penser qu'une interaction entre le domaine BolA de SufE1 et une Grx-CGFS est possible. Cette interaction pourrait être impliquée dans la régulation du métabolisme de synthèse des centres Fe-S ou alors permettrait de faire face à différents stress (Ye et al, 2006).

Par ailleurs il a été proposé que la capacité plus restreinte d'un hétérodimère BolA-Grx à donner son centre Fe-S vis-à-vis de la forme homodimérique pourrait représenter une forme de stockage et de régulation du fer intracellulaire (Willems et al, 2013). Ceci permettrait notamment d'adapter le transfert du centre Fe-S en fonction des besoins de la cellule (Yeung et al, 2011).

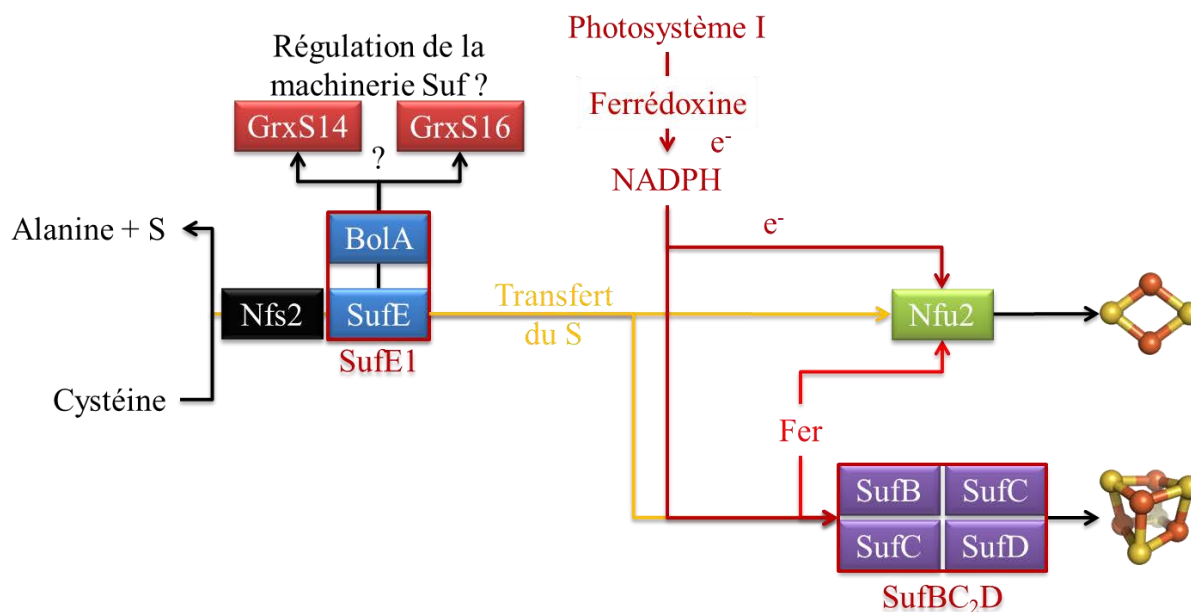


Figure n°16 Schéma non exhaustif proposé pour l'intervention des différentes protéines chloroplastiques de plantes impliquées dans la biogénèse des centres Fe-S (Balk & Pilon, 2011; Bandyopadhyay et al, 2008; Rouhier et al, 2010). Nfs2 est la cystéine désulfurase chloroplastique du groupe II (SufS) ; SufE1 est une sulfurtransférase qui favorise l'activité de la cystéine désulfurase Nfs2 ; GrxS14 et GrxS16 sont des glutarédoxines de classe II (Grx-CGFS) ; NADPH pour nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; Nfu2 est impliquée dans la synthèse et dans le transport des centres Fe-S ; SufB, SufC et SufD font partie du complexe SufBC₂D qui sert à la biosynthèse des centres Fe-S.

A partir de toutes ces données il semble donc que les protéines BolA et tous leurs homologues sont impliqués dans une multitude de régulations et que BolA serait une sorte de point de contrôle au niveau de la cellule dans la régulation de différents types de stress. L'organisme le plus étudié à ce niveau est *E. coli* mais de nombreuses données sont encore manquantes pour comprendre comment BolA agit réellement au sein de tous ces mécanismes (Figure n°17).

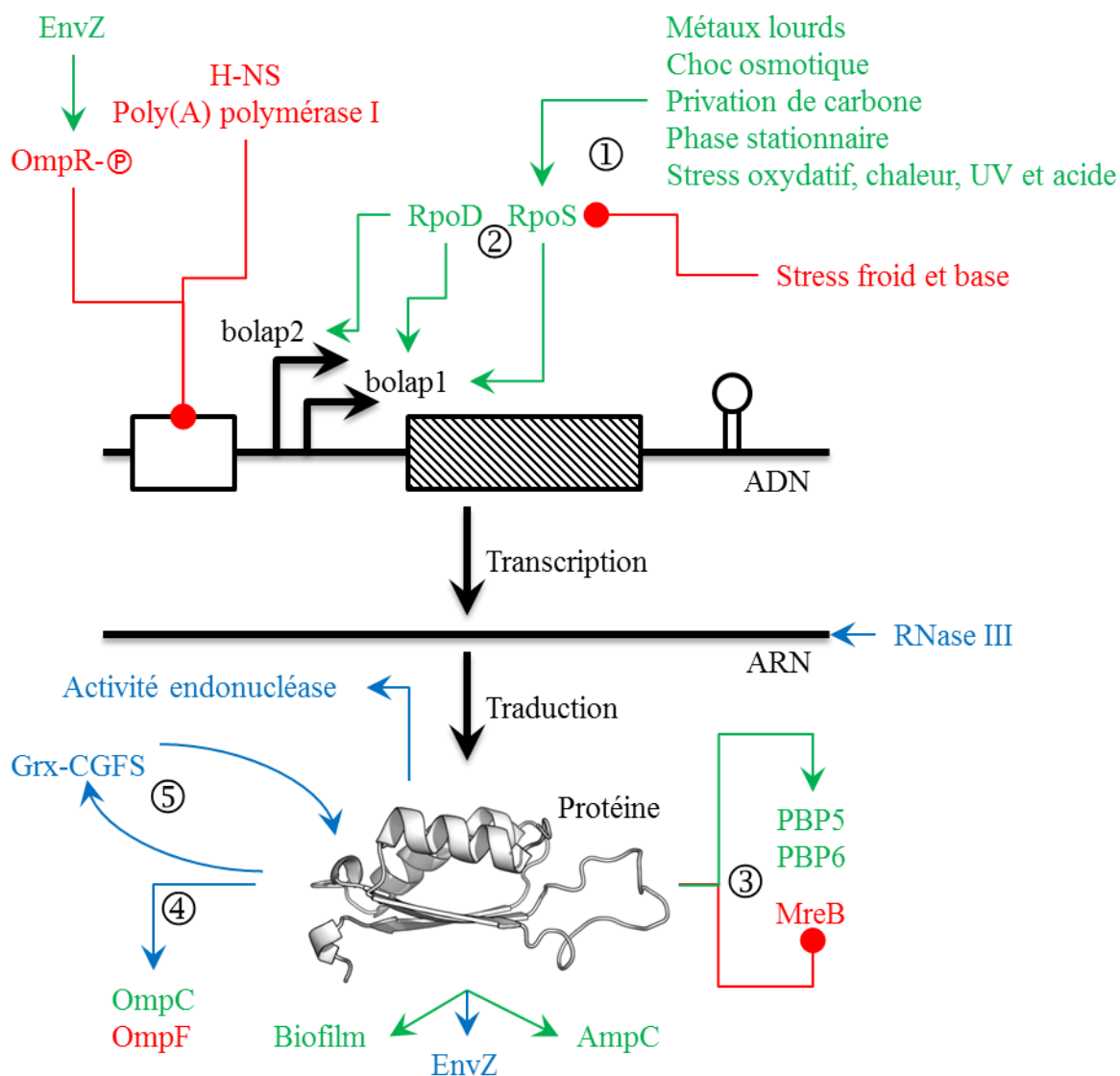
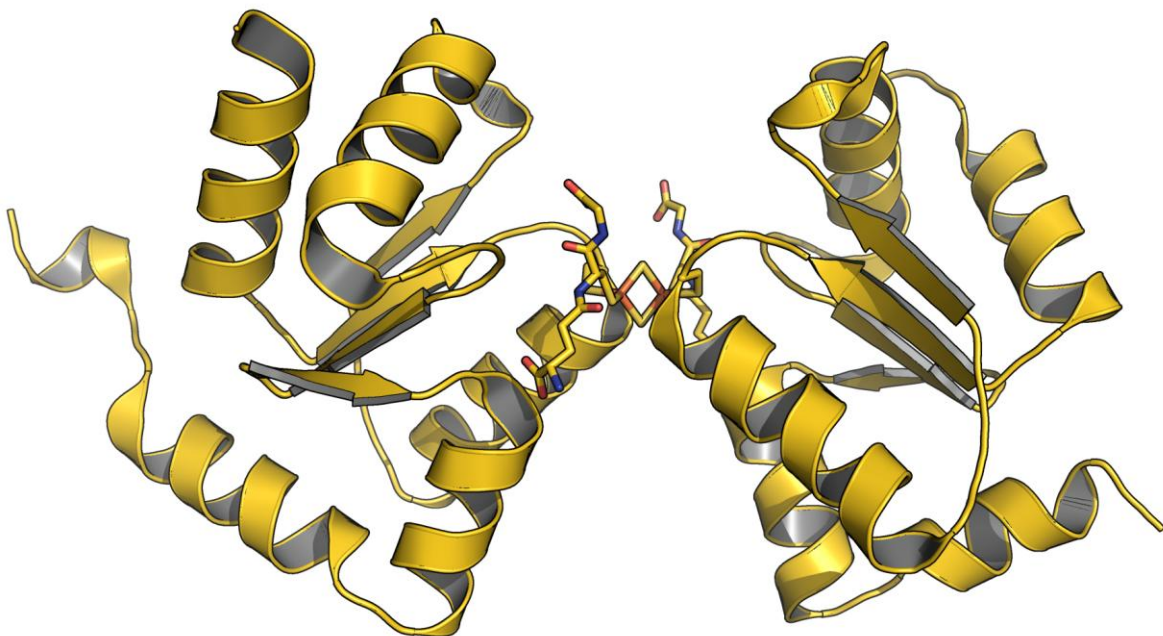


Figure n°17 Schéma bilan sur les connaissances actuelles de l'implication de BOLA au sein de différents mécanismes chez *E. coli*. Sont représentés en rouge les effets négatifs (ou répression), en vert les effets positifs (ou activation) et en bleu les effets non connus (ou alternatifs). ①: effet des stress environnementaux ; ②: sous-unité sigma de l'ARN polymérase ; ③: implication de BOLA en tant que facteur de transcription ; ④ : contrôle de la balance des porines ; ⑤ : régulation appliquée entre les BOLA et les Grx-CGFS au sein des dimères apo et holo au niveau de l'homéostasie du fer.

Les glutarédoxines



II. Les glutarédoxines

Tous les organismes vivants sont soumis aux effets de leur environnement et plus particulièrement les organismes aérobies qui sont exposés à des espèces réactives de l'oxygène provenant de leur métabolisme ou de leur exposition à des composés générateurs de radicaux libres. Les cellules ont donc mis en place un mécanisme efficace de défense contre ces espèces réactives de l'oxygène génératrices de dommages très importants pouvant conduire à la mort cellulaire. Ce système de défense est composé d'enzymes, des vitamines C et E (Grant, 2001) et de petites molécules comme le GSH, qui est l'antioxydant majeur des cellules. En 1976, les glutarédoxines (Grx) mises en évidence suite à la découverte d'un nouveau système de transport de l'hydrogène et d'électrons chez *E. coli*. Ce système participe notamment à la réduction de la ribonucléotide réductase qui est une enzyme essentielle puisqu'elle catalyse le passage du ribose au désoxyribose pour les nucléotides puriques ou pyrimidiques. Ce système de transport de l'hydrogène implique le NADPH, le GSH, la glutathion réductase et une Grx (Holmgren, 1976).

II.A. Description des glutarédoxines

II.A.1. Classification

Les glutarédoxines sont de petites enzymes ubiquitaires d'une centaine d'acides aminés regroupées en 6 classes notées de I à VI à partir d'une classification phylogénétique basée au départ sur des organismes photosynthétiques, puis étendue à tous les organismes (Figure n°18). Cette classification prend en compte la nature de la séquence, la signature typique du site actif mais aussi des motifs et des domaines conservés (Couturier et al, 2009a; Rouhier et al, 2010). Seules les classes I et II sont communes à tous les organismes et uniquement des structures tridimensionnelles ont été résolues pour les classes I et II. Une des particularités des Grx est qu'elles sont présentes en très grand nombre chez les organismes photosynthétiques qui

possèdent environ 30 gènes alors que les autres organismes n'en possèdent que 2 à 7 (Rouhier et al, 2004).

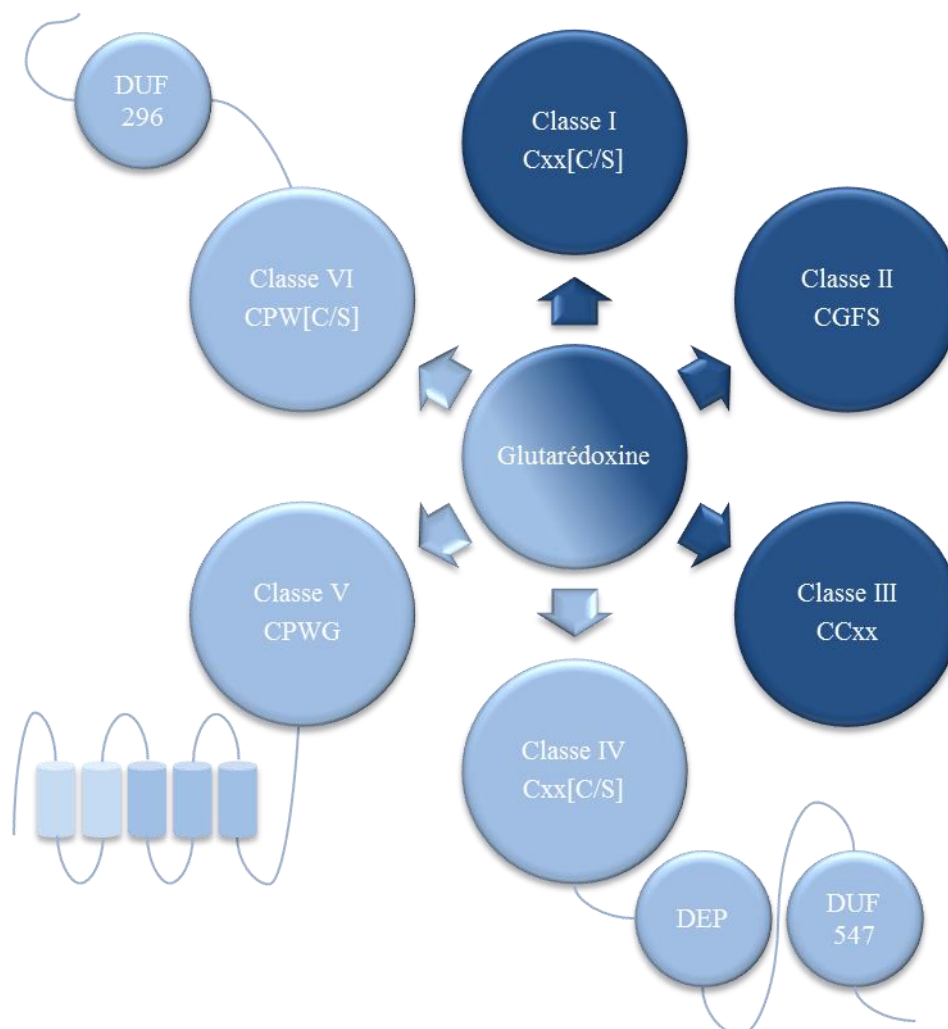


Figure n°18 Schéma représentant les 6 différentes classes de Grx. La signature ainsi que la présence des domaines conservés sont présentés. A noter que certaines Grx possèdent des domaines additionnels.

La classe I commune à tous les règnes possède une signature Cxx[C/S], malgré une signature ne contenant pas obligatoirement deux cystéines cette classe est appelé également dithiol (Figure n°18). La classe II, dite monothiol de par sa signature CGFS, est présente chez les eucaryotes et quelques procaryotes. Il est intéressant de noter que dans le cas des Grx de classe II

il y a la présence de glutarédoxines dites PICOT (PKC-Interacting Cousin Of Thioredoxin). Il s'agit de la répétition de domaines glutarédoxines de classe II à la suite d'un domaine du type thiorédoxine. Le nombre de domaines Grx peut varier de un à trois et sont présents uniquement chez les eucaryotes comme la GrxS17 d'*A. thaliana* par exemple qui en possède trois (Couturier et al, 2014; Ojeda et al, 2006). La classe III des Grx est spécifique aux plantes terrestres. Elle correspond généralement à des Grx avec un site actif du type CCxx (Lemaire, 2004). Cependant, le nombre d'isoformes varie grandement entre les plantes supérieures et les plantes inférieures. La classe IV, présente chez les eucaryotes, possède une séquence de Grx fusionnée à 2 domaines distincts DEP et DUF547 présents en C-terminal et de fonctions inconnues. Les classes V et VI sont spécifiques aux cyanobactéries. La classe V possède un site actif atypique CPWG et à l'extrémité C-terminale une séquence conservée TMHMM permettant sans doute une localisation transmembranaire. La classe V peut également être divisée en 2 sous-groupes selon la présence de 3 à 5 domaines transmembranaires de différentes tailles. La classe VI de signature atypique CPW[C/S] présente un domaine N-terminal DUF296 de fonction inconnue. Il subsiste cependant quelques Grx qui possèdent des domaines additionnels comme la GrxS16 (classe II) d'*A. thaliana* qui possède en N-terminal un domaine endonucléase (Liu et al, 2013).

II.A.2. Les glutarédoxines sous forme « apo »

II.A.2.a. Structure des glutarédoxines sous forme monomérique

Les glutarédoxines sont caractérisées par le repliement canonique des thiorédoxines. Ce repliement est composé d'un feuillet β central entouré d'hélices α du type $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2\alpha_3\beta_3\beta_4\alpha_4\alpha_5$ où α_1 et α_3 se trouvent d'un côté du feuillet et, α_2 , α_4 et α_5 de l'autre. Dans le feuillet seul β_3 est antiparallèle aux autres brins et l'hélice α_5 n'est pas toujours présente (Figure n°19). La cystéine catalytique de l'enzyme est exposée au solvant et se trouve au niveau N-terminal de l'hélice α_2 .

Des motifs communs sont retrouvés chez toutes les Grx (Couturier et al, 2009a). En effet, une séquence ‘‘TVP’’ située 35 à 40 acides aminés après le site actif est retrouvée tout comme 10 acides aminés après ce motif, un motif ‘‘GG’’ formant une pliure à proximité du site actif (appelée « GG kink »). L’une des principales différences au niveau structural entre les Grx de classe I et II réside dans la présence d’une extension de cinq résidus juste avant le site actif (α_2) pour les Grx de classe II (Yogavel et al, 2014).

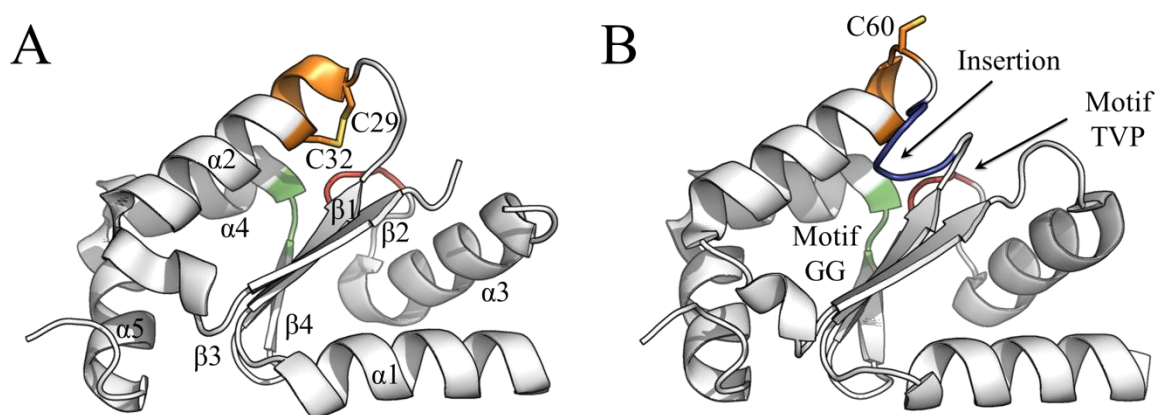


Figure n°19 Représentation des éléments de structures secondaires des glutarédoxines ainsi que leurs éléments remarquables. (A) Structure de la Grx1 de *Plasmodium falciparum* de classe I (code pdb 4MZC). (B) Structure de la Grx5 de *Saccharomyces cerevisiae* de classe II (code pdb 3GX8). Les éléments de structure secondaire ainsi que les cystéines des signatures respectives sont annotés. Le motif TVP est représenté en rouge, le motif GG est représenté en vert et l'insertion de cinq résidus des Grx de classe II est représentée en bleu.

II.A.2.b. Les différents états des glutarédoxines sous-forme apo

Le terme apo désigne pour les Grx l'état lorsqu'elles jouent leur rôle catalytique d'oxydoréductase. L'état oxydé peut être présent soit sous la forme d'un pont disulfure entre les deux cystéines catalytiques (dans le cas d'une signature CxxC) soit sous une forme glutathionylée. Au sein des Grx de classe I et II, il s'avère que le site de fixation du GSH est

conservé et implique les trois motifs définis auparavant (signature Cxx[C/S], TVP et GG). Outre la cystéine catalytique des Grx qui est impliquée dans la formation d'un pont disulfure avec le GSH, différents acides aminés participent à la stabilisation du GSH à travers un réseau de liaisons hydrogène impliquant la partie γ -glutamyle, cystéinyle et glycine du GSH (Figure n°20).

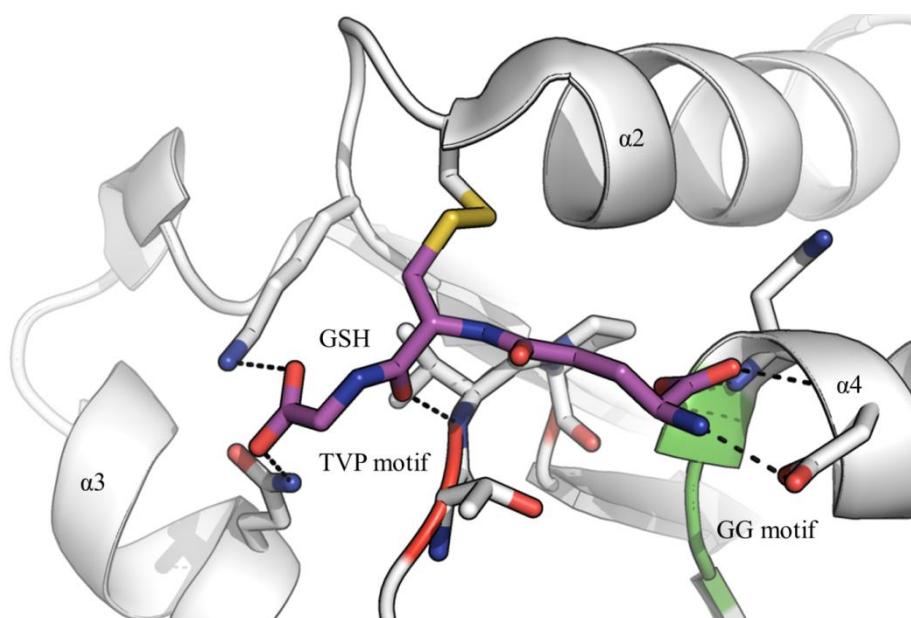


Figure n°20 Site de fixation du glutathion au sein de la Grx1 de *Saccharomyces cerevisiae* (3C1S). Le site de fixation implique la cystéine catalytique, les deux résidus après le motif GG pour la stabilisation de la partie γ -glutamyle, le 2^{ème} résidu du motif TVP pour la stabilisation de la chaîne principale de la partie cystéinyle et enfin deux résidus présents dans l'hélice α 3 et dans la boucle précédant le site actif pour la partie glycine.

II.A.3. Structure des glutarédoxines sous forme « holo »

II.A.3.a. Les dimères

Bien que de nombreuses structures de Grx ont été déterminées, peu de structures holodimériques autour d'un centre [2Fe-2S] ont été résolues et seulement pour les classes I et II. Ce centre jouerait le rôle de verrou à l'interface du dimère (senseur du stress oxydant) pour relâcher des Grx sous forme apo actives ou serait transporté vers des protéines cibles (Iwema et

al, 2009; Rouhier et al, 2007). Dans ce complexe chaque atome de fer est coordiné par 4 atomes de soufre provenant de la cystéine du GSH, de la cystéine catalytique de la Grx et les 2 atomes de soufre inorganiques du centre [2Fe-2S] (Figure n°21).

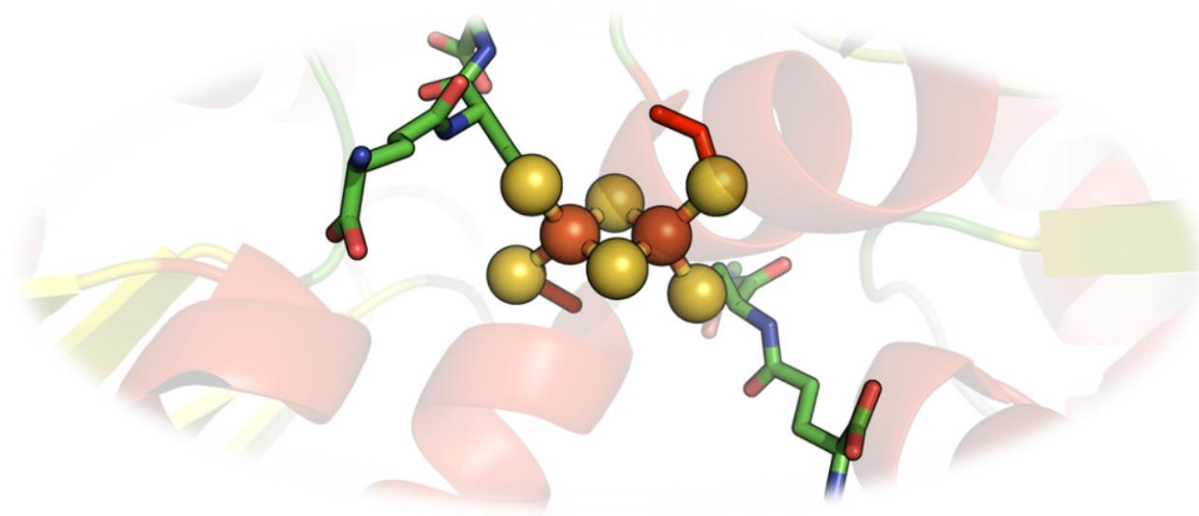


Figure n°21 Coordination d'un centre [2Fe-2S] par deux cystéines et deux GSH au sein de la Grx2 humaine (code pdb 2HT9).

A l'heure actuelle seulement cinq structures sous forme holo sont connues. Bien que les structures des formes apo des classes I et II soient relativement similaires, dans le cas des formes holodimériques, l'orientation relative entre les deux monomères est différente entre les classes I et II (Figure n°22). Dans les deux cas, l'homodimère possède une symétrie axiale binaire avec l'axe de symétrie passant par les deux atomes de soufre du centre [2Fe-2S]. Dans la forme holo de classe I les deux feuillets sont quasiment orthogonaux alors que dans celle de classe II, ils sont coplanaires. Les analyses structurales semblent montrer que l'insertion de cinq résidus au niveau de la boucle précédant l'hélice α_2 dans les Grx de classe II est un antidéterminant stérique pour la formation de l'homodimère de classe I. Au sein d'un dimère de Grx de classe II, le centre [2Fe-2S] est plus accessible au solvant et plus labile que dans celui de classe I (Couturier et al, 2011; Iwema et al, 2009; Johansson et al, 2007; Johansson et al, 2011; Rouhier et al, 2007).

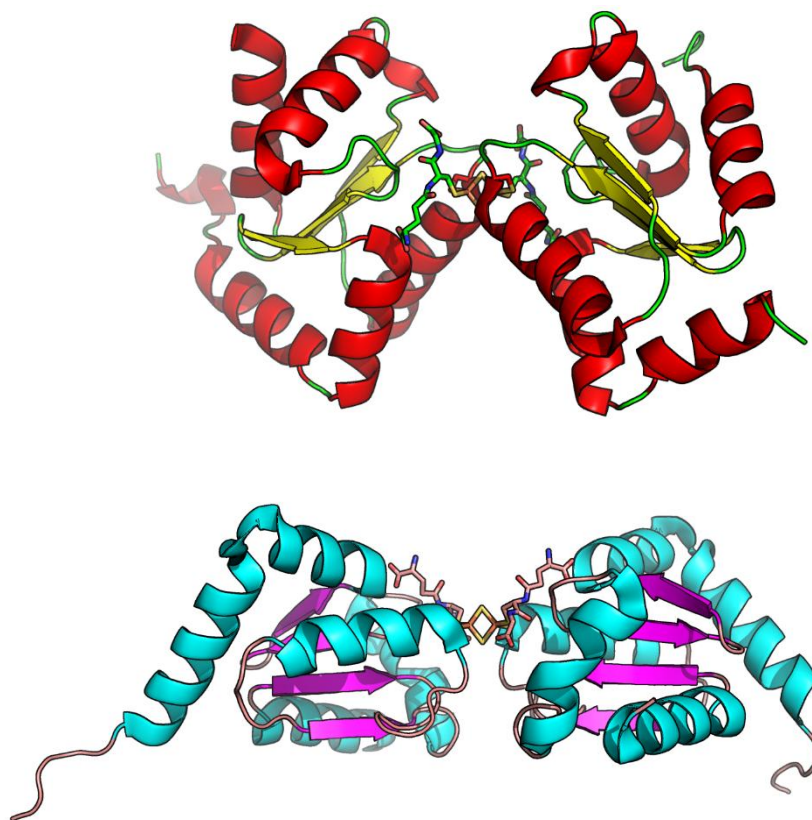


Figure n°22 Représentation en mode ruban et flèche d'une Grx de classe I (HsGrx2, code pdb 2HT9, en haut) et d'une Grx de classe II (EcGrx4, code pdb 2WCI, en bas) sous forme holodimérique. Le centre [2Fe-2S] ainsi que les molécules de GSH et les cystéines catalytiques sont représentés en bâtons.

II.A.3.b. Les tétramères

Au-delà de la forme dimérique des Grx, il s'avère que certaines Grx ont la capacité de former des tétramères. Cette tétramérisation a été observée *in vitro* dans le cas de la Grx6 (classe I) de *S. cerevisiae* et dépend d'une extension N-terminale qui permet une oligomérisation non covalente (Luo et al, 2010; Mesecke et al, 2008). De façon intéressante la structure de la Grx5 humaine (Figure n°23) présente la particularité d'être sous la forme d'un tétramère (deux dimères) incorporant 2 centres [2Fe-2S] (Johansson et al, 2011). Un arrangement équivalent est observé dans le cas de la Grx4 d'*E. coli*. Cette forme oligomérique de la Grx5 a été confirmée par

diverses expériences *in vitro* comme la gel-filtration et la centrifugation analytique (Johansson et al, 2011).

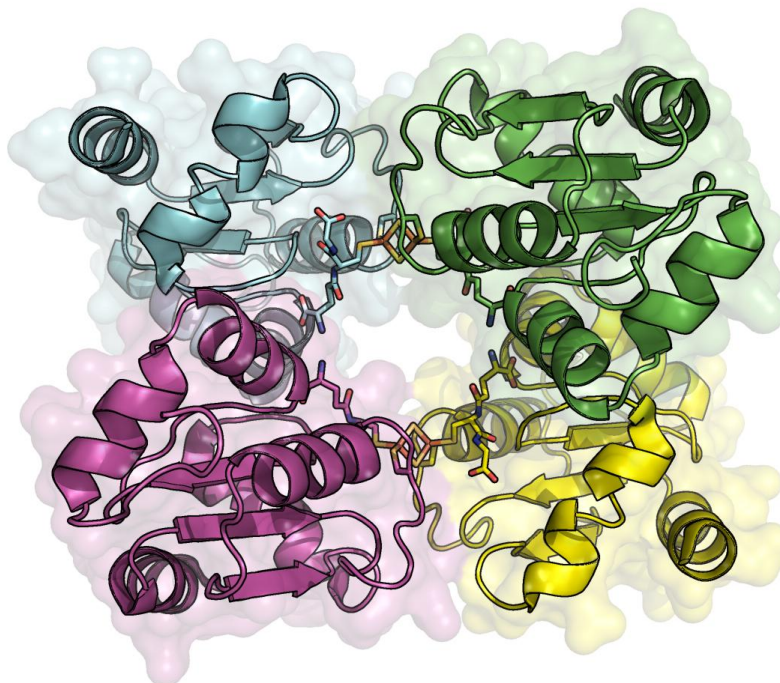


Figure n°23 Organisation tétramérique de la Grx5 humaine (code pdb 2WUL). Les différents monomères sont représentés par des couleurs différentes. Les glutathions, les centres [2Fe-2S] ainsi que les cystéines catalytiques sont représentés en bâtons.

II.B. Fonction enzymatique des glutarédoxines

La Grx est une enzyme ubiquitaire importante dans le maintien de l'homéostasie redox des groupements thiols de la cellule dépendant du pouvoir réducteur du NADPH. Ce processus vital pour la cellule fait intervenir deux systèmes supposés distincts. L'une de ces voies utilise la Trx et la thiorédoxine réductase alors que l'autre voie utilise la Grx avec le GSH et la glutathion réductase (Prinz et al, 1997). Les Grx, réduites par le GSH en utilisant des électrons donnés par le NADPH, sont connues pour leurs implications dans les réactions de réponses face un stress

oxydant en réalisant majoritairement une déglutathionylation de leur substrat (Rouhier et al, 2004; Rouhier et al, 2008) et sont impliquées dans d'autres réactions d'oxydoréduction et de réductions de ponts disulfure (Figure n°24). De façon générale les Grx sont impliquées dans la fonction antioxydante au sein des cellules avec le concours du GSH (Holmgren, 2000).

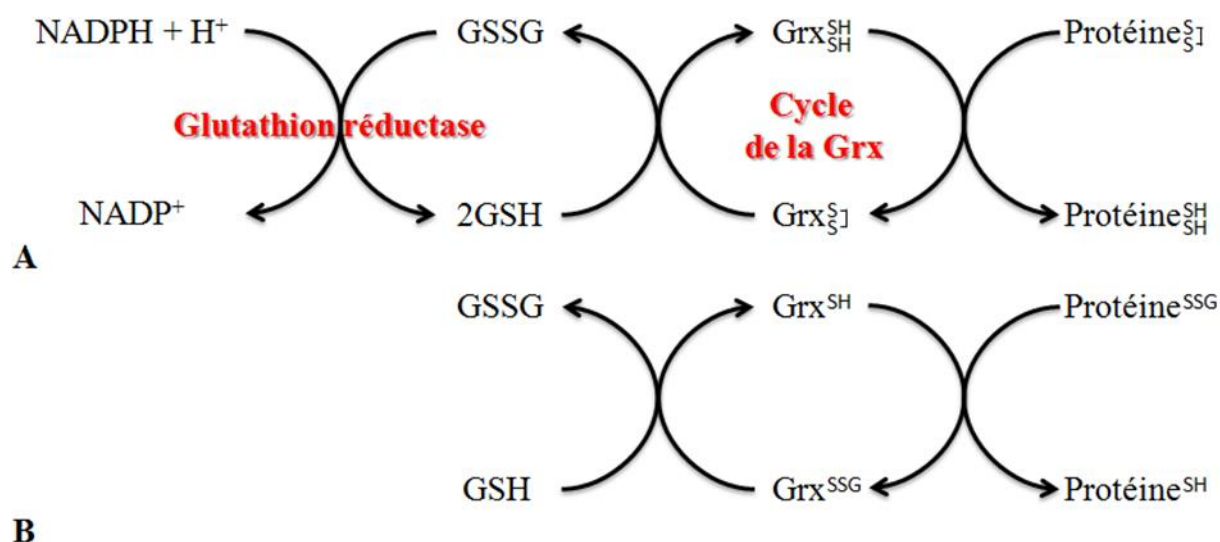


Figure n°24 Représentation des réactions catalysées par les Grx. La Grx catalyse la réduction de ponts disulfure (A) dans les protéines et est impliquée dans la déglutathionylation des protéines (B). Elle est réduite par la conversion de glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé qui sera à son tour recyclé en GSH par la glutathion réductase à l'aide du NADPH.

II.B.1. Les glutarédoxines dans le stress oxydant

Les Grx de classe I et II (Cxx[C/S] et CGFS, respectivement) ne sont pas impliquées dans les mêmes mécanismes biologiques et leurs activités respectives sont différentes. Les Grx de classe I (et peut-être de classe II) peuvent catalyser la réduction de pont disulfure au sein de protéines par le biais de la première cystéine catalytique. Il y a tout d'abord une attaque nucléophile sur le pont disulfure cible. Le pont disulfure intermédiaire alors formé entre les protéines est attaqué par le second thiolate de la signature CxxC pour les Grx de classe I ou par une molécule de GSH pour les Grx de classe II. Le pont disulfure intramoléculaire résultant pour

les Grx de classe I est ensuite réduit par une molécule de GSH. A ce stade la première cystéine est glutathionylée et le mécanisme de régénération de cette cystéine est identique pour les deux classes de Grx. La première cystéine sera enfin régénérée par une molécule de GSH conduisant à la formation de glutathion oxydé qui sera ensuite reconverti en deux molécules de GSH par le biais de la glutathion réductase et du NADPH.

En plus de leur action classique de déglutathionylation des protéines, certaines glutarédoxines de classe I possèdent une activité glutathion peroxydase et glutathion transférase (Collinson & Grant, 2003; Collinson et al, 2002; Lee et al, 2002). Elles présentent aussi une activité *in vitro* avec de petites molécules comme le β -hydroxyethyl disulfide (HED) et une activité déhydroascorbate réductase (DHAR) (Bushweller et al, 1992; Holmgren & Aslund, 1995). Contrairement aux Grx de classe I, la Grx5 de levure, la Grx4 d'*E. coli* et la PfGLP-1 de *P. falciparum* (toutes des Grx de classe II) sont inactives avec le HED ce qui montre une différence catalytique entre les deux classes et l'incapacité des Grx de classe II à déglutathionyler de petites molécules (Fernandes et al, 2005; Rahlfs et al, 2001; Tamarit et al, 2003). Il a également été montré chez *E. coli* que les Grx de classe I participent à l'activation/réduction de la ribonucléotide réductase, de la 3'-phospho-adénylyl-sulfate réductase (PAPS), de l'arséniate réductase (détoxification) et du facteur de transcription OxyR impliqué dans la réponse à un stress oxydant (Carmel-Harel & Storz, 2000; Fernandes & Holmgren, 2004). Chez *S. cerevisiae*, les Grx de classe I (Grx1 et Grx2) sont aussi impliquées dans la réponse face à un stress oxydant (Molina et al, 2004). La Grx1 apparaît importante pour la protection contre les radicaux superoxydes alors que la Grx2 semble importante pour la protection contre le stress lié aux peroxydes (Luikenhuis et al, 1998). Par ailleurs, les Grx de classe II de *S. cerevisiae* (Grx3/4-PICOT nucléocytoplasmiques) ne semblent pas jouer un rôle critique dans la réponse à un stress

oxydant et elles ne sont pas impliquées dans les processus de déglutathionylation (Shenton et al, 2002). Bien qu'il soit clair que les Grx de classe I sont impliquées dans la réponse envers un stress oxydatif, pour les Grx de classe II, il est plus difficile de trancher car il a été montré que la Grx5 de *S. cerevisiae* (classe II) peut réduire l'anhydrase carbonique III *in vitro* et qu'elle est également impliquée dans la protection des protéines contre un stress oxydatif (Rodríguez-Manzaneque et al, 1999; Tamarit et al, 2003).

Ceci permet de mettre en avant des différences au sein des Grx de classe II, sans doute entre les Grx mono-domaines et les Grx dites PICOT et entre Grx ayant une localisation cellulaire différente. La Grx5 mitochondriale semble également jouer un rôle clé dans la machinerie de synthèse et de transport des centres Fe-S puisque la Grx5 est directement reliée à deux enzymes, l'aconitase et à la succinate déshydrogénase, qui nécessitent des centres Fe-S pour exercer leurs fonctions respectives (Rodríguez-Manzaneque et al, 2002). L'une des différences majeures entre les Grx de classe I et II réside dans leur capacité à interagir avec le GSH (réaction de déglutathionylation) et dans leur fonction au niveau de l'homéostasie du fer.

II.B.2. Les glutarédoxines dans l'homéostasie du fer

Le fer est un oligoélément indispensable à la vie présent dans les cofacteurs de diverses protéines et dont la structure électronique favorise la formation de deux états d'oxydation différents, fer ferreux (Fe^{II}) et fer ferrique (Fe^{III}). Cette capacité rend le fer idéal pour son utilisation dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction. Cependant, cette même propriété rend toxique un excès de fer libre. Dans le cytoplasme des cellules, une partie importante du fer est sous forme réduite et peut donc participer à la réaction de Fenton : $\text{Fe}^{\text{II}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$. Le Fe^{II} réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour générer du Fe^{III} , des ions hydroxydes (OH^-) et des radicaux hydroxyles ($\text{OH}^\bullet$) qui sont eux très réactifs. L'ensemble de ces

radicaux représente alors un risque pour l'intégrité des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques. Ainsi une accumulation du fer, comme une carence, peut conduire à la mort cellulaire, c'est pourquoi la concentration en fer doit être soigneusement contrôlée et limitée. Outre les systèmes de stockage et de transport déjà caractérisés au niveau du contrôle du fer chez les organismes vivants, le fer qui entre dans la composition de certaines molécules (comme les hèmes et les centres Fe-S), peut aussi se complexer avec certaines enzymes pour en modifier les propriétés. Parce que ce métal a une forte réactivité et conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, l'homéostasie du fer doit être strictement contrôlée afin de prévenir les effets délétères et éviter le stress oxydatif. Par conséquent, divers mécanismes en lien avec l'absorption du fer, le transport entre les différents compartiments cellulaires, l'utilisation et le stockage dans les cellules sont mis en place.

À côté de leur fonction dans la défense antioxydante chez les bactéries, il a été montré récemment que les Grx sont impliquées dans la régulation et le transport du fer (Rodríguez-Manzaneque et al, 1999). L'intervention des Grx au niveau de l'homéostasie du fer se fait à plusieurs niveaux, de la régulation des gènes au transport final à des apoprotéines. Il semble tout d'abord que les Grx interviennent « en amont » de la synthèse dans la régulation de gènes en réponse au fer. Cette intervention semble évidente chez *S. cerevisiae* puisque les Grx 3 et 4 (Grx de classe II) semblent jouer un rôle clé avec les protéines BolA dans la régulation des facteurs de transcription Aft1 (iron-regulated transcriptional activator) et Aft2 (Ojeda et al, 2006; Poor et al, 2014). Cette régulation semble s'effectuer par un complexe Grx-BolA holo-hétérodimérique. En effet, il semble que les protéines de la classe BolA interviennent avec les Grx en réponse à un stress oxydant et dans certains cas dans l'incorporation d'un centre [2Fe-2S] qui permettrait la signalisation cellulaire sur la quantité de fer présent dans la cellule (Li et al, 2011a). La régulation

apportée par les Grx peut également s'effectuer lors de la synthèse des centres Fe-S. En effet, chez *A. thaliana* par exemple, on retrouve une cystéine désulfurase nommée AtNfs2 qui est impliquée dans les étapes précoces de la synthèse des centres Fe-S. La protéine AtNfs2 qui peut être induite par un stress va être suractivée par son partenaire biologique la sulfurtransférase AtSufE1 qui va prendre le soufre pour l'amener au lieu de synthèse des centres Fe-S. Les Grx de classe II pourraient être impliquées dans la régulation de cette étape suite à un stress car la protéine AtSufE1 possède un domaine Bola capable d'interagir avec les Grx de classe II (Couturier et al, 2014). Enfin les Grx interviennent également dans les dernières étapes de la synthèse des centres Fe-S en jouant un rôle dans le transport des centres et dans la maturation des protéines nécessitant un centre Fe-S. Ainsi, il semble que la Grx5 joue un rôle majeur à ce niveau puisqu'elle intervient dans la maturation de nombreuses molécules. Chez les vertébrés, elle est requise pour la synthèse de l'hème (Wingert et al, 2005). Des structures ont été caractérisées seulement pour des centres [2Fe-2S] mais il a été montré que les Grx de classe II peuvent également incorporer des centres [3Fe-4S] et [4Fe-4S] (Zhang et al, 2013). Par ailleurs le nombre de centres fixés au sein d'une forme holo peut varier comme pour la glutarédoxine 3 PICOT humaine qui possède deux domaines Grx-CGFS pouvant fixer un centre [2Fe-2S] chacun (Haunhorst et al, 2010).

Ainsi la fonction d'un homodimère de Grx de classe II semble être différente de celle retrouvée chez les Grx de classe I. Bien que les Grx de classe II soient impliquées dans le transport du centre [Fe-S] vers des protéines acceptrices comme par exemple la ferrédoxine (*in vitro*) ou encore la fumarate nitrate réductase (FNR) (Achebach et al, 2004; Bandyopadhyay et al, 2008) et dans la régulation de gènes en réponse au fer et dans la maturation de certaines protéines

(Kumánovics et al, 2008), les Grx de classe I auraient plutôt un rôle de senseur du stress oxydant (Lillig et al, 2005; Rouhier et al, 2007).

II.C. Régulation de facteurs de transcription

II.C.1. Les facteurs de transcription TGA et les glutarédoxines de classe III

Les facteurs de transcription de la famille TGA à domaine leucine *zipper* constituent une sous-famille conservée de régulateurs de la transcription présente chez les plantes. Chez l'organisme modèle *A. thaliana* il y a la présence d'au moins 10 facteurs de transcription TGA noté TGA1-7, PERIANTHIA (PAN) et TGA9-10 (Murmu et al, 2010; Shearer et al, 2009). Les facteurs PAN, TGA9 et TGA10 sont impliqués dans le développement de la plante alors que les facteurs TGA1 à TGA7 sont associés aux processus de détoxification et de défense contre les molécules xénobiotiques et dont les cibles génomiques sont notamment les glutathion-S-transférases (Murmu et al, 2010; Zhang et al, 2003). Par exemple, il a été montré que les facteurs TGA2, TGA5 et TGA6 sont impliqués dans la défense contre le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* (Zhang et al, 2003). L'intervention de tels facteurs au niveau de la protection des plantes semble reliée à celle de glutarédoxines de classe III. Elles sont présentes en très grand nombre chez les plantes dont 21 isoformes chez *A. thaliana* (Rouhier et al, 2006). Il s'avère que la Grx ROXY1 (classe III) a la capacité de catalyser la réduction de TGA1, TGA9 et TGA10 et peut également interagir avec TGA2 au niveau du noyau (Murmu et al, 2010; Ndamukong et al, 2007). Tout comme ROXY1, ROXY2 (classe III) peut catalyser la réduction de TGA9 et TGA10 (Murmu et al, 2010). Ceci met en évidence le fait que certaines Grx ont la capacité de jouer leur rôle d'oxydoréductase dans le noyau par le biais de modifications post-traductionnelles réalisées au niveau des facteurs TGA (Li et al, 2009b). En effet, l'activité de ces facteurs est dépendante de l'état d'oxydation de une ou deux cystéines présentes en C-terminal de la protéine et que les Grx

de classe III pourraient venir réduire (Murmu et al, 2010). Cette interaction entre les Grx de classe III et les facteurs de transcription TGA semble être essentielle pour le développement de la fleur notamment des pétales et de l'anthère (Murmu et al, 2010; Ndamukong et al, 2007). Dans le cas de ROXY1 les séquences LxxLL et ALWL situées au niveau de l'hélice $\alpha 5$ (en C-terminal) semblent primordiales pour l'interaction avec TGA (Li et al, 2011b). Par la méthode de double hybride il a pu être montré que ROXY1 peut interagir avec tous les facteurs TGA d'*Arabidopsis*. Ainsi il semble exister une forte affinité entre ROXY1 et les facteurs TGA3 et TGA7, une affinité intermédiaire pour TGA2 et une faible affinité pour TGA1, TGA4, TGA5 et TGA6 (Li et al, 2009b).

II.C.2. Les facteurs de transcription Aft et le couple BolA-Grx de classe II

L'implication des Grx dans les étapes précoces de la biosynthèse des centres Fe-S telles que la régulation de l'opéron du fer a principalement été étudiée chez la levure. Des études génétiques et biochimiques ont montré que la régulation de l'opéron du fer chez la levure *S. cerevisiae* était une voie composée de plusieurs étapes et impliquant des protéines venant de différents compartiments cellulaires tels que la mitochondrie, le cytosol et le noyau. Il a été montré très récemment que les glutarédoxines de classe II PICOT (Grx3 et Grx4) sont impliquées dans la régulation des facteurs de transcription Aft1 et Aft2 chez *S. cerevisiae* (Pujol-Carrion et al, 2006; Ueta et al, 2007; Ueta et al, 2012). La localisation cellulaire des Grx3/4 (Grx3 ou Grx4) ainsi que celle des facteurs de transcription Aft1/2 est nucléo-cytoplasmique (Figure n°25). Dans le cas des Grx3/4 la localisation nucléaire est dépendante de leur domaine N-terminal du type thiorédoxine alors que dans le cas d'Aft1/2 la localisation nucléaire est dépendante de la concentration intracellulaire en fer (Lopreiato et al, 2004; Yamaguchi-Iwai et al, 2002).

Il a été supposé que la multimérisation d'Aft1 ainsi que son export du noyau vers le cytoplasme par la protéine Msn5p (RanGTP-binding protein) sont régulés ou induits par les Grx3/4 dans des conditions riches en fer (Pujol-Carrion et al, 2006; Ueta et al, 2007; Ueta et al, 2012). Une autre hypothèse serait que les Grx3/4 empêcheraient d'une manière ou d'une autre Aft1/2 d'interagir avec de l'ADN (Li et al, 2011a).

L'inhibition de l'opéron du fer par Aft1 est dépendante d'un signal mitochondrial provenant de la machinerie de biosynthèse des centres Fe-S, signal relayé par un complexe multiprotéique impliquant les Grx3/4 ainsi que les protéines Fra1 et Fra2 (Kumánovics et al, 2008). Des résultats suggèrent que Fra1 (aminopeptidase) et Fra2 (BolA_C) sont des protéines « signal » cytosoliques qui sont liées à la concentration des centres Fe-S dans la cellule (Kumánovics et al, 2008). La formation des holo-hétérodimères Fra2-Grx3/4 incorporant des centres [Fe-S] module d'une part l'activité d'Aft1 (Li et al, 2009a) et d'autre part modifie la fonction de transport des centres Fe-S des Grx3/4 (Li et al, 2011a). Il a supposé que ces hétérocomplexes Fra2-Grx3/4 soient des senseurs du fer intracellulaire en interagissant et modulant l'activité des facteurs de transcription Aft1/2 (Li et al, 2011a). Toutes ces modulations de l'activité du facteur de transcription Aft1 sont effectuées par interaction directe avec la Grx et semblent être effectuées par des éléments importants de celle-ci comme la cystéine catalytique et le GSH (Ayer et al, 2010; Ojeda et al, 2006). Du côté de Fra2 il s'avère que la présence de l'histidine dans la coordination du centre [2Fe-2S] est aussi un élément important car sa mutation empêche l'inhibition fer-dépendante de l'activité d'Aft1 (Li et al, 2011a). En plus des résidus déjà identifiés au sein du complexe Fra2-Grx3/4, il semble que la modulation de l'activité d'Aft1 est dépendante de son motif $_{291}CxC_{293}$. L'interaction Aft1-Grx3/4 a déjà été montrée par double hybride et par co-immunoprécipitation et s'effectue au niveau C-terminal du côté Grx (Hoffmann

et al, 2011; Ojeda et al, 2006). Il est intéressant de noter que les Grx ROXY utilisent cette même région pour interagir avec les facteurs de transcription TGA (voir ci-dessus).

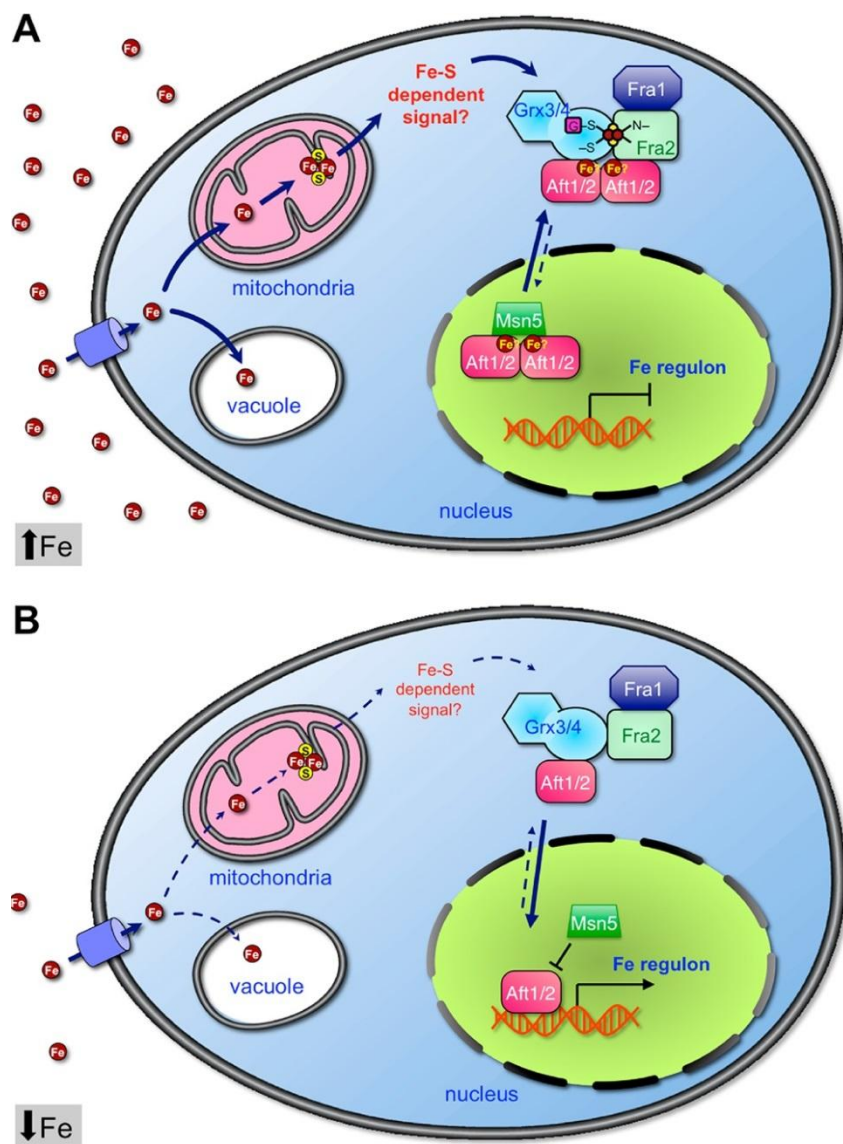
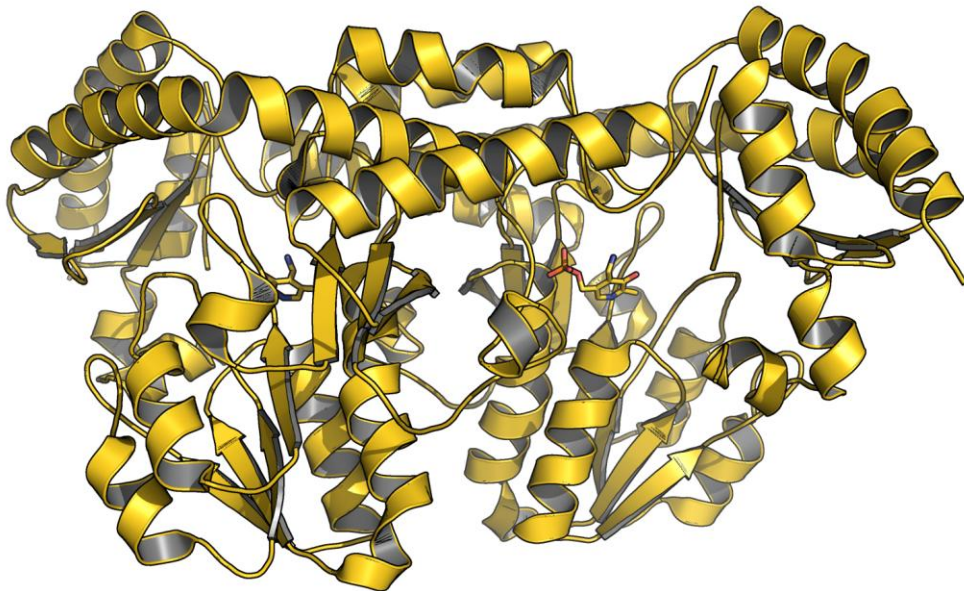


Figure n°25 Schéma représentant les conséquences sur Aft1/2 d'une forte (A) ou d'une faible (B) concentration en fer intracellulaire. L'intervention des couples Grx3/4 et Fra1/2 est également représentée. Adapté de (Li & Outten, 2012).

Les cystéine désulfurases



III. Les cystéine désulfurases

La cystéine, acide aminé essentiel au sein des protéines, est utilisée comme source de soufre pour la biosynthèse de très nombreux cofacteurs comme la biotine (vitamine B8), l'acide lipoïque, la molybdoptérine et la thiamine, ainsi que pour la production de centres Fe-S au niveau des protéines et comme thionucléosides pour l'ARNt (Mihara & Esaki, 2002). En raison de la toxicité inhérente au fer libre et au soufre, la biogenèse des centres Fe-S est médiée par des protéines spécifiques plutôt que par une formation chimique spontanée. Ces enzymes essentielles à la maturation des centres Fe-S ont tout d'abord été identifiées au sein du cluster de gènes *nif* chez *Azotobacter vinelandii* (Jacobson et al, 1989). Le mécanisme réel d'utilisation de ce soufre est encore peu connu néanmoins une cystéine désulfurase intervient dans la première étape à savoir la récupération du soufre par désulfuration d'une L-cystéine.

III.A. Classification

La toute première cystéine désulfurase à avoir été identifiée est la protéine NifS (NIF : Nitrogen-Fixation) qui fait partie d'un complexe impliqué dans la fixation de l'azote chez *A. vinelandii* (Zheng et al, 1993). Par la suite, un homologue de NifS a été identifié toujours chez *A. vinelandii* et nommé IscS (ISC : Iron-Sulfur Clusters) pour son rôle supposé dans la biosynthèse des centres Fe-S (Schwartz et al, 2000). De façon intéressante, beaucoup d'organismes possèdent plusieurs équivalents du gène *nifs*. Par exemple *E. coli* possède trois protéines homologues à NifS/IscS d'*A. vinelandii*. Elles ont été nommées IscS, CsdA (CSD : Cysteine Sulfinate Desulfinase) et SufS (SUF : SUIFur-mobilization). Dans certains cas SufS est aussi nommée CsdB. Les CD appartiennent au groupe des aminotransférases de classe V (Figure n°26) possédant un repliement particulier (Grishin et al, 1995). Au sein de cette classe, les CD sont séparées en deux groupes (I et II) selon leur séquence (Mihara et al, 1997). Ainsi d'après les

séquences, NifS et IscS appartiennent au groupe I tandis que CsdA et SufS sont des représentants du groupe II (Loiseau et al, 2005; Outten et al, 2003).

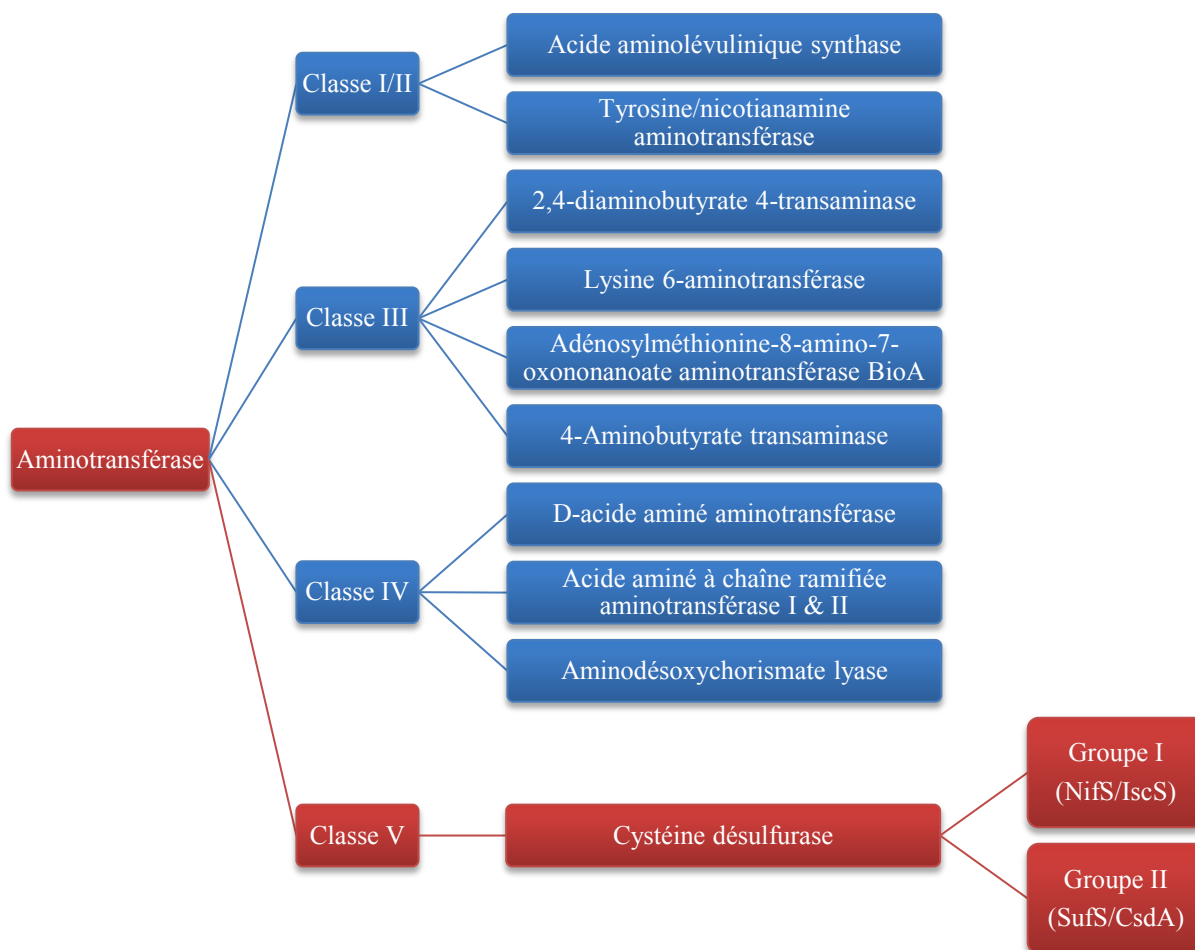


Figure n°26 Représentation schématisée des différentes classes d'aminotransférases. Classification basée sur des données issues du site www.ebi.ac.uk. Les codes d'accès sont IPR004839 (classe I/II), IPR005814 (classe III), IPR001544 (classe IV) et IPR000192 (classe V).

III.A.1. La cystéine désulfurase de l'opéron NIF

Toutes les CD impliquées dans la mobilisation du soufre pour la création d'un centre Fe-S font partie d'un plus grand ensemble faisant intervenir de nombreuses protéines regroupées la plupart du temps sous la forme d'un opéron. Des analyses biochimiques montrent que la protéine NifS est une cystéine désulfurase dépendante du phosphate de pyridoxal (PLP). Ces enzymes

fonctionnent avec le PLP comme un cofacteur qui va se fixer de façon covalente à une lysine bien conservée à proximité de la cystéine catalytique qui est un résidu invariant au sein des CD (Zheng & Dean, 1994; Zheng et al, 1993). Cette cystéine permet l'attaque nucléophile du groupe sulfhydryle du substrat cystéine et il en résulte la formation d'un intermédiaire cystéine persulfide suite à la conversion de la cystéine en alanine. Le mécanisme catalytique de la désulfuration des cystéines ou de la déséléation des sélénocystéines catalysée par les isoformes d'*E. coli* est initié par la formation d'une base de Schiff avec le PLP (voir partie III.A.4). Il a été proposé que NifS fournit le soufre inorganique requis pour la formation de métallos-centre au sein de la nitrogénase en présence de cystéine et de fer ferreux *in vitro* (Zheng & Dean, 1994). La nitrogénase est responsable de la conversion du N_2 en NH_3 chez la bactérie. NifS est également impliquée dans la synthèse de la biotine (vitamine B8) et de l'acide lipoïque chez *E. coli* (Kiyasu et al, 2000; Mihara & Esaki, 2002). NifS fait partie de l'opéron NIF regroupant plusieurs protéines dont la protéine NifU qui va servir de transporteur pour le soufre et l'emmener au lieu de synthèse des différentes molécules telles que les centres Fe-S (Yuvaniyama et al, 2000).

III.A.2. La cystéine désulfurase de l'opéron ISC

Il a été montré que IscS joue un rôle majeur dans l'assemblage des centres Fe-S alors que NifS est plus spécialisée dans la maturation de la nitrogénase *in vivo*. IscS est une enzyme de « ménage » qui a une activité cystéine désulfurase et mobilise le soufre de la cystéine notamment pour la réparation de centres [4Fe-4S] au sein de la dihydroxy-acide déshydratase (Flint, 1996). Cette étape intervient en amont de la biosynthèse du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide). IscS est également impliquée dans la biosynthèse de la thiamine (vitamine B1) et dans la modification des ARNt chez *E. coli* (Lauhon & Kambampati, 2000; Schwartz et al, 2000).

III.A.3. La cystéine désulfurase de l'opéron *SUF*

Au sein de l'opéron *sufABCDE* la protéine SufS est utilisée de façon préférentielle dans des conditions limitantes en fer et dans des conditions de stress oxydatif (Outten et al, 2004; Outten et al, 2003). Contrairement aux autres CD, SufS montre une faible activité envers la L-cystéine comme substrat et une meilleure activité avec la L-sélénocystéine. C'est pour cela qu'elle est plutôt classée comme sélénocystéine lyase chez les mammifères (Mihara et al, 2000a). L'acte de déséléation est différent car il ne nécessite pas la présence de la cystéine nécessaire à l'activité désulfurase. Malgré cette préférence, plusieurs évidences ont montré son implication dans la biosynthèse de centres Fe-S, et elle peut fournir le soufre dans le cas de la biosynthèse de la molybdoptérine chez *E. coli* (Mihara & Esaki, 2002; Zhang et al, 2010). Cette dernière action est également réalisée par les deux autres CD présentes chez *E. coli* à savoir IscS et CsdA. L'activité de désulfuration réalisée par SufS peut néanmoins être très largement améliorée lorsque la sulfurtransférase SufE est présente (Loiseau et al, 2003). Ainsi au sein de cet opéron, le complexe SufE-SufS joue un rôle important au niveau de la récupération et de la livraison du soufre soit à SufB au sein du complexe SufBC₂D soit directement à la protéine « échafaudage » SufA (*in vitro*) qui aura une de ses cystéines sous la forme d'un intermédiaire persulfide (Layer et al, 2007; Sendra et al, 2007). Le complexe SufBC₂D possède une activité ATPase et va faire la biosynthèse du centre Fe-S (Figure n°27). Une fois que le centre [4Fe-4S] ou [2Fe-2S] sera synthétisé, il sera pris en charge par SufA qui l'emmènera vers des protéines acceptrices (Loiseau et al, 2003).

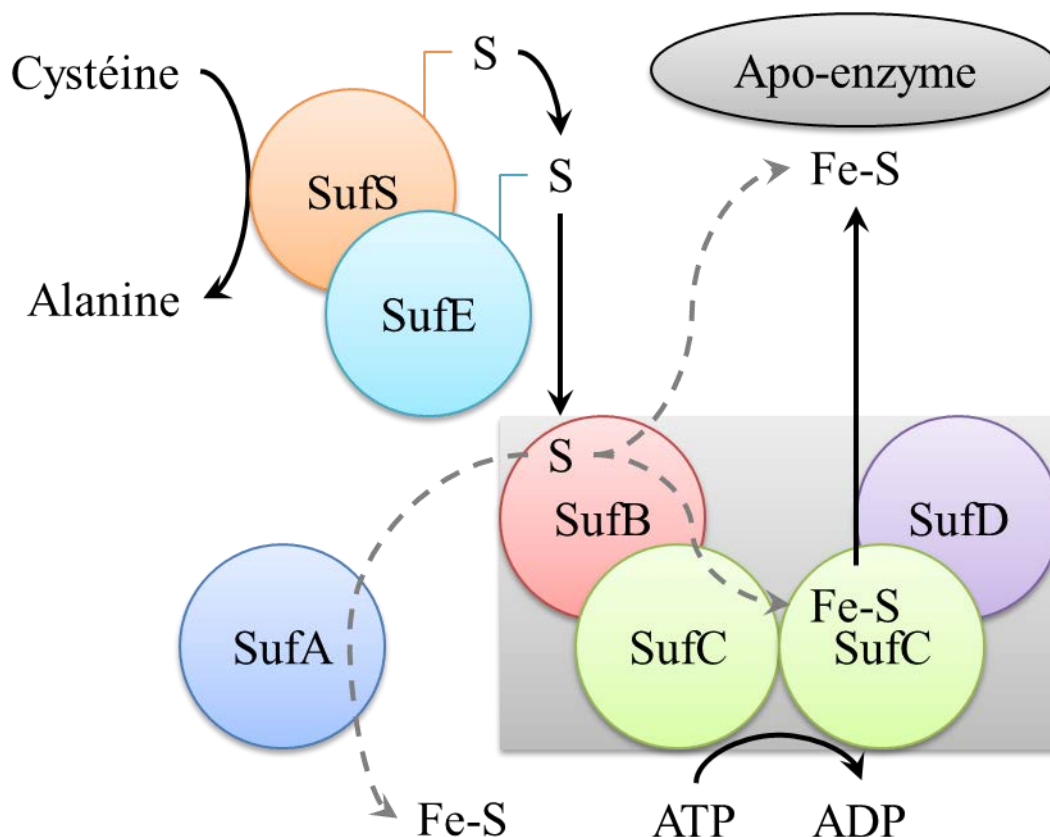


Figure n°27 Schéma représentant le système de synthèse des centres Fe-S au sein de l'opéron *SufABCDE*.

III.A.4. La cystéine désulfurase de l'opéron *CSD*

Il est intéressant de noter que le système CSD (opéron *csdAE*) a été le dernier à être découvert (Mihara et al, 2000b). Dans le cas des trois isoformes retrouvés chez *E. coli*, il s'avère que CsdA est la plus efficace des CD et qu'elle possède en plus une activité de déséléation (Mihara et al, 2000b). Ces activités sont dues au fait que CsdA peut prendre en charge un grand nombre de substrats tels que l'acide sulfinique, la L-sélénocystéine et la L-cystine (Mihara et al, 1997). Le soufre ou le sélénium ainsi récupéré doit ensuite être transféré à une protéine cible (Loiseau et al, 2005). Tout comme les autres CD, CsdA est aussi impliquée dans la biogénèse des centres Fe-S et nécessite tout comme SufS la présence d'une sulfurtransférase (SufE ou CsdE)

pour jouer pleinement son rôle et amener le soufre au lieu de synthèse (SufBCD) des centres Fe-S (Loiseau et al, 2005; Trotter et al, 2009). Récemment la structure du complexe formé par CsdA-CsdE a été résolue par cristallographie des rayons X (Kim & Park, 2013). Au sein de ce complexe les deux protéines sont dans une conformation où la cystéine C61 de CsdE se retrouve proche de la cystéine C358 de CsdA mimant ainsi le complexe fonctionnel. Bien qu'impliquée dans la biogénèse des centres Fe-S, CsdA intervient aussi dans une autre voie par le biais de CsdL (ex-YgdL) dans la biosynthèse de composés thiolatés (Trotter et al, 2009).

III.B. Propriétés des cystéine désulfurases

III.B.1. Structure

Les cystéine désulfurases sont des enzymes se présentant sous la forme d'homodimères (Figure n°28) constitués de monomères d'environ 400 acides aminés. Les CD des groupes I et II adoptent le même repliement qui est le plus souvent décrit sous la forme de deux domaines (Kaiser et al, 2000). Le premier est défini autour d'un feuillet de 7 brins β incluant un site de fixation du PLP lequel est stabilisé par de nombreuses liaisons hydrogène et par le noyau imidazole d'une histidine conservée réalisant des interactions de π -stacking. Le deuxième domaine correspond à la zone autour du deuxième feuillet composé de 4 à 6 brins β . Ce domaine comprend aussi une extension dans laquelle se trouve la cystéine catalytique des CD. Enfin, il arrive qu'un troisième domaine soit défini au sein des CD. Ce domaine est le plus variable dans la littérature car il comprend uniquement des hélices α qui n'ont pas été rattachées aux deux domaines précédents (Figure n°28). Le site actif des CD de groupe I et II est différent même si elles possèdent les mêmes propriétés enzymatiques (Mihara & Esaki, 2002). En effet, le site actif des CD de groupe II est plus enfoui et plus stabilisé que celui des CD de groupe I. Cette relative instabilité du site actif (ou cette agitation thermique) pour les CD de groupe I est visible au sein

des différentes structures résolues car dans la plupart des cas des résidus sont non modélisés au niveau du site actif (Cupp-Vickery et al, 2003).

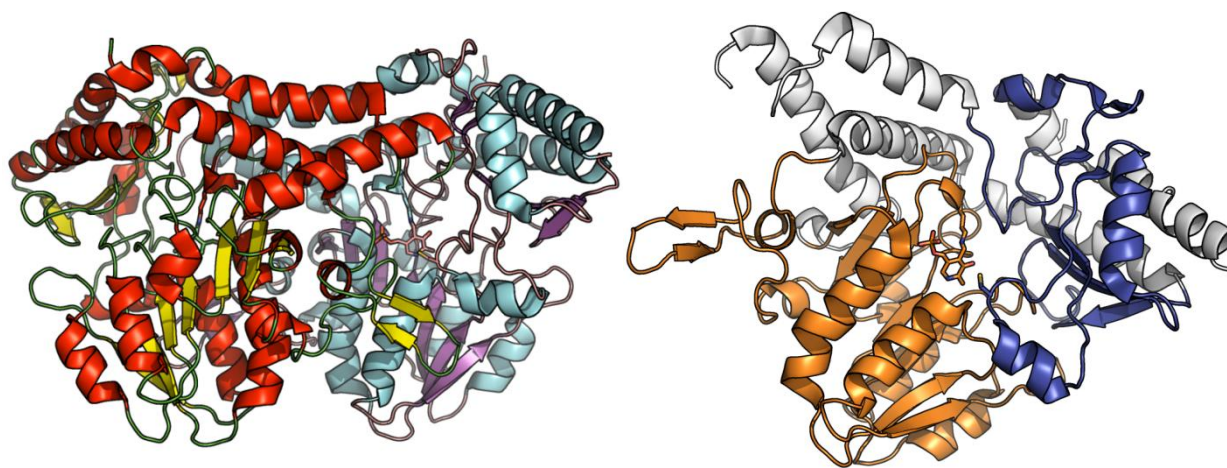


Figure n°28 Représentation en mode ruban et flèche du dimère de la cystéine désulfurase SufS de *Synechocystis* (code pdb 1T3I) à gauche. La figure de droite représente un monomère avec les différents domaines. Le premier domaine est en orange (site de fixation du PLP), le deuxième domaine portant la cystéine catalytique est en bleu et le troisième domaine composé uniquement d'hélices α est en blanc.

III.B.2. Mécanisme enzymatique

La fonction réelle des cystéine désulfurases est de récupérer le soufre pour la synthèse de biomolécules par le biais du PLP et la plupart du temps de leur cystéine catalytique. Le mécanisme enzymatique (Singh et al, 2013a) par lequel elles réalisent la désulfuration de cystéines est résumé ci-dessous (Figure n°29). A l'heure actuelle de très nombreuses structures de CD ont été résolues que ce soit pour le groupe I ou II ce qui a permis d'observer différents états de la réaction de désulfuration. Bien que les CD des groupes I et II présentent des différences structurales le mécanisme enzymatique admis reste globalement le même.

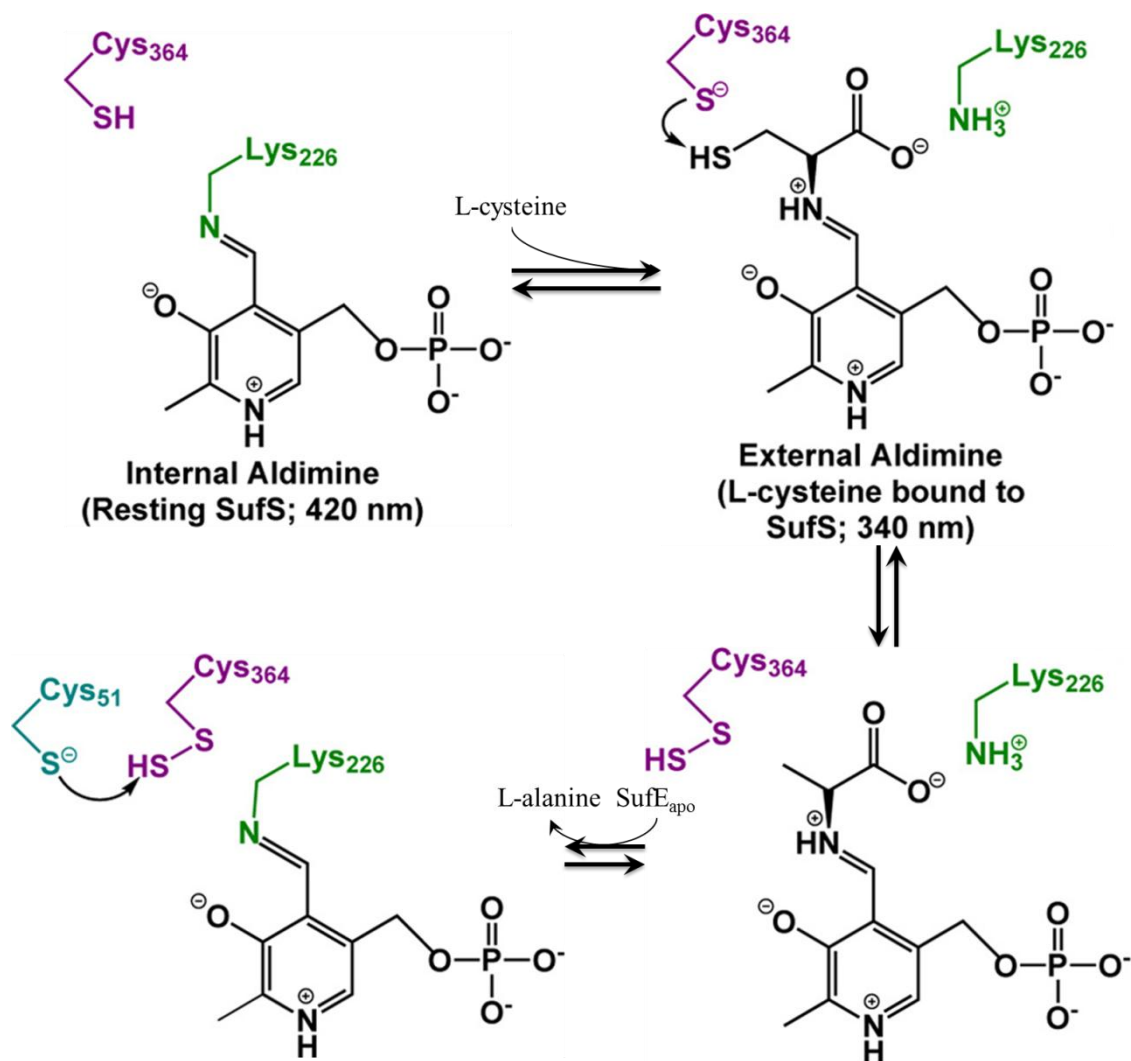


Figure n°29 Mécanisme catalytique de la désulfuration d'une cystéine catalysée par une SufS. Les résidus marqués en violet (C364) et vert (K226) appartiennent à SufS et le résidu en bleu (C51) appartient à la sulfurtransférase SufE. Adapté de Singh et al, 2013a.

III.B.3. Les cystéine désulfurases de plantes

III.B.3.a. Identification chez *Arabidopsis thaliana*

A partir de l'étude d'*A. thaliana*, uniquement deux CD classiques participant à la biogenèse des centres Fe-S sont retrouvées (Pilon et al, 2009). Cependant au sein de la sulfurase ABA3 qui nécessite la présence d'un cofacteur à molybdène (MoCo) il y a la présence en N-

terminal d'un domaine cystéine désulfurase fonctionnel (Bittner et al, 2001). La première CD à avoir été identifiée est Nfs1 (groupe I-IscS) dont la localisation subcellulaire est mitochondriale alors que la deuxième est chloroplastique et est nommée Nfs2 (groupe II-SufS) (Kushnir et al, 2001; Léon et al, 2002). Bien que les deux organites contiennent une chaîne de transport d'électrons qui dépend de l'assemblage de protéines à centres Fe-S, ils contrastent néanmoins d'un point de vue oxydo-réduction. Par le biais de la respiration mitochondriale il y a consommation d'oxygène tandis que la photosynthèse, présente dans les chloroplastes, participe à la génération d'oxygène. En outre, la photosynthèse est connue pour produire des espèces réactives de l'oxygène, ce qui peut conduire à un stress oxydatif. La stabilité des centres Fe-S dépendant de la concentration en oxygène, il n'est pas surprenant que Nfs2 soit semblable aux SufS bactériennes, qui sont supposées fonctionner suite à un stress oxydatif (Van Hoewyk et al, 2007). La réalisation d'un mutant Δ Nfs1 ou Δ Nfs2 engendre de graves dysfonctionnements et peut être létale pour la plante ce qui indique qu'il n'y a pas de complémentarité fonctionnelle entre les deux CD (Van Hoewyk et al, 2007).

III.B.3.b. Implications biologiques

Par le biais de leur activité cystéine désulfurase, les deux CD de plantes sont principalement impliquées dans les étapes précoces de la biogenèse des centres Fe-S. Au niveau de la mitochondrie, Nfs1 participe à la maturation de l'aldéhyde oxydase qui contient deux centres [2Fe-2S] (Frazzon et al, 2007). Indépendamment de la machinerie de biosynthèse des centres Fe-S, il a également été montré *in vitro* que Nfs1 stimule la formation de la vitamine B8 (Picciocchi et al, 2003). Au niveau du chloroplaste, Nfs2 est impliquée dans la maturation de la ferrédoxine, du cytochrome b6f du photosystème I et de protéines Rieske (Van Hoewyk et al, 2007). Il est intéressant de noter que Nfs2 a la particularité de présenter une activité sélénocystéine lyase 300 fois supérieure à son activité cystéine désulfurase tout comme CsdB

d'*E. coli* (Mihara et al, 1999; Pilon-Smits et al, 2002). Que ce soit Nfs1 ou Nfs2, il s'avère que les deux protéines ont une faible activité cystéine désulfurase mais celle-ci peut être augmentée en présence d'un partenaire biologique. Nfs1 peut ainsi être stimulée en présence de la frataxine qui est notamment impliquée dans l'homéostasie du fer (Qi & Cowan, 2011; Turowski et al, 2012) ou par la sulfurtransférase SufE1 dont la localisation cellulaire varie entre le chloroplaste et la mitochondrie (Xu & Møller, 2006). En comparaison, Nfs2 n'est stimulée que par les sulfurtransférases SufE1, SufE2 et SufE3 (Narayana Murthy et al, 2007; Ye et al, 2006). A titre d'exemple, en présence des sulfurtransférases l'activité cystéine désulfurase de Nfs2 est de 40 à 70 fois supérieure à son activité de base montrant l'importance des SufE au sein du couple Nfs2-SufE (Narayana Murthy et al, 2007; Ye et al, 2006). La particularité de la protéine SufE1 chez les plantes est qu'elle possède en C-terminal un domaine BolA (^{SufE1}BolA) pouvant interagir avec des glutarédoxines de classe II (Xu & Møller, 2006). Il est supposé que l'interaction Grx-^{SufE1}BolA permet une régulation redox au sein du chloroplaste dans le cas de la biosynthèse des centres Fe-S en régulant le complexe Nfs2-SufE1 (Ye et al, 2006). Le gène codant la protéine chloroplastique SufE2 n'est exprimé que dans le pollen et semble impliquée avec Nfs2 dans la biosynthèse de métabolites spécifiques au pollen (Narayana Murthy et al, 2007). La particularité de la protéine chloroplastique SufE3 est qu'elle possède un domaine C-terminal type quinolate synthase NadA nécessitant un centre [4Fe-4S] et SufE3 est impliquée dans les étapes cruciales de la biosynthèse du NAD (Narayana Murthy et al, 2007).

Objectifs

Les protéines de la famille BolA sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques en interagissant avec des partenaires distincts. Parmi les nombreuses actions connues pour les protéines BolA, différentes études ont montré qu'elles peuvent interagir avec de l'ADN en exerçant un rôle de facteur de transcription chez *E. chaffeensis* ainsi que chez *E. coli* et en exerçant un rôle d'endonucléase nécessitant la présence de magnésium chez *C. reinhardtii*. Elles sont également inductibles par différents types de stress notamment chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Enfin, il est supposé qu'elles jouent un rôle dans la régulation de facteur de transcription chez *E. coli* et *S. cerevisiae* en modulant les propriétés fonctionnelles des glutarédoxines de classe II, nécessitant la présence ou pas d'un centre [2Fe-2S]. Il s'avère qu'il y a cooccurrence des gènes BolA et glutarédoxines de classe II dans pratiquement tous les génomes séquencés et que les protéines BolA ne semblent pas interagir avec les glutarédoxines des autres classes. Pour compliquer la compréhension des différents mécanismes de cette famille de protéines, les protéines BolA ont la capacité de former des homodimères covalents (observés au sein d'*A. thaliana* et de *B. bovis*) et des homodimères non-covalents (observés chez *E. coli* ainsi que chez *C. reinhardtii*). Aucune fonction biologique précise n'a été associée pour le moment à l'une de ces deux formes homodimériques. Enfin, BolA peut aussi exister sous la forme d'un domaine comme dans le cas de la sulfurtransférase SufE1 d'*A. thaliana* qui est le partenaire biologique de la cystéine désulfurase Nfs2 impliquée dans la biogénèse des centres Fe-S au niveau du chloroplaste. Ainsi, la fonction exacte des BolA est encore inconnue et ces protéines n'étaient décrites structuralement qu'à l'état monomérique au départ de ce travail.

C'est pour remédier à ce manque d'informations structurales et biochimiques que les équipes « Biostructures et Modélisation » du laboratoire CRM2, « Réponse aux stress et régulation redox » du laboratoire IAM et du « Department of Chemistry and Center for

Metalloenzyme Studies » de l'université de Géorgie à Athens (USA) ont collaboré. Cette thèse s'est articulée autour des trois axes présentés sous la forme de résultats et discussions. Cette étude avait pour objectif principal d'apporter des évidences structurales sur les interactions entre les protéines BolA et les glutarédoxines. Un autre objectif était aussi d'étendre les informations structurales des BolA peu décrites dans la littérature. Les méthodes d'investigation majeures ont été la cristallographie des rayons X et la résonance magnétique nucléaire. Le laboratoire IAM travaille depuis de nombreuses années sur les oxydoréductases de plantes, ainsi le modèle d'étude a été *Arabidopsis thaliana* qui possède 3 BolA plus le domaine BolA de la sulfurtransférase SufE1. Au départ de cette thèse aucune structure tridimensionnelle de ces BolA n'avait été établie. Ainsi, une première étape a été de tenter de caractériser ces structures, la seconde étant d'étudier les modes d'interaction de ces BolA avec les glutarédoxines. Les caractérisations structurales de toutes ces isoformes avaient pour but d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes mettant en jeu les protéines BolA et les glutarédoxines.

Résultats et discussion

La partie « résultats et discussion » de mon manuscrit de thèse est divisée en trois grands chapitres correspondant aux trois différentes parties de ma synthèse bibliographique à savoir les protéines BolA, les glutarédoxines et les cystéine désulfurases. Chacun de ces chapitres est constitué d'une brève introduction suivie d'une présentation et d'une discussion des résultats structuraux obtenus durant ma thèse avec le concours des informations biochimiques apportées par l'équipe du professeur Nicolas Rouhier (Laboratoire IAM, UMR UL-INRA 1136).

Le premier chapitre concerne les protéines BolA dont l'étude structurale a amené à la caractérisation de plusieurs isoformes permettant de faire pour la première fois une analyse structurale comparative de cette famille de protéines. Ainsi des formes monomériques de BolA à histidine (BolA_H) provenant d'*A. thaliana* ont été caractérisées par cristallographie des rayons-X (BolA1 (AtBolA1) et ^{SufE1}BolA) et chez *Sinorhizobium meliloti* (YrbA en complexe avec des métaux (nickel et cuivre)). La structure d'une BolA_C (AtBolA2) a été caractérisée sous une forme monomérique par RMN et dimérique par cristallographie des rayons-X. Par le biais de la RMN des expériences d'interactions réalisées avec les couples ¹⁵N-BolA2-[GrxS14/S17] et ¹⁵N-GrxS14-[BolA1/2] ont permis de caractériser structuralement le tout premier complexe Grx-BolA apo. La structure du complexe Grx-BolA holo a par contre été modélisée à partir de structures disponibles. Cette modélisation a ensuite été confirmée par des études spectroscopiques réalisées par le professeur Michael K. Johnson (Department of Chemistry and Center for Metalloenzyme Studies, University of Georgia) entre l'AtGrxS14 et BolA1 permettant de caractériser précisément les quatre ligands impliqués dans la coordination du centre [2Fe-2S]. Il s'agit de la toute première étude d'un complexe holo entre une Grx et une BolA_H. La plupart de ces résultats montrant l'implication du couple Grx-BolA dans l'homéostasie du fer sont présentés sous la forme d'un article paru en 2014 dans « The Journal of Biological Chemistry » et intitulé

« Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes » (partie I.A.). Ce chapitre est également consacré à la présentation de l'homodimérisation des BolA (partie I.B.). La dimérisation covalente des BolA_C par création d'un pont disulfure entre les deux sous-unités semble être reliée à une forme de régulation redox en lien avec les glutarédoxines alors que dans le cas des BolA_H la formation d'un dimère non covalent semble importante dans certains cas précis pour interagir avec de l'ADN. Enfin, différents types d'interactions entre les BolA et les métaux sont présentés en lien avec une possible fonction de régulation ou de détoxification (partie I.C.).

Le deuxième chapitre concerne les glutarédoxines et leur capacité à s'homodimériser autour d'un centre Fe-S dans une forme dite holo. Ce chapitre commence tout d'abord avec une revue retraçant l'état actuel des connaissances sur l'implication des glutarédoxines au niveau de l'homéostasie du fer. Cette revue a été soumise dans « BBA Molecular Cell Research » et est intitulée « The roles of glutaredoxins integrating Fe-S clusters: sensing, transfer or repair functions ». Ma contribution majeure dans cette revue concerne l'analyse structurale des différents complexes (partie II.A.). Bien que des structures sous la forme holodimérique pour les classes I (HsGrx2 et PtGrxC1) et II (EcGrx4 et HsGrx5) étaient déjà connues avant le début de ma thèse il était intéressant d'étudier le lien qu'il existe entre la signature des glutarédoxines et leur capacité à former (ou pas) certains holodimères. Durant ma thèse et les travaux qui ont précédés (stages pré-doctoraux sur la GrxC5 d'*A. thaliana*) quatre structures de glutarédoxines ont été caractérisées par cristallographie des rayons-X et sont présentées au sein des différentes parties. Les structures apo et holo de la glutarédoxine C5 d'*A. thaliana* (signature WCSYC) ont permis la production d'un article scientifique paru en 2011 dans « The Journal of Biological Chemistry » et intitulé « *Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore

Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins » (partie II.B.1.). Cet article montre que les natures des résidus autour de la cystéine catalytique semblent jouer un rôle dans la capacité des Grx à incorporer des centres Fe-S. Une proline présente après la cystéine catalytique a été supposée empêcher la dimérisation des Grx. Récemment il a été montré que la glutarédoxine 2 de *C. reinhardtii* (signature CPYC) peut incorporer un centre Fe-S. L'étude de ses spécificités et une comparaison de sa structure cristallographique aux autres structures de glutarédoxines de même signature sont réalisées (partie II.B.2.).

Le troisième et dernier chapitre concerne les cystéine désulfurases et la caractérisation structurale par cristallographie des rayons-X de la première cystéine désulfurase eucaryote de groupe II à savoir la protéine Nfs2 d'*A. thaliana*. La structure de cette protéine est présentée ainsi que la structure du mutant de la cystéine catalytique à travers un article paru en 2014 dans « Acta Crystallographica Section F » et intitulé « X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana* ». A travers cette partie (partie III.) une étude comparative poussée des différentes cystéine désulfurases est réalisée afin d'uniformiser la classification groupe I et groupe II. Le site de fixation des partenaires biologiques des cystéine désulfurases (sulfurtransférase ou protéines échafaudage impliquées dans la création de centres Fe-S) est également discuté.

I. Chapitre n°1 : les différents partenaires de la protéine BolA

I.A. Apo/Holo-dimérisation Grx-BolA

I.A.1. Introduction

Les fonctions biologiques assurées par les protéines sont parfois très complexes et cette complexité vient du fait que de nombreuses protéines fonctionnent au sein de complexes macromoléculaires ce qui rend l'appréhension de leur rôle très difficile. C'est pourquoi l'identification des PPI constitue une étape essentielle pour la compréhension des fonctions protéiques. De plus il arrive que la formation de complexes soit régie par des changements environnementaux permettant ainsi une signalisation spécifique à la cellule. Au sein de ces différents complexes quelques protéines peuvent avoir un partenaire biologique unique mais rarement avec différents modes d'interactions (Nooren & Thornton, 2003). C'est dans ce contexte que le couple glutarédoxine – BolA a été étudié durant ma thèse. Les protéines BolA ont été initialement définies comme des régulateurs de la transcription sensible au stress ayant la capacité de modifier la forme des cellules d'*E. coli* (Aldea et al, 1988; Santos et al, 1999). Les Grx, quant à elles, ont longtemps été considérées comme des oxydoréductases GSH-dépendantes (Rouhier et al, 2010). Il est donc surprenant qu'une BolA nommée Fra2 et une Grx de classe II (Grx3/4) contribuent à la régulation de l'homéostasie du fer en formant un holo-hétérodimère avec un centre [2Fe-2S] (Li et al, 2009a).

Au sein de l'holo-hétérodimère Grx-BolA_C en partie caractérisé, le centre Fe-S est lié par deux cystéines (une provenant de la Grx et une du GSH) et une histidine (histidine invariante des BolA) mais le quatrième ligand est inconnu (Li et al, 2011a; Li et al, 2009a). D'autre part, il a été signalé que les couples Grx-BolA provenant de différents organismes pourraient aussi constituer des apo-hétérodimères (Li et al, 2009a; Yeung et al, 2011). Ceci est cohérent avec

l'observation selon laquelle une interaction *in vivo* Grx3/4-Fra2 est trouvée à la fois dans des cellules riches et pauvres en fer (Kumánovics et al, 2008). Cependant aucun de ces deux complexes Grx-BolA (apo et holo) n'a été caractérisé structuralement. C'est pour remédier à ce manque de données structurales que durant mon travail de thèse j'ai étudié la capacité des protéines BolA et Grx à former des hétérodimères apo et holo.

I.A.2. Résultats et discussion

Presque toutes les structures des protéines BolA d'*A. thaliana* (BolA1, BolA2, BolA4 et SufE1 BolA) ont été caractérisées durant ma thèse excepté AtBolA4. Au cours des étapes de cristallogénèse de nombreux problèmes sont apparus pour les protéines BolA1, BolA2 et SufE1 BolA. Il s'avère que les protéines BolA sont très difficiles à cristalliser à en juger par les structures présentes dans la PDB qui proviennent essentiellement de la RMN. En effet, la plupart d'entre elles possèdent une longue extrémité N-terminale ou C-terminale non structurée. La cristallogénèse était tellement délicate que la résolution de structure de la BolA_C appelée AtBolA2 (93 acides aminés) a été menée par RMN, à partir d'un échantillon doublement marqué ^{13}C - ^{15}N . L'étude des données de relaxation R_1 , R_2 et NOE [^{15}N , ^1H] a mis en évidence que les 10 derniers résidus de la protéine sont non structurés, permettant d'expliquer les problèmes rencontrés en cristallogénèse. Dans le cas de la sulfurtransférase SufE1 (305 acides aminés) possédant un domaine BolA en C-terminal relié par un long *linker* à un domaine SufE en N-terminal, nous avons produit le domaine BolA séparément en utilisant des structures connues de BolA pour déterminer son extrémité N-terminale. Ainsi le domaine SufE1 BolA (97 acides aminés) a été cristallisé dans le groupe d'espace C2 et la diffraction des cristaux a été réalisée sur la ligne PROXIMA 1 du synchrotron SOLEIL à une résolution maximale de 1,7Å. Après de nombreux tests et différentes formes tronquées d'AtBolA1 (160 acides aminés) les 63 premiers résidus de la

séquence ont été supprimés en se basant sur la structure de ^{SufE1}BolA, permettant ainsi la cristallisation de la protéine dans le groupe d'espace $C222_1$. Les données ont été collectées sur la ligne FIP-BM30A de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) et sa structure a été obtenue à une résolution optimale de 2,0Å. ^{SufE1}BolA et AtBolA1 sont des représentants du groupe BolA_H et leurs structures ont été résolues par remplacement moléculaire. Les trois structures résolues chez *A. thaliana* plus celles présentes dans la PDB ainsi que de nombreuses séquences provenant de la base de données UniProt ont permis de mettre en évidence de façon précise les spécificités structurales des BolA_H et des BolA_C et la présence d'uniquement deux résidus invariants à savoir une phénylalanine présente au niveau de $\eta 2$ et l'histidine invariante des BolA présente au niveau N-terminal du brin $\beta 3$. Ainsi la différence majeure réside dans la longueur et dans la composition de la « boucle [H/C] » portant respectivement l'histidine et la cystéine des BolA_H et des BolA_C (Tableau n°1).

Afin de déterminer la structure du complexe Grx-BolA apo déjà observé *in vitro* dans certains organismes (Li et al, 2009a; Yeung et al, 2011) nous avons tout d'abord cartographié par RMN la zone d'interaction de l'AtGrxS14 sur AtBolA2 marquée ¹⁵N (¹⁵N-BolA2). Cette expérience a permis de déterminer la zone d'interaction sur ¹⁵N-BolA2. Afin de caractériser le complexe du côté de chacun des partenaires, nous avons ensuite cartographié à l'inverse la zone d'interaction d'AtBolA2 sur AtGrxS14 marquée ¹⁵N (¹⁵N-GrxS14), ce qui a nécessité l'attribution des résidus de la ¹⁵N-GrxS14. Enfin, les expériences d'interaction ont été réalisées avec les couples ¹⁵N-BolA2-[GrxS14/S17] et ¹⁵N-GrxS14-[BolA1/2] afin de vérifier que les zones d'interactions sont indépendantes des isoformes utilisées et qu'elles sont toujours identiques au sein des différents couples Grx-BolA. De façon très intéressante la zone d'interaction entre ces protéines n'implique pas les résidus potentiellement impliqués dans la

coordination du centre [2Fe-2S] au sein du complexe holo. Cette zone d'interaction se trouve même à l'opposé de ces résidus. Dans le cas de l'AtGrxS14 les résidus impliqués dans l'interaction avec AtBola2 au sein du complexe apo proviennent de son extrémité C-terminale. Cette zone est très intéressante car elle avait été identifiée comme étant impliquée dans la régulation du facteur de transcription Aft1 de *S. cerevisiae* et des facteurs de transcription TGA d'*A. thaliana* (Hoffmann et al, 2011; Li et al, 2011b). Ce complexe Grx-BolA apo permet pour la première fois d'identifier structuralement et de façon précise l'interaction entre une Grx et un facteur de transcription. Au niveau d'AtBola2 les résidus impliqués dans l'interaction sont majoritairement localisés autour d'un motif « RHR » formant un patch positif au niveau de l'hélice $\alpha 3$. Cette zone correspond au site potentiel de fixation des acides nucléiques chez BolA puisque $\alpha 3$ est la 2^{ème} hélice, considérée comme l'hélice de reconnaissance, d'un motif Helix-Turn-Helix (HTH) connu pour fixer les acides nucléiques (ADN ou ARN). Ainsi le complexe Grx-BolA apo met en jeu les zones de régulations respectives des deux partenaires.

Dans le cas du complexe Grx-BolA holo, des études spectroscopiques avaient été réalisées par l'équipe de Li *et al*, mais uniquement sur des BolA_C et ne permettant pas d'identifier précisément les quatre ligands (Li et al, 2011a; Li et al, 2009a; Li et al, 2012). Ainsi en collaboration avec le professeur Michael K. Johnson nous avons étudié un complexe holo formé d'AtBola1 (BolA_H) et de l'AtGrxS14 autour d'un centre [2Fe-2S]. Ainsi par le biais de la modélisation et de données spectroscopiques (absorption UV-visible, dichroïsme circulaire, résonance RAMAN et résonance paramagnétique électronique) il a été possible de proposer un modèle pour le complexe Grx-BolA_H holo. Les données indiquent une coordination différente pour les deux atomes de fer du centre [2Fe-2S]. En plus des deux atomes de soufre inorganiques provenant du centre Fe-S, les atomes de fer seraient alors coordonnés par la cystéine catalytique de

la Grx et celle du GSH d'un côté et par deux histidines de l'autre côté (histidine invariante des BolA et l'histidine de la boucle [H/C]). Ceci a permis de mettre en évidence pour la première fois l'implication des BolA_H dans la formation de complexe holo ainsi que l'identification de tous les ligands du centre [2Fe-2S] au sein d'une coordination analogue à celle des protéines de type Rieske.

Par homologie il est supposé que la cystéine des BolA_C peut assurer la même fonction en dépit de son éloignement de l'histidine invariante. Cette hypothèse est étayée par l'étude RMN de la dynamique réalisée sur AtBolA2 montrant que la boucle contenant cette cystéine est flexible et permet donc des réarrangements structuraux importants. Le fait que ces protéines soient retrouvées dans tous les compartiments cellulaires, possédant à la fois de l'ADN et des machineries relatives aux centres Fe-S, suggère que les complexes apo et holo observés entre l'AtGrxS14 et AtBolA1/2 devraient être similaires dans tous les organismes.

En conclusion, il s'avère que les protéines BolA et Grx ont la capacité de former deux dimères très différents impliquant les zones de régulation de chacune au sein du complexe apo et les résidus essentiels à la coordination d'un centre [2Fe-2S] au sein du complexe holo. Cette commutation entre ces deux complexes peut être impliquée dans la voie de signalisation du fer au sein des cellules. Chez *Saccharomyces*, le facteur de transcription Aft1 reconnaît le complexe holo et se fixe au même endroit que BolA dans le cas du complexe Grx-BolA apo. Il est donc possible qu'Aft1 ne puisse interagir avec le complexe Grx-BolA apo. Ainsi ces complexes apo/holo pourraient réguler Aft1 qui joue un rôle important dans l'entrée ou le stockage du fer chez la levure. Tous ces résultats sont présentés dans l'article (partie I.A.3.).

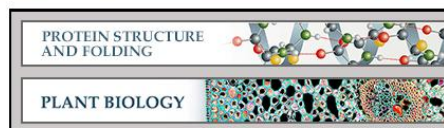
I.A.3. Article

- *Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes.*



Protein Structure and Folding:
Structural and Spectroscopic Insights into
BolA-Glutaredoxin Complexes

Thomas Roret, Pascale Tsan, Jérémy
 Couturier, Bo Zhang, Michael K. Johnson,
 Nicolas Rouhier and Claude Didierjean
J. Biol. Chem. 2014, 289:24588-24598.
 doi: 10.1074/jbc.M114.572701 originally published online July 10, 2014



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.572701](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.572701)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](http://www.jbc.org/).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2014/07/10/M114.572701.DC1.html>

This article cites 58 references, 17 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/289/35/24588.full.html#ref-list-1>

Structural and Spectroscopic Insights into BolA-Glutaredoxin Complexes[§]

Received for publication, April 10, 2014, and in revised form, July 10, 2014. Published, JBC Papers in Press, July 10, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.572701

Thomas Roret^{‡§}, Pascale Tsan^{‡§}, Jérémy Couturier^{¶||1}, Bo Zhang^{**}, Michael K. Johnson^{**}, Nicolas Rouhier^{¶||1}, and Claude Didierjean^{‡§2}

From the [‡]Université de Lorraine and [§]CNRS, UMR 7036 CRM2, BioMod group, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France, [¶]Université de Lorraine, UMR 1136 Interactions Arbres Microorganismes, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France, ^{||}INRA, UMR 1136 Interactions Arbres Microorganismes, F-54280 Champenoux, France, and ^{**}Department of Chemistry and Center for Metalloenzyme Studies, University of Georgia, Athens, Georgia 30602

Background: BolA and glutaredoxin interact together in the iron metabolism.

Results: They form two types of heterodimers with different binding surfaces depending on the presence or absence of an iron-sulfur cluster.

Conclusion: The function of both proteins is likely modulated by the nature of the interaction.

Significance: Understanding the molecular mechanisms responsible for iron sensing is crucial for all iron-mediated cellular processes.

BolA proteins are defined as stress-responsive transcriptional regulators, but they also participate in iron metabolism. Although they can form [2Fe-2S]-containing complexes with monothiol glutaredoxins (Grx), structural details are lacking. Three *Arabidopsis thaliana* BolA structures were solved. They differ primarily by the size of a loop referred to as the variable [H/C] loop, which contains an important cysteine (BolA_C group) or histidine (BolA_H group) residue. From three-dimensional modeling and spectroscopic analyses of *A. thaliana* GrxS14-BolA1 holo-heterodimer (BolA_H), we provide evidence for the coordination of a Rieske-type [2Fe-2S] cluster. For BolA_C members, the cysteine could replace the histidine as a ligand. NMR interaction experiments using apoproteins indicate that a completely different heterodimer was formed involving the nucleic acid binding site of BolA and the C-terminal tail of Grx. The possible biological importance of these complexes is discussed considering the physiological functions previously assigned to BolA and to Grx-BolA or Grx-Grx complexes.

Because proteins usually function in macromolecular complexes, identifying protein-protein interactions constitute an essential step toward the understanding of protein networks and functions. The description of these interactions is difficult because they can for example be very transient, or a given protein can have multiple partners involving different or overlapping binding sites, or more rarely it can have a single partner but

different modes of interactions (1). BolAs were initially defined as stress-responsive transcriptional regulators whose overexpression in *Escherichia coli* modified bacterial shape and induced biofilm formation (2, 3), whereas glutaredoxins (Grxs)³ were long thought to uniquely function as glutathione (GSH)-dependent oxidoreductases (4). It was thus surprising that a BolA, referred to as Fra2 (Fe repressor of activation-2), and cytosolic monothiol Grx3/4 contributed to the regulation of iron homeostasis by forming stable [2Fe-2S] cluster-bridged holo-heterodimers controlling the nuclear translocation of the *Saccharomyces cerevisiae* Aft1/Aft2 transcription factors in response to a mitochondrial signal (5–7). Hence, BolA may modify monothiol Grx functions by converting Grx homodimers bridging a labile [2Fe-2S] cluster into a heterodimer containing a more stable [2Fe-2S] cluster (7). This cluster is ligated by two cysteines (one from Grx and one from a GSH molecule) and one histidine (invariant histidine of BolAs), but the fourth ligand is unknown (7, 8). On the other hand, it was reported that Grx-BolA couples from various sources could also form apo-heterodimers (7, 9). This is consistent with the observation that an *in vivo* Grx3/4-Fra2 interaction is found both in iron-replete and iron-depleted yeast cells (5).

However, none of these Grx-BolA complexes was structurally characterized at the atomic scale. In *Arabidopsis thaliana* there are three genes encoding BolA proteins (AtBolA1, AtBolA2, and AtBolA4). In addition, the sulfurtransferase AtSufE1 contains a C-terminal BolA domain (^{SufE1}BolA) that is only present in plant members (10). From a previously established classification, these AtBolAs can be separated into two groups that contain either a conserved histidine (AtBolA1, AtBolA4, and ^{SufE1}BolA; BolA_H group) or cysteine (AtBolA2;

[§] This article contains supplemental Figs. S1–S3.

The resonance assignments and relaxation data of AtBolA2 and the NMR chemical shift mapping of AtGrxS14-BolA2 are available at the Biological Magnetic Resonance Data Bank (codes 19849 and 19850).

The atomic coordinates and structure factors (codes 2MM9, 2MMA, 4PUG, and 4PUJ) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>).

¹ Supported by a grant overseen by ANR (Grant 2010BLAN1616) as part of the “Investissements d’Avenir” program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE).

² To whom correspondence should be addressed: Université de Lorraine, UMR7036 CRM2, BioMod group, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: 33-383684879; E-mail: claudedidierjean@univ-lorraine.fr.

³ The abbreviations used are: Grx, glutaredoxins; AtGrx, *A. thaliana* glutaredoxin; ^{SufE1}BolA, C-terminal BolA domain of the sulfurtransferase SufE1; [H/C] loop, loop containing the histidine and cysteine residues from BolA_H and BolA_C groups; ScGrx, *S. cerevisiae* glutaredoxin; HSQC, heteronuclear single quantum correlation; r.m.s.d., root mean square deviation; KH, K-homology; HTH, helix-turn-helix.

BolA-Glutaredoxin Complexes

BolA_C group) residue (11). Besides solving the structure of AtBolAs by x-ray crystallography or NMR spectroscopy, apo- and holo-heterodimers formed between AtBolAs and monothiol AtGrxs have been characterized using three-dimensional modeling, UV-visible absorption/CD, EPR, and resonance Raman and NMR spectroscopies. The results indicated the formation of two types of complexes involving distinct regions of both partners and facilitated identification of the ligands for [2Fe-2S] cluster-bridged heterodimers involving for the first time a BolA_H member.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmid Constructions—The cloning of AtBolA1 (At1g55805), AtBolA2 (At5g09830), BolA domain of AtSufE1 (At4g26500), AtGrxS14 (At3g54900), and AtGrxS17 (At4g04950) into pET vectors was described previously (10, 12). For AtBolA1, another version coding a protein deprived of the first 63 amino acids instead of 51 amino acids was cloned into pET12a using 5'-CCCCCCCCCATATGGCAATAGAGAA-TCGA-3' (AtBolA1_for) and 5'-CCCGGATCCCTAGTCTT-TAGAAGGAGA-3' (AtBolA1_rev) primers to shorten the unstructured N-terminal part that likely prevented its crystallization. For co-expression experiments, the sequences coding for an N-terminally His-tagged AtGrxS14 and an untagged AtBolA1 were inserted into the first and second cloning sites (NcoI/BamHI and NdeI/XhoI) of a pCDFDuet plasmid by sub-cloning His₆-AtGrxS14 from pET15b and by amplifying AtBolA1 from a pET12a::AtBolA1 using 5'-CCCCCCCCCAT-ATGAGCAGCGTTGAGAAAACC-3' (AtBolA1_for2) and 5'-CCCCCTCGAGCTAGTCTTTAGAAGG-3' (AtBolA1_rev2) primers and subsequent insertion into the second cloning site.

Expression and Purification of Recombinant Proteins—Unlabeled tagged or untagged proteins were expressed and purified as previously (10, 12). For simple ¹⁵N (AtGrxS14) or double ¹⁵N- and ¹³C-labeled proteins (AtBolA2), cells were grown in M9 minimal medium supplemented with ¹⁵NH₄Cl (1 g/liter) and either D-glucose or D-[¹³C]glucose (2 g/liter). For protein co-expression, an *E. coli* BL21(DE3) colony transformed by pCDFDuet HisAtGrxS14-BolA1 was grown at 37 °C in LB media. The culture was induced with 1 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside at A₆₀₀ = 0.45, and the bacterial cultures were further cultivated at 34 °C for 5 h. The cells were collected by centrifugation at 5000 × g for 15 min at 4 °C and stored at -80 °C. 7 g of cell paste were thawed and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.8 containing 1 mM GSH, 10 μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 15 μg/ml DNase, and 5 μg/ml RNase. The cells were lysed by sonication, and cell debris was removed by centrifugation at 39,700 g for 1 h at 4 °C. The following chromatographic purification processes were carried out inside a glove box (O₂ < 2 ppm) with degassed buffers. The extract was loaded onto a 2 × 5-ml His-Trap column (GE Healthcare) equilibrated with binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 1 mM GSH, 0.5 M NaCl, and 20 mM imidazole). The column was washed with 5 column volumes of binding buffer before elution with a linear gradient of 20 to 500 mM imidazole. The purest fractions containing AtGrxS14 and AtBolA1 were concentrated using a YM10 Amicon ultrafiltration. Anaerobic reconstitution experiments were carried out by

incubating AtGrxS14-BolA1 with a 10-fold excess of ferrous ammonium sulfate and L-cysteine and catalytic amounts of IscS in the presence of 5 mM GSH. The reconstitution reaction was carried out under strictly anaerobic conditions (<2 ppm O₂) at room temperature for 1.5 h. Excess reagents were then removed by a HiTrap Q-Sepharose, and fractions containing Fe-S cluster-bound proteins were concentrated by ultrafiltration. Protein concentrations were determined using BSA as a standard (Roche Applied Science) with Bio-Rad Dc protein assay in conjunction with the microscale-modified procedure (13). Iron concentrations were determined after KMnO₄/HCl protein digestion (14) using a 1000 ppm atomic absorption iron standard to prepare standard solutions of known iron concentration (Fluka). All sample concentrations and ε or Δε values are expressed based on the concentration of the AtGrxS14-BolA1 complex.

UV-Visible Absorption/CD, Resonance Raman and EPR Measurements—All samples for spectroscopic investigations were prepared under an argon atmosphere in the glove box unless otherwise noted. UV-visible absorption and CD spectra were recorded in sealed anaerobic 1-mm quartz cuvettes at room temperature using a Shimadzu UV-3101 scanning spectrophotometer and a Jasco J-715 spectropolarimeter, respectively. Resonance Raman spectra were recorded at 22 K on frozen droplets of sample mounted on the cold finger of a Displex Model CSA-202E closed cycle refrigerator (Air Products, Allentown, PA) using a Ramanor U1000 scanning spectrometer (Instruments SA, Edison, NJ) coupled with a Sabre argon-ion laser (Coherent, Santa Clara, CA). X-band (~9.6 GHz) EPR spectra were recorded using a ESP-300D spectrometer (Bruker, Billerica, MA) equipped with an ER-4116 dual mode cavity and an ESR 900 flow cryostat (Oxford Instruments, Concord, MA). Spin quantification were assessed by double integration with reference to a 1 mM Cu (EDTA) samples using non-power saturating conditions for both sample and standard.

Crystallization, Data Collection, Structure Determination, and Refinement—AtBolA1 and ^{SufE1}BolA were crystallized by the microbatch under oil method at 278 K. 2 μl of AtBolA1 (8.25 mg/ml) were crystallized by mixing with 2.1 μl of crystallization solution containing a mixture of 18% PEG4000, 6% 2-propanol, 6% 2.5 hexanediol, 4% xylitol, and 0.07 M sodium acetate. 2 μl of ^{SufE1}BolA (8.60 mg/ml) were crystallized by mixing with 1.6 μl of crystallization solution containing a mixture of 12% PEG20000, 6% ethylene glycol, 0.02 M trimethylamine HCl, and 0.1 M MES, pH 6.5. They were flash-cooled in liquid nitrogen after a short soak in crystallization solution premixed with 20% glycerol as a cryoprotectant. X-ray diffraction experiments were performed at 100 K at beamline FIP-BM30A (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France) for AtBolA1 and at beamline PROXIMA 1 (SOLEIL, Saint-Aubin, France) for ^{SufE1}BolA. Their data sets at 2.0 and 1.7 Å, respectively, were indexed and processed using XDS (15) and scaled and merged with Scala (16) from the CCP4 program package (17). Both structures were solved by molecular replacement with Molrep (18) using the *Mus musculus* BolA1 coordinates (PDB entry 1V60) as first search model. Structures were refined using automatic calculations from PHENIX (19) with manual inspection and corrections using Coot (20) (Table 1).

Bola-Glutaredoxin Complexes

TABLE 1
Crystallographic statistics

	AtBola1	Surf1Bola
Data collection		
Beam line	FIP-BM30A	PROXIMA 1
Space group	C22 ₂	C2
Unit cell (Å)	30.09, 179.88, 66.82	95.83, 31.63, 68.63
Resolution (Å)	45.0–2.0	46.2–1.7
Unique reflections	12,798/1,790	20,575/2,902
Average redundancy	4.6/4.5	3.2/2.6
Completeness (%)	99.8/98.9	99.5/97.2
R _{merge}	0.10/0.35	0.03/0.36
I/σ	11.3/4.1	20.6/2.6
Refinement		
Resolution (Å)	45.0–2.0	46.2–1.7
R _{free} /R	22.58/19.94	21.32/19.13
Total number of atoms	1,659	1,533
Water	206	165
Average B factor	24.11	32.95
r.m.s.d.		
Bonds	0.003	0.006
Angles	0.849	1.066
MolProbity analysis		
Clashscore, all atoms	3.09 (99%)	1.46 (99%)
MolProbity score	1.10 (100%)	0.88 (100%)

The validation of the crystal structures was performed with MolProbity (21). The atomic coordinates for AtBola1 (PDB entry 4PUG) and Surf1Bola crystal (PDB entry 4PUI) structures are available at the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank.

NMR Analyses—The AtBola2 NMR samples typically contained 0.9 mM uniformly ¹⁵N or ¹³C,¹⁵N-labeled protein in 50 mM phosphate, pH 6.0, 10% (v/v) D₂O and 0.02% (w/v) sodium azide under nitrogen atmosphere. All NMR experiments were carried out at 298 K on a Bruker spectrometer (600 MHz) equipped with a cryogenic probe. NMR data were processed with NMRPipe (22) and analyzed with NMRViewJ (23). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignment was obtained from ¹H,¹⁵N HSQC, ¹H,¹⁵N TOCSY (two-dimensional total correlation spectroscopy)-HSQC (mixing time T_m = 80 ms), ¹H,¹⁵N NOESY-HSQC (T_m = 100 ms and 150 ms), HNHA, HNHB, HNCA, HNCO, HN(CA)CO, and CBCA(CO)NH spectra. Aromatic side chains signals were assigned using COSY, TOCSY, and NOESY homonuclear experiments in D₂O. 2248 distance restraints were derived from NOESY experiments. 150 ψ dihedral restraints were obtained by DANGLE program (24) or from ³J_{H_{NH}α} in CcpNmr (25). 59 hydrogen bond restraints were inferred from slowly exchanging amide protons identified on a ¹H, ¹⁵N HSQC recorded after redissolving lyophilized protein in D₂O. These restraints were applied in an iterative structure calculation and a simulated annealing protocol with water refinement at the end using ARIA2.3 (26) and CNS1.21 (27) (Table 2). 100 structures were generated, and the 20 structures of lowest energy were kept. The backbone root mean square deviation (r.m.s.d.) among the 20 lowest-energy structures is 0.89 Å for the whole protein. Structural quality was analyzed using MolProbity (21). ¹⁵N relaxation parameters were determined using NMRViewJ (23) from ¹⁵N R₁ (relaxation delays: 2, 50, 100, 200, 400, 600, 900, and 1200 ms), R₂ (15.68, 31.36, 47.04, 62.72, 78.40, 94.08, 125.44, and 156.80 ms), and ¹H,¹⁵N heteronuclear NOE experiments. Interaction experiments were carried at pH 7.0. ¹H,¹⁵N HSQC were typically recorded with 0.12 mM uniformly ¹⁵N-

TABLE 2
Statistics from NMR structure calculations of AtBola2 using ARIA2 and CNS

VDW, van der Waals; ELEC, electrostatic; Cdh violations, CNS structure calculation output logs for dihedral angle restraint violations.

Experimental restraints	
Total NOEs	2248
Intraresidue	504
Sequential	789
Medium	624
Long range	331
Restraints statistics	
r.m.s.d. from standard geometry	
Bond (Å)	0.0057 ± 0.0004
Angle (°)	0.72 ± 0.03
Improper (°)	2.05 ± 0.20
Dihedral (°)	40.31 ± 0.19
Energies of final structures (kcal.mol⁻¹)	
E _{TOTAL}	−3368.76 ± 106.42
E _{bond}	48.69 ± 6.30
E _{angle}	211.10 ± 19.54
E _{improper}	468.16 ± 94.15
E _{dihedral}	496.48 ± 4.58
E _{VDW}	−845.88 ± 8.01
E _{ELEC}	−3,747.30 ± 78.36
r.m.s.d. backbone, residue 1–80 (Å)	0.56 ± 0.12
r.m.s.d. backbone, all (Å)	0.89 ± 0.61
NOE violations >0.5 Å	0.75 ± 0.91
Cdh violations >5°	3.25 ± 1.29

labeled AtBola2 (or AtGrxS14) samples. 0.1, 0.2, 0.5, 1, and 2 eq of unlabeled AtGrxS14/GrxS17 (or AtBola2/Bola1) were successively added using a 0.4 mM stock sample. The apo-heterodimer AtGrxS14-Bola2 structure was obtained by docking using GRAMM-X Protein-Protein Docking Web Server v.1.2.0 (28) coupled to an energy refinement using YAMBER force field from YASARA (29). Residues exhibiting either chemical shift variations above 2 S.D. or large signal broadening were defined as interface residues in the docking protocol. The atomic coordinates for AtBola2 NMR structures (PDB entry 2MM9) and the AtGrxS14-Bola2 apo-heterodimer model (2MMA) are available at the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank.

Intrinsic Fluorescence Properties of AtGrxS14—Fluorescence was recorded with a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent) with 1-cm path length cuvettes. Prior to measurement, 10 μM AtGrxS14 in Tris-HCl 30 mM pH 8.0 buffer was incubated or not with varying concentrations of AtBola1 ranging from 5 to 30 μM at 25 °C for 10 min. The resulting fluorescence was recorded between 280 and 450 nm after excitation at 270 nm. For determining the apparent K_d value, the decrease in AtGrxS14 fluorescence at 337 nm was plotted against AtBola1 concentration using the one binding site hyperbola model (GraphPad Prism 6 software) and the following equation: fluorescence intensity = B_{max} * [AtBola1]/(K_d + [AtBola1]), where B_{max} represents the fluorescence intensity of maximal binding.

Sequence Analyses—All proteins of the Bola/YrbA family and all proteins that contain a Bola domain, i.e. around 12,000 sequences from Uniprot database, have been retrieved. After removing identical sequences but also transit peptides and protein regions that do not strictly belong to a Bola domain, 2444 sequences were aligned using MAFFT (31). As a starting point, a structural alignment was performed by Strap (32) using the 11 known Bola structures. This structural alignment is used in MAFFT (31) with the 2444 sequences to make a final alignment.

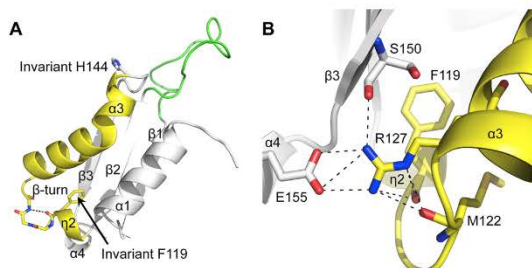


FIGURE 1. **BolA overall fold.** A, the Phe-119 and His-144 invariant residues and the β -turn are plotted on the x-ray structure of AtBolA1. The potential nucleic acid binding region containing the HTH structural motif is in yellow, and the [H/C] loop containing the putative [2Fe-2S] cluster ligands is in green. B, putative hydrogen bonds involving Arg-127 in AtBolA1.

RESULTS AND DISCUSSION

AtBolA Structures Support the Existence of Two Different Groups—Two BolA categories were previously distinguished from primary structure analyses: those having a conserved cysteine (Cys-29 in AtBolA2; BolA_C group) and those having another conserved histidine (His-109 and His-324 in AtBolA1 and ^{SufE1}BolA, respectively; BolA_H group) in addition to an invariant histidine. Crystallization of the chloroplastic BolA1 and of the C-terminal domain of SufE1 (^{SufE1}BolA) from *A. thaliana* provided two BolA_H structures, solved at high resolution (2.0 and 1.7 Å, respectively). The solution structure of the nucleocytoplasmic AtBolA2, which belongs to the BolA_C group, was obtained by NMR using standard heteronuclear experiments. All these structures revealed a well conserved fold, although a structure-based sequence alignment of ~2500 non-redundant BolA sequences revealed only two invariant residues, Phe-119 and His-144 (AtBolA1 numbering). This structural alignment has been used thereafter to determine residue conservation.

Solved AtBolA models exhibit an α/β -structure made of four helices and three strands with an $\alpha 1\beta 1\beta 2\eta 2\alpha 3\beta 3\alpha 4$ (η : 3_{10} -helix) topology (Fig. 1A) that is similar to previously described BolA models (33). All β -strands (7–8 residues) form a central three-stranded β -sheet scaffold ($\beta 1$ anti-parallel to $\beta 2$ and $\beta 3$) with the $\alpha 4$ helix anchored at one side of the β -sheet, whereas other helices are on the opposite side. A local structural difference can, however, be noticed in the solution structure of AtBolA2. According to the NMR data, especially to the D₂O exchange experiments, $\beta 3$ is split into two short strands, $\beta 3'$ and $\beta 3''$, connected by an additional Lys-71 residue, an insertion found mostly in plant BolA_C (84% versus 2% in other kingdoms). The BolA invariant phenylalanine is located in $\eta 2$ (Fig. 1A) and seems essential for BolA unique hydrophobic core, whereas the invariant histidine is found at the N-terminal end of $\beta 3$.

All secondary structures are connected by short loops (1–4 residues) except the one situated between $\beta 1$ and $\beta 2$. This $\beta 1$ - $\beta 2$ loop that we refer to as [H/C] loop contains the histidine and cysteine residues from BolA_H and BolA_C groups, respectively. In accordance with the existence of two groups, the [H/C] loop can be formed by 11 ± 6 (up to 20) residues in BolA_H members, whereas it is generally only 7 ± 2 residues in

BolA_C members. In BolA_H, the histidine (His-109 in AtBolA1), located before the N-terminal end of $\beta 2$, is in most cases followed by an aromatic amino acid (Tyr/Phe in 87% of BolA_H). In BolA_C, the cysteine (Cys-29 in AtBolA2) is frequently surrounded by glycines in a GGCG signature (69%) and is usually located three residues before the histidine position found in BolA_H.

An Arginine of the Conserved Face Governs $\alpha 4$ -Helix Formation—The most conserved residues in BolAs including the histidine or cysteine of the [H/C] loop, the invariant histidine and phenylalanine are generally found in the same region termed the “conserved face” by Kasai *et al.* (33). From all AtBolA structures, it seems also that the side chain of an arginine residue (Arg-127 in AtBolA1) present in $\alpha 3$ -helix is involved in tertiary structure maintenance (Fig. 1B). This arginine corresponds to the first arginine of a well conserved “RHR” signature (present in 41% of the sequences). It may be replaced by a glutamine in some proteins, but in plant BolAs it is mostly invariant (97%). Several putative intramolecular hydrogen bonds exist between its guanidinium group and four residues located in distinct protein regions, *i.e.* with carbonyl group of Phe-119 (in $\eta 2$), Met-122 (in $\eta 2$ - $\alpha 3$ loop), and Ser-150 (in $\beta 3$) and with Glu-155 carboxylate group (in $\alpha 4$) (Fig. 1B). This last interaction probably governs $\alpha 4$ -helix formation because it is the sole polar link between $\alpha 4$ and the rest of the protein. Accordingly, in *Ehrlichia chaffeensis* and *Rickettsia prowazekii* BolA structures (PDB entry 2KZ0 and 2MCQ, respectively), two examples where the arginine residue is replaced by a glutamine, the C-terminal end is shorter by seven residues, and $\alpha 4$ is missing.

The Helix-turn-helix (HTH) Motif of BolAs Is Potentially Involved in DNA Binding—Currently, only bacterial BolA_H members have been shown to act as transcriptional regulators by binding to gene promoters (34, 35), whereas Uvi31+, a BolA_H from *Chlamydomonas reinhardtii*, likely exhibits endonuclease activity (36). The capacity to bind nucleic acids is in line with the fact that BolA possesses an overall fold related to the one found in type II K-homology (KH) domain-containing proteins (33) known to bind nucleic acids.

In KH domains the nucleic acid binding region involves the third β -strand and a HTH structural motif, formed by the two consecutive helices of the KH motif $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ with a short connecting GXXG loop (type II β -turn) (37). The interaction of KH domains with nucleic acids is stabilized by electrostatic interactions, with a positively charged patch on the HTH structural motif interacting with the negatively charged phosphate/sugar backbone of nucleic acids. The HTH motif in BolAs is different due to the absence of the GXXG loop between helices $\eta 2$ and $\alpha 3$. In AtBolAs, this connection between $\eta 2$ and $\alpha 3$ helices is an outgrowth of 4 residues versus 2 for canonical KH domains. This loop contains the invariant phenylalanine in a specific EXGX signature (type II β -turn). The glycine is also a well conserved residue (>90% conserved in all organisms). In plant BolAs the capacity to bind nucleic acids would arise mainly from a positively charged patch (RHR signature present in $\alpha 3$) that is part of the conserved face (Fig. 2A). It brings a strong positive charge around the protruding turn of the HTH motif, whereas the rest of the conserved face is nearly neutral and the

Bola-Glutaredoxin Complexes

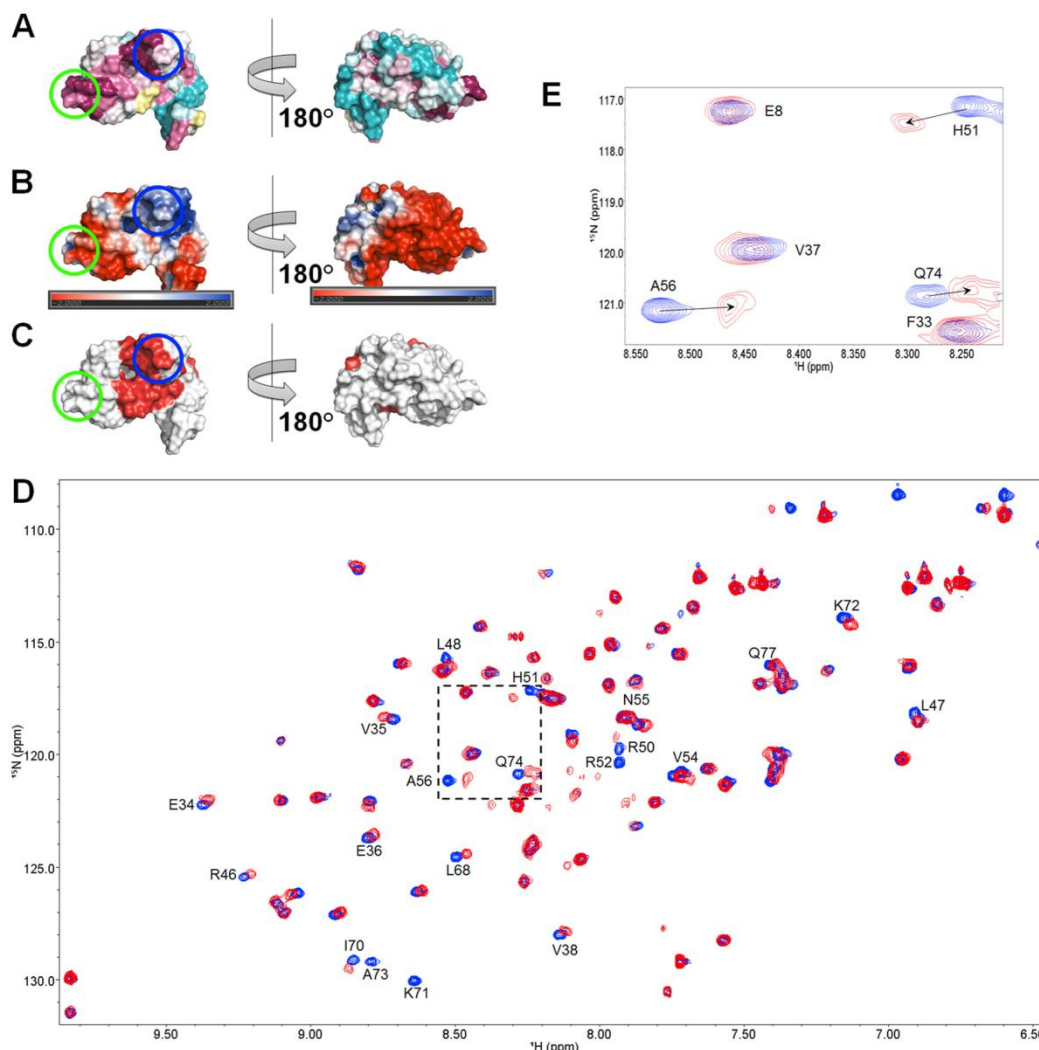


FIGURE 2. **Interaction of AtBolaA2 with AtGrxS14.** A, the left panel displays the conserved face of Bolas, and the right panel displays the variable face of Bolas. Residue conservation ranges from 0% (cyan) to 100% (purple). RHR signature (blue circle) and putative ligands of the [2Fe-2S] cluster (green circle) are also highlighted on AtBolaA2 surface. B, electrostatic potential of AtBolaA2 generated by APBS (57) and showing negative charges in red and positive charges in blue. C, mapping of the residues of AtBolaA2 (red) involved in the interaction with AtGrxS14, as shown by NMR. D, overlay of ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of AtBolaA2 (blue) and ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of AtGrxS14-BolaA2 at a 1:1 ratio (red). The assigned peaks are indicated with the residue number and one-letter code. E, zoom of the area delimited by dashed lines in D. The arrows indicate the direction in which the amide peak shifts upon the addition of AtGrxS14.

"variable face" globally negative (Fig. 2B). Another difference is that, compared with their corresponding helices in KH domains, helices η_2 and α_3 do not have the same length. Despite this difference, the orientation of the second helix remains rather similar, which suggests that the predominant role of "DNA recognition helix" found in KH domains is conserved in Bolas. Finally, it is noticeable that a loop resembling the variable [H/C] loop present between the two consecutive β -strands in Bolas is also present in type II KH domains (37).

The HTH Motif of Bolas Is Involved in Glutaredoxin Recognition—Because Bolas have the ability to interact both with DNA and Grx apoforms, we sought to determine interaction surfaces (7, 10). The interaction was studied using NMR spectroscopy by performing chemical shift mapping on AtBolaA2 with its biological partner AtGrxS17 but also with AtGrxS14, whose x-ray structure was solved (38). Upon the addition of unlabeled AtGrxS14, some peaks of AtBolaA2 in the ^1H , ^{15}N HSQC spectrum experience show significant chemical

BoLA-Glutaredoxin Complexes

shift perturbations and line broadening (Fig. 2, D and E). These peaks correspond to residues Glu-34–Glu-36, Val-38, Leu-47–Leu-48, Arg-50–Arg-52, Val-54–Ala-56, Leu-68, Lys-71–Gln-74, and Gln-77, which are located around the positively charged RHR signature of $\alpha 3$ (Fig. 2C and supplemental Fig. S1A), and thus coincides with the putative nucleic acid binding region. Interestingly, it does not include the BoLA invariant histidine involved in the [2Fe-2S] cluster ligation (39). Although the quality of the resulting spectra was poorer due to the larger size of the complex, a similar interface was determined using AtGrxS17 (supplemental Fig. S1B). Overall, it indicates that the BoLA interaction surface with Grxs and nucleic acids is similar, suggesting that the formation of Grx-BoLA apo-heterodimer should modify the nucleic acid binding capacity of BoLAs.

The C-terminal Region of Glutaredoxins Is Involved in BoLA Recognition in Grx-BoLA Apo-heterodimer.—The residues in Grxs involved in the formation of Grx-BoLA apo-heterodimers were mapped by NMR using AtGrxS14 in interaction with its biological partner AtBoLA1 (a BoLA_H) but also with AtBoLA2 (a BoLA_C, 17.5% identity with AtBoLA1). The addition of unlabeled AtBoLA1 or AtBoLA2 induced similar perturbations on the ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of AtGrxS14 (supplemental Fig. S1, C and D), which was assigned from ^1H , ^{15}N heteronuclear three-dimensional experiments. Residues identified as involved in the interaction are Val-79, Lys-83, Val-85, Gln-105, Leu-110, Val-112, Lys-130–Ser-133, Trp-135, Thr-137, Gln-140, Ile-143, Glu-146–Phe-148, Ile-153, Leu-155–Glu-166, and Glu-168. They are mainly located at the C terminus, forming a negatively charged patch around a quite conserved “GEL” motif present in the last α -helix and opposite to the CGFS active site (supplemental Fig. S2).

Although NMR is a very sensitive method, the relevance of these apoGrx-BoLA interactions was further examined by measuring variations in the intrinsic fluorescence of AtGrxS14 in the presence of AtBoLA1 since AtGrxS14 has a single Trp residue (Trp-135), which is part of the interaction area, and AtBoLA1 has no Trp residue. As expected, adding increasing concentrations of AtBoLA1 quenched AtGrxS14 fluorescence (Fig. 3A). From this experiment, a dissociation constant (K_d) of $7 \pm 2 \mu\text{M}$ was determined for the AtBoLA1–AtGrxS14 couple (Fig. 3B), suggesting that this interaction may be physiologically relevant.

Altogether, these data describing AtGrxS14–[BoLA1/BoLA2] interactions represent the first structural description of a complex between a monothiol Grx and a transcriptional regulator. Considering that the RHR signature in BoLAs and the sequence surrounding the GEL motif in Grxs are mostly conserved, this type of interaction may be extended to all monothiol Grx and BoLA couples. For instance, in plants there is at least one BoLA and one monothiol Grx in subcellular compartments possessing DNA and/or an Fe-S cluster biosynthesis machinery (10). It is worth noting that the importance of the C-terminal region in Grxs for protein-protein interactions was already evident in the examples of Aft1 and TGA transcription factors (supplemental Fig. S2) (40, 41).

The [H/C] Loop Should Contain the Fourth Fe-S Cluster Ligand in Grx-BoLA_C Holo-heterodimers.—A remarkable property of BoLAs is their capacity to form [2Fe-2S]-bridged

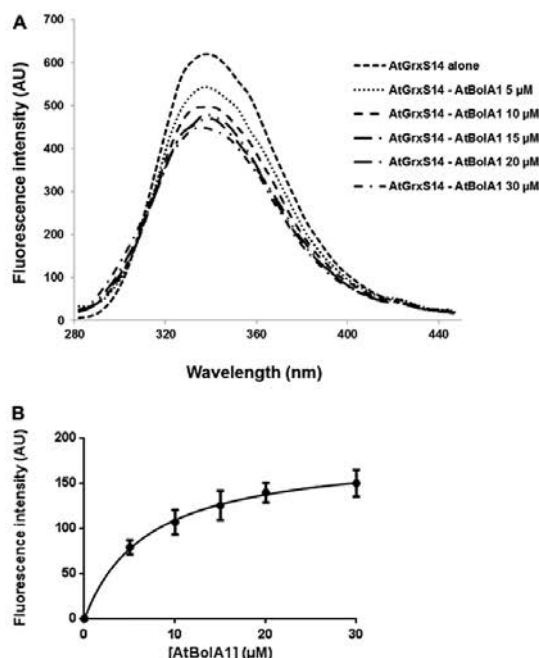


FIGURE 3. Influence of AtBoLA1 on AtGrxS14 intrinsic fluorescence. A, representative experiment showing the changes in AtGrxS14 fluorescence in the presence of increasing concentrations of AtBoLA1. B, decrease of fluorescence emission at 337 nm was plotted against AtBoLA1 concentration to determine the K_d value using a hyperbola equation. The data are represented as mean $\pm$ S.D. of three separate experiments. AU, arbitrary units.

dimers with Grxs, but all ligands are not identified (39). From known BoLA_C structures, the only conserved candidate residue of the [H/C] loop that has the ability to coordinate an iron atom and is spatially close to the invariant histidine is the cysteine of the GGCG motif. In available AtBoLA2 model structures, this cysteine is clearly too far from the invariant histidine to serve as a cluster ligand with measured distances of 5 up to 15 Å. Hence, a conformational rearrangement of the [H/C] loop should occur to place this cysteine at an adequate position for serving as a [2Fe-2S] cluster ligand. The presence of a majority of small residues such as glycines could confer the necessary backbone flexibility for this loop. Supporting this view, relaxation data on AtBoLA2 showed a slight decrease in the ^1H , ^{15}N heteronuclear NOE values for this loop (supplemental Fig. S3), which indicates an increased mobility on fast (ps-ns) time scale and suggests that such a rearrangement is possible. What is more puzzling is that the mutation of the equivalent cysteine (Cys-66) in *S. cerevisiae* Fra2 neither abolishes Fe-S cluster formation into ScGrx3–Fra2 complex nor significantly changes its spectroscopic signature (8). However, although the mutagenesis work performed on all histidine and cysteine residues failed to identify the fourth ligand, the spectroscopic characterization of the ScGrx3–Fra2 heterodimer indicated that this residue could be another cysteine but not another histidine.

BolA-Glutaredoxin Complexes

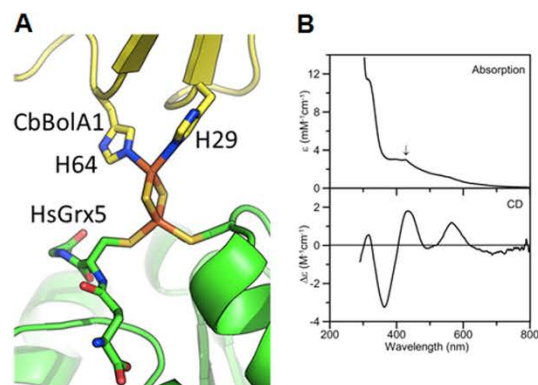


FIGURE 4. Glutaredoxin-BolA_H holo-heterodimer. A, model of the Grx-BolA holo-heterodimer with Rieske-type [2Fe-2S] coordination built using human Grx5 (PDB entry 2WUL) (58) and *C. burnetii* BolA, which coordinates a cobalt atom via His-29 and His-64 (PDB entry 3TR3). These residues are ideally positioned to coordinate an iron atom of a [2Fe-2S] cluster instead of cobalt, and they were used to orientate the BolA domain in the heterodimeric model. B, UV-visible absorption and CD spectra of AtGrxS14-BolA1 heterodimers. ϵ and $\Delta\epsilon$ values are expressed per AtGrxS14-BolA1 heterodimer, and the arrow indicates the Soret band from a trace heme impurity. AU, arbitrary units.

Rieske-type [2Fe-2S] Coordination Occurs in Grx-BolA_H Holo-heterodimers—In available BolA_H structures, the histidine from the [H/C] loop is close to the invariant histidine and could potentially serve as the unknown ligand. Moreover, contrary to Cys-66 in Fra2, its position is imposed by the presence of the β_2 strand. Interestingly, in the x-ray structure of a *Coxiella burnetii* BolA_H, a cobalt atom is ligated by these two histidines, mimicking iron ligation. From this structure and that of a monothiol Grx homodimer, a model for a Grx-BolA holo-heterodimer with Rieske-type [2Fe-2S] coordination can be easily built (Fig. 4A). In this model, the distance required between the two nitrogen atoms to coordinate an iron atom should be around 3.5 Å, which can be reached via a simple change of histidine rotamer in AtBolA1 and ^{SuTE1}BolA structures. To confirm this possibility, the plastidial *A. thaliana* GrxS14 and BolA1 were co-expressed in *E. coli*. Purification under anaerobic conditions resulted in a Grx-BolA complex with partial [2Fe-2S] cluster occupancy (~0.3 cluster per heterodimer) and a trace amount of heme impurity, as judged by iron and protein analysis, UV-visible, absorption, and CD absorption spectroscopies (Fig. 4B). Homogeneous samples containing 2.1 ± 0.2 iron/heterodimer and with ϵ_{400} values = 8.5 ± 0.2 mM⁻¹cm⁻¹, both indicative of one [2Fe-2S] cluster/heterodimer, were obtained by anaerobic reconstitution in the presence of 5 mM GSH and repurification on a Q-Sepharose column (Fig. 5A). The corresponding CD spectrum of the [2Fe-2S]²⁺ cluster-bound AtGrxS14-BolA1 complex is significantly different from that of the [2Fe-2S] cluster-bridged AtGrxS14 homodimer (Fig. 5B). However, the CD spectrum is similar to that of the ScGrx3-Fra2 holo-heterodimer except that the pronounced positive bands at 440 and 565 nm in AtGrxS14-BolA1 shift to 425 and 583 nm, respectively, in ScGrx3-Fra2 (Fig. 5B). Resonance Raman spectra of [2Fe-2S]²⁺ clusters are sensitive to ligand type and conformation and provided evidence for the

presence of a single histidyl [2Fe-2S] cluster ligand in the ScGrx3-Fra2 heterodimer (7) and complete cysteinyl ligation for [2Fe-2S] clusters in ScGrx3 and AtGrxS14 homodimers (7, 12). A comparison of the resonance Raman spectra of the [2Fe-2S]²⁺ centers in ScGrx3-Fra2 and AtGrxS14-BolA1 heterodimers and the AtGrxS14 homodimer is shown in Fig. 5C. Both heterodimer spectra show multiple bands in the low energy region (250–300 nm), which are indicative of histidyl ligation (7). Moreover, the observation of three bands in this region for AtGrxS14-BolA1 (250, 282, and 296 cm⁻¹) compared with two for ScGrx3-Fra2 (275 and 300 cm⁻¹) is tentatively interpreted as the former involving two rather than one histidyl ligand at the unique iron site. The 250-cm⁻¹ band would have a major contribution from symmetric stretching of the two Fe-N (His) bonds, with one or both of the 282 and 296 cm⁻¹ bands having a significant contribution from asymmetric stretching of the two Fe-N(His) bonds. The available pH dependence and N-isotope shift data for the Rieske-type and mitoNEET proteins argues against the assignment of the band in the 250–300 cm⁻¹ region to pure Fe-N(His) stretching mode (42–45). Rather, Fe-N(His) stretching is distributed over low energy Fe-S stretching modes and internal modes of coordinated cysteine ligands and enhanced via the visible S-to-Fe charge transfer transitions.

The most definitive spectroscopic evidence for a Rieske-type ligation in AtGrxS14-BolA1 heterodimer comes from EPR studies of the dithionite-reduced complex (Fig. 5D). Whereas the [2Fe-2S]²⁺ clusters in homodimeric Grxs are reductively labile, the [2Fe-2S]²⁺ cluster in AtGrxS14-BolA1 is quantitatively reduced by dithionite to stable [2Fe-2S]¹⁺ centers, as observed in ScGrx3-Fra2 heterodimer (7, 12). For AtGrxS14-BolA1, this is illustrated by the UV-visible absorption/CD and EPR studies. The inset in Fig. 5A shows the anomalous near axial resonance ($g = 2.02, 1.96, 1.65, g_{av} = 1.88$) of the [2Fe-2S]¹⁺ center in dithionite-reduced AtGrxS14-BolA1, which accounts for 1.0 ± 0.1 spins per [2Fe-2S] cluster. The resonance is very different from that observed for the [2Fe-2S]¹⁺ center in dithionite-reduced ScGrx3-Fra2 ($g = 2.01, 1.92, 1.87, g_{av} = 1.93$) (Fig. 5C). The g value anisotropy and g_{av} value of $S = 1/2$ [2Fe-2S]¹⁺ centers are determined primarily by the distortion and ligation at the localized-valence Fe(II) site (46, 47). The g_{av} values are generally in the range 1.95–1.97 for complete cysteinyl ligation, 1.93–1.94 for 3 cysteinyl and 1 histidyl ligand, and 1.88–1.92 for Rieske-type centers with 2 cysteinyl ligands at the Fe(III) site and 2 histidyl ligands at the Fe(II) site (7, 48). Hence the g_{av} value puts the [2Fe-2S]¹⁺ center in AtGrxS14-BolA1 heterodimer firmly in the Rieske-type class. However, the g value isotropy is not typical of reduced Rieske proteins, which generally exhibit rhombic resonances. Thus the near axial resonance with $g_{\perp} > g_{\parallel}$ is anomalous for Rieske proteins but can be interpreted in terms of a distinct type of distortion involving an increased (His)N-Fe-N(His) angle that would result in a predominant $d_{xyx^2-y^2}$ ground state (46). In summary, the proposed holo-heterodimer model shows a domain arrangement totally different from the one found in the apo-heterodimer model derived from NMR data (Fig. 6A).

BolA-Glutaredoxin Complexes

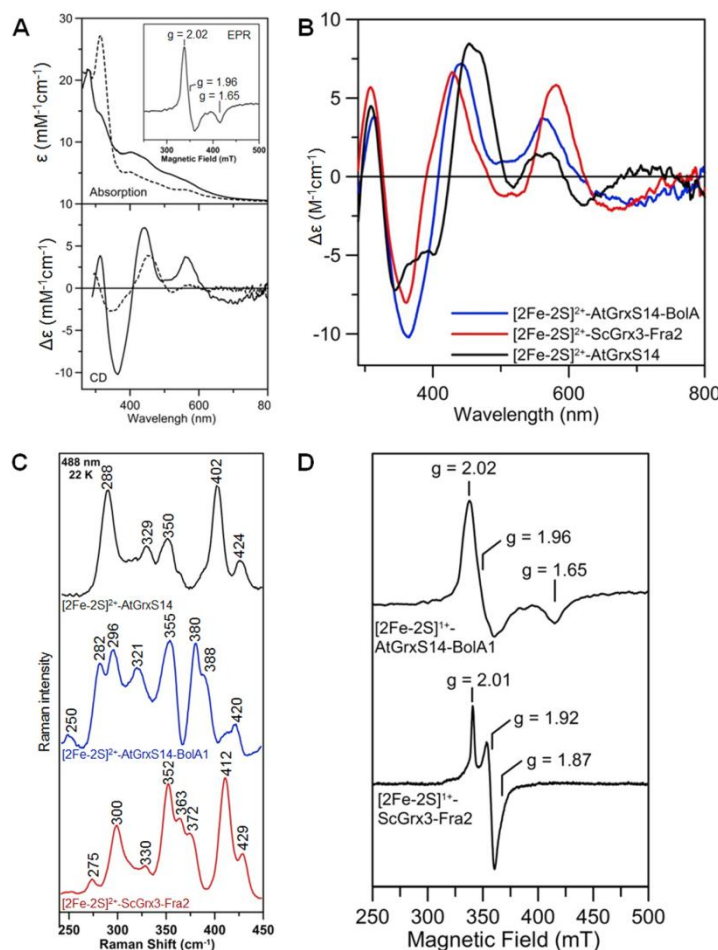


FIGURE 5. Spectroscopic studies of AtGrxS14-BolA1 holo-heterodimers. A, UV-visible absorption and CD spectra of oxidized (solid line) and dithionite-reduced (broken line) reconstituted AtGrxS14-BolA1 complex. ϵ and $\Delta\epsilon$ values are expressed per AtGrxS14-BolA1 heterodimer, and the intense band at 314 nm in the reduced absorption spectrum arises from excess dithionite. The inset shows the X-band EPR spectrum of the dithionite-reduced sample recorded at 10 K and 9.581 GHz, with a microwave power of 5 milliwatts and a modulation amplitude of 0.65 millitesla. B, comparison of the CD spectra of the $[2Fe-2S]^{2+}$ centers in the AtGrxS14-BolA1 and ScGrx3-Fra2 heterodimers and the AtGrxS14 homodimer. $\Delta\epsilon$ values are expressed per $[2Fe-2S]^{2+}$ cluster. C, comparison of the resonance Raman spectra of the $[2Fe-2S]^{2+}$ centers in the AtGrxS14-BolA1 and ScGrx3-Fra2 heterodimers and the AtGrxS14 homodimer. Spectra were recorded using 488-nm laser excitation. Samples were ~ 2 mm in the $[2Fe-2S]$ cluster and were in the form of a frozen droplet at 17–22 K. Each spectrum is the sum of 100 scans, with each scan involving photon counting for 1 s at 0.5 cm^{-1} increments with 6 cm^{-1} spectral resolution. Bands due to lattice modes of ice have been subtracted from all spectra. D, comparison of the X-band EPR spectra of the dithionite-reduced $[2Fe-2S]^{1+}$ centers in the AtGrxS14-BolA1 and ScGrx3-Fra2 heterodimers. EPR conditions: microwave frequency, 9.581 GHz; modulation amplitude, 0.65 millitesla; microwave power, 5 milliwatts; temperature, 10 K. Spin quantification of both EPR signals indicates 1.0 ± 0.1 spins per $[2Fe-2S]$ cluster.

Biological Function of Grx-BolA Apo- and Holo-heterodimers—An important question is how apo- and holo-Grx-BolA complexes are formed in the cells, as Grxs and BolAs are first translated as apoproteins and they might preferentially form apo-heterodimers. Hence, the Fe-S cluster might eventually be inserted through the functioning of the assembly machinery of the same compartment (pathway 1 in Fig. 6B) (49). Consistently, a Grx-BolA apo-heterodimer can accept a $[2Fe-2S]$ cluster from IscA, an A-type cluster donor (50). Interestingly, the NMR-based docking AtGrxS14-BolA2 apo-heterodimer model

shows that the residues used for Fe-S cluster coordination from both partners are relatively well exposed and not directly implicated in the contact region.

Based on the observation that adding Fra2 to the more labile holo-homodimeric Grxs displaces the equilibrium toward the formation of a more stable ScGrx3-Fra2 holo-heterodimer (7), an alternative pathway to form Grx-BolA holo-heterodimers is from holo-homodimeric Grxs (pathway 2 in Fig. 6B). Hence, there may be a dynamic equilibrium that is dependent on the expression and/or subcellular local-

BolA-Glutaredoxin Complexes

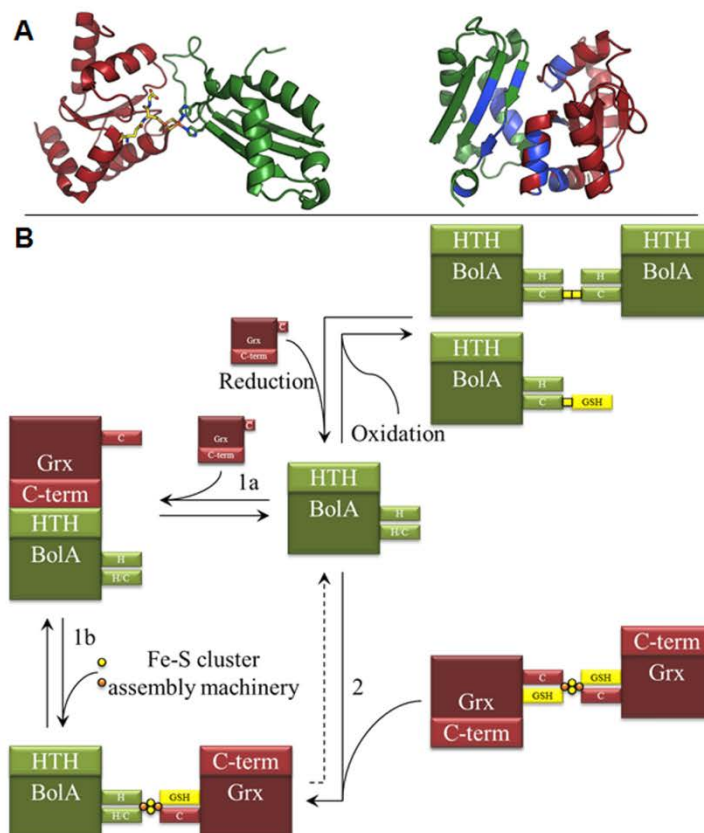


FIGURE 6. **Formation of BolA-Grx complexes.** A, comparison of AtGrxS14-BolA apo- and holo-heterodimers. The [2Fe-2S]-bridged AtGrxS14-BolA1 holo-heterodimer model was built from the structures of individual proteins. The model of AtGrxS14-BolA2 apo-heterodimer was obtained by NMR-based docking from residues (colored in blue) presenting high chemical shift variations upon partner addition. Grxs are colored in green, BolA are in red, and glutathione is in yellow. B, recapitulative scheme showing the formation of BolA-BolA and Grx-BolA complexes. From the current literature, there are two pathways to form Grx-BolA holo-heterodimers. Grx-BolA apo-heterodimers can accept a [2Fe-2S] cluster from IscAs or possibly other Fe-S assembly components (pathway 1) (50). Alternatively BolA can displace a Grx monomer from holo-homodimeric Grxs as shown for the ScGrx3-Fra2 couple (pathway 2) (7). In principle, the reactions are reversible, and monomeric BolAs or Grx-BolA apo-heterodimers could be reformed by disruption (7) of the Grx-BolA holo-heterodimer Fe-S cluster or its transfer to an acceptor. Due to the presence of a cysteine residue, BolA_{Cs} can form disulfide bridges either as covalent dimers or as glutathionylated forms, both forms being reversibly reduced by Grxs (10). The physiological relevance of each form has not been always elucidated, but interconversion can affect all assumed functions of both proteins (DNA binding, iron-sensing, or Fe-S cluster maturation).

ization of both proteins or on the presence of Fe-S cluster maturation or repair systems.

The function of these holo-heterodimers is still not clear (6, 9, 50, 51). The only characterized physiological role for a Grx-BolA holo-heterodimer is in sensing the intracellular iron/Fe-S cluster status in yeast. The current model is that a complex formed by Fra1, Fra2, Grx3, and Grx4 links the mitochondrial Fe-S or iron status to the control of a set of genes involved in iron uptake, transport, and storage known as the iron regulon via the regulation of Aft1 transcription factor (5). Under iron-deficient conditions, Aft1 is concentrated in the nucleus and activates the iron regulon, whereas under iron-sufficient conditions it is found predominantly in the cytoplasm. The current view is that Aft1 continuously shuttles between the cytosol and the nucleus but that specific signals maintain it in a given compartment. For instance, it was shown that its translocation from

the nucleus to the cytoplasm is promoted by an iron-dependent multimerization and that Grx3/4 are essential for the nuclear export of Aft1 upon iron-replete conditions (52, 53). Importantly, the recognition of Aft1 involves at least a negatively charged region in the yeast Grx4 formed by the last 16 C-terminal residues (supplemental Fig. S2) (40). Overall, although it is not clear where the Grx-BolA complex is acting, it is very likely that the formation of the Fe-S cluster in the Grx-BolA heterodimer is crucial for Aft1 regulation. Indeed, the known Fe-S cluster ligands (GSH, Grx catalytic cysteine, and BolA invariant histidine) are all required for iron-dependent inhibition of Aft1 activity *in vivo* (8, 54). Accordingly, it was shown recently that a ScGrx3/4-Fra2 holo-heterodimer, but not Grx3 holo-homodimer, can transfer an Fe-S cluster to Aft2, used as an Aft representative, inducing Aft2 dimerization (6).

BolA-Glutaredoxin Complexes

Although the mode of action and regulation of Aft1 is not yet completely elucidated, the formation of two types of Grx-BolA heterodimers involving different protein regions allows implementing the working model of Aft1 regulation. First, the observation that the Grx C-terminal region is accessible in holo-heterodimers suggests that in yeast cells under iron-replete conditions, the formation of Grx-BolA holo-heterodimers may contribute to the cytoplasmic retention/nuclear export of Aft1 either by simply recruiting it or by transferring their Fe-S clusters. On the contrary, in iron-depleted conditions, Grx and BolA should form apo-heterodimers. In this case the C-terminal tail of Grx is hidden by its partner, which should prevent the possibility of interacting with Aft1, allowing it to accumulate in the nucleus and to activate the genes placed under its control. The existence of these different types of complexes may explain why ScGrx3/4-Fra2 interactions were detected in cells independently of the iron status. Despite the fact that Aft1 is restricted to a few species, similar iron regulation systems might exist in other organisms including plants. For instance, in *Schizosaccharomyces pombe*, Fepl and Php4, two transcriptional regulators of iron homeostasis, are regulated by a Grx4 ortholog (55, 56). Whether a BolA is required in this case is not yet elucidated.

In summary, in the case of the Grx-BolA holo-heterodimer, the interface comprises the conserved residue of the [H/C] loop and the invariant histidine of BolAs, a glutathione, and the catalytic cysteine of Grxs. Conversely, in the case of the Grx-BolA apo-heterodimer, the interaction surface between the two partners surprisingly includes the putative DNA binding anchor point of BolAs and the transcription factor binding surface of monothiol Grxs. Therefore, BolA and Grx function/activity can be adjusted via several post-translational events as all BolA types can form apo and holo-heterodimers with monothiol Grxs. Such an example where two proteins interact with two distinct regions is quite unusual.

Acknowledgments—Access to the Bruker DRX 600 (NMR) and x-ray diffraction facilities of the Université de Lorraine was appreciated. We are grateful to the staff members of Proxima-1 beamline of the SOLEIL Synchrotron and of BM30A beamline at European Synchrotron Radiation Facility.

REFERENCES

- Nooren, I. M., and Thornton, J. M. (2003) Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486–3492
- Aldea, M., Hernández-Chico, C., de la Campa, A. G., Kushner, S. R., and Vicente, M. (1988) Identification, cloning, and expression of bolA, an ftsZ-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 5169–5176
- Santos, J. M., Freire, P., Vicente, M., and Arraiano, C. M. (1999) The stationary-phase morphogene bolA from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Mol. Microbiol.* **32**, 789–798
- Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M. K., and Jacquot, J. P. (2010) Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 43–52
- Kumánovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D., Ward, D. M., and Kaplan, J. (2008) Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 10276–10286
- Poor, C. B., Wegner, S. V., Li, H., Dlouhy, A. C., Schuermann, J. P., Sanishvili, R., Hinshaw, J. R., Riggs-Gelasco, P. J., Outten, C. E., and He, C. (2014) Molecular mechanism and structure of the *Saccharomyces cerevisiae* iron regulator Aft2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 4043–4048
- Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Naik, S. G., Lees, N. S., Hoffman, B. M., Riggs-Gelasco, P. J., Huynh, B. H., Johnson, M. K., and Outten, C. E. (2009) The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* **48**, 9569–9581
- Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Keller, G., Riggs-Gelasco, P. J., Winge, D. R., Johnson, M. K., and Outten, C. E. (2011) Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for *in vivo* iron signaling in yeast. *J. Biol. Chem.* **286**, 867–876
- Yeung, N., Gold, B., Liu, N. L., Prathapam, R., Sterling, H. J., Willams, E. R., and Butland, G. (2011) The *E. coli* monothiol glutaredoxin Grx2 forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster-containing complexes. *Biochemistry* **50**, 8957–8969
- Couturier, J., Wu, H. C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J. M., Jacquot, J. P., Gaymard, F., Vignols, F., and Rouhier, N. (2014) Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of *Arabidopsis thaliana* BolA2 and SufE1. *Mol. Plant* **7**, 187–205
- Willems, P., Wanschers, B. F., Esseling, J., Szklarczyk, R., Kudla, U., Duarte, L., Forkink, M., Nooteboom, M., Swarts, H., Gloerich, J., Nijtmans, L., Koopman, W., and Huynh, M. A. (2013) BOLA1 is an aerobic protein that prevents mitochondrial morphology changes induced by glutathione depletion. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 129–138
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gualberto, J. M., Claxton, R., Naik, S. G., Huynh, B. H., Herrero, E., Jacquot, J. P., Johnson, M. K., and Rouhier, N. (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* **27**, 1122–1133
- Brown, R. E., Jarvis, K. L., and Hyland, K. I. (1989) Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* **180**, 136–139
- Fish, W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol.* **158**, 357–364
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132
- Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242
- Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOL-REP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25
- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501
- Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293
- Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMR view: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* **4**, 603–614
- Cheung, M. S., Maguire, M. L., Stevens, T. J., and Broadhurst, R. W. (2010) DANGLE: a bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. *J. Magn. Reson.* **202**, 223–233
- Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., and Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software

Bola-Glutaredoxin Complexes

- pipeline. *Proteins* **59**, 687–696
26. Linge, J. P., O'Donoghue, S. I., and Nilges, M. (2001) Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol.* **339**, 71–90
27. Br nger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921
28. Tovchigrechko, A., and Vakser, I. (2006) GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* **34**, W310–W314
29. Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., and Karplus, K. (2009) Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* **77**, 114–122
30. Keller, S., Vargas, C., Zhao, H., Piszczek, G., Brautigam, C. A., and Schuck, P. (2012) High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Anal. Chem.* **84**, 5066–5073
31. Katoh, K., and Standley, D. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780
32. Gille, C., and Fr mmler, C. (2001) STRAP: editor for STRuctural Alignments of Proteins. *Bioinformatics* **17**, 377–378
33. Kasai, T., Inoue, M., Koshiba, S., Yabuki, T., Aoki, M., Nunokawa, E., Seki, E., Matsuda, T., Matsuda, N., Tomo, Y., Shirouzu, M., Terada, T., Obayashi, N., Hamana, H., Shinya, N., Tatsuguchi, A., Yasuda, S., Yoshida, M., Hirota, H., Matsuo, Y., Tani, K., Suzuki, H., Arakawa, T., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Kigawa, T., and Yokoyama, S. (2004) Solution structure of a Bola-like protein from *Mus musculus*. *Protein Sci.* **13**, 545–548
34. Cheng, Z., Miura, K., Popov, V. L., Kumagai, Y., and Rikihisa, Y. (2011) Insights into the CtrA regulon in development of stress resistance in obligate intracellular pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. *Mol. Microbiol.* **82**, 1217–1234
35. Freire, P., Moreira, R. N., and Arraiano, C. M. (2009) Bola inhibits cell elongation and regulates MreB expression levels. *J. Mol. Biol.* **385**, 1345–1351
36. Shukla, M., Minda, R., Singh, H., Tirumani, S., Chary, K., and Rao, B. (2012) UVI31+ is a DNA endonuclease that dynamically localizes to chloroplast pyrenoids in *C. reinhardtii*. *PLoS ONE* **7**, 1–13
37. Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008) Structure and function of KH domains. *FEBS J.* **275**, 2712–2726
38. Li, L., Cheng, N., Hirschi, K. D., and Wang, X. (2010) Structure of *Arabidopsis* chloroplastic monothiol glutaredoxin AtGRXcp. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 725–732
39. Li, H., Mapolelo, D. T., Randeniya, S., Johnson, M. K., and Outten, C. E. (2012) Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human Bola2. *Biochemistry* **51**, 1687–1696
40. Hoffmann, B., Uzarska, M. A., Berndt, C., Godoy, J. R., Haunhorst, P., Lillig, C. H., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2011) The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 19–30
41. Li, S., Gutsche, N., and Zachgo, S. (2011) The ROXY1 C-terminal L*LL motif is essential for the interaction with TGA transcription factors. *Plant Physiol.* **157**, 2056–2068
42. Rotsaert, F. J., Pikus, I. D., Fox, B. G., Markley, J. L., and Sanders-Loehr, J. (2003) N-isotope effects on the Raman spectra of Fe(2S(2)) ferredoxin and Rieske ferredoxin: evidence for structural rigidity of metal sites. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 318–326
43. Kounosu, A., Li, Z., Cosper, N. J., Shokes, J. E., Scott, R. A., Imai, T., Urushiyama, A., and Iwasaki, T. (2004) Engineering a three-cysteine, one-histidine ligand environment into a new hyperthermophilic archaeal Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 12519–12528
44. Iwasaki, T., Kounosu, A., Kolling, D. R., Crofts, A. R., Dikanov, S. A., Jin, A., Imai, T., and Urushiyama, A. (2004) Characterization of the pH-dependent resonance Raman transitions of archaeal and bacterial Rieske [2Fe-2S] proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4788–4789
45. Tirrell, T. F., Paddock, M. L., Conlan, A. R., Smoll, E. J., Jr., Nechushtai, R., Jennings, P. A., and Kim, J. E. (2009) Resonance Raman studies of the (His)(Cys)3 2Fe-2S cluster of MitoNEET: comparison to the (Cys)4 mutant and implications of the effects of pH on the labile metal center. *Biochemistry* **48**, 4747–4752
46. Bertrand, P., Guigliarelli, B., Gayda, J., Peter, B., and Gibson, J. (1985) A ligand-field model to describe a new class of 2Fe-2S clusters in proteins and their synthetic analogues. *Biochim. Biophys. Acta* **831**, 261–266
47. Guigliarelli, B., and Bertrand, P. (1999) Application of EPR spectroscopy to the structural and functional study of iron-sulfur proteins. *Adv. Inorg. Chem.* **47**, 421–497
48. Link, T. (1999) The structures of Rieske and Rieske-type proteins. *Adv. Inorg. Chem.* **47**, 83–157
49. Couturier, J., Touraine, B., Briat, J. F., Gaymard, F., and Rouhier, N. (2013) The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Front Plant Sci.* **4**, 259
50. Mapolelo, D. T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A. N., Li, H., Couturier, J., Outten, C. E., Rouhier, N., and Johnson, M. K. (2013) Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe-S cluster trafficking. *Dalton Trans.* **42**, 3107–3115
51. Cameron, J. M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T. A., Tong, W. H., Ogilvie, I., Shoubridge, E. A., and Robinson, B. H. (2011) Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 486–495
52. Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., and de la Torre-Ruiz, M. (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **119**, 4554–4564
53. Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seibert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C. H., and Lill, R. (2010) Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* **12**, 373–385
54. Ojeda, L., Keller, G., Mühlenhoff, U., Rutherford, J. C., Lill, R., and Winge, D. R. (2006) 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
55. Jbel, M., Mercier, A., and Labb , S. (2011) Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1. *Eukaryot Cell* **10**, 629–645
56. Mercier, A., and Labb , S. (2009) Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1. *J. Biol. Chem.* **284**, 20249–20262
57. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10037–10041
58. Johansson, C., Roos, A. K., Montano, S. J., Sengupta, R., Filippakopoulos, P., Guo, K., von Delft, F., Holmgren, A., Oppermann, U., and Kavanagh, K. L. (2011) The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem. J.* **433**, 303–311

Downloaded from <http://www.jbc.org/> at Université de Lorraine on August 31, 2014

Supplemental Data

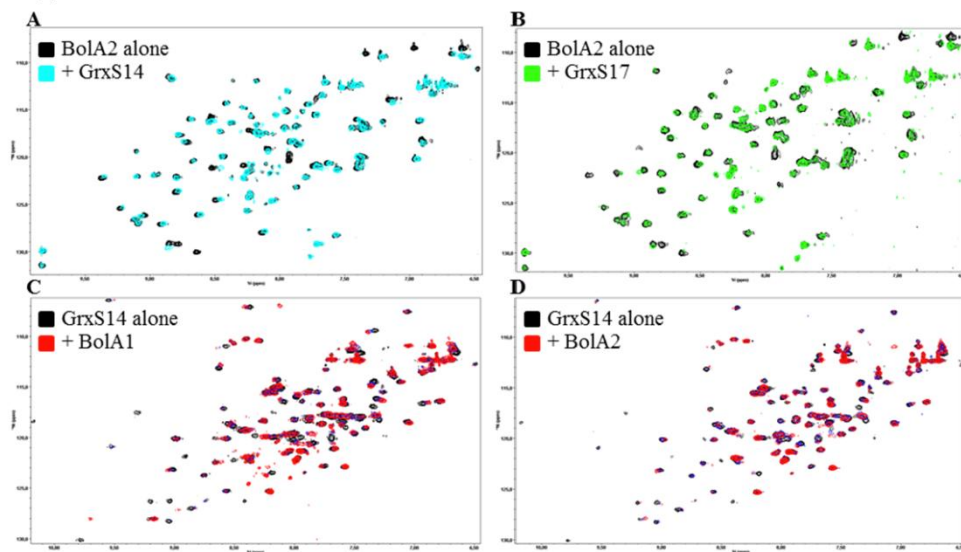


Figure S1. ^1H - ^{15}N HSQC NMR experiments

AtBolA2 is alone (black) or with 1 equivalent of AtGrxS14 (A) and AtGrxS17 (B) (blue and green respectively) at pH 7.0 and 288K. AtGrxS14 is alone (black) or with 1 equivalent of AtBolA1 (C) and AtBolA2 (D) (red) at pH 7.0 and 288K.

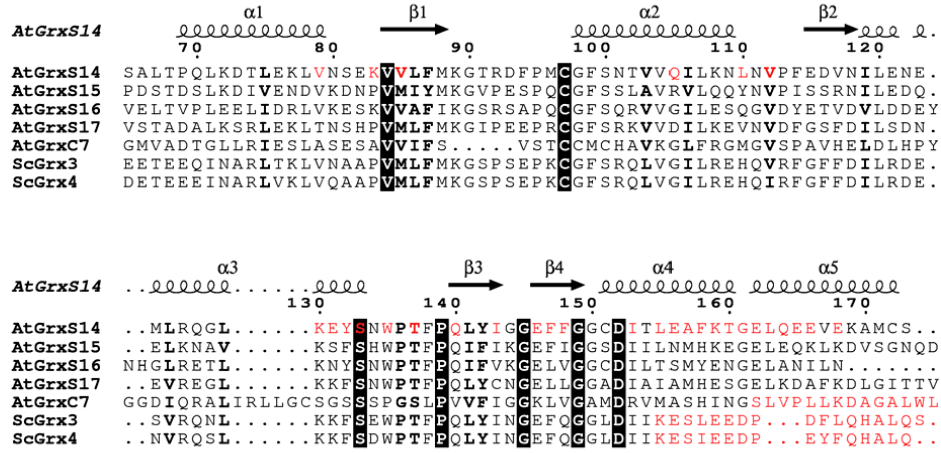


Figure S2. Glutaredoxin interacting areas with transcription factors

Multiple sequence alignment of AtGrxS14 with *S. cerevisiae* Grx3 and Grx4, *A. thaliana* GrxS15, S16, S17 and GrxC7 (with CCMC active site). Secondary structure annotation and numbering on top correspond to AtGrxS14. Conserved residues are in black box and residues potentially interacting with AtBolA2 (AtGrxS14), Aft1 (ScGrx3/4) and TGA (AtGrxC7) are colored in red.

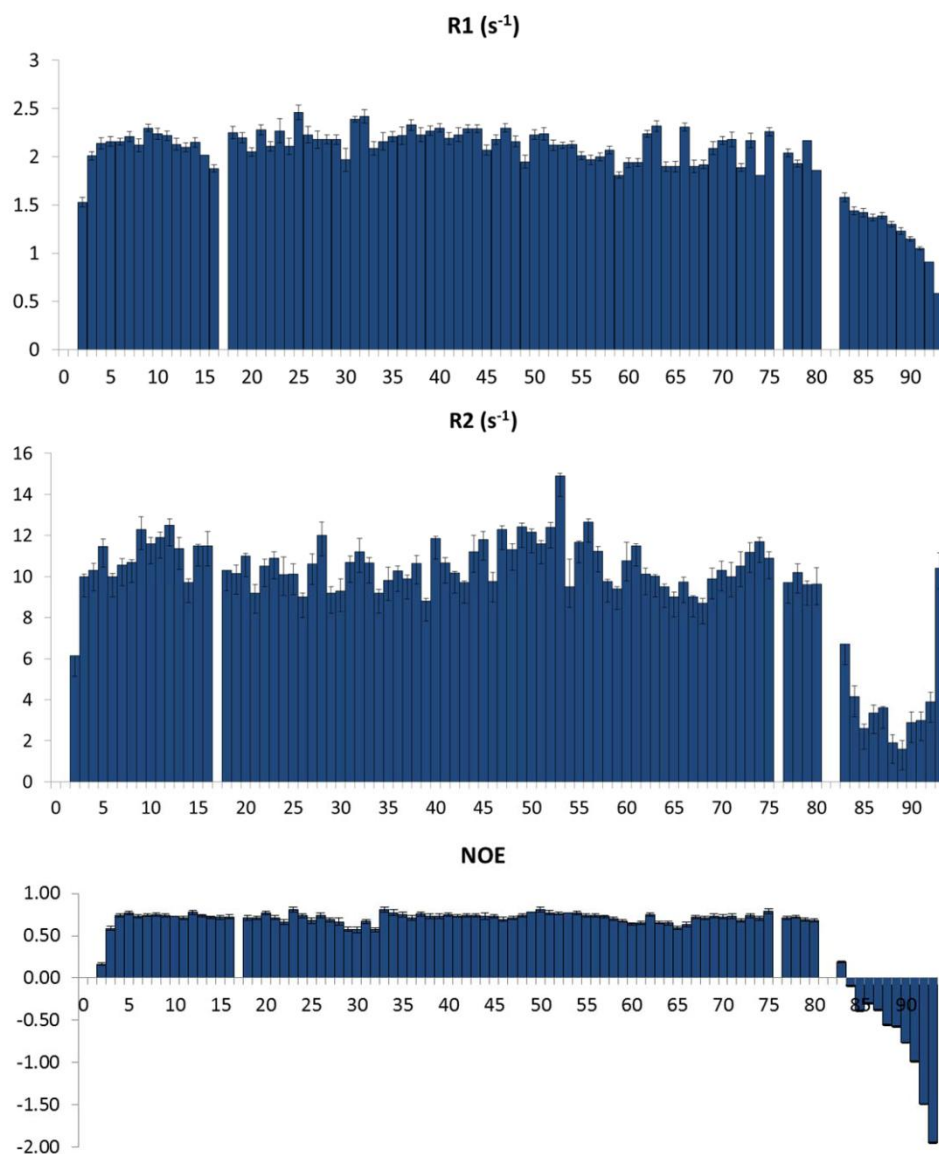


Figure S3. ¹⁵N backbone relaxation measurements

R_1 , R_2 , and [^1H , ^{15}N] heteronuclear NOE plotted as function of the residue number for AtBolA2. The [^1H , ^{15}N] heteronuclear NOE negative values observed for the 10 C-terminal residues indicate that this tail is totally unstructured which may have hampered crystallization. In fact, structural disorder in N- and C-terminal extensions can also be noticed in the NMR models of BolA1 from *M. musculus* and *E. coli*.

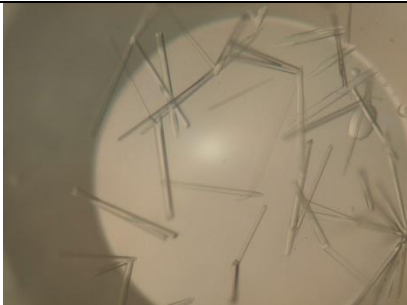
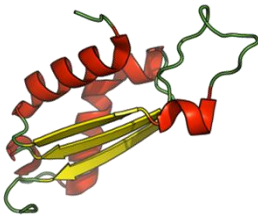
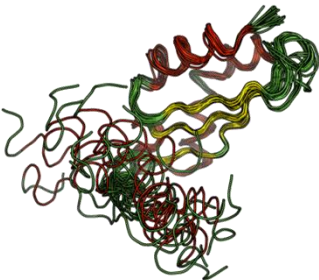
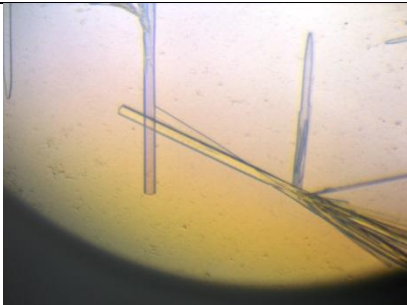
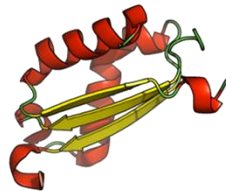
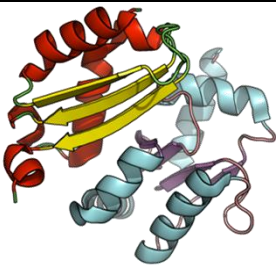
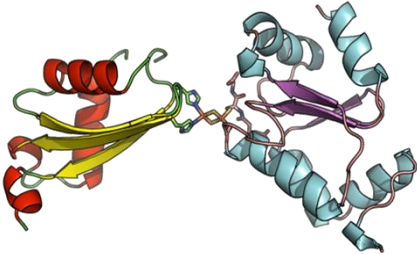
AtBola1	 Cristallographie des rayons X – 2,0Å	
AtBola2	Résonance magnétique nucléaire	
SufE1 ^{Bola}	 Cristallographie des rayons X – 1,7Å	
AtGrxS14 - Bola2 apo	Résonance magnétique nucléaire <i>Docking</i> Minimisation d'énergie	
AtGrxS14 - Bola1 holo	Modélisation Absorption UV Dichroïsme circulaire Résonance RAMAN Résonance paramagnétique électronique	

Tableau n°1 Tableau récapitulatif des différentes structures présentes au sein de l'article « Structural and spectroscopic insights into Bola-glutaredoxin complexes ».

I.B. Homodimérisation des BolA

I.B.1. Introduction

Chez les bactéries, il est clairement établi que les protéines BolA sont impliquées dans la réponse à une variété de stress engendrant la surexpression des gènes codant pour BolA (Kim et al, 1997; Santos et al, 1999). Pour pallier à ces différents types de stress les protéines BolA ont été initialement décrites comme des morphogènes qui produisent une forme cellulaire arrondie lorsqu'elles sont surexprimées permettant ainsi de limiter le contact avec le milieu extérieur (Aldea et al, 1988). En outre, il a été montré que les BolA_H présentes chez *E. coli* and *E. chaffeensis* pouvaient être des facteurs de transcription se fixant directement sur les régions promotrices de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire (Cheng et al, 2011; Freire et al, 2009; Guinote et al, 2011). Par contre pour Uvi31⁺ de *C. reinhardtii* (inductible par les UV) qui se fixe également à l'ADN, une activité endonucléase a été mise en évidence (Shukla et al, 2012). Plus récemment il a été montré que les protéines BolA et glutarédoxines de classe II sont impliquées par le biais de deux types de dimères dans l'homéostasie du fer (Couturier et al, 2014; Li & Outten, 2012).

Par ailleurs, il semble que les BolA_H ont la capacité de former des dimères non covalents pour assurer certaines fonctions biologiques (Shukla et al, 2012) et que les BolA_C peuvent former des dimères covalents par le biais de leur cystéine qui est réductible par les glutarédoxines (Couturier et al, 2014). La structure d'AtBolA2 sous la forme dimérique oxydée est présentée et comparée à la forme dimérique oxydée de la BolA_C de *B. bovis*. A partir de l'empilement cristallin très particulier d'AtBolA2 un modèle pour la dimérisation des BolA_H est également proposé.

I.B.2. Résultats et discussion

I.B.2.a. Cristallisation et affinement de la structure

La protéine nucléo-cytoplasmique BolA2 oxydée d'*A. thaliana* a été obtenue par traitement avec du peroxyde d'hydrogène (Couturier et al, 2014) et a été cristallisée dans le groupe d'espace $P2_1$ par la méthode de microbatch en goutte à l'huile à 4°C. Afin d'obtenir des cristaux (Figure n°30), 1µL de la protéine à 10 mg.mL⁻¹ a été mélangé avec 1µL de la condition de cristallisation JBScreen Classic 1 C4 contenant un mélange de 30% de PEG1000 et le tampon Tris-HCl à 100mM pH 8,5. Une solution contenant le mélange de la condition de cristallisation et 20% (v/v) de glycérol ont ensuite été utilisés comme cryo-protecteur avant de collecter les données à 100K sur la ligne FIP-BM30A de l'ESRF.

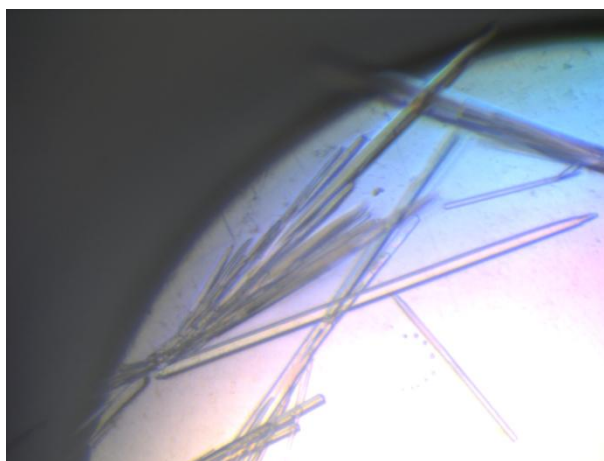


Figure n°30 Photographie des cristaux de la protéine BolA2 oxydée d'*Arabidopsis thaliana*.

Les données obtenues à 1,9Å de résolution ont ensuite été traitées de façon classique en utilisant XDS (Kabsch, 2010) pour l'intégration puis Scala (Evans, 2005) provenant de la suite CCP4 (Winn et al, 2011) pour la mise à l'échelle et la réduction des données. La structure a ensuite été résolue par remplacement moléculaire en utilisant Molrep (Vagin & Teplyakov, 2009) à partir de la structure RMN de la forme réduite d'AtBolA2 (code pdb 2MM9). La structure a

après été affinée automatiquement par la biais de PHENIX (Adams et al, 2010) avec des inspections et des corrections manuelles en utilisant Coot (Emsley et al, 2010) entre chaque macrocycle d'affinement (Tableau n°2).

Collecte des données	AtBolA2
Ligne synchrotron	FIP-BM30A
Groupe d'espace	$P2_1$
Paramètre de maille (Å)	29,64 x 81,42 x 33,11
	$\beta = 108,62^\circ$
Résolution (Å)	40,71-1,90 (2,00-1,90)
Réflexions uniques	11470 (1395)
Redondance moyenne	3,7 (2,9)
Complétude (%)	97,1 (80,8)
R_{merge}	0,06 (0,26)
R_{meas}	0,07 (0,32)
R_{pim}	0,04 (0,18)
I/ σ (I) moyen	14,2 (4,0)
Affinement	
Résolution (Å)	40,7-1,9
$R_{\text{free}}/R_{\text{work}}$	20,42/17,75
Nombre total d'atomes	1472
Nombre de molécules d'eau	194
Facteur B moyen	27,85
Ramachandran favorable	99,37%
Ramachandran défavorable	0,00%
R.m.s déviations	
Liaisons	0,007
Angles	1,041
MolProbity analyse	
Clashscore, tous atomes	4,65 (97%)
MolProbity score	1,57 (93%)

Tableau n°2 Tableau récapitulatif des statistiques cristallographiques de la protéine BolA2 oxydée d'*A. thaliana*. Les valeurs indiquées entre parenthèses pour la collecte des données correspondent à la couronne de plus haute résolution. $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl) \rangle}$. $R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{n/n-1} \sum_i^n |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i^n \langle I(hkl) \rangle}$. $R_{\text{pim}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{1/n-1} \sum_i^n |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i^n \langle I(hkl) \rangle}$. $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$. 5% des réflexions ont été sélectionnés pour le calcul du R_{free} . Root-mean-square deviation calculé à partir de valeurs idéales (Engh & Huber, 1991). MolProbity clashscore est le nombre de clash sérieux pour 1000 atomes (Chen et al, 2010). MolProbity score est un score utilisant le clashscore, le pourcentage de résidus dans la zone non favorable du digramme de Ramachandran et le pourcentage de mauvais rotamères (Chen et al, 2010).

I.B.2.b. Description de la structure

La structure d'AtBolA2 (93 acides aminés) se présente sous la forme d'un dimère covalent où les deux sous-unités sont présentes dans l'unité asymétrique et sont reliées par un pont disulfure entre les deux cystéines 29 comme observé *in vitro* (Couturier et al, 2014). Pour chacun des monomères la densité électronique est manquante pour les 11 derniers résidus de la séquence indiquant une grande flexibilité de la partie C-terminale. Cette observation est en accord avec les données de la précédente partie concernant la structure d'AtBolA2 réduite résolue par RMN (partie I.A.2.). Une sous-unité est composée de quatre hélices et de quatre brins β avec un arrangement du type $\alpha 1\beta 1\beta 2\eta 2\alpha 3\beta 3'\beta 3''\alpha 4$ (η est une hélice 3_{10}). Ainsi la structure s'articule autour d'un feuillet central composé des quatre brins β où l'hélice $\alpha 4$ se retrouve d'un côté et les trois hélices de l'autre côté (Figure n°31).

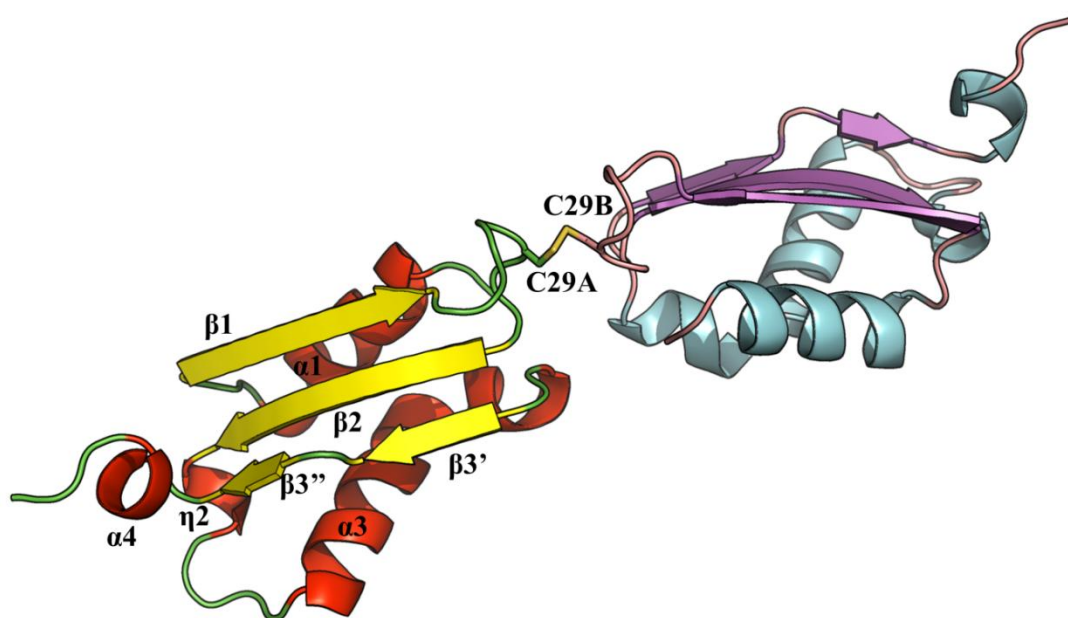


Figure n°31 Représentation en mode ruban et flèche de la structure dimérique de la protéine AtBolA2.

Seul le monomère A situé à gauche est annoté. Le pont disulfure entre C29A et C29B est également représenté en mode bâton.

Au sein de la structure les quatre brins sont arrangés dans l'ordre $\beta 1$ (résidus 19 à 24), $\beta 2$ (résidus 32 à 38), $\beta 3'$ (résidus 67 à 70) et $\beta 3''$ (résidus 72 à 74) avec le brin $\beta 1$ qui est antiparallèle aux autres. Les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ sont connectés par la courte boucle [H/C] contenant la cystéine 29 et formant dans ce cas un β -turn de type I' (résidus 26 à 29). Les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ sont reliés par différents éléments comprenant l'hélice $\eta 2$ (résidus 40 à 43), un β -turn de type II (résidus 42 à 45) et l'hélice $\alpha 3$ (résidus 46 à 64). Ces trois éléments ($\eta 2$, le β -turn de type II et $\alpha 3$) constituent le motif HTH (helix-turn-helix) des protéines BolA. Ce motif HTH a été prédit comme étant le site de fixation de l'ADN pour les protéines BolA (Kasai et al, 2004). Comme toutes les autres BolA, AtBolA2 possède les deux résidus invariants localisés au niveau de $\eta 2$ (F42) et de l'extrémité N-terminale du brin $\beta 3$ (H66). La particularité de la protéine AtBolA2 et par extension tous les représentants équivalents à BolA2 chez les plantes est que le brin $\beta 3$ est décomposé en $\beta 3'$ et $\beta 3''$ reliés par un résidu additionnel qui est la lysine 71 dans ce cas.

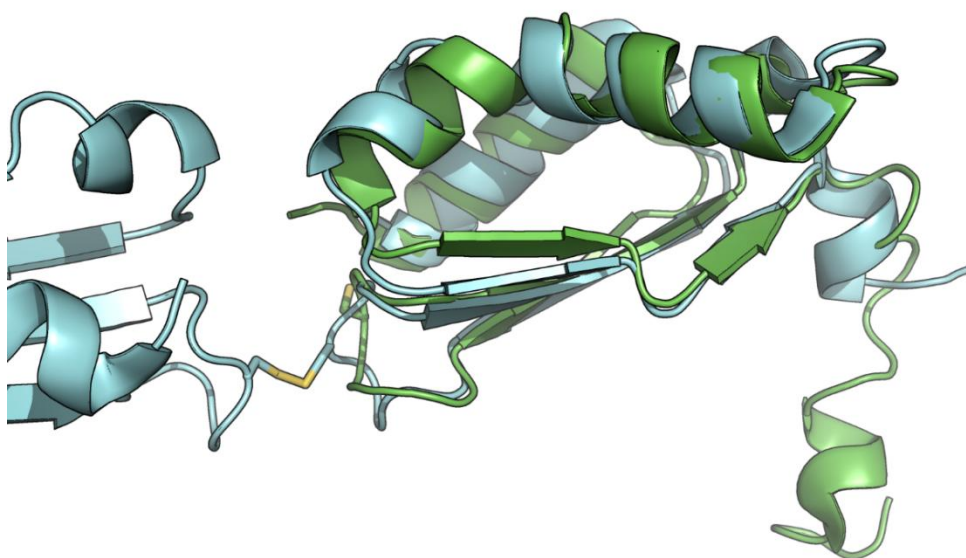


Figure n°32 Représentation en mode ruban et flèche à l'aide du logiciel PyMol de la structure d'AtBolA2. Superposition de la forme dimérique oxydée d'AtBolA2 (cyan) avec sa forme monomérique réduite (vert).

Afin de voir s'il y a des différences entre les formes réduite et oxydée d'AtBola2 une superposition a été réalisée et un RMSD de 1,7Å a été obtenu (Figure n°32). Cette valeur élevée vient probablement du fait que deux méthodes différentes ont été utilisées pour déterminer les structures des formes monomérique (RMN) et homodimérique (RX). Toutefois une différence notable réside autour de la cystéine 29 où le motif GGC₂₉G subit des réarrangements structuraux importants pour favoriser la dimérisation avec un RMSD de 6,6Å.

I.B.2.c. Le dimère covalent des Bola_C

Le dimère covalent est formé par un pont disulfure entre les deux cystéines 29 de chacun des monomères avec une très faible interface d'environ 170Å². De plus, aucune interaction n'est observée entre les deux monomères. Ceci semble indiquer que l'orientation relative entre les deux monomères est induite par l'empilement cristallin. Afin de vérifier cette hypothèse une superposition des monomères A a été réalisée entre la forme dimérique d'AtBola2 et celle de la Bola de *B. bovis* (code pdb 3O2E). De façon non-surprenante les monomères B ne se superposent pas du tout. Les deux protéines forment ainsi des dimères avec des arrangements spatiaux différents (Figure n°33).

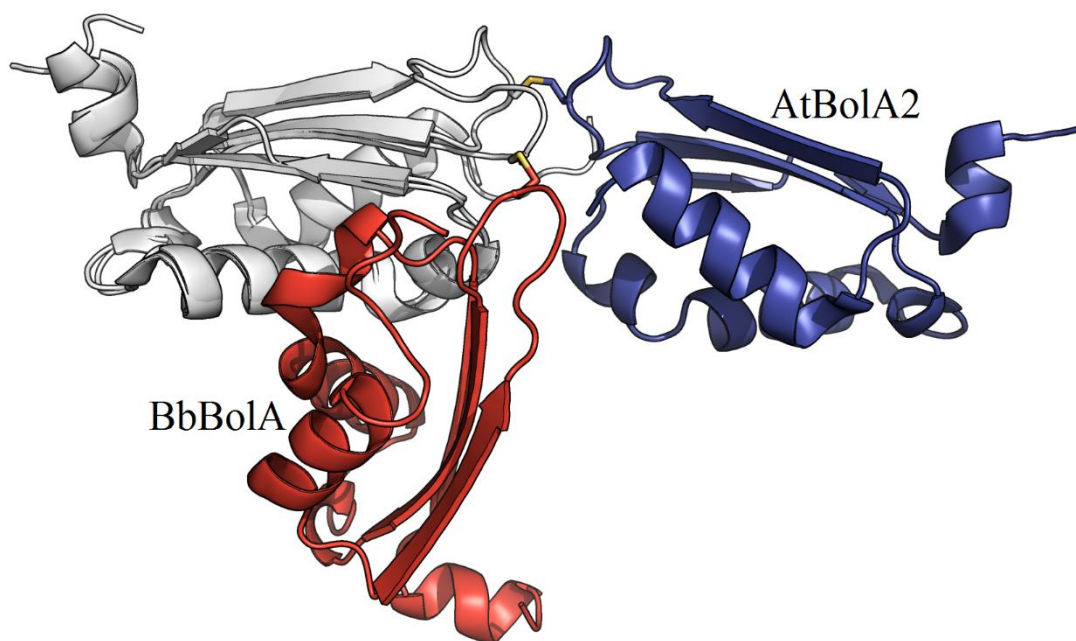


Figure n°33 Représentation des dimères covalents des protéines BolA2 d'*A. thaliana* (bleu) et BolA de *B. bovis* (rouge) où les monomères A sont superposés (blanc). Les monomères B sont reliés par la cystéine 29 dans les deux dimères.

Dans le cas du dimère formé par la protéine de *B. bovis*, l'interface est plus grande ($630,9\text{\AA}^2$) mais avec peu d'interactions polaires. Seuls les résidus arginine 52 (chaîne latérale) et sérine 56 (chaîne principale) sont impliqués dans des liaisons hydrogène et tous les autres résidus à l'interface (la conservation globale est de 34,5% et la conservation moyenne des résidus à l'interface est de 39,8%) semblent impliqués dans des interactions du type hydrophobe. Ainsi l'observation de ces deux types de dimères semble indiquer qu'en solution les homodimères covalents de *B. bovis* et d'*A. thaliana* n'adoptent pas d'arrangements particuliers et sont probablement flexibles. De façon importante le dimère covalent d'AtBolA2 peut être réduit efficacement par son partenaire biologique la GrxS17 nucléocytoplasmique de classe II (Couturier et al, 2014). Par homologie avec des facteurs de transcription tels qu'OxyR qui peut être réduit par la Grx1 d'*E. coli* (Aslund et al, 1999), nous pouvons supposer que l'état redox de

la cystéine d'AtBolA2 dépendant d'un stress oxydatif peut servir à moduler les propriétés des BolA_C et peut-être sa capacité à interagir avec l'ADN ou avec des partenaires physiologiques (Toledano et al, 2004). En se basant sur ces hypothèses il est alors possible que les BolA_C soient régulées par les Grx de façon redox dépendante via la réduction de la cystéine ou de façon non redox dépendante par la formation des complexes Grx-BolA apo- et holo-hétérodimériques.

I.B.2.d. Le dimère non-covalent

L'analyse des contacts cristallins a permis de révéler un autre homodimère putatif mais cette fois non covalent (dimère B) et plus compact que le covalent (dimère A) (Figure n°34). Il s'avère que l'empilement cristallin d'AtBolA2 a conduit à la formation d'une chaîne infinie de dimères B. Le dimère non covalent présente une symétrie binaire avec l'axe de symétrie située perpendiculairement au plan moyen du feuillet β . Cet empilement permet la création, d'un côté d'un long feuillet de 6 brins β et de l'autre côté l'emboîtement des deux motifs HTH par le biais des hélices $\alpha 3$ avec une interface de $705,7 \text{ \AA}^2$. Toutefois, comme les dimères covalents (de *B. bovis* et d'*A. thaliana*) l'assemblage non covalent est stabilisé par peu d'interactions polaires. Seules les chaînes latérales des résidus glutamique 34, sérine 69 et lysine 71 sont impliquées dans des interactions polaires au sein de cette interface compacte qui est composée de 22 acides aminés (la conservation moyenne de ces résidus est de 45%). Les deux hélices $\alpha 3$, portant les motifs RHR impliqués dans la fixation de la Grx au sein du complexe BolA-Grx apo et supposés important pour la reconnaissance de l'ADN, forment ainsi une surface ininterrompue chargée positivement qui peut favoriser la reconnaissance des acides nucléiques.

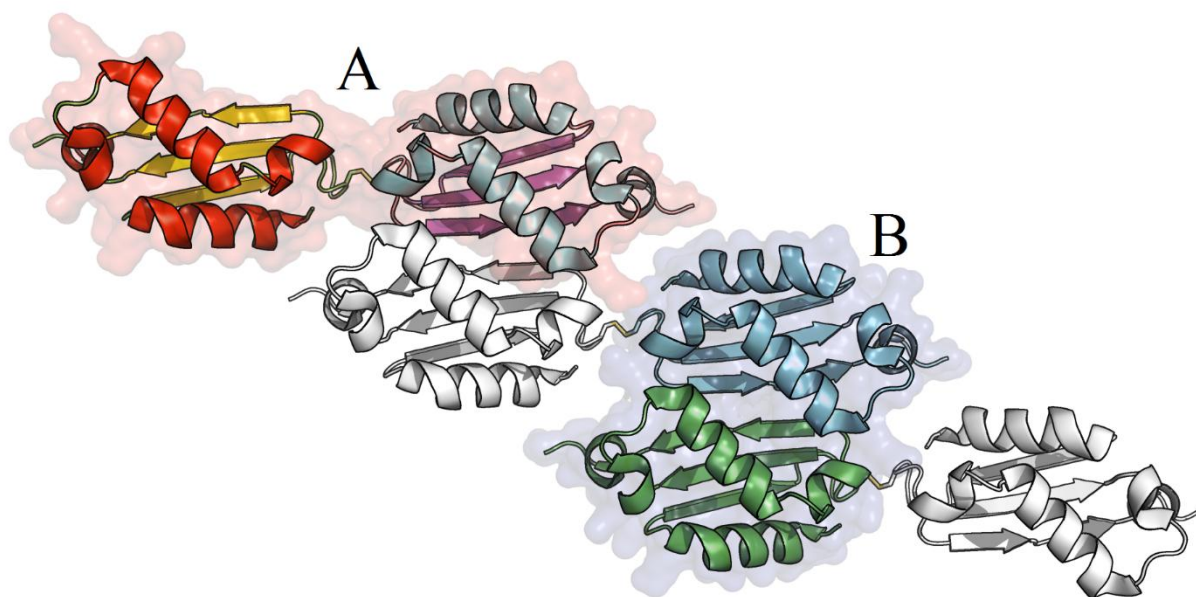


Figure n°34 Représentation de l'empilement cristallin de la protéine AtBolA2. Le dimère covalent (A) est entouré en rouge alors que le dimère compact (B) est entouré en bleu.

Dans certains cas il a été rapporté la formation d'un dimère non covalent impliquant les BolA_H (Shukla et al, 2012). Afin de tenter de vérifier si le dimère non covalent observé dans le cristal d'AtBolA2 peut avoir une réalité biologique une expérience de *docking* a été réalisée à l'aide du serveur ClusPro (<http://cluspro.bu.edu/login.php>). Le *docking* a été réalisé en utilisant toutes les structures de BolA résolues par cristallographie des rayons X (Tableau n°3). Dans chaque cas seule la première solution du *docking* est représentée. De façon intéressante tous les complexes proposés sont relativement similaires même si les scores (ou indices de confiance) ne sont pas très élevés. Ainsi dans tous les cas, il y formation d'un long feuillet de brins β avec un rapprochement des hélices $\alpha 3$ sensées participer à la reconnaissance de l'ADN. De plus les protéines ayant plusieurs motifs HTH ont le plus souvent une meilleure affinité pour les acides nucléiques que les protéines ne contenant qu'un seul motif HTH (Aravind et al, 2005; Valverde et al, 2008). Il est donc possible que la formation de se dimère non covalent, dans le cas des

BolA, corresponde à une forme biologiquement active qui pourrait être impliquée dans l'interaction avec des acides nucléiques.

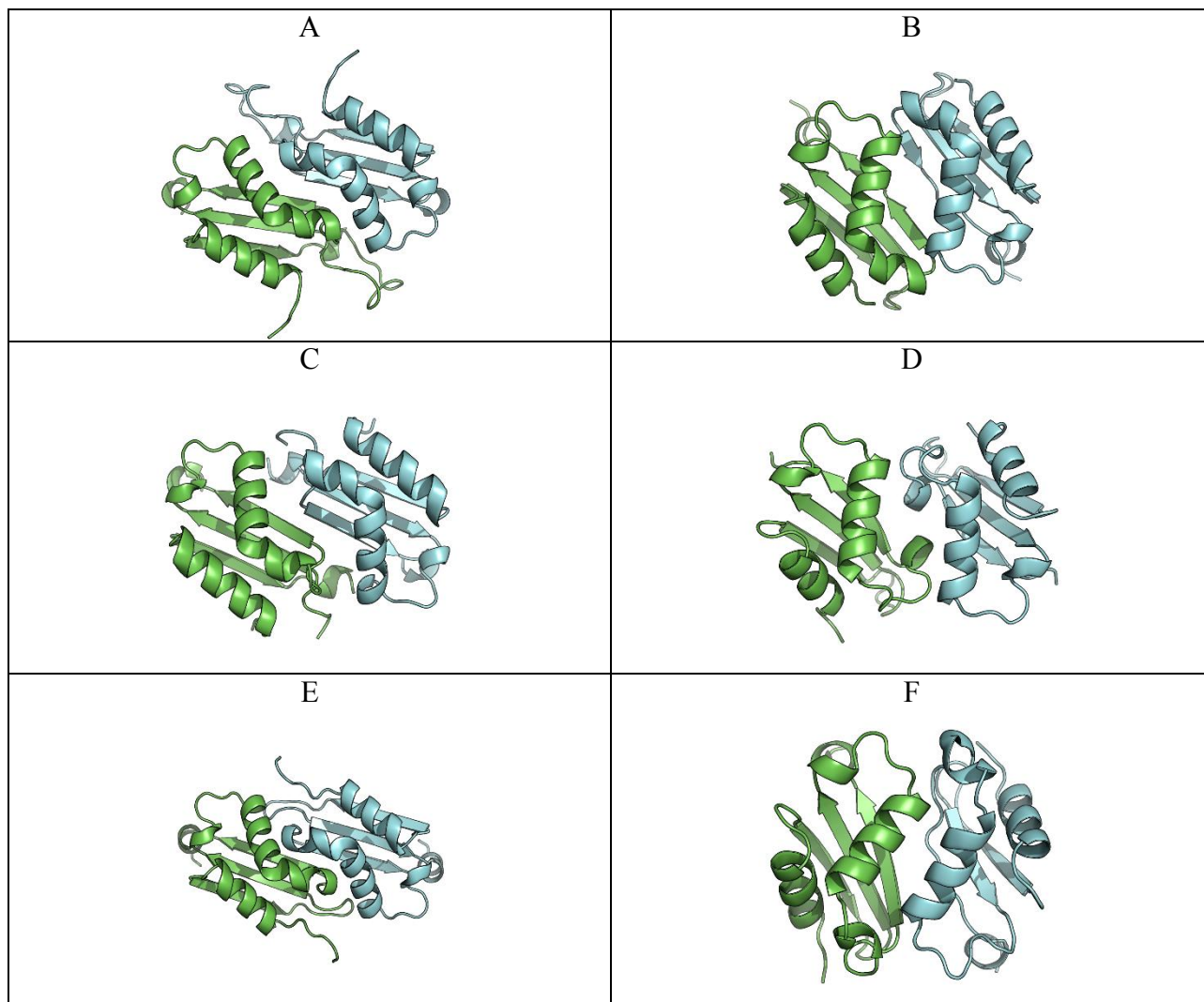


Tableau n°3 Représentation des dimères non covalents obtenus à partir du logiciel de docking ClusPro.

Uniquement la première solution est représentée dans chacun des cas suivants. A-AtBolA1 (score 149/1000). B-AtBolA2 (score 309/1000). C-^{SufE1} BolA (score 293/1000). D-YrbA de *Sinorhizobium meliloti* (score 417/1000). E-BolA de *Babesia bovis* (score 150/1000). F-BolA de *Coxiella burnetii* (score 218/1000). Le score représente la taille du groupe, c'est-à-dire le nombre de modèles similaires sur 1000 complexes issus du docking. Ce score est à titre indicatif et ne permet pas de juger de la qualité du docking mais plutôt de voir la probabilité que les deux monomères s'organisent d'une façon donnée.

I.C. Les protéines BolA et les métaux

I.C.1. Introduction

Au sein de nombreux processus biologiques, l'assimilation d'ions métalliques par les cellules est nécessaire à la fonction de certaines molécules comme l'hème qui contient un atome de fer ou la vitamine B12 qui contient un atome de cobalt (Banerjee & Ragsdale, 2003; Vinogradov et al, 1991). Cependant, une régulation fine au sein des cellules est indispensable car certains métaux libres sont relativement toxiques même à faible concentration (Hall, 2002; Valko et al, 2006). Lors d'une étude de métatranscriptomique des sols, il a été montré que les protéines BolA permettent d'augmenter la tolérance à certains métaux comme le cobalt, le cadmium, le zinc et le manganèse en interférant avec l'homéostasie du fer chez la levure (Lehembre et al, 2013). Les protéines BolA sont actuellement présentées comme des facteurs de transcription inductibles par un stress participant à la défense d'*E. coli* en modifiant la forme de ses cellules (Freire et al, 2006b; Santos et al, 1999). Au niveau de l'homéostasie du fer, il a été montré que les protéines de la famille BolA sont capables de lier directement des atomes de fer sous la forme d'un centre [2Fe-2S] au sein d'un holo-hétérodimère avec des glutarédoxines de classe II (Li et al, 2009a; Yeung et al, 2011). Cette capacité permet notamment de réguler la concentration intracellulaire en fer chez la levure *S. cerevisiae* par le biais du facteur de transcription Aft1 (Li et al, 2009a). La protéine Uvi31⁺ (BolA_H), présente chez *C. reinhardtii*, est également capable de lier directement des métaux. En effet, pour jouer pleinement son rôle d'endonucléase elle fixe deux atomes de magnésium (Singh et al, 2014b). De plus, la structure de la protéine BolA de *C. burnetii* (code pdb 3TR3) montre qu'elle a la capacité de fixer du cobalt provenant de la condition de cristallisation. Mis à part le fer et le magnésium il n'est pas montré que les protéines BolA sont en mesure de fixer directement d'autres métaux pour assurer une fonction biologique.

Au sein de la bactérie *Sinorhizobium meliloti*, qui peut former une relation symbiotique avec certaines plantes, il y a la présence de deux BolA_H nommés BolA et YrbA comme chez *E. coli*. YrbA d'*E. coli* (EcYrbA) confère une résistance aux cellules en cas de stress acide (Guinote et al, 2012). De plus tout comme les protéines BolA, EcYrbA possède la capacité à interagir avec des Grx de classe II (Grx4) au sein de la machinerie d'assemblage des centres Fe-S (Butland et al, 2008). De façon intéressante YrbA n'appartient pas aux groupes classiques des BolA (BolA1, BolA2, BolA3 et BolA4) (Kasai et al, 2004; Zhou et al, 2008). De plus, la structure tridimensionnelle d'EcYrbA, résolue par RMN et déposée dans la PDB, n'a pas été décrite dans la littérature (code pdb 1NY8). Sont présentées ci-dessous la structure cristallographique d'YrbA de *S. meliloti* (SmYrbA) ainsi que sa comparaison avec les autres structures de BolA.

I.C.2. Résultats et discussion

I.C.2.a. Cristallisation et affinement de la structure

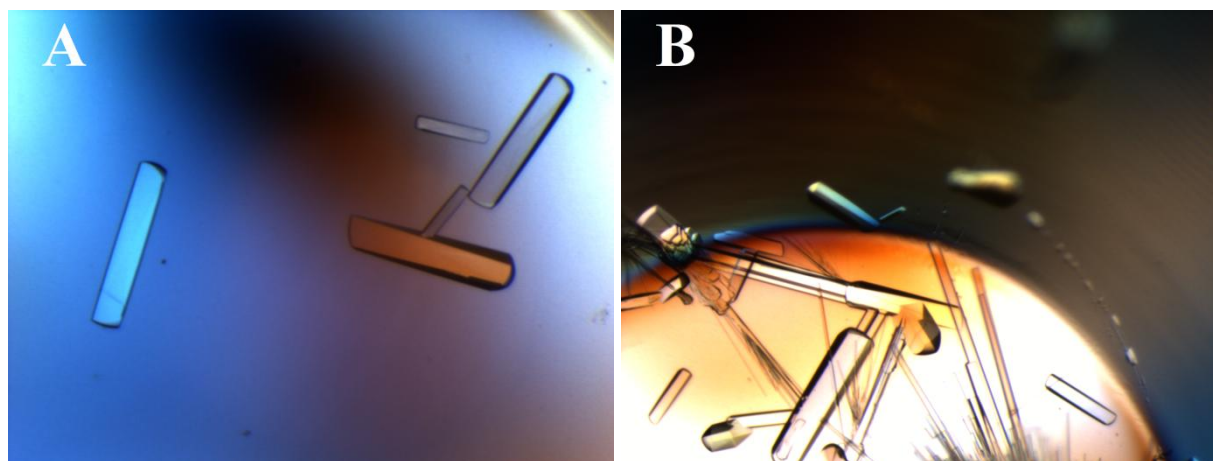


Figure n°35 Photographie des cristaux obtenus pour la protéine SmYrbA en complexe avec du nickel (A) et en complexe avec du cuivre (B).

Une version tronquée de la protéine SmYrbA (77 acides aminés) a été produite au sein du laboratoire IAM dans laquelle les deux premiers résidus méthionine et proline ont été clivés. De

façon très intéressante en observant les données statistiques provenant de l'expérience de cristallogénèse par la méthode de microbatch en goutte à l'huile à 4°C, la protéine nécessite la présence d'un ion métallique divalent pour être cristallisée. La solution stock de la protéine contient le tampon Tris-HCl à 30mM à pH 8,5. Ainsi dans un premier temps 2µL de la protéine à environ 38 mg.mL⁻¹ ont été mélangés avec 2µL d'une condition de cristallisation contenant 1M de sulfate de lithium, 0,1M de tampon TRIS-HCl à pH 8,5 et 0,01M de chlorure de nickel (Figure n°35A). Puis dans un second temps différents métaux ont été testés avec une condition de cristallisation similaire où le sel de nickel a été remplacé par d'autres sels de métaux (cobalt, fer, palladium, argent, zinc, cuivre, magnésium et manganèse). Des cristaux en présence de sels de cuivre et de cobalt ont été obtenus. Cependant seuls les cristaux en présence de nickel et cuivre ont été analysés en diffraction. Les cristaux en présence de cuivre ont été obtenus en mélangeant 1µL de la solution de protéine concentrée à 19 mg.mL⁻¹ avec une condition de cristallisation contenant 0,7M de sulfate de lithium, 0,1M de tampon TRIS-HCl à pH 8,5 et 0,02M d'acétate de cuivre (Figure n°35B). Les cristaux « SmYrbA-Ni » ont été mesurés sur la ligne FIP-BM30A de l'ESRF alors ceux de « SmYrbA-Cu » ont été mesurés sur le diffractomètre SuperNova (Agilent) de notre laboratoire avec une source au cuivre. Dans tous les cas les mesures ont été effectuées à 100K et les cristaux ont été protégés par trempage rapide dans une solution contenant le mélange de la condition de cristallisation et 20% (v/v) de glycérol.

Les cristaux du couple SmYrbA-Ni diffractant très bien, nous avons été limités à une résolution finale de 0,98Å par la distance cristal-détecteur. Pensant que la protéine SmYrbA était capable de fixer le nickel, le cristal a ensuite été mesuré au seuil d'absorption de l'atome de nickel ($Z = 28$) pour essayer de résoudre la structure par la méthode SAD (Single-wavelength

Anomalous Diffraction) ou par la méthode MAD (Multiple-wavelength Anomalous Diffraction) (Tableau n°4 et Figure n°36).

	Pic	Inflexion	Eloigné	SmYrbA-Ni
Ligne synchrotron		FIP-BM30A		
Groupe d'espace		$P2_12_12_1$		
Paramètre de maille (Å)		30,89 x 31,92 x 62,83		
Longueur d'onde (Å)	1,485952	1,486573	1,482608	0,979993
Résolution (Å)	31,86-1,50	31,88-1,50	31,89-1,50	31,92-0,98
	(1,58-1,50)	(1,58-1,50)	(1,58-1,50)	(1,03-0,98)
Complétude (%)	95,4 (74,9)	95,3 (74,1)	95,7 (76,2)	97,2 (81,3)
R_{merge}	0,066 (0,223)	0,051 (0,248)	0,047 (0,322)	0,074 (0,359)
R_{meas}	0,072 (0,268)	0,055 (0,300)	0,052 (0,386)	0,077 (0,433)
R_{pim}	0,028 (0,142)	0,022 (0,161)	0,020 (0,204)	0,023 (0,236)
I/ σ (I) moyen	16,6 (4,6)	20,9 (4,7)	21,3 (3,9)	22,5 (3,2)
Réflexions uniques	9931 (1106)	9961 (1102)	10014 (1125)	35397 (4201)
Redondance moyenne	6,1 (3,5)	6,1 (3,4)	6,2 (3,5)	9,3 (3,1)
Complétude anormale (%)	94,1 (68,3)	94,1 (68,1)	94,5 (69,8)	94,0 (62,2)
Multiplicité anormale moyenne	3,3 (1,8)	3,3 (1,7)	3,3 (1,8)	4,9 (1,7)

Tableau n°4 Tableau récapitulatif des statistiques pour la protéine SmYrbA cristallisée avec du nickel (SmYrbA-Ni). Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

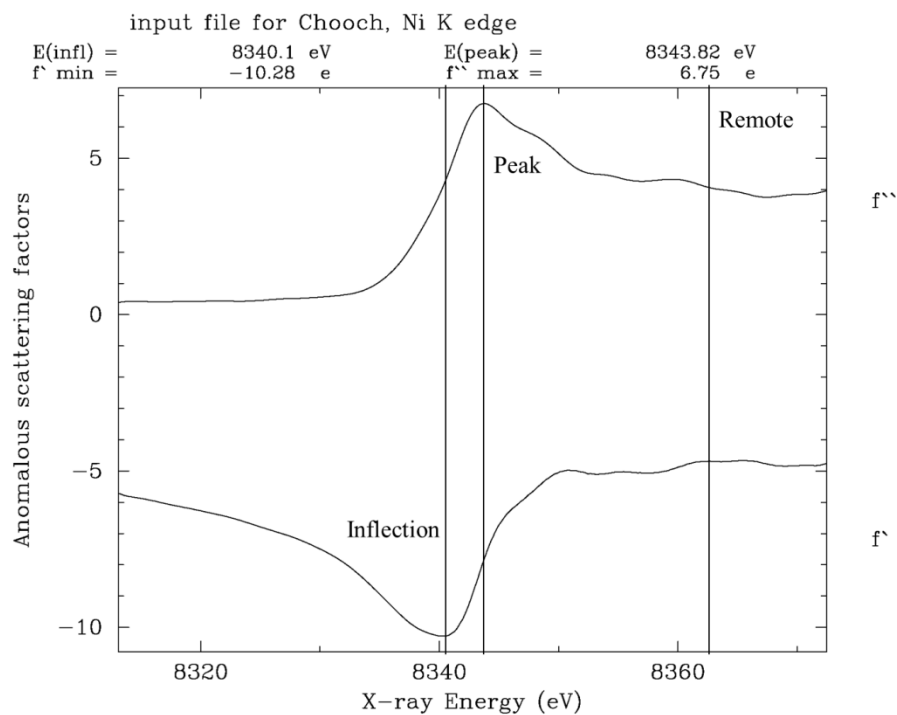
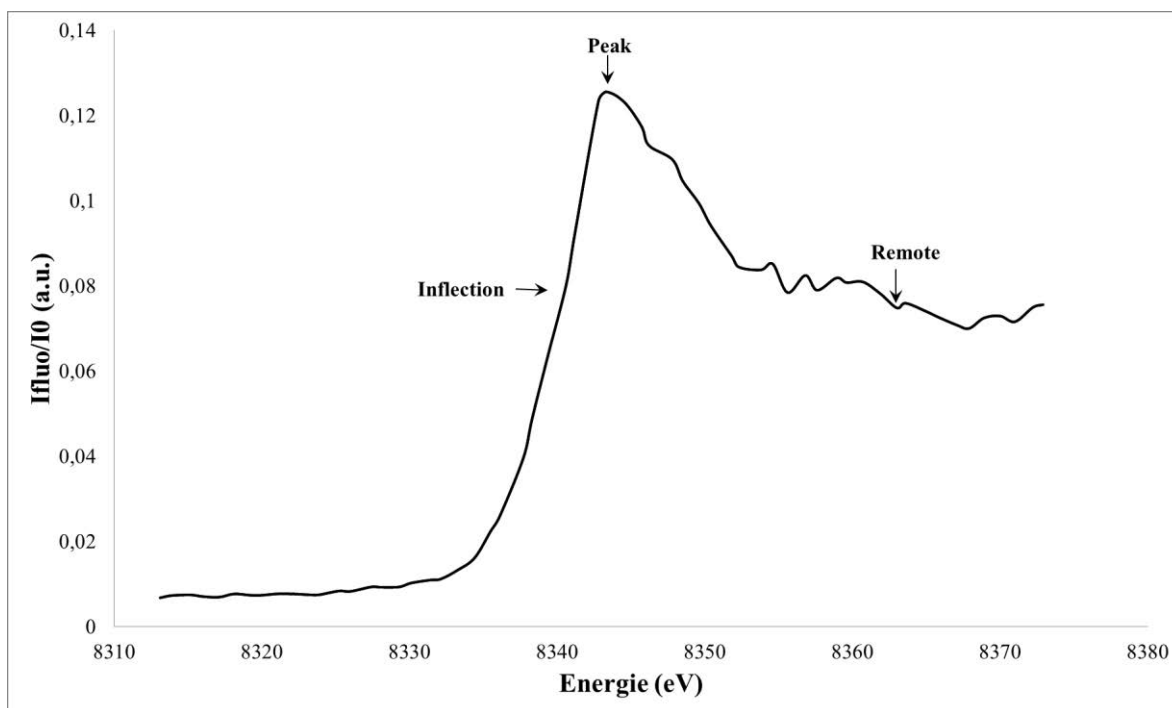


Figure n°36 Est représenté en haut le spectre d'absorption enregistré en mode fluorescence sur la ligne BM30A à l'ESRF sur un cristal de SmYrbA cristallisé avec un sel de chlorure de nickel. Sont représentés en bas les facteurs de diffusions anomaux f' et f'' du nickel en fonction de l'énergie du rayonnement incident obtenu à partir du spectre à l'aide du programme CHOOCH (Evans & Pettifer, 2001).

La structure de la protéine SmYrbA cristallisée avec du cuivre (SmYrbA-Cu) a été résolue par remplacement moléculaire à partir de la structure SmYrbA-Ni à une résolution maximale de 1,5Å (Tableau n°5).

	SmYrbA-Cu
Groupe d'espace	$P2_12_12_1$
Paramètre de maille (Å)	30,73 x 32,06 x 62,58
Longueur d'onde (Å)	1,5406
Résolution (Å)	15,53-1,50 (1,58-1,50)
Complétude (%)	99,0 (94,0)
R_{merge}	0,175 (0,784)
R_{meas}	0,180 (0,879)
R_{pim}	0,041 (0,380)
I/σ(I) moyen	13,3 (1,4)
Réflexions unique	10339 (1389)
Redondance moyenne	16,3 (4,9)

Tableau n°5 Tableau récapitulatif des statistiques pour la protéine SmYrbA cristallisée avec du cuivre (SmYrbA-Cu). Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent à la couronne de plus haute résolution.

Pour SmYrbA-Ni les données de diffraction ont été intégrées à l'aide du logiciel XDS (Kabsch, 2010) et la mise à l'échelle et la réduction des données ont été effectuées à l'aide du programme SCALA (Evans, 2005). Ce programme est disponible au sein de la suite de programmes CCP4 (Winn et al, 2011). Le phasage par la méthode SAD ou MAD de SmYrbA-Ni a alors été réalisé automatiquement en utilisant successivement les procédures AutoSol et AutoBuild (Tableau n°6) de la suite de programmes PHENIX (Terwilliger et al, 2009; Terwilliger et al, 2008). Le modèle le plus complet a été obtenu à partir des données MAD.

L'intégration et la mise à l'échelle des données de diffraction de SmYrbA-Cu ont été réalisées à l'aide du logiciel CrysAlisPro (Agilent). Le phasage par remplacement moléculaire a été effectué en utilisant Molrep (Vagin & Teplyakov, 2009) à partir de la structure de SmYrbA-Ni. Les deux structures (SmYrbA-Ni et SmYrbA-Cu) ont ensuite été affinées automatiquement

par la biais du module phenix.refine de PHENIX (Adams et al, 2010) avec des inspections et des corrections manuelles en utilisant le logiciel graphique Coot (Emsley et al, 2010) (Tableau n°7).

	SAD	MAD
AutoSol		
Nombre de site atome lourds	3	1
Bayesian CC	46,02	55,90
FOM (%)	54,4	73,0
R_{work}	20,39	34,23
R_{free}	19,72	39,54
Corrélation modèle-carte	0,80	0,62
Résidus modélisés	65	47
Chaines latérales	65	40
AutoBuild		
R_{work}	19,38	21,21
R_{free}	19,36	24,07
Corrélation modèle-carte	0,74	0,76
Résidus modélisés	67	71
Chaines latérales	67	71
Molécules d'eau	118	79

Tableau n°6 Tableau regroupant les statistiques pour le phasage automatique SAD et MAD et la construction automatique du modèle de SmYrbA-Ni par le biais de PHENIX.

	SmYrbA-Ni	SmYrbA-Cu
Affinement		
Résolution (Å)	31,92-0,98	15,53-1,50
$R_{\text{free}}/R_{\text{work}}$	12,23/10,97	17,02/13,26
Nombre total d'atomes	1362	1240
Nombre de molécules d'eau	112	135
Facteur B moyen	8,43	10,15
Ramachandran favorable	98,75%	98,63%
Ramachandran défavorable	0,00%	0,00%
R.m.s déviations		
Liaisons	0,009	0,004
Angles	1,372	0,857
MolProbity analyse		
Clashscore, tous atomes	2,40 (95%)	1,81 (99%)
MolProbity score	1,02 (97%)	0,94 (100%)

Tableau n°7 Tableau regroupant les statistiques issues de l'affinement des structures de SmYrbA cristallisée avec du nickel et du cuivre.

I.C.2.b. Description de la structure

SmYrbA-Ni et SmYrbA-Cu cristallisent dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$ avec une molécule dans l'unité asymétrique. Le taux de solvant de 37% est relativement faible et l'analyse de l'empilement des molécules au sein du cristal ne révèle des canaux de solvant que suivant la direction cristallographique [010]. Ces deux propriétés pourraient expliquer le haut pouvoir diffractant des cristaux. Les affinements cristallographiques révèlent sans ambiguïté que la protéine SmYrbA a la capacité d'incorporer un atome de nickel ou un atome de cuivre par monomère. SmYrbA apporte deux ligands : l'histidine invariante de la famille des BolA (ici H67) et l'histidine conservée uniquement dans la sous-famille des BolA_H (ici H32). Les autres ligands sont quatre molécules d'eau. Les six ligands confèrent ainsi une géométrie octaédrique dans la coordination de l'atome de métal. La structure de la protéine SmYrbA possède un repliement α/β du type $\alpha 1\beta 1\beta 2\eta 2\alpha 3\alpha 3'\beta 3$ (η est une hélice 3_{10}) similaire à celui observé pour les autres BolA mais présente néanmoins des particularités notables (Figure n°37).

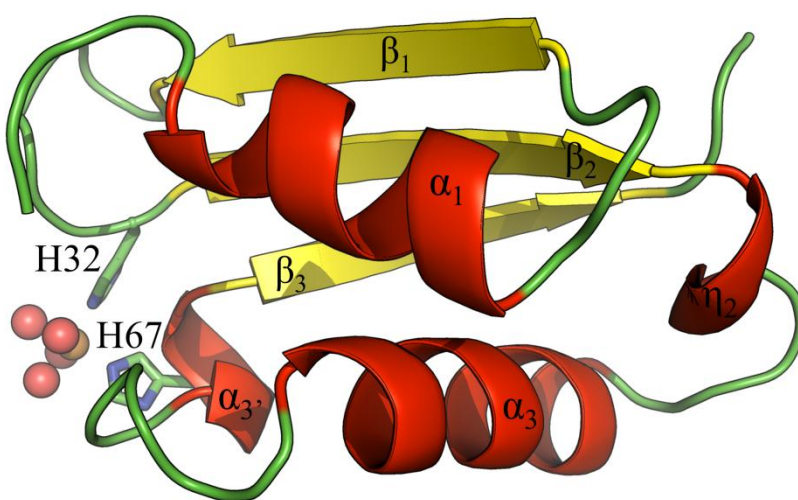


Figure n°37 Représentation en mode ruban et flèche de la structure de la protéine YrbA de *S. meliloti* à 1,50Å de résolution. Les deux histidines impliquées dans la coordination du métal sont représentées en bâton, l'atome de cuivre et les molécules d'eau sont représentées par des sphères.

(1) La boucle [H/C] comprise entre $\beta 1$ et $\beta 2$ est plus courte que dans la plupart des autres BOLA_H, pour mémoire cette boucle est systématiquement courte dans les BOLA_C (Figure n°38).

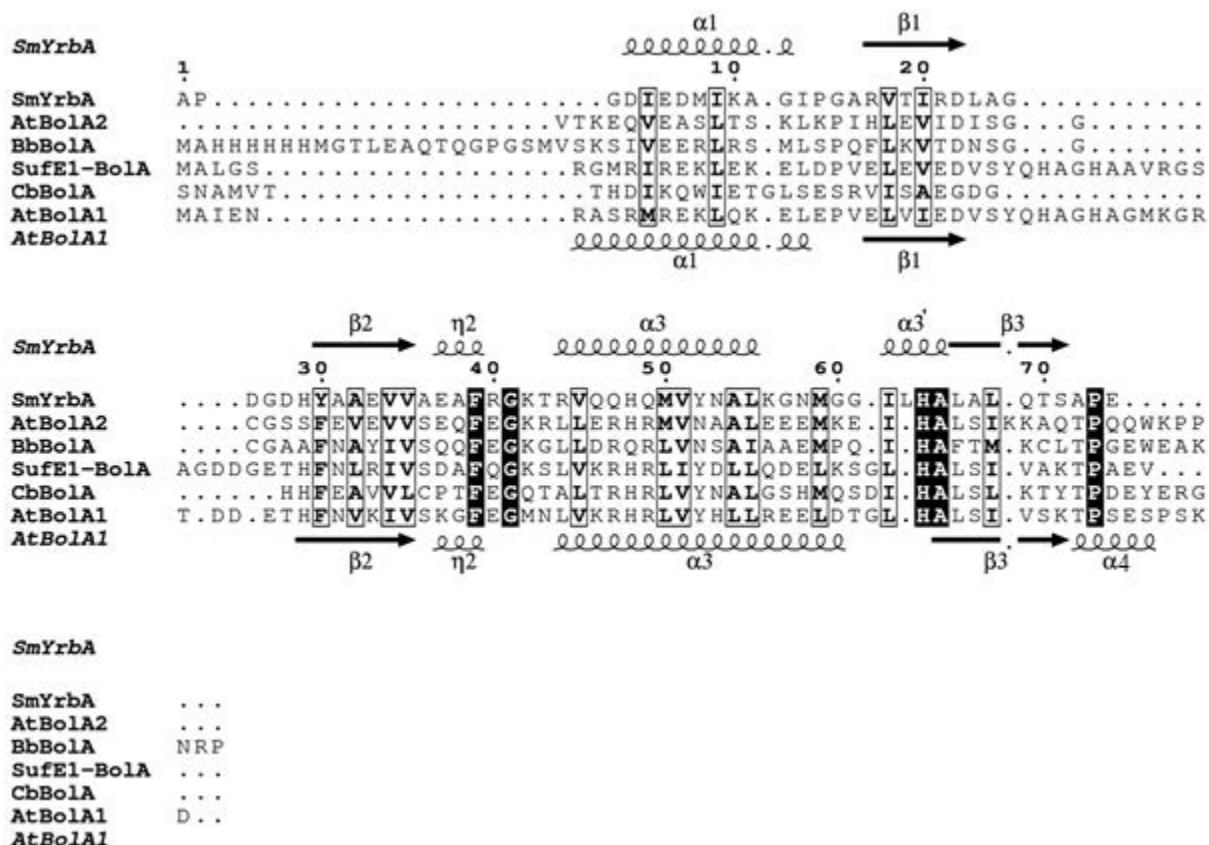


Figure n°38 Alignement structural des protéines BOLA résolues par cristallographie des rayons X.

L'alignement structural a été réalisé à partir du logiciel STRAP (Gille & Frömmel, 2001) puis les données ont été importées dans le logiciel ESPript (Gouet et al, 1999). Les résidus conservés sont encadrés et les résidus invariants sont présentés dans des boîtes noires. AtBOLA2 et BbBOLA sont des BOLA_C alors que SmYrbA, ^{SufE1}BOLA, CbBOLA et AtBOLA1 sont des BOLA_H. AtBOLA1, AtBOLA2 et ^{SufE1}BOLA sont des BOLA d'*A. thaliana*, BbBOLA est une BOLA de *B. bovis* et CbBOLA est une BOLA de *C. burnetii*.

(2) SmYrbA ne possède pas d'extension C-terminale après le brin $\beta 3$. L'analyse des séquences de BOLA disponibles dans les banques de données (voir article Structural and spectroscopic insights into BOLA-glutaredoxin complexes dans la partie I.A.3.) avait permis de remarquer que dans la majorité des cas, l'absence de cette extension pouvait être corrélée avec la

nature du premier résidu du motif [R/Q][H/Q][R/Q] situé au niveau de l'hélice $\alpha 3$ (Figure n°38). Au sein des BolA, en cas de présence d'une arginine il y a la présence d'une extension C-terminale qui se replie sous la forme d'une hélice $\alpha 4$. Cette arginine fait notamment de nombreuses interactions avec le reste de la protéine et participe à la stabilisation de l'hélice $\alpha 4$ par le biais d'une liaison hydrogène avec un acide glutamique présent dans un motif du type TPxE situé juste après le brin $\beta 3$. Dans SmYrbA cet acide glutamique n'est pas présent et le premier résidu du motif [R/Q][H/Q][R/Q] est une glutamine, dont la chaîne latérale se superpose avec celle de l'arginine présente habituellement dans les BolA possédant une hélice $\alpha 4$. L'atome N ϵ de l'arginine ou N $\epsilon 2$ de la glutamine sont importants car ils réalisent des interactions avec les C=O de la phénylalanine invariante et du résidu i+3 du β -turn de type II de signature FxGx et situé entre les hélices $\eta 2$ et $\alpha 3$ (Figure n°38).

(3) Une autre observation importante est la formation de l'hélice $\alpha 3'$ contenant les résidus ILHA (conservation de 4,4%, 88,9%, 100% et 90,6%, calcul fait sur la base d'un alignement d'environ 2500 séquences de BolA, voir article Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes dans la partie I.A.3.) dont l'histidine invariante H67 qui participe à la coordination du cuivre et du nickel. Habituellement cette histidine invariante se situe dans une boucle au niveau N-terminal du brin $\beta 3$ et non dans une hélice (Figure n°39). Une analyse des structures non redondantes (identité de séquence inférieure à 30%) au sein de la PDB révèle que les résidus coordonnant le cuivre (139 structures) et le nickel (304 structures) se trouvent majoritairement dans des boucles (40,0%) et non pas dans des hélices (30,5%). Le fait que des résidus hautement conservés puissent adopter un arrangement spatial aussi différent pourrait suggérer une fonction biologique propre à YrbA. Cette position singulière peut être favorisée par la présence d'un motif unique G₆₃G₆₄ qui permet la création d'un β -turn de type II entre le résidu

M62 et le résidu I65 du motif ILHA de l'hélice $\alpha 3'$. Il est donc possible que cette hélice observée pour la première fois dans une Bola soit naturellement présente au sein de SmYrbA et que l'ajout d'un métal (Figure n°40) pour cristalliser la protéine ne fasse que stabiliser et favoriser une position atypique de l'histidine invariante. Le motif $G_{63}G_{64}$ n'est pas présent dans la structure primaire d'EcYrbA et sa structure tridimensionnelle ne possède pas l'hélice $\alpha 3'$ additionnelle.

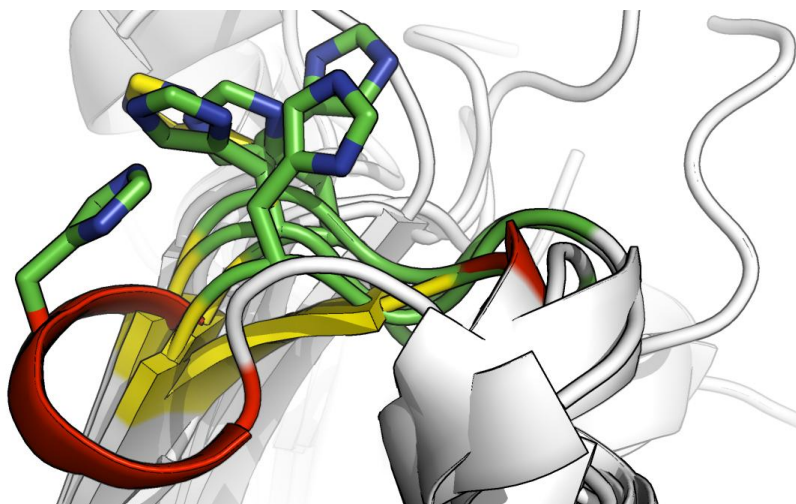


Figure n°39 Superposition des différentes structures en mode ruban et flèche de Bola résolues par cristallographie des rayons X. L'histidine invariante des Bola est représentée en bâtons. Les structures superposées sont celles des protéines Bola1, Bola2 et ^{SufE1}Bola d'*A. thaliana*, Bola de *B. bovis*, Bola de *C. burnetii* et enfin de la protéine YrbA de *S. meliloti*. Seule pour la structure de SmYrbA il y a la présence d'une hélice α au niveau de l'histidine invariante.

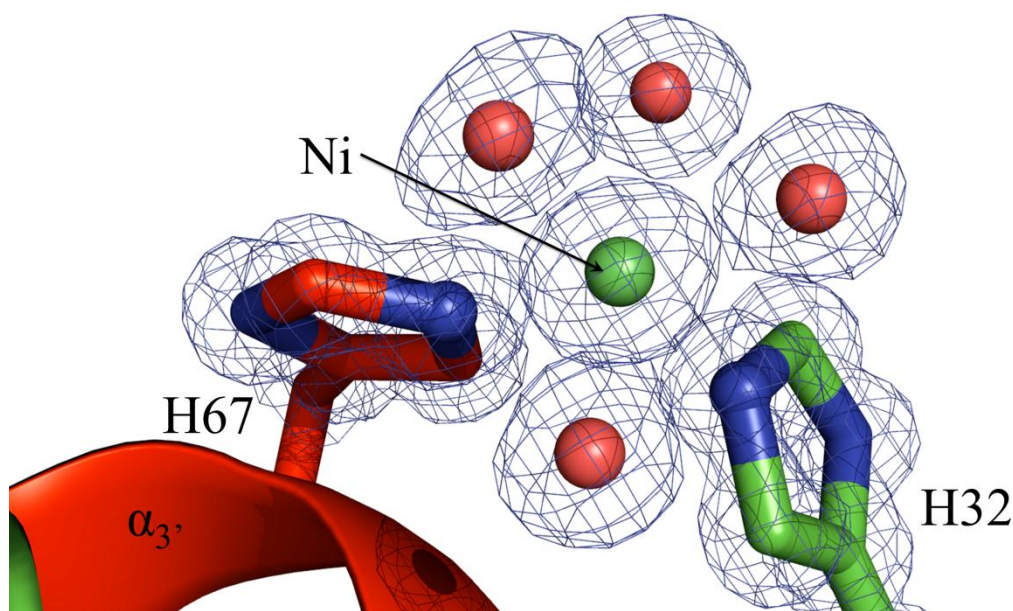


Figure n°40 Site de fixation du nickel coordonné par l'histidine invariante H67 et l'histidine conservée H32 de la boucle [H/C]. 4 molécules d'eau sont également impliquées dans la coordination de l'ion métallique dans une géométrie octaédrique. La densité électronique est représentée pour les résidus impliqués dans la coordination du nickel par une carte $\sigma A\ 2mFo-DFc$ avec un contour de $1,2\sigma$.

I.C.2.c. Les BolA et les métaux

Que ce soit pour la structure SmYrbA-Cu ou SmYrbA-Ni, l'atome de métal se trouve dans une coordination octaédrique avec les deux histidines conservées et 4 molécules d'eau comme ligands. Dans la structure SmYrbA-Ni, l'atome de nickel est quasi-équidistant de ses ligands avec une distance métal-ligand d'environ $2,1\text{\AA}$. En comparant la position des six atomes coordonnant le nickel avec ceux coordonnant le cuivre (Tableau n°8 et Figure n°41) on remarque une différence au niveau des molécules d'eau 3 et 4 qui sont plus éloignées de $0,3\text{\AA}$ dans la structure SmYrbA-Cu. Cette différence est due à l'effet Jahn-Teller du cuivre (II) hexacoordiné (Veidis et al, 1969). Ce type de complexe va subir une distorsion en dehors du plan formé ici par les deux histidines et les molécules d'eau 5 et 6 ce qui engendre une elongation de la distance apicale métal-ligand. Ce type de géométrie octaédrique impliquant deux histidines et quatre molécules

d'eau dans la coordination d'un métal a déjà été observé au sein de 11 structures. Cependant aucune fonction biologique n'a été associée à ce type de coordination (Addy et al, 2007; Weeratunga et al, 2010) et aucune information entre SmYrbA et les atomes de cuivre et de nickel n'est connue à ce jour.

	①	②	③	④	⑤	⑥
Nickel	Histidine [H/C] 2,07Å	Histidine invariante 2,07Å	H₂O 2,09Å	H₂O 2,10Å	H₂O 2,10Å	H₂O 2,12Å
Cuivre	Histidine [H/C] 2,02Å	Histidine invariante 2,05Å	H₂O 2,47Å	H₂O 2,39Å	H₂O 2,13Å	H₂O 2,10Å

Tableau n°8 Tableau récapitulatif de la coordination du nickel et du cuivre par SmYrbA.

Une géométrie avec six ligands peut être observée au sein de la structure de la BolA de *C. burnetii* (Figure n°41) cristallisée en présence d'un sel de cobalt. Dans ce cas précis il y a l'intervention d'une molécule symétrique ce qui donne une coordination finale de l'atome de cobalt par trois histidines et trois molécules d'eau. Au sein de nombreux processus biologiques il arrive que du Co^{2+} remplace du Fe^{2+} , on retrouve même certains hèmes avec un atome de cobalt à la place du fer. De plus, une grande quantité de cobalt dans les cellules de levure induit la surexpression du gène codant pour BolA (Lehembre et al, 2013). Il semble également que sa voie de régulation, ainsi que celle du cuivre, soit très similaire à celle du fer chez la levure (Alkim et al, 2013; Li & Outten, 2012; Li & Kaplan, 2004).

Dans le cas du fer, les protéines BolA_H peuvent coordonner un centre [2Fe-2S] en complexe avec des glutarédoxines de classe II (Figure n°41). Dans cette coordination l'atome de fer est coordonné par les deux histidines et par deux soufres inorganiques provenant du centre Fe-S (voir article Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes dans la partie I.A.3.). Un complexe similaire entre une BolA_C (Fra2) et les Grx3/4 ainsi formé permet

notamment la translocation du facteur de transcription Aft1 pour la régulation de l'homéostasie du fer dans les cellules de levure (Li et al, 2011a).

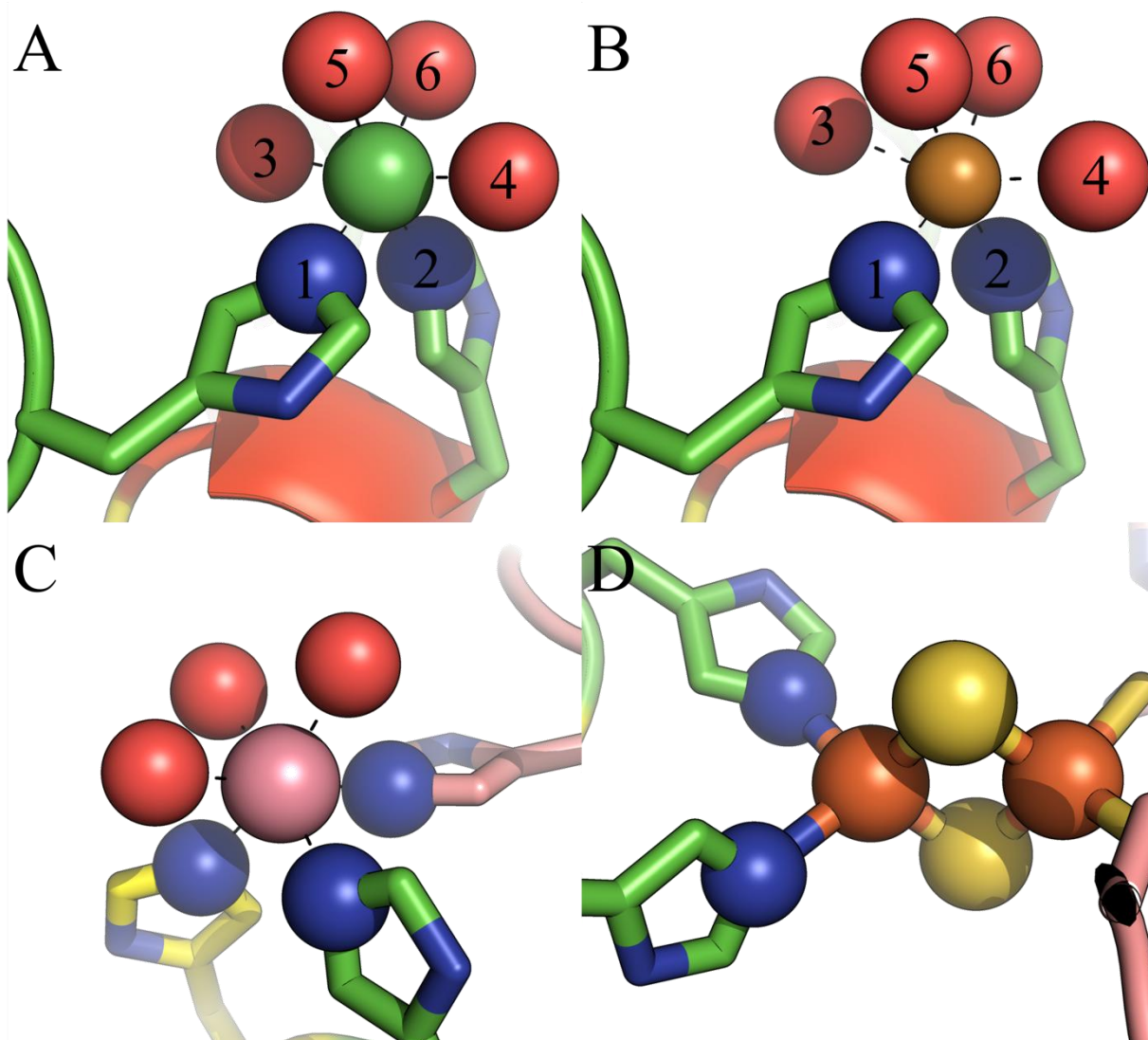


Figure n°41 Représentation des différents couples BolA-métal connus à ce jour. (A) YrbA de *S. meliloti* en complexe avec un atome de nickel à une résolution de 0,98 Å. (B) YrbA de *S. meliloti* en complexe avec un atome de cuivre à une résolution de 1,5 Å. (C) Bola de *C. burnetii* à 2,5 Å de résolution en complexe avec un atome de cobalt nécessitant l'intervention d'une histidine d'une molécule symétrique au sein de l'unité asymétrique du cristal. (D) Complexe holo-hétérodimérique GrxS14-BolA1 d'*A. thaliana* autour d'un centre [2Fe-2S].

Récemment, il a été montré par RMN, qu'Uvi31⁺ (BolA_H) de *C. reinhardtii* peut exister sous une forme monomérique et dimérique et qu'elle a besoin de deux atomes de magnésium par monomère pour exercer son activité endonucléase (Shukla et al, 2012; Singh et al, 2014b). Parmi les différents résidus ayant une variation de déplacement chimique significative sur le spectre ¹H, ¹⁵N HSQC lors de l'ajout de magnésium, on retrouve les deux histidines conservées des BolA_H ainsi que trois autres histidines au niveau de la boucle [H/C] (Singh et al, 2014b). Toutefois, une analyse des structures de protéines coordonnant des métaux permet de s'apercevoir que les ligands préférentiels des atomes de magnésium ne sont pas des histidines (Tableau n°9). Par ailleurs, de nombreuses endonucléases connues fonctionnent effectivement avec du magnésium mais coordonné majoritairement par des acides aspartiques (Pingoud & Jeltsch, 2001). Il est aussi intéressant de noter que pour les atomes de cobalt, de cuivre, de fer et de nickel, les histidines sont dans tous ces cas les ligands majoritaires (Tableau n°9).

	Cobalt	Cuivre	Fer	Nickel	Magnésium
Acide aspartique	23,3	5,3	21,4	14,5	28,6
Acide glutamique	19,9	8,4	19,5	13,0	18,0
Asparagine	0,3	0,9	1,6	1,4	8,7
Cystéine	4,8	20,6	5,8	7,3	0,7
Histidine	39,6	42,3	41,5	47,7	5,5
Méthionine	1,6	11,3	0,2	1,9	0,8
Sérine	2,7	1,5	0,2	2,7	7,6
Thréonine	0,7	0,7	0,2	0,6	9,6
Tyrosine	1,6	2,9	6,2	0,4	1,6

Tableau n°9 Tableau montrant le site de fixation des principaux métaux que les BolA peuvent coordonner d'après les structures cristallographiques. Ces statistiques (en %) ont été obtenues par le biais du server PDBe (Motifs and Sites). A titre d'exemple, 28,6% des atomes de magnésium sont coordonnés par un acide aspartique.

En conclusion, il semble que les protéines BolA ont la capacité de pouvoir fixer de nombreux métaux par le biais de deux histidines qui sont notamment impliquées dans la coordination d'un

centre [2Fe-2S] avec les glutarédoxines de classe II. Cette capacité pourrait par exemple jouer un rôle *in vivo* dans la détoxification des métaux lourds.

II. Chapitre n°2 : partenaires biologiques de BolA, les Grx

II.A. Implication dans l'homéostasie du fer

II.A.1. Introduction

Les glutarédoxines (Grx) sont des oxydoréductases habituellement impliquées dans la réduction des protéines glutathionylées mais elles sont également impliquées dans l'homéostasie du fer. La plupart des Grx lient des centres [2Fe-2S] de façon identique en collaboration avec du glutathion. Cependant, des différences subtiles dans l'arrangement structural permettent d'expliquer pourquoi les Grx de classe II peuvent accepter des centres Fe-S et les transférer à des protéines acceptrices, alors que les Grx de classe I ne le font généralement pas. La vue actuelle est que les centres Fe-S plus stables au sein des Grx de classe I pourraient constituer un senseur du stress oxydatif. En effet, en réponse à un signal d'oxydation, les holodimères sans activité de disulfure réductase, doivent être convertis en une forme monomérique active. Une fonction supposée pour les Grx de classe II serait de participer à la réparation des centres Fe-S dans les voies de signalisation. Les Grx de classe II seules régulent notamment l'homéostasie du fer chez la levure en modulant l'activité de facteurs de transcription et éventuellement par la formation d'hétéro-complexes avec des protéines analogues à BolA. A travers la revue (partie II.A.2.) un état de l'art des propriétés biochimiques et structurales des Grx incorporant des centres Fe-S est exposé par rapport à leurs fonctions associées, qu'elles soient établies ou putatives. Ma contribution majeure dans cette revue est limitée à la présentation des données structurales.

II.A.2. Revue

- *The roles of glutaredoxins integrating Fe-S clusters: sensing, transfer or repair functions.*

ARTICLE IN PRESS

BBAMCR-17363; No. of pages: 15; 4C: 4, 6, 7, 8

Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr


Review

The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?

Jérémy Couturier^{a,b}, Jonathan Przybyla-Toscano^{a,b}, Thomas Roret^{c,d}, Claude Didierjean^{c,d}, Nicolas Rouhier^{a,b,*}
^a Université de Lorraine, UMR 1136 Interactions Arbres Microorganismes, F-54500 Vand uvre-l s-Nancy, France

^b INRA, UMR 1136 Interactions Arbres Microorganismes, F-54280 Champenoux, France

^c Université de Lorraine, UMR 7036 CRM2, BioMod group, 54506 Vand uvre-l s-Nancy, France

^d CNRS, UMR 7036 CRM2, BioMod group, 54506 Vand uvre-l s-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2014

Received in revised form 17 September 2014

Accepted 18 September 2014

Available online xxxx

Keywords:

Glutaredoxins

Iron–sulfur center

Reductases

Iron sensing

ABSTRACT

Glutaredoxins (Grxs) are major oxidoreductases involved in the reduction of glutathionylated proteins. Owing to the capacity of several class I Grxs and likely all class II Grxs to incorporate iron–sulfur (Fe–S) clusters, they are also linked to iron metabolism. Most Grxs bind [2Fe–2S] clusters which are oxidatively- and reductively-labile and have identical ligation, involving notably external glutathione. However, subtle differences in the structural organization explain that class II Fe–S Grxs, having more labile and solvent-exposed clusters, can accept Fe–S clusters and transfer them to client proteins, whereas class I Fe–S Grxs usually do not. From the observed glutathione disulfide-mediated Fe–S cluster degradation, the current view is that the more stable Fe–S clusters found in class I Fe–S Grxs might constitute a sensor of oxidative stress conditions by modulating their activity. Indeed, in response to an oxidative signal, inactive holoforms i.e., without disulfide reductase activity, should be converted to active apoforms. Among class II Fe–S Grxs, monodomain Grxs likely serve as carrier proteins for the delivery of preassembled Fe–S clusters to acceptor proteins in organelles. Another proposed function is the repair of Fe–S clusters. From their cytoplasmic and/or nuclear localization, multidomain Grxs function in signalling pathways. In particular, they regulate iron homeostasis in yeast species by modulating the activity of transcription factors and eventually forming heterocomplexes with BolA-like proteins in response to the cellular iron status. We provide an overview of the biochemical and structural properties of Fe–S cluster-loaded Grxs in relation to their hypothetical or confirmed associated functions. This article is part of a Special Issue entitled: Fe/S proteins: Analysis, structure, function, biogenesis and diseases.

  2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glutaredoxins (Grxs) represent a widespread family of thiol oxidoreductases controlling notably the cellular redox state of a myriad of proteins together with thioredoxins (Trxs). However, for a specific subset of Grxs that bind iron–sulfur clusters, the disulfide reductase activity might have been lost during evolution or became secondary/unnecessary. Both Grxs and Trxs were first identified in the bacterium *Escherichia coli* as electron donors for the ribonucleotide reductase (RNR) [1,2]. However, their reduction system is different. Trxs are usually dependent on NADPH- or ferredoxin-Trx reductases whereas Grxs are dependent on glutathione and its associated NADPH-dependent glutathione reductase. A few studies highlighted that some Grxs can be recycled by Trx reductases [3–5] and some Trxs by GSH and/or Grx [6–8]. From this initial

discovery that both systems may have somehow redundant functions, Grxs and Trxs have been extensively studied in both prokaryotes and eukaryotes to understand the differences when existing. Both proteins share a similar 3D structure, but the current view, which suffers of course some exceptions, is that, owing to their capacities to interact and recognize glutathione, Grxs are more particularly involved in the reduction of glutathionylated proteins, whereas Trxs are rather implicated in the reduction of disulfide bonds involving two protein cysteinyl residues. Indeed, glutathionylation is a post-translational modification which corresponds to the formation of specific disulfide bond between the cysteine of glutathione and a single protein cysteinyl residue. This modification occurs as an intermediate of some catalytic mechanisms, especially in enzymes using a sulfenic acid chemistry, but it is also viewed as a regulatory mechanism modulating protein function for signaling purposes or as a protective mechanism of cysteine residues from irreversible oxidation [9–11].

In principle, the reduction of glutathionylated proteins requires a single catalytic cysteine residue, but many Grxs have a dithiol CxxC active site motif. It served initially as a basis to distinguish dithiol (CPY/FC motif) and monothiol (CGFS motif) Grxs [12]. However, from

^{*} This article is part of a Special Issue entitled: Fe/S proteins: Analysis, structure, function, biogenesis and diseases.

^{*} Corresponding author at: Université de Lorraine, UMR 1136 Interactions Arbres Microorganismes, F-54500 Vand uvre-l s-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 42 25.

E-mail address: Nicolas.Rouhier@univ-lorraine.fr (N. Rouhier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>
0167-4889/  2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

2

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

deeper comparative genomics and phylogenetic analyses, the classification was later refined especially for photosynthetic organisms, as an important variability in the active site sequences exists and for instance many Grxs with monothiol active sites (CSYS or CPYS) form a clade with CPYC prototypes. Hence, Grxs with CPY/FC or close active sites belong to the class I, whereas Grxs with CGFS active sites belong to the class II [13]. Except some bacterial and archaeal phyla, at least one representative of these two Grx classes is present in most living organisms [14,15]. Note that the class II Grx isoforms are split into single domain and multidomain Grxs. The CGFS-type Grxs with a single domain are present in both eukaryotes and prokaryotes, whereas multidomain monothiol Grxs, which consist of a conserved N-terminal Trx-like domain fused to 1 to 3 Grx domains at the C-terminus, are restricted to eukaryotes [13,16]. At this point, it can be noticed that all class II Grxs should have the capacity to bind Fe–S clusters owing in particular to their extremely conserved CGFS active site sequence. Among class I Grxs, the situation is more complex. The current view is that the “ancestor” Grxs containing CPYC active site motifs were unable to ligate Fe–S clusters and that during evolution the loss of the active site proline notably allowed some members to acquire the capacity to bind Fe–S clusters and possibly new functions. However, the demonstration that certain Grxs with a CPYC motif have a similar ability raises new evolutionary questions. Several additional classes contain proteins with a domain architecture including a Grx module but they are usually present only in specific kingdoms, the active site signatures are quite variable and they have often not yet been characterized [13,14].

Concerning the catalytic mechanism employed by Grxs, the number of cysteines in the active site motif and the type of disulfide bond in the target proteins will be important factors [15]. In any case, the N-terminal active site cysteine constitutes the catalytic residue and is indispensable for the reductase activity. In the so-called monothiol mechanism which applies mostly for the reduction of glutathionylated proteins, this cysteine becomes glutathionylated and it is regenerated by a GSH molecule. On the other hand, the reduction of disulfide bonds involving protein cysteinyl residues requires a dithiol mechanism and thus an additional recycling residue that can be either the second active site cysteine residue or an additional extra active site cysteine. The latter mechanism is similar to the one used by Trxs. In this case, oxidized Grxs can be regenerated either by two GSH molecules or by dithiol–disulfide exchange with Trx reductase as mentioned above. Thus, it is important to mention that Grxs with dithiol active sites can potentially use both a monothiol and a dithiol mechanism [17].

Concerning the physiological roles, Grxs are associated to a large number of cellular processes. Reverse genetic analyses indicated they were primarily connected to oxidative stress response mechanisms including regulation of apoptosis, tolerance to heavy metals but also that some Grxs are important for developmental processes (see recent reviews) [16,18–22]. Considering the increasing number of identified glutathionylated proteins, which all constitute potential Grx substrates, we anticipate that the cellular processes implicating Grxs will continue to expand in the coming years.

Beyond the functions connected to the Grx oxidoreductase activity, several studies conducted since 2002 pointed to the capacity of both class I and II Grxs to bind iron–sulfur (Fe–S) clusters and to the importance of class II Fe–S Grxs for different iron-regulated processes. These Grxs will be referred thereafter to as class I Fe–S Grxs and class II Fe–S Grxs. Grxs from class II are particular since their function(s) could rely uniquely on their capacity to bind an Fe–S cluster not on a potential reductase activity which still has to be demonstrated in several cases. In any case, considering the fact that human Grx2 holoform, a class I Grx, has no significant disulfide reductase activity [23], none of the Fe–S ligating Grxs, do they belong to class I or II, should exhibit reductase activity under their holoforms. In this review, we discuss the recent genetic, biochemical, structural and molecular studies that contributed to improve our understanding about the physiological roles of Fe–S containing Grxs. A wealth of information is available from studies

conducted in yeast and human models, whereas it lags behind in bacteria and plants. After illustrating the types of Fe–S clusters bound by Grxs and the structural bases explaining the differences between class I and class II Fe–S Grxs, we will focus our attention on the role of class II Fe–S Grxs in the maturation or repair of Fe–S clusters and in the regulation of iron homeostasis.

2. Structural and spectroscopic insights into the Fe–S cluster binding capacity of glutaredoxins

2.1. Class I Fe–S glutaredoxins usually bind stable [2Fe–2S] clusters into homodimers

Human Grx2 was the first member characterized as an Fe–S cluster-binding protein [23]. The biochemical characterization of the recombinant protein demonstrated that it can bind a [2Fe–2S] cluster into a homodimer, a property which was then confirmed for poplar GrxC1. Moreover, analytical GSH measurements coupled to the resolution of the three dimensional structure of the GrxC1 holoform showed that the Fe–S cluster is in fact coordinated by the N-terminal active site cysteine of both monomers and by the cysteines of two GSH molecules [24,25]. A similar ligation mode was observed in human Grx2 [26,27], *A. thaliana* GrxC5 [28] and very likely *S. cerevisiae* Grx6 [29] (Table 1). In the case of ScGrx6, the form binding Fe–S clusters is a tetramer but it is likely related to the existence of an N-terminal extension that promotes noncovalent dimerization [29,30]. Note that an extra beta-sheet is found in the Grx domain of ScGrx6 [30]. However, since this addition is likely present in yeast Grx7, a protein that does not incorporate an Fe–S cluster, it should not be crucial for cofactor ligation. Although the cluster of poplar GrxC1 is reductively labile [25], the Fe–S clusters assembled onto class I Fe–S Grxs are much more stable compared to those assembled onto class II Fe–S Grxs. Indeed, the proteins, at least the plant isoforms, can generally be homogeneously purified under aerobic conditions without losing much Fe–S cluster. Compared to conventional class I Grxs with CPYC and CPFC active site sequences, all these proteins have the peculiarity not to have the active site proline, but instead a glycine (poplar GrxC1) or a serine (HsGrx2, AtGrxC5 and ScGrx6). Consistently, site-directed mutagenesis studies performed on poplar GrxC1 and HsGrx2 as well as on Grxs with a CPxx active site signature (poplar GrxC2, C3, and C4 and human Grx1) that do not visibly assemble such an Fe–S cluster showed that, in all these proteins, the proline prevents the assembly of an Fe–S cluster, whereas the presence of a glycine or a serine was sufficient for Fe–S cluster incorporation (Fig. 1) [25,26].

However, depending on the Grxs considered, other factors are clearly important. Indeed, *Trypanosoma brucei* 2-C-Grx1 and zebrafish Grx2 are able to bind an Fe–S cluster despite having a CPYC active site [31,32]. In the case of zebrafish Grx2, the Fe–S cluster binding is unusual since it is bound within a monomer and the coordination could involve four cysteines present outside the active site and specific to teleosts [31]. Other information came from the biochemical and structural comparison of two plant chloroplastic isoforms, PtGrxS12 (²⁸WCSYS³² active site) and AtGrxC5 (²⁸WCSYC³²). Indeed, despite having a strong sequence identity, only GrxC5 can form a [2Fe–2S] cluster-bridging homodimer [28]. Site-directed mutagenesis performed on GrxS12 indicated that the simple substitution of Trp28 by a tyrosine or of Ser32 by a cysteine enabled the incorporation of an Fe–S cluster, meaning that these two positions (–1 and +3 compared to the ligand cysteine) are also crucial for Fe–S cluster binding [28,33]. Accordingly, the opposite Cys32 to serine mutation in GrxC5 prevents Fe–S cluster binding [28]. The observed stabilizing effect of Cys32 was attributed to the formation of a hydrogen bond between Cys32 and a lysine residue preceding the active site (Lys26) which helps stabilizing the loop containing the active site residues essential for Fe–S cluster coordination [28].

All these biochemical, spectroscopic and structural studies have been performed with recombinant proteins. An important aspect to

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

3

Table 1
Mutant phenotypes and associated functions of Fe–S cluster-binding glutaredoxins.

Class I				
Organism	Protein names	Active site signatures	Mutant phenotype(s)	References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grx6	CSYS	Increased sensitivity toward oxidizing agents, reduced sensitivity to the glycosylation inhibitor, tunicamycin.	[143,144]
<i>Danio rerio</i>	Grx2	CPYC	Impaired angiogenesis and brain and heart development	[145–147]
<i>Homo sapiens</i>	Grx2	CSYC	Increased sensitivity toward cell death inducers	[148]
<i>Mus musculus</i>	Grx2	CSYC	Increased sensitivity to oxidative stress, decreased mitochondrial complex I activity	[149]
<i>Rattus norvegicus</i>	Grx2	CSYC	Impaired mitochondrial Fe–S cluster assembly and IRP1 regulation	[38]
<i>Trypanosoma brucei</i>	2-C-Grx1	CPYC	No growth phenotype	[32]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GrxC1	CGYC	No visible phenotype in standard growth conditions	[150]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GrxC5	CSYC	None yet described	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Grx1	CGYC	Decreased growth, increased sensitivity to H ₂ O ₂ , impaired nodule formation and nitrogen fixation capacity	[108]
Class II				
Organism	Protein names	Active site signatures	Mutant phenotype(s)	References
Single domain				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grx5	CGFS	Increased sensitivity to oxidative stress and defaults in Fe–S cluster assembly	[12,48,49,51]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Grx5	CGFS	Defaults in Fe–S cluster assembly, decreased amount of mitochondrial DNA, reduced growth and sensitivity toward oxidants	[65,128]
<i>Danio rerio</i>	Grx5	CGFS	Embryo lethal	[53]
<i>Homo sapiens</i>	Grx5	CGFS	Defaults in Fe–S cluster assembly, sideroblastic anemia, nonketotic hyperglycemia, increased apoptosis in osteoblasts	[52,54,55,151]
<i>Trypanosoma brucei</i>	1-C-Grx1	CAYS	Lethal	[39]
<i>Trypanosoma brucei</i>	1-C-Grx2	CGFT	None yet described	
<i>Trypanosoma brucei</i>	1-C-Grx3	CGFT	None yet described	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Grx2	CGFS	Defaults in Fe–S cluster assembly, deregulation of RirA transcriptional activity, increased intracellular iron content, modified nodule development	[108]
<i>Escherichia coli</i>	Grx4	CGFS	Sensitivity to iron depletion	[80]
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Grx5	CGFS	None yet described	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Grx-nif	CGFS	None yet described	
<i>Gloeobacter violaceus</i>	GvGrx3	CGFS	None yet described	
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	TeGrx3	CGFS	None yet described	
<i>Synechocystis PCC6803</i>	SyGrx3	CGFS	Hypersensitivity to metals and oxidative stress (H ₂ O ₂ , heat, high light) treatments	[152]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GrxS14	CGFS	Sensitivity of root growth to H ₂ O ₂	[77]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GrxS15	CGFS	Sensitivity of root growth to H ₂ O ₂	[153]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GrxS16	CGFS	None yet described	
Multidomain				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grx3	CGFS	Impaired regulation of Aft1/iron homeostasis	[112,113]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grx4	CGFS	Impaired regulation of Aft1/iron homeostasis	[112,113]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Grx4	CGFS	Lethal	[128]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grx3/4	CGFS	Impaired iron trafficking and assembly of Fe–S proteins, heme, and iron-containing proteins, reduced growth and sensitivity to oxidizing agents	[104,113]
<i>Danio rerio</i>	Grx3	CGFS	Impaired heme synthesis and Fe–S protein maturation	[107]
<i>Homo sapiens</i>	Grx3/Picot	CGFS	Decreased activities of cytosolic Fe–S proteins	[107]
<i>Mus musculus</i>	Grx3	CGFS	Embryonic lethality, cardiac hypertrophy in heterozygous mice	[154]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GrxS17	CGFS	Hypersensitivity to elevated temperature and altered auxin perception	[91]

consider is the *in cellulo* existence and proportion of Fe–S bound Grx forms. The presence of an Fe–S cluster was in fact rarely unambiguously demonstrated and the relative abundance compared to apo-proteins never assessed. Grx2 immunoprecipitation from human cell lines cultivated with ⁵⁵Fe isotope indicated the presence of radiolabelled iron which suggested that an Fe–S cluster is assembled *in vivo* [23]. Another confirmation of the capacity of human Grx2 to bind an Fe–S cluster *in vivo* came from the genetic engineering of a Grx2 fusion with Venus fluorescent protein fragments and its expression in the cytosol of bacterial and mammalian cells [34]. The detection of fluorescence in these cells which resulted from reassembly of the split Venus was indicative of the building of a [2Fe–2S] cluster onto a dimeric Grx2. In mammalian cells, it was shown to require the iron–sulfur cluster assembly proteins, ISCU and NFS1.

Another crucial question is the function of these Fe–S bound Grx forms. Indeed, contrary to the apofrom, the holoform of human Grx2 has no reductase activity [23]. Moreover, in recombinant human Grx2, the Fe–S cluster is stabilized in the presence of GSH, whereas GSSG but also dithionite and ascorbate promoted Fe–S cluster degradation

[23]. From this observation, the authors proposed that the Fe–S cluster serves as redox sensor, by modulating Grx2 activity in response to changing conditions. Indeed, they proposed that Grx2 could exist mostly under an inactive holoform under non-stress conditions, whereas the disruption of the Fe–S cluster upon oxidative stress conditions would result in the formation of catalytically active monomers. A similar GSH or glutathionyl-spermidine (Gsp) stabilization effect was also observed for example for poplar GrxC1 and *T. brucei* 2-C-Grx1 respectively [25,32]. Indeed, in the parasite, specific thiols such as Gsp and trypanothione (T(SH)₂) can replace GSH as non-protein Fe–S cluster ligands. The observed GSH stabilizing effect might be related to the constant exchange observed between the GSH involved in Fe–S ligation and the free GSH pool as observed for human Grx2 and poplar GrxC1 [26,35] but also for poplar GrxS14, a class II Fe–S Grx [35]. Accordingly, it was shown also that GSH prevents the Fe–S cluster transfer from plant holo Grxs to an apo-ferredoxin, the effect being more marked with class I compared to class II Fe–S Grxs. For instance, according to its inability to complement the yeast *grx5* mutant, it was initially shown that GrxC1 is unable to transfer its Fe–S cluster to an apo-ferredoxin in

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

4

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

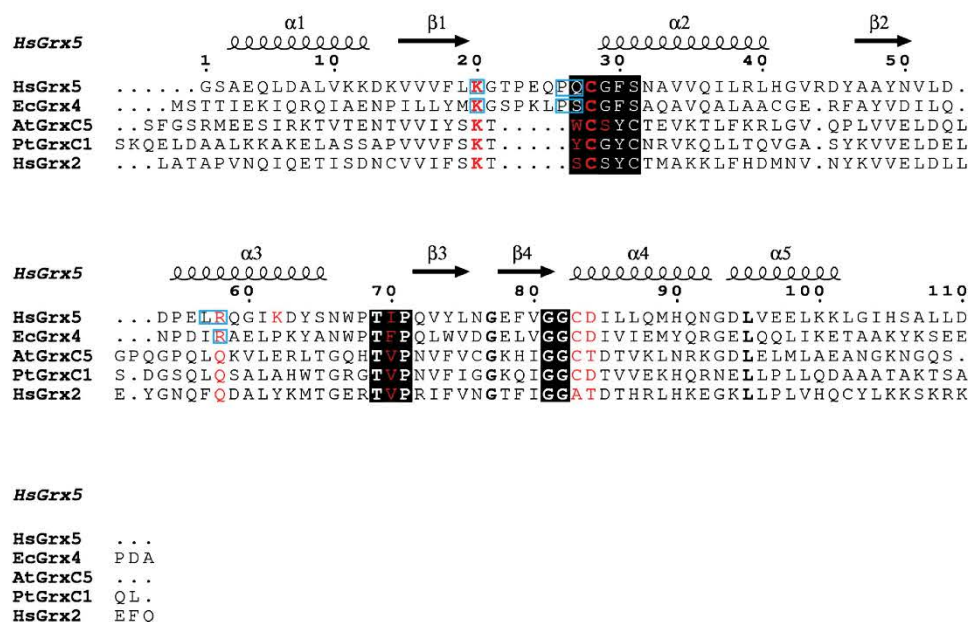


Fig. 1. Structural alignment of [2Fe-2S]-cluster bridged glutaredoxins. Sequences from Fe-S containing Grxs whose structures are solved were aligned using Strap (<http://www.bioinformatics.org/strap/>) based on all available X-ray structures. The secondary-structure elements of human Grx5 are indicated on top of the figure, with arrows representing β -sheets and cylinders α -helices. The active site Grx signature and the TVP and GG motifs are in black rectangles. Residues interacting with GSH molecules are colored in red. Residues involved in the monomer-monomer interface in class II Grx holoforms are highlighted with blue rectangles.

the presence of GSH [36]. A transfer occurs in fact in the absence of GSH albeit with a relatively weak rate constant compared to class II Fe-S Grxs [35]. A bidirectional Fe-S cluster transfer between human Grx2 and the scaffold protein ISU was also evident from *in vitro* experiments [37]. All these Fe-S cluster transfer results have to be interpreted with caution since GSH likely shifts the thermodynamic equilibrium of the reaction. Additionally, other parameters such as the GSH/GSSG ratio and total glutathione concentration which are varying in a cellular context are important to consider when thinking to the *in vivo* Fe-S cluster delivery steps involving Grxs. Since the GSSG destabilizing effect on poplar GrxC1 was very weak and since Fe-S clusters are also known to be sensitive to reactive oxygen species, it might be that the oxidative sensing mechanism relies on superoxide ion (O_2^-) or on H_2O_2 instead of GSSG. Indeed, as assessed with redox sensitive GFP (roGFP) probes, the GSSG levels, which are very low compared to GSH levels in cells under normal conditions, would remain far below GSH levels under stress conditions and may not be sufficient to promote Fe-S cluster disassembly. The phenotypic and molecular analyses of cells or organisms depleted for these Fe-S cluster containing class I Grxs are scarce (Table 1). In most examples, the observed defects were either developmental as in the case of zebrafish Grx2 or consisted in a decreased tolerance to oxidative stress conditions. The only study that pointed to a clear relationship with iron homeostasis was performed with rat cell lines, showing that the extinction of mitochondrial Grx2 led to the impaired assembly of several mitochondrial Fe-S proteins and to IRP1 deregulation [38]. However, there was no evidence that it was linked to the capacity of Grxs to assemble Fe-S clusters.

2.2. Fe-S clusters ligated by class II Fe-S glutaredoxins are more labile and their nature and binding mode is more variable

Following the identification of Fe-S clusters in class I Fe-S Grxs, several studies reported that CGFS Grxs also formed holo-homodimers

incorporating a [2Fe-2S] cluster with a ligation similar to class I Fe-S Grxs [36,39–41]. Interestingly, human Grx5 might incorporate two [2Fe-2S] clusters into a tetramer, but the existence of such oligomeric form is debated [42,43]. The analysis of human Grx3 and Arabidopsis GrxS17, multidomain CGFS Grxs possessing two and three Grx domains, indicates that the holoproteins also form dimers but that they contain two or three Fe-S clusters respectively according to the number of Grx domains (our unpublished result, [44]). In the case of the mitochondrial 1-C-Grx1 isoform of *T. brucei* and as reported for Tb2-C-Grx1, Gsp and T(SH)₂ can serve as ligands instead of GSH [45]. While class I Fe-S Grxs were shown to bind uniquely [2Fe-2S] clusters, the recent spectroscopic characterization of a recombinant ScGrx5 demonstrated its ability to incorporate linear [3Fe-4S] and [4Fe-4S] clusters [46]. Strikingly, there was no sign of Fe-S cluster when purification is achieved immediately after cell lysis and regardless of the use of aerobic or anaerobic conditions, whereas exposure of cell-free extracts to aerobic conditions allowed purifying linear [3Fe-4S] cluster-bound forms. Accordingly, *in vitro* anaerobic reconstitution experiments showed that, in the presence of GSH, a linear [3Fe-4S] cluster is predominantly reconstituted. On the other hand, in the presence of DTT but in the absence of GSH, a [4Fe-4S] cluster is the only Fe-S cluster bound form into a dimer. These results also prompted the authors to reinterpret previous UV/visible spectra obtained for several recombinant class II Fe-S Grxs initially attributed as [2Fe-2S] cluster [41], as containing linear [3Fe-4S] clusters or a mixture between linear [3Fe-4S] and [2Fe-2S] clusters. Such a variation has also been observed for *A. thaliana* GrxS16 which binds a [2Fe-2S] cluster into a dimer upon reconstitution experiments in the presence of GSH, but a [4Fe-4S] cluster into a tetramer when GSH is replaced by DTT (our unpublished result).

Besides the active site cysteine, the contribution of other active site residues including the CGFS signature and the GSH binding residues has been examined by site-directed mutagenesis on a few isoforms. Using *Synechocystis* Grx3 and yeast Grx4 as models, it was shown that

ARTICLE IN PRESS

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

5

mutating residues involved in GSH recognition abolished or decreased Fe–S cluster formation respectively [41,47]. This is explained by the fact that GSH position in apo- and holo-Grxs does not vary much (see Section 2.3). From most of the mutagenesis work performed with class I Grxs, it was initially thought that the presence of a glycine or a small residue after the catalytic cysteine (at position +1) is required. However, a mutational analysis achieved by Hoffmann and co-workers revealed that the requirements for Fe–S cluster stabilization, at least in yeast Grx4, are different, not to say opposite [47]. Indeed, they showed that substituting the glycine by a proline does not prevent cofactor assembly, whereas replacing the serine (position +3) by a cysteine, forming a dithiol active site as in human Grx2, poplar GrxC1 or Arabidopsis GrxC5, resulted in its destabilization. Importantly all tested variants were able to bind iron and most likely Fe–S clusters and restored the growth of a *S. cerevisiae* strain where Grx3 is deleted and Grx4 is expressed under the control of the glucose-repressible GAL-L promoter. However, most of these variants were unable to completely compensate Aft1 deregulation (see explanation about the connexion in Section 4) indicating that these changes somehow disturbed the cofactor environment, preventing interaction or cofactor transfer with Aft1.

2.3. Structural properties and comparison of Fe–S cluster binding Grxs

Only five crystal structures of Fe–S cluster-bridged Grxs have been solved to date, three from class I (PtGrxC1, AtGrxC5, HsGrx2) and two from class II (HsGrx5, EcGrx4) and they are all with [2Fe–2S] clusters [25,27,28,40,43]. In all these structures, the [2Fe–2S] cluster is at the interface of two Grx chains and each iron atom is coordinated by four sulfur atoms, two inorganic from the cluster, one from the N-terminal active site cysteine of Grx chain and one from the cysteine moiety of GSH. However, not all Grx holofoms are dimeric. Indeed, crystallographic studies showed a higher oligomerization in the solid state for PtGrxC1 and HsGrx5. Both crystal forms contained four protein molecules in the asymmetric unit. For poplar GrxC1, the tetramer contains only one [2Fe–2S] cluster and owing to the use of aerobic conditions, it likely resulted from co-crystallization of one holodimer and of two monomers coming from the disruption of another holodimer [25]. On the other hand, the tetrameric organization of HsGrx5 which contains two [2Fe–2S] clusters, forming a dimer of holodimer, may be biologically relevant (Fig. 2a). However, while the oligomerization state was initially confirmed by gel-filtration chromatography experiments and sedimentation velocity analytical ultracentrifugation [43], NMR and analytical gel filtration analyses performed in another study provided evidence for the presence of a single Fe–S cluster into a dimer [42]. Interestingly, crystal packing analysis of the X-ray structure of EcGrx4 revealed a tetramer similar to HsGrx5, but there has been no experimental confirmation about the formation of such oligomers in solution. Among these contacts, there are only few polar interactions which might explain the observed discrepancy in the oligomerization state depending on the conditions and concentrations used. Only the *S. cerevisiae* Grx6 [29] and a specific *A. thaliana* [4Fe–4S]-loaded GrxS16 holofom (our unpublished results) proved to exist as tetramers in solution. However, compared to HsGrx5, the tetramer formation in ScGrx6 is different as it involves a specific N-terminal domain.

Before comparing in more details apo- and holofoms in each class and class I vs class II holofoms, it is important to describe the organization of a Grx monomer. All Grx monomers exhibit a thioredoxin fold made of a central four-stranded mixed β -sheet flanked by five α -helices with an $\alpha 1\beta 1\alpha 2\beta 2\alpha 3\beta 3\alpha 4\alpha 5$ topology. At the primary sequence level, typical motifs, containing residues forming the active site, are conserved in most Grxs. The Cxx[C/S] signature is invariably positioned at the N-terminus of $\alpha 2$, the TVP sequence is situated in the loop between $\beta 3$ and $\alpha 3$ and the GG sequence is found at the N-terminal end of $\alpha 4$. In apoforms of both class I and class II Grxs, the GSH binding site is conserved and involves four anchor points.

The first crucial amino acid is the N-terminal active site cysteine since it is involved in the formation of a mixed disulfide with glutathione during the catalytic cycle. The second region involves two residues interacting with the carboxyl group of glycine. It is composed of a well-conserved lysine found in the loop between $\beta 1$ and $\alpha 2$ and of another residue found in $\alpha 3$, predominantly a glutamine or an arginine in class I or class II Grx isoforms respectively. The third key position is occupied by the residue preceding the *cis*-proline of the consensus TVP motif (in general a valine) that interacts with the GSH cysteinyl moiety via main chain-main chain hydrogen bonds. The last GSH anchor point is formed by the interaction of the γ -glutamyl group of GSH with two residues located in $\alpha 4$ and immediately following the characteristic GG motif.

Surprisingly, despite having a similar Fe–S cluster coordination, the orientation of the two Grx monomers in class I and class II Grx holodimers is different (Fig. 2b). In both cases, the monomers are related by a 2-fold axis. In class I Fe–S Grxs, the mean β -sheet planes of both monomers are quasi perpendicular, while in class II Fe–S Grxs they are quasi coplanar in a head-to-head fashion [25,27,40,43]. The presence of a 5 residue insertion prior to the active site cysteine in class II Fe–S Grxs seems to determine the type of assembled dimer (Fig. 1). There is no contact between the two monomers in class I Grx holodimers, except via the glutathione molecules (see below), whereas conserved hydrogen bonds between monomers stabilize the dimers in *E. coli* Grx4 and human Grx5 (Lys22, Pro28, Ser29 and Arg59 in *E. coli* Grx4 and equivalent residues in human Grx5) (Fig. 3a). Nevertheless, the Fe–S cluster is more solvent-exposed in class II Fe–S Grxs compared to class I Fe–S Grxs.

Upon Fe–S cluster incorporation, the GSH position only slightly varies. Nevertheless, additional residues from the active site participates to GSH stabilization in class I Fe–S Grxs but not class II Fe–S Grxs. In poplar GrxC1 (YCGYC signature), the Tyr at position –1 compared to the ligand cysteine interacts with the GSH of the same monomer, whereas in human Grx2 (SCSYC signature), the serine (position –1) interacts with the GSH of the other monomer. In AtGrxC5 (WCSYC signature), the Trp and Ser residues interact with GSH of the other monomer (Fig. 3b). On the other hand, more drastic changes occur to the residues forming the active site during the transition from apomonomer to holo-dimer, since Fe–S cluster incorporation causes steric constraints. Confirming the site-directed mutagenesis experiments, an in-depth analysis of class I Fe–S Grx structures indicated that, except the catalytic/ligand cysteine, most residues adopt different rotamers in the apo- vs holo-form (Fig. 3c & d). In human Grx2, it concerns essentially the lateral chains of serine and tyrosine at position +1 and +2 respectively [27]. In Arabidopsis GrxC5, the lateral chains of residues at position –1, +1 and +2 also adopt different rotamers in both forms [28]. Moreover, as already mentioned, the cysteine at position +3 forms a hydrogen bond with the main chain of the conserved lysine preceding the active site motif in Grxs, which stabilizes the loop containing other residues essential for Fe–S cluster binding [28]. Interestingly, most of these changes help protecting the cluster from solvent and from oxidative degradation. The residue at position +3 is also important for Fe–S cluster incorporation into class II Fe–S Grxs. Indeed, in *E. coli* Grx4 apoform, this Ser residue interacts with another serine, at position –1, whereas it interacts with the conserved lysine preceding the active site in holodimers [40].

Overall, these structural analyses revealed that the formation of Grx holodimers necessitates local conformational rearrangements, affecting notably most residues of the active site signature. Indeed these residues provide the required protein backbone flexibility for Fe–S cluster binding and also allow the formation of favorable interactions with the neighboring GSH. Finally, these changes and the differences in subunit orientation between class I and II Grx holofoms confer different Fe–S cluster stabilities which could explain the distinct functions attributed to these proteins, Fe–S cluster transfer for class II Fe–S Grxs and oxidative signaling via Fe–S cluster degradation for class I Fe–S Grxs.

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

6

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

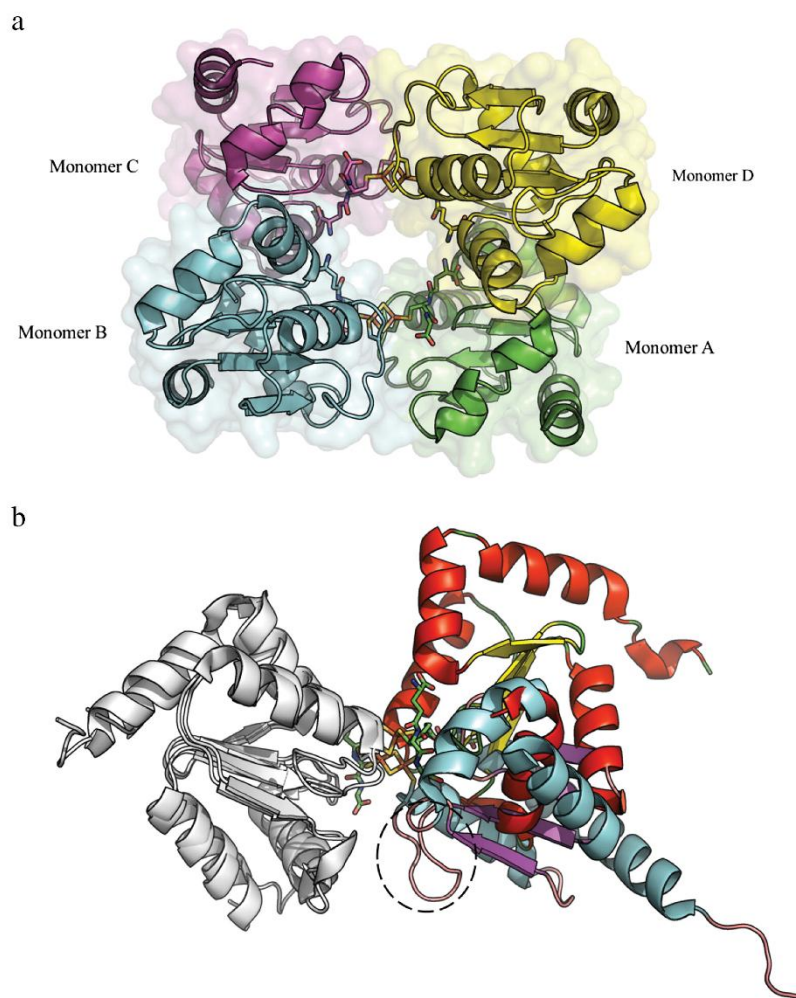


Fig. 2. Oligomerization states of Grxs. (a) Tetrameric organization of human Grx5 which contains two [2Fe-2S] clusters and four GSH molecules (in sticks), forming a dimer of holodimer (holodimer 1: A–B and holodimer 2: C–D). (b) Superposition of the X-ray structures of HsGrx2 (class I) and EcGrx4 (class II) holodimers. Monomers A (colored in white) of both structures were superposed to highlight differences in monomer B orientation. For monomer B, secondary structures (helices, strands and loops) are colored respectively in red, yellow and green for HsGrx2 and in cyan, purple and pink for EcGrx4. The 5 residue insertion before the active site of class II Grxs is circled.

3. Involvement of organellar class II Fe-S Grxs in the maturation of Fe-S proteins

3.1. Mitochondrial monodomain class II Fe-S Grxs mediate the transfer of Fe-S clusters by linking early and late-acting components of the ISC machinery

3.1.1. Phenotypic analyses of mutants

The implication of class II Fe-S Grxs in Fe-S cluster biogenesis was initially demonstrated by the phenotypic characterization of a *S. cerevisiae* null strain for the mitochondrial Grx5 [12,48]. It was first shown that the *grx5* mutant displays a high sensitivity to hydrogen peroxide and menadione resulting in growth defects in minimal medium, a decreased tolerance to an osmotic stress and it is unable to grow on respiratory media [12]. Accordingly, higher levels of glutathionylated and

carbonylated proteins have been detected in this mutant [12,49]. These observations together with the *in vitro* demonstrated reductase activity of Grx5 towards a glutathionylated carbonic anhydrase from rat suggested that Grx5 primarily acted as an oxidoreductase playing a central role in the protection of proteins against oxidative damage under normal growth conditions and stress conditions [50]. However, an experiment aiming at isolating genes/proteins that suppress *grx5* mutant phenotypes led to the isolation of proteins involved in the maturation of Fe-S clusters, including the chaperone Ssq1 and the carrier protein Isa2 [48]. Interestingly, the Isa1 paralog was unable to suppress the phenotypes. Hence, the refined analysis of *grx5* mutant phenotypes indicated that iron accumulated in the cells and that the activities of two mitochondrial Fe-S proteins, aconitase and succinate dehydrogenase, were impaired [48,51].

In vertebrates, the mutation of *grx5* leads to severe diseases and is embryo-lethal in zebrafish [52–54]. In all analyzed mutants or patients,

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

7

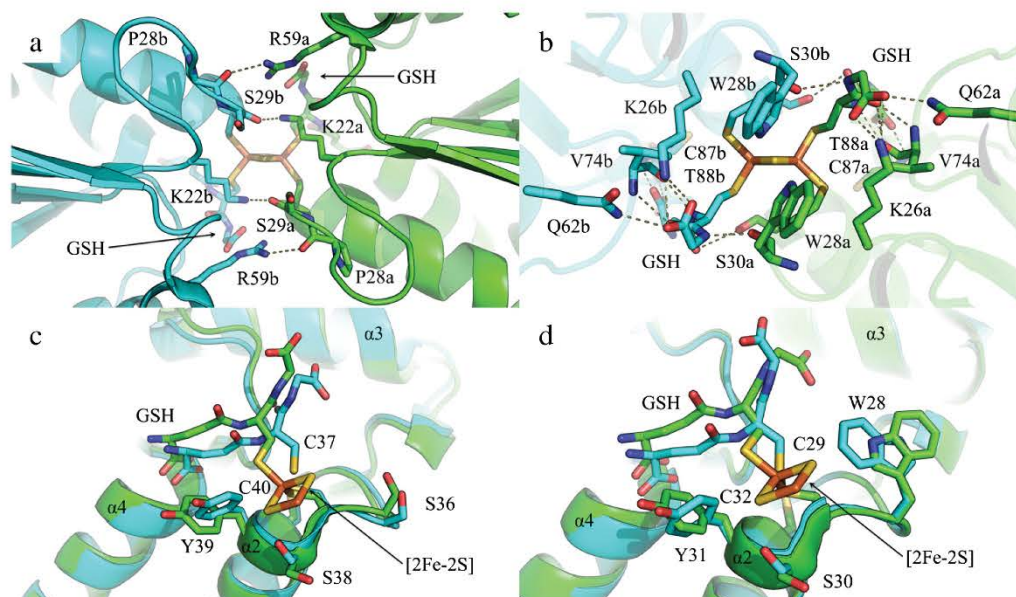


Fig. 3. Intermolecular interactions and structural rearrangements upon [2Fe-2S] cluster ligation. (a) [2Fe-2S] cluster coordination in EcGrx4 (class II) with contacting residues at the dimer interface. Monomer A is colored in green and monomer B in cyan. (b) [2Fe-2S] cluster coordination of AtGrxC5 (class I) with GSH intermolecular bonds. (c) and (d) Conformational rearrangements in HsGrx2 and AtGrxC5 upon [2Fe-2S]-cluster ligation, respectively. Apoforms and holoforms are colored in cyan and green, respectively.

a heme synthesis defect was observed explaining that the zebrafish *shiraz* mutant developed a hypochromic anemia which corresponds to a defect in hemoglobin production [53] and that a human patient with a mutation in *grx5* developed a sideroblastic-like microcytic anemia [52]. The functional and molecular characterization of these mutants indicated that the mitochondrial Fe-S cluster assembly is indeed impaired [54]. Consequently, the major regulator of iron homeostasis, the iron-regulatory protein 1 (IRP1), which is connected to the mitochondrial Fe-S cluster biosynthesis, is also affected. IRP1 is a cytosolic protein that acts as an aconitase when binding a [4Fe-4S] cluster but as a post-transcriptional regulator under apoform, recognizing iron responsive elements (IRE) of target genes for their regulation. The defect in heme synthesis is thus explained by the deregulation of the aminolaevulinate synthase (ALAS2) which codes for the enzyme involved in the first step of heme biosynthesis and the expression of which is usually repressed by IRP1. More recently, another mutation in the human *Grx5* gene has been associated to nonketotic hyperglycemia [55]. This patient harbors a deficient lipoylation, suggesting that Grx5 is required for the maturation of the mitochondrial Fe-S containing lipoate synthase [55].

3.1.2. Molecular mechanisms

At the molecular level, the question was to delineate the precise function of these Grx5 orthologs in this multistep Fe-S cluster maturation process. Indeed, there is a plethora of proteins involved and although their position in the sequence of events is often clearly established, their exact function(s) are sometimes less clear. The current knowledges are that the cysteine desulfurase Nfs1 is responsible of sulfur mobilization from cysteine and is stabilized by Isd11 [56]. They form ternary complexes with Isu/IscU scaffold proteins and quaternary complexes upon frataxin arrival (Fig. 4). The frataxin would regulate the entry of iron into the complex [57], but it is likely not the iron donor or storage protein, meaning that another iron chaperone/delivery system should exist. The electrons required to reduce sulfane sulfur into

sulfide would be provided by a NADH/ferredoxin reductase (FdxR)/ferredoxin (Fdx) system. From studies performed with the bacterial IscS, it is interesting to note that ferredoxin and frataxin were found to compete for IscS binding, suggesting that there might be a continuous exchange between both proteins in this complex [58,59]. What is pretty clear is that the Ssq1 (HSP70 type) and Jac1 (J-type) chaperone proteins as well as the nucleotide exchange factor Mge1 participate in the early steps of the Fe-S cluster transfer but whether they are essential for all reactions is unclear. Additional carrier proteins, namely Ind1, Isa1/Isa2 and Nfu1, are required for the maturation of specific clusters [56]. Isa1/Isa2 are acting in conjunction with Iba57 proteins [60]. While it is not clear how Ind1 gets its Fe-S cluster, Nfu and Isa/IscA are likely supplied by Grx5 [60,61].

In order to assign a precise function to Grx5, Mühlenhoff and collaborators initially analyzed the *in vivo* incorporation of radiolabelled ^{55}Fe into some target proteins after feeding the yeast *grx5* mutant by this element [51]. Using this approach, they observed an accumulation of iron and possibly of Fe-S cluster on Isu1 as for *ssq1* or *jac1* mutants which suggested that they are all acting after Isu1, having either redundant or eventually complementary functions [51]. It is noteworthy that this observation was consistent with the complementation of the *grx5* mutant by Ssq1 overexpression [48]. At this point, the question was to know whether Grx5 was involved in the reduction of some specific ISC components or acceptor proteins or whether it incorporated itself an Fe-S cluster for its subsequent delivery to final acceptors or to ISC partner proteins. Whereas the first point is difficult to assess, it was shown that a recombinant ScGrx5 did bind a [2Fe-2S] cluster *in vitro* [62]. Moreover, it also very likely binds an Fe-S cluster *in vivo* since radiolabelled ^{55}Fe protein can be immunoprecipitated from cells overproducing ScGrx5 [62]. However, the nature of the incorporated Fe-S cluster is not yet completely clear since in another study, an in depth spectroscopic characterization of ScGrx5 demonstrated the ability of the recombinant protein to incorporate linear [3Fe-4S] clusters and [4Fe-4S] clusters in addition to [2Fe-2S] cluster [46]. Moreover,

ARTICLE IN PRESS

8

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

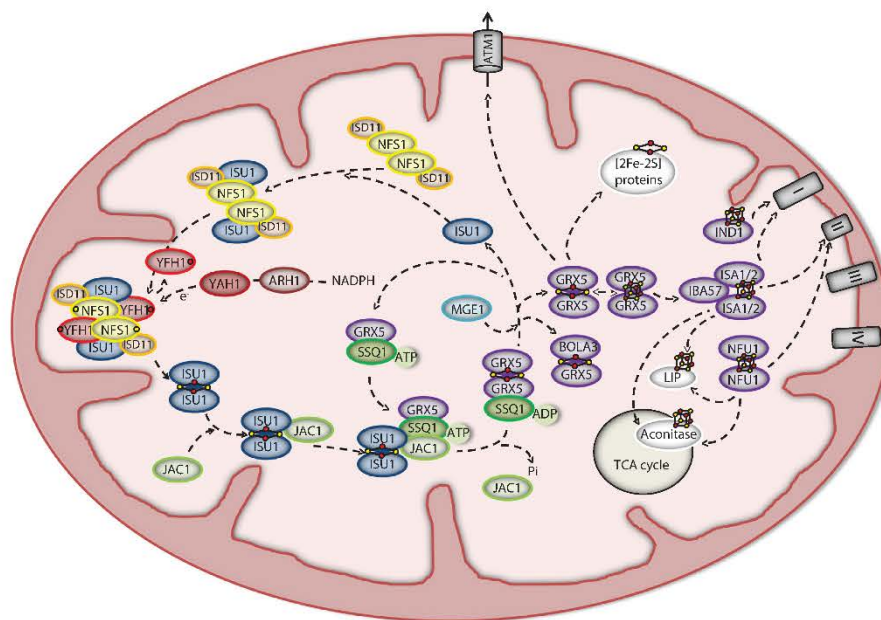


Fig. 4. Working model of the mitochondrial Fe-S cluster biogenesis with emphasis on the central role of Grx5. As discussed in the text, Grx5 is the last acting protein among the core components of the ISC machinery. From genetic studies performed essentially in yeast and mammals, it receives Fe-S clusters from Isu/IscU scaffolds, in a process requiring the Ssq1/Jac1 chaperones. The type of received Fe-S cluster is not clear since both Grx5 and IscU are able to integrate [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters and are required for the assembly of proteins containing both cluster types, contrary to other carrier proteins (Isa1/2, Nfu1, Ind1/H) which are only required for the maturation of [4Fe-4S] cluster-containing proteins. Among carrier proteins, a physical interaction involving Grx5 has only been characterized with Isa proteins. The pathways for supplying Fe-S clusters to Ind1 and Nfu1 are not yet clear. Another major function of Grx5 could also be to supply a substrate to the ATM1 transporter, would it be GSH derivatives or GSH complexed Fe-S clusters. Protein names mostly correspond to yeast protein nomenclature. Human and plant protein names have been used respectively for BolA3 and Ind1/H that only exists in organisms having complex I. Note that in plants additional proteins may be required since SufE1 is found in mitochondria and interact with Nfu1 and some families are expanded. For instance, there are likely 2 Nfu and 3 IscA-like proteins in this organelle. When documented, the stoichiometries of each component in protein complexes, the protein oligomerization states and the Fe-S cluster types have been indicated. LIP is for lipoate synthase, sulfur atoms are represented in yellow and iron atoms in red.

in vitro Fe-S cluster transfer experiments showed the capacity of [4Fe-4S] cluster-bridged ScGrx5 to transfer its cluster to an apo-aconitase [46]. These results were particularly interesting considering that aconitase activity is affected in the *grx5* mutant and that Grx5 is involved in the maturation of both [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters as shown by examining the Fe-S cluster binding of two reporter Fe-S proteins bearing both types of clusters in $\Delta grx5$ cells [62].

Recently, Uzarska and collaborators deciphered the molecular determinants controlling the interactions between Isu1, Grx5, Ssq1 and Jac1 [62]. Since Fe-S cluster incorporation into a *S. pombe* Grx5 expressed in *isu1*, *jac1* or *ssq1* mutant backgrounds is decreased, it was concluded that all three proteins are required for the maturation of Grx5 holoform. Then, by coupling *in vitro* and *in vivo* approaches, they have demonstrated that an apoform of Grx5 interacted with Ssq1, preferentially when the latter is in an ADP rather than in an ATP state. The fact that it did not prevent Isu1–Ssq1 interaction indicated that Grx5 and Isu1 can bind Ssq1 simultaneously at independent sites. Hence, the current view is that a Jac1–holoIsu1 complex is recruited by Ssq1, already in complex or not with Grx5, thus facilitating the Fe-S cluster transfer from Isu1 to Grx5 (Fig. 4). Then, by exchanging ADP to ATP onto Ssq1, Mge1 would promote the disassembly of the Ssq1–Grx5 complex. Consistent with this model, the *in vitro* [2Fe-2S] cluster transfer between Isu and Grx5 from *Azotobacter vinelandii* is strongly stimulated by the presence of HscA and HscB, the bacterial chaperones orthologous to yeast Ssq1 and Jac1 respectively [63].

At this point, the question was to determine what the physiological Fe-S acceptors of Grx5 were. Among the known components of the ISC

machinery, this could be Ind1, Nfu1, Isa1/2 or eventually Iba57, although there is no evidence that the latter protein can incorporate an Fe-S cluster. Whereas there is no direct evidence for an interaction with Ind1, Nfu1 or Iba57, several evidences link Grx5 with Isa proteins. First, an interaction between *S. cerevisiae* Grx5 and Isa1 was demonstrated by binary yeast two-hybrid [64]. Using bimolecular fluorescence complementation, an interaction between Grx5 and Isa1 and Isa2 was also observed for *S. pombe* proteins [65]. More recently, it was demonstrated by nuclear magnetic resonance (NMR) experiments that human Grx5 is able to transfer its [2Fe-2S] cluster to human Isa orthologs, IscA1 and IscA2 [42]. This transfer seems unidirectional as no Fe-S cluster transfer was observed when IscA1 under holoform and Grx5 under apoform were incubated together [42]. These NMR experiments also revealed that, in solution, Grx5 holoform would exist as a mixture of two species and that one of these species preferentially transfers its Fe-S cluster to IscA1. Moreover, according to previous reports pointing to the stabilizing effect of GSH [35], increasing GSH concentration does not favor Fe-S cluster release revealing that it is stably bound in Grx5 and that its transfer requires specific protein–protein interactions between Grx5 and acceptor protein. Finally, as no interaction was visible between both proteins under apoform, the [2Fe-2S] cluster seems indispensable to promote the interaction between Grx5 and IscA1/2 as already observed for other metal transfer reactions [42]. From the documented existence of Grx–BolA interaction in numerous species, another likely partner of Grx5 is BolA3. The study of a human patient presenting a mutation in the *bolA3* gene demonstrated that this protein is required for the normal maturation of Fe-S enzymes in

ARTICLE IN PRESS

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

9

the respiratory chain complexes and for lipoate-containing 2-oxoacid dehydrogenases [55,66,67]. As BolAs cannot incorporate an Fe–S cluster by itself, this suggests that BolA3 function would be linked either to its capacity to form holo-heterodimer with Grx5 or to an inhibitory effect of some Grx5 homodimer functions. However, the latter effect is unlikely since the defects in the *bolA3* mutant do not exactly match those in the *grx5* mutant.

Overall, these results indicate that mitochondrial Grx5 members belong to the core mitochondrial ISC assembly machinery. Indeed, several target proteins of the mitochondrial ISC machinery are affected in *grx5* mutants (aconitase, succinate dehydrogenase, lipoate synthase) but, more importantly, *grx5* mutants are the only one described so far among carrier proteins where the cytosolic CIA machinery and the Aft1 or IRP1 regulation are also impaired [54,62,68]. Hence, by facilitating the transfer of Fe–S clusters preformed on Isu scaffold proteins to more specific ISC targeting factors such as IscA1/2, Grx5 seems to be the first acting protein among all carrier proteins. Moreover, to date, this is the only carrier protein which proved to be required for the assembly of both [2Fe–2S] and [4Fe–4S], whereas Nfu, IscA, Iba57, Ind1 seem devoted to the maturation of proteins containing [4Fe–4S] clusters. For this reason, it is assumed that it could also provide Fe–S clusters to mitochondrial [2Fe–2S] binding proteins such as ferrochelatase or ferredoxin [69]. Concerning its contribution to the ISC export machinery, an attractive hypothesis would be that it provides glutathione-complexed Fe–S clusters or other glutathione persulfide forms to the ATM transporters. Indeed, GSH is clearly required for this process [70], and GSH, GSH derivatives and glutathione-complexed Fe–S clusters proved to significantly stimulate the ATPase activity of ATM transporters [71–73].

While the role of the mitochondrial Grx5 seems conserved across kingdoms, it is important to mention that the poplar GrxS15 ortholog does not complement the *grx5* mutant phenotypes [36]. In *Trypanosoma brucei*, there are 2 class II Grxs in mitochondria, namely 1-C-Grx1 and 1-C-Grx2. While 1-C-Grx1 possesses an N-terminal extension unrelated to the Trx domain found in multidomain CGFS Grxs and a slightly different CAYS active site signature, it binds an Fe–S cluster and based on its capacity to complement the yeast *grx5* mutant, it might be the one participating to the Fe–S cluster biogenesis [39]. The protein seems indispensable for the parasite life, since gene silencing or deletion is impossible [45]. In summary, it is puzzling that the deletion of Grx5 in yeast species only leads to relatively mild phenotypes whereas it is lethal in some other organisms and the deletion of *Isu/IsuU*, the Fe–S cluster donor recurrently leads to strong phenotype defects. Possible interpretations are that Grx5 only assists cofactor assembly for a specific subset of non-essential Fe–S proteins or that it is an accessory protein in yeast, i.e. Fe–S clusters can still be transferred from Isu to acceptor proteins possibly through the chaperone system. We have mentioned already above that overexpression of Ssq1 but also Isa2 can suppress Grx5 defects. On the other hand, the observed synthetic lethality when Grx5 mutation is combined to Grx2 deletion or to Grx3/4 deletion in *S. cerevisiae* is another point to integrate in this scheme [12]. Indeed, this indicates that these Grxs can somehow substitute to Grx5 function. Since *S. cerevisiae* Grx2 does not likely incorporate an Fe–S cluster, this could imply that at least part of the Grx5 function relies on a reductase activity.

3.2. Undefined roles of chloroplastic class II Fe–S glutaredoxins in the SUF machinery

In photosynthetic organisms, many Fe–S proteins are also present in chloroplasts and they are essential for photosynthesis, some proteins being present in the cytochrome b6/f and photosystem I complexes and involved in chlorophyll metabolism. They are also required for example for nitrogen or sulfur metabolism, an Fe–S cofactor being found in GOGAT and nitrite reductase or in APS reductase and sulfite reductase respectively [74–76]. Hence, plants possess an additional Fe–S

cluster assembly machinery specifically devoted to the maturation of chloroplastic Fe–S proteins [76]. This SUF machinery, derived from a bacterial system, is present along the green lineage (cyanobacteria, algae, terrestrial plants). While the role of many actors has been precisely determined, the one of plant class II Fe–S Grxs in this process, if any, is not yet elucidated (reviewed in [76]).

The hypothesis that GrxS14 and GrxS16 participate to the maturation of Fe–S clusters in the chloroplast in association with the SUF machinery was built on the observation that poplar and Arabidopsis proteins were able to complement the yeast *grx5* mutant defects when targeted into mitochondria [36,77]. Moreover, poplar and Arabidopsis recombinant proteins can incorporate labile [2Fe–2S] clusters that can be rapidly and quantitatively transferred to the apoform of *Synechocystis* ferredoxin [35,36]. Altogether, these data suggested a role of carrier proteins similar to the one attributed to mitochondrial Grx5. For this reason, the relationship with other known SUF components was investigated. For example, *in vitro* transfer experiments between [2Fe–2S]-bridged monothiol Grxs and potential acceptor apoproteins have revealed a rapid, unidirectional and quantitative transfer from AtGrxS14 to AtSufA1, a chloroplastic A-type protein [78] or to the sirohdrochlorin ferrochelatase SirB (Albetel, Couturier, Rouhier, Johnson, unpublished results). On the other hand, using the same approach, it was shown that GrxS16 but not GrxS14 can receive a [2Fe–2S] cluster from AtNfu2 [79]. These different results confirmed that, depending on the partners, chloroplastic class II Fe–S Grxs can either receive or transfer Fe–S clusters but their exact role and position in the whole process remain undetermined. Indeed, genetic evidences are still lacking maybe because of a redundancy between these proteins. The phenotypic analysis of a GrxS14 knock-out mutant showed that the root development of Murashige and Skoog medium grown plants was slightly altered in response to H₂O₂ treatment [77] but it did not reveal any link to a deregulation of the SUF machinery or of iron homeostasis.

Some more evidence came from the study of Grx4, the only class II Fe–S Grx from *E. coli*. Albeit its role(s) is not yet elucidated, a link with the SUF machinery was done from some genetic analyses. It was observed that a *grx4/grxD* mutant is sensitive to iron depletion [80] and that the mutation of the *grx4* gene is synthetic lethal when combined to any mutation of genes of the *isc* operon [81]. Given that mutants for genes of the *suf* operon display the same characteristics [82], it was concluded that Grx4 is functionally linked to the SUF system. Also, it was shown that the activity of MiaB, a radical SAM enzyme involved in tRNA methylation, is impaired in a *grx4* mutant [83]. Besides, the description of a covalent interaction of Grx4 with the SufE sulfurtransferase via their respective cysteine residues pointed to a possible role of Grx4 in regulating sulfur release from SufE or to the direct assembly of an Fe–S cluster onto Grx4 without the involvement of the identified SUFBCD scaffold complex [84]. This interaction may also make echo to the existence of SufE1 proteins in plants, hybrid proteins formed by a SufE domain fused to a BolA domain [85,86]. SufE1 is essential for the Fe–S cluster biogenesis in chloroplasts and possibly in mitochondria, acting as a sulfur-transferase in conjunction to the cysteine desulfurase Nfs2 and possibly Nfs1 [85,86]. Using binary yeast two-hybrid and bimolecular fluorescence complementation assays in *A. thaliana* protoplasts, an interaction of both plastidial GrxS14 and GrxS16 with SufE1 has been demonstrated and this interaction seems to depend on the presence of the BolA domain of SufE1 [87]. Besides a possible regulation of the redox state of SufE1 was suggested by the observation that these Grxs can reduce an inactive SufE1 glutathionylated form [87]. Hence, the question of a possible regulatory role of plastidial CGFS Grxs is raised. Since SufE1 activity is crucial for activation of Nfs2, the interaction with Grxs might allow the fine tuning of the whole chloroplastic Fe–S cluster assembly system. This could be achieved via a redox control, via a simple non Fe–S dependent interaction or eventually via the formation of Grx–SufE1 holo-heterodimers since the formation of Fe–S bridged BolA–Grx dimers seems universal.

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

10

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

3.3. Putative roles of class II Fe–S glutaredoxins in Fe–S cluster repair/regeneration

Beyond the *de novo* assembly of Fe–S clusters, other evidences suggest that monodomain class II Fe–S Grxs could play a role in the repair of Fe–S clusters. This role has been notably proposed following the demonstration that ScGrx5 has the ability to incorporate linear [3Fe–4S] clusters [46]. The observation that these linear [3Fe–4S] cluster-loaded Grx5 forms were only isolated after exposure of cell-free extracts to aerobic conditions, whereas it was devoid of Fe–S clusters when purification was achieved directly after bacterial cell lysis, suggested that ScGrx5 could recycle released Fe–S clusters from damaged proteins. Incidentally, this might also prevent the harmful effects due to the iron accumulation observed in *grx5* mutant cells. Another result consistent with a role in Fe–S repair or regeneration comes from the observed impaired MiaB activity in an *E. coli grx4* mutant [83]. Indeed, MiaB is a radical SAM enzyme which binds two [4Fe–4S] clusters, one of them is an auxiliary cluster which serves for sulfur donation [88]. This implies that an Fe–S cluster regeneration or repair mechanism should exist to keep MiaB functional. Although the existence of a [4Fe–3S] cluster on MiaB after turnover activity still has to be proved, the fact that Grx4 interacts with MiaB under both apo- and holoforms but, contrary to NfuA, is unable to transfer an Fe–S cluster led the authors to hypothesize that Grx4 might participate to the regeneration of an active MiaB either by providing the missing sulfur atom under holoforms or by scavenging the partially degraded [4Fe–3S] cluster under apoforms [83]. Further experiments are urgently needed to substantiate this point.

4. Regulatory functions of nucleocytoplasmic multidomain class II Fe–S Grxs in iron metabolism

4.1. General overview

Among multidomain Grxs, only higher plants possess class II Grxs with three Grx domains, referred to as GrxS17, whereas other photosynthetic and non-photosynthetic eukaryotes have isoforms formed by one Grx domain such as in *S. cerevisiae* Grx3 and Grx4 or two Grx domains such as in mammalian Grx3 also called PICOT (protein kinase C interacting cousin of thioredoxin) [89]. Most multidomain class II Grxs are localized in the cytosol and/or in the nucleus [90–93]. Although not involved in Fe–S cluster binding, the N-terminal Trx-domain found in these proteins proved to have important contributions. Despite the lack of specific NLS signature, the Trx-domain is responsible for the nuclear localization of yeast Grx3/4 [93]. Moreover, it is essential for their roles in iron trafficking and Aft1 regulation *in vivo*, possibly functioning as a docking site facilitating the interaction with partner proteins [47,94]. Accordingly, its importance was also confirmed for the interactions of Grx4 with Fep1 and Php4, two transcriptional regulators of iron homeostasis in *S. pombe* (see Section 4.3) [95,96] and for the demonstrated role in actin cytoskeleton organization [97]. Interestingly, all these functions do not require the remnant cysteine of the Trx-like active site signature [47,97].

From their specific subcellular localization and their specific properties, multidomain class II Fe–S Grxs represents a distinct functional group [47]. Previous studies assigned numerous functions to these eukaryote specific proteins (Table 1). For example, yeast Grx3 and Grx4 are involved in the polarization of actin cytoskeleton, thus contributing to oxidative stress resistance [97]. Human Grx3, which was originally identified as interacting with the protein kinase C- θ [98], is involved in various signalling pathways [99–101]. In *A. thaliana*, GrxS17 is associated to the temperature-dependent post-embryonic development through the modulation of auxin response [91]. While these functions do not necessarily link them to iron metabolism, other studies have reported that, at least in some organisms, multidomain Grxs are in fact directly or indirectly involved in the sensing of iron status and in the cellular distribution of iron.

Most multidomain Grxs tested so far (ScGrx3, ScGrx4, poplar and Arabidopsis GrxS17 and human Grx3) are able to restore the deficiency of yeast *grx5* mutant when they are expressed in mitochondria [36,93,102]. These data suggested that these Grxs could fulfill a carrier function similar to Grx5 isoforms, i.e., to accept an Fe–S cluster from a donor and to transfer it to an acceptor. Strikingly, the maturation of holo-Grx3 is only dependent on the mitochondrial ISC assembly machinery but not on the cytosolic CIA machinery system [103]. Indeed, in the absence of two early-acting CIA components, Nbp35 and Dre2, iron binding to Grx3/4 unexpectedly increased rather than decreased [104]. By analogy to the Fe–S cluster accumulation on the mitochondrial Isu1 in the absence of Grx5, the absence of recipient proteins as Nbp35 might have led to the accumulation of Fe–S loaded Grx3/4 forms. These observations clearly make these Grxs as ideal candidates linking the ISC and CIA machineries by receiving the mitochondrial signal exported from mitochondria by ATM transporters. Whether mitoNEET, an Fe–S protein present in the outer membrane of mitochondria is also involved remains to be determined.

Because of this central position, diverse phenotypes have been described for yeast *grx3* and *grx4* mutant strains (Table 1). Besides their involvement in Aft1/2-dependent iron sensing (detailed below), an independent function in the regulation of intracellular Fe trafficking was suggested. Indeed, the deletion of both Grx3 and 4 in the W303 genetic background is lethal [104]. Using a conditional mutant strain, it was shown that all iron-requiring reactions in cytosol, mitochondria and nucleus are affected. Despite the induction of Aft1-dependent iron uptake, the Grx3 and 4 depletion also leads to the impairment of several mitochondrial iron-dependent proteins such as complexes II and III, the mitochondrial Fe–S protein aconitase, but also of cytosolic proteins such as the heme-containing catalase [104]. In addition, the activity of several proteins containing di-iron centers such as the cytosolic ribonucleotide reductase (RNR), the mitochondrial mono-oxygenase Coo7 are also strongly decreased [104,105]. These Grx3/4 depleted cells also displayed a decreased iron level in mitochondria and an increased iron level in the cytosol respectively. The lower iron level in mitochondria is quite surprising since previous studies reported that defects in mitochondrial Fe–S cluster biogenesis were rather associated to higher iron levels [106]. Altogether, these data indicate that, in *S. cerevisiae*, Grx3 and 4 facilitate the correct assembly of several types of iron containing centers in various proteins. The exact biochemical role of these Grxs is however unclear. Since the mutation of the active site cysteine abolished the ability of these Grxs to function in iron regulation and trafficking, the role might be either related to their ability to bind an Fe–S cluster, which was proved to occur *in vivo* or to its inability to mediate GSH-dependent reactions [47,104]. Measuring the GSH levels and its redox state in the various subcellular compartments would be very informative.

In vertebrates, a crucial role of the cytosolic Grx3 in cellular iron homeostasis was also observed [107]. The silencing of Grx3 in human HELA cells decreased the activity of several cytosolic Fe–S proteins and these Grx3-deficient cells displayed features characteristic of iron starvation. Moreover, the deletion of Grx3 in zebrafish impaired heme biosynthesis as exemplified by the observed defects in the maturation of hemoglobin during embryonic development. All these results suggest that the function of cytosolic multidomain class II Fe–S Grxs in iron homeostasis could be conserved between yeast and vertebrates despite human Grx3 is unable to functionally complement the corresponding yeast mutant [47].

The absence of multidomain Grxs in prokaryotes raises the question of whether a similar Grx controlled Fe regulation system exists and whether this role is played by monodomain class II Fe–S Grxs. As mentioned above, the role of *E. coli* Grx4 is rather associated to the maturation of Fe–S clusters in connexion with the SUF machinery. However, the described interaction of *E. coli* Grx4 with BolA [80], which rather suggests sensing or regulatory roles, may complicate a bit the picture. Nevertheless, there is no evidence to date for a direct relationship

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

11

with Fur, the major iron regulator in *E. coli*. In *Sinorhizobium meliloti*, deletion of *grx2* coding for the only class II Fe–S Grx leads to defects in the maturation of Fe–S proteins and to an increase in the intracellular iron content, but also to the deregulation of RirA, which has analogous roles to Aft1, regulating notably genes involved in iron uptake [108]. This suggests dual functions in the sensing of the cellular iron status and in the maturation of Fe–S proteins.

4.2. Implication of BolA in the Grx-mediated Aft1/2 regulation in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae*, the iron metabolism is controlled at the transcriptional level by two major transcription factors, Aft1/2 constituting the sensing system under low-iron conditions and Yap5 representing the sensing system in response to high-iron conditions (reviewed in [109]). Aft1 and its paralog Aft2 are involved in the response to iron deficiency by activating the iron regulon i.e., genes coding for proteins involved in iron uptake and intracellular sequestration and in mitochondrial iron metabolism, whereas Yap5 only regulates the expression of four genes, one of which is *grx4*, suggesting a cross-link between both systems [110]. However, the activation mechanisms seem different since both Grx3 and Grx4 are required to control the Aft1/2 activity [104,111–113], whereas they are apparently not implicated in the regulation of Yap5 activity [114].

The interaction between Aft1 and Grx3 was initially discovered via a high-throughput yeast two-hybrid approach [115]. Then, the study of simple *grx3* or *grx4* mutants revealed an overloading of intracellular iron and the constitutive activation of iron regulon [112,113] and this was confirmed for a *grx3grx4* double mutant [104]. As already mentioned, cells defective for core components of the mitochondrial ISC machinery or mutated for *atm1* also exhibited a constitutive expression of the iron regulon [70,111,116]. Thus, it suggested that the inhibition of Aft1/2 necessitates the transmission of signal dependent on the ISC and ISC export machineries and that is relayed by Grxs [117]. A more complete picture of the molecular mechanism responsible for this regulation has been obtained recently and is detailed below.

Under low-iron conditions, Aft1 is localized in the nucleus where it is able to promote gene transcription, whereas under iron-sufficient conditions, Aft1 is inactive being exported to the cytoplasm by interaction with the nuclear exporter Msn5 [118,119]. Nevertheless although Aft1 remained in the nucleus in a yeast *msn5* mutant, its activity was still suppressed in iron-replete conditions which suggested that Aft1 dissociation from DNA requires an additional step [117]. In fact, using a genetic screen designed to identify genes that regulate the iron regulon, it has been shown that Grx3 and Grx4 were involved in a protein complex also comprising two cytosolic proteins named Fra1 (Fe repressor of activation 1), an aminopeptidase P-like and Fra2 (Fe repressor of activation 2), a BolA-like protein, the depletion of which also led to an increased transcription of the iron regulon [111]. The isolation of Fra2 was consistent with the iron homeostasis defects previously observed for a *fra2* mutant [120].

Subsequently, several studies have reported that, besides the capacity of Grx3/4 to bind an Fe–S cluster into homodimers, they can also form [2Fe–2S] cluster-bridging heterodimeric complexes with Fra2 [94]. Interestingly, Fra2 converted the [2Fe–2S] Grx3 homodimer to [2Fe–2S] Grx3–Fra2 heterodimer, this conversion being thermodynamically and kinetically favored [121]. From the biochemical and spectroscopic characterizations of these clusters, it was concluded that the ligation involved the cysteinyl residues of the CGFS active site signature and of one glutathione molecule and a histidyl residue from Fra2, whereas the nature of the fourth ligand was unknown [94, 121]. Recent spectroscopic and structural characterization of a GrxS14–BolA1 heterocomplex involving Arabidopsis proteins indicated that an additional histidyl residue from BolA1 is the fourth ligand, forming a Rieske-type Fe–S cluster [122]. However, BolA1 and Fra2 do not belong to the same phylogenetic clade and Fra2 does not possess

the equivalent His residue. Instead, it was proposed that a cysteine residue found in the same loop could constitute the fourth ligand for members of the Fra2 clade.

The *in vivo* validation that the mutation of the conserved C-terminal His103 destabilized the Fe–S cluster and prevented the iron-dependent inhibition of Aft1 [121], confirmed that the [2Fe–2S] Grx3/4–Fra2 heterodimer is indispensable for Aft1 inhibition. The understanding of the precise molecular mechanism involved in the regulation of Aft1/2 came from the report that Aft2 can bind a [2Fe–2S] cluster into a dimer and that it only interacts with and accepts an Fe–S cluster from a [2Fe–2S] loaded Fra2–Grx3 complex but not from a [2Fe–2S] cluster bound form of a Grx3–Grx3 homodimer [123]. Overall, it was concluded that the DNA affinity of the [2Fe–2S] loaded Aft2 is decreased, which promotes its nuclear export, preventing as explained above its ability to activate the iron regulon. The fact that Aft1/2 is only partially repressed in the *fra2* mutant under iron-replete conditions suggests that a Grx3/4 holo-homodimer may be able to transfer Fe–S cluster to Aft1/2 *in vivo* although less efficiently [111]. Recently, structural and spectroscopic data on Grx–BolA complexes showed that the apo- and holo-heterodimers formed between both proteins involved different protein regions [122]. This evidence may help in refining the model of Aft1/2 regulation by Grx–BolA heterodimers. Under iron-replete conditions, favoring the formation of holo-heterodimers, the Grx C-terminal region, which was shown to be involved in Aft1 recognition [47], is accessible. Hence, this might allow the recruitment of Aft1/2 and thus the Fe–S cluster transfer to Aft1/2 and its subsequent export from the nucleus. On the contrary, under iron-depleted conditions, the formation of Grx–BolA apo-heterodimers should be favored. In this complex, the Grx C-terminal tail is part of the interaction area with BolA. Thus, the masking of this region likely prevents the interaction with Aft1/2 which promotes its accumulation in nucleus where it can activate the iron regulon [122]. For more complete information on all the Aft1 regulation aspects, we invite the reader to refer to a recent review [109].

To conclude on the role of yeast cytosolic class II Fe–S Grxs in iron metabolism, it is noteworthy that the Fe trafficking and Aft1/2 regulation functions are independent although both require Fe–S cluster binding. Indeed, mutagenesis studies aiming at deciphering the specificity of interaction between Grx4 and Aft1 demonstrated that the replacement of the C-terminal part of *S. cerevisiae* Grx4 by the corresponding region of *Schizosaccharomyces pombe* Grx4 abolished the interaction between Grx4 and Aft1 but did not impair Fe trafficking functions [47].

4.3. Glutaredoxins also control iron homeostasis in *Schizosaccharomyces pombe*

In *S. pombe*, iron homeostasis is essentially regulated by two transcription factors Fep1 and Php4 [124,125]. Under iron-replete conditions, Fep1 represses the expression of iron uptake and transport genes to avoid iron overload. On the contrary, under low-iron conditions, Php4 represses the expression of genes involved in iron-dependent metabolic pathways [126]. In addition, the expression of these two transcription factors is reciprocally controlled allowing a direct cross-talk between iron uptake and iron utilization [126,127]. Interestingly, both repressors are controlled at the post-translational level by Grx4, the only cytosolic class II Fe–S Grx in *S. pombe* [128]. Indeed, genetic studies of the *grx4* mutant revealed that Php4- and Fep1-regulated genes are constitutively repressed and that Php4 was constantly localized in the nucleus [95,96,129,130]. Similarly, it was shown that Fep1 is also constitutively active and bound to its target gene promoters in a *fra2* *S. pombe* mutant [131].

The physical interaction of Grx4 with Fep1 and Php4 was confirmed by yeast two hybrid assays, bimolecular fluorescence complementation and co-immunoprecipitation studies and it was shown by mutagenesis to depend on the cysteine of the Grx domain [95,96,129,130]. Hence, these results suggest that the presence of an Fe–S cluster on Grx4 is indispensable for its ability to interact with Fep1 and Php4. However,

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

12

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

the physiological and likely molecular mechanisms involving the Fe–S binding Grx4 homodimer in the regulation of Fep1 and Php4 should be different, since Grx4 inhibits Fep1 under low-iron conditions and Php4 under iron-replete conditions [124]. In the case of the Fep1 interaction with Grx4 and Fra2, it was shown that the Trx domain of Grx4 strongly interacts with the C-terminal part of Fep1 and that Fra2 interacts with Fep1 independently of the cellular iron status [95,131]. On the contrary, the Grx domain of Grx4 interacts with the N-terminal part of Fep1 only under iron-limiting conditions [95,129]. Finally, it was demonstrated that the Fep1–Fra2 interaction occurs in nuclei and that both proteins form a complex with Grx4 [131]. Hence, all these results seem to indicate that the regulation of Fep1 by both Grx4 and Fra2 in *S. pombe* resembles the regulation of Aft1/2 by the Grx3/4–Fra2 complex in *S. cerevisiae*. However, considering that iron binding is not necessary for Fep1 DNA binding and that there is no demonstration of an Fe–S cluster bound to Fep1 [95,129], the requirement of an holo-Grx4 for regulating Fep1 activity implies that it does not involve an Fe–S cluster transfer between both proteins but that the interaction of Fep1 with Fra2 and/or holoGrx4 would trigger conformational changes on Fep1, favoring its DNA binding and thus its repressive activity [124].

In contrast to Fep1, the regulation of Php4 activity by monothiol Grx4 might be different from the Grx3/Grx4 regulation of Aft1/Aft2 in *S. cerevisiae*. As in the case of Fep1–Grx4 interaction, the Trx domain of Grx4 is constitutively associated with Php4 whatever the cellular iron status [96]. On the contrary, the interaction between the Grx domain of Grx4 and Php4 occurs under high-iron conditions. This Php4–Grx4 interaction is abolished when the cysteine of the CGFS signature or when two conserved cysteine residues in Php4 are mutated [96]. Hence, it has been proposed that under high-iron conditions, Grx4 and Php4 may form an holoheterodimer preventing the binding of Php4 to the Php2/Php3/Php5 complex and favoring its export from the nucleus by the Crm1 exportin [96]. From all these data, a model for the iron-dependent control of gene expression in *S. pombe* involving notably Fep1, Php4 and Grx4 but not Fra2 has been proposed recently. We invite the reader to refer to this review for more exhaustive details about these molecular mechanisms [124].

4.4. Evolutionary conservation of the Grx–BoLA interaction and possible additional roles

There is a plethora of evidence that the class II Fe–S Grx–BoLA functional relationship is conserved in both prokaryotes and eukaryotes. Indeed, both genes are found in adjacent position in several prokaryote genomes and a strong co-occurrence exists between both genes [13,132]. Moreover, hybrid proteins where a BoLA domain is fused to a Grx domain are present in some proteobacteria of the Methylococcales order. Besides these genomic evidences, high-throughput approaches experimentally confirmed a physical interaction for *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *E. coli* and *A. thaliana* proteins [133–138]. During the last five years, the Grx–BoLA interaction has been more extensively studied using targeted biochemical and cellular approaches, focusing in particular on the molecular and structural determinants involved in the formation of Grx–BoLA holo-heterodimer [87,94,111]. However, despite the demonstration that proteins from *E. coli*, human and *A. thaliana* can form [2Fe–2S] cluster-bridged heterodimer [80,139,140], their involvement in the regulation of iron homeostasis has been demonstrated only in *S. cerevisiae* whereas it awaits a firm confirmation in *S. pombe* and in other organisms.

On the other hand, several reports suggest that the interaction between some Grx and BoLA, essentially the protein couples present in organelles (mitochondria and chloroplasts), could fulfill other functions notably related to the maturation of Fe–S clusters and its regulation. Indeed, there are 3 BoLA isoforms in *S. cerevisiae* 4 in *S. pombe*, 2 in *Homo sapiens* and 3 in plants (4 by including the BoLA domain of SufE1 protein) [87,141]. In *S. pombe*, it seems that they are not interchangeable since, among the four BoLA-like proteins, only *fra2* deletion

caused defects in the transcriptional response to iron starvation [131]. In human, BoLA1 and BoLA3 are found in mitochondria together with Grx5 [66,142]. While the role of BoLA1 seems associated to the control of the mitochondrial thiol redox potential, BoLA3 would participate to the maturation of Fe–S proteins. The demonstration that Grx–BoLA heterodimers can give or receive Fe–S clusters supports a widespread distribution of the latter role. Indeed, *in vitro* transfer experiments showed an efficient [2Fe–2S] cluster transfer from an *A. vinelandii* A-type protein (^{NIF}IscA) to a *S. cerevisiae* Fra2–Grx3 apo heterodimer [78]. On the other hand, although the Fe–S cluster transfer occurs for regulatory purposes, a *S. cerevisiae* Fra2–Grx3 heterodimer is able to transfer its Fe–S cluster to an apoAft2 [123]. Finally, as explained in the Section 3.2, the presence of a BoLA domain in plant SufE1 proteins raises the possibility that it contributes to a Grx-controlled regulation mechanism allowing to modulate SUF functioning.

5. Conclusions and perspectives

Considering the variability found in the domain organization of Grxs, the existence of numerous Fe–S bound Grxs and BoLAs in different sub-cellular compartments, and the capacity of Grxs to integrate various types of Fe–S clusters alone or with BoLA, the roles associated to these Grxs are very diverse. *In vitro* analyses dealing in particular with the spectroscopic and structural characterization of recombinant proteins are still required since mutational analyses indicated that it is fairly impossible to predict from the primary sequence, which Grxs can assemble Fe–S clusters. However, an important aspect in the future will be to validate these *in vitro* observations by demonstrating the physiological relevance of these forms. In this respect, the observation that Grx functions are impaired when the cysteine of the active site signature is mutated is insufficient as it affects both the oxidoreductase and Fe–S cluster binding properties. In addition, although showing the presence of Fe–S clusters bound to Grxs *in vivo* is already a good start, evaluating the relative proportion of apo vs holoforms would be more valuable. However, this aspect currently encounters major technical problems.

Acknowledgements

The UMR1136 is supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d’Avenir” program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE).

References

- [1] A. Holmgren, Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73 (1976) 2275–2279.
- [2] T.C. Laurent, E.C. Moore, P. Reichard, Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from Escherichia coli B, J. Biol. Chem. 239 (1964) 3436–3444.
- [3] A.P. Fernandes, M. Fladvad, C. Berndt, C. Andresen, C.H. Lillig, P. Neubauer, M. Sunnerhagen, A. Holmgren, A. Vlamis-Gardikas, A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from Escherichia coli can serve as a substrate for thioredoxin reductase, J. Biol. Chem. 280 (2005) 24544–24552.
- [4] C. Johansson, C.H. Lillig, A. Holmgren, Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase, J. Biol. Chem. 279 (2004) 7537–7543.
- [5] M. Zaffagnini, L. Michelet, V. Massot, P. Trost, S.D. Lemaire, Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin, J. Biol. Chem. 283 (2008) 8868–8876.
- [6] E. Gelhaye, N. Roubier, J.P. Jacquot, Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction, FEBS Lett. 555 (2003) 443–448.
- [7] C.S. Koh, N. Navrot, C. Didierjean, N. Roubier, M. Hirasawa, D.B. Knaff, G. Wingsle, R. Samian, J.P. Jacquot, C. Corbier, E. Gelhaye, An atypical catalytic mechanism involving three cysteines of thioredoxin, J. Biol. Chem. 283 (2008) 23062–23072.
- [8] H. Zhang, Y. Du, X. Zhang, J. Lu, A. Holmgren, Glutaredoxin 2 reduces both thioredoxin 2 and thioredoxin 1 and protects cells from apoptosis induced by auranofin and 4-hydroxynonenal, Antioxid. Redox Signal. 21 (2014) 669–681.
- [9] I. Dalle-Donne, R. Rossi, G. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans, Trends Biochem. Sci. 34 (2009) 85–96.

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, Biochim. Biophys. Acta (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

13

- [10] J.J. Mielay, M.M. Gallogly, S. Qanungo, E.A. Sabens, M.D. Shelton, Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 1941–1988.
- [11] M. Zaffagnini, M. Bedhomme, C.H. Marchand, S. Morisse, P. Trost, S.D. Lemaire, Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 567–586.
- [12] M.T. Rodríguez-Manzanque, J. Ros, E. Cabisco, A. Sorribas, E. Herrero, Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 8180–8190.
- [13] J. Couturier, J.P. Jacquot, N. Roubier, Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2539–2557.
- [14] R. Alves, E. Vilaprinyo, A. Sorribas, E. Herrero, Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins, *BMC Evol. Biol.* 9 (2009) 66.
- [15] N. Roubier, S.D. Lemaire, J.P. Jacquot, The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 143–166.
- [16] E. Herrero, M.A. de la Torre-Ruiz, Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 1518–1530.
- [17] J. Couturier, J.P. Jacquot, N. Roubier, Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 518.
- [18] E.M. Allen, J.J. Mielay, Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins, *Antioxid. Redox Signal.* 17 (2012) 1748–1763.
- [19] M.A. Comini, R.L. Krauth-Siegel, M. Bellanda, Mono- and dithiol glutaredoxins in the trypanothione-based redox metabolism of pathogenic trypanosomes, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 708–722.
- [20] E.M. Hanschmann, J.R. Godoy, C. Berndt, C. Hudemann, C.H. Lillig, Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 1539–1605.
- [21] Y. Meyer, C. Belin, V. Delorme-Hinoux, J.P. Reichheld, C. Riondet, Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance, *Antioxid. Redox Signal.* 17 (2012) 1124–1160.
- [22] N. Roubier, Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly, *New Phytol.* 186 (2010) 365–372.
- [23] C.H. Lillig, C. Berndt, O. Vergnolle, M.E. Lonn, C. Hudemann, E. Bill, A. Holmgren, Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 8168–8173.
- [24] Y. Feng, N. Zhong, N. Roubier, T. Hase, M. Kusunoki, J.P. Jacquot, C. Jin, B. Xia, Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site, *Biochemistry* 45 (2006) 7998–8008.
- [25] N. Roubier, H. Unno, S. Bandyopadhyay, L. Masip, S.K. Kim, M. Hirasawa, J.M. Gualberto, V. Lattard, M. Kusunoki, D.B. Knaff, G. Georgiou, T. Hase, M.K. Johnson, J.P. Jacquot, Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe–2S] cluster in poplar glutaredoxin C1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 7379–7384.
- [26] C. Berndt, C. Hudemann, E.M. Hanschmann, R. Axelsson, A. Holmgren, C.H. Lillig, How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid. Redox Signal.* 9 (2007) 151–157.
- [27] C. Johansson, K.L. Kavanagh, O. Gileadi, U. Oppermann, 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 (2007) 3077–3082.
- [28] J. Couturier, E. Stroher, A.N. Albetel, T. Roret, M. Muthuramalingam, L. Tarrago, T. Seidel, P. Tsan, J.P. Jacquot, M.K. Johnson, K.J. Dietz, C. Didierjean, N. Roubier, Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 27515–27527.
- [29] N. Mesecke, S. Mittler, E. Eckers, J.M. Herrmann, M. Deponce, Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins, *Biochemistry* 47 (2008) 1452–1463.
- [30] M. Luo, Y.L. Jiang, X.X. Ma, Y.J. Tang, Y.X. He, J. Yu, R.G. Zhang, Y. Chen, C.Z. Zhou, Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6, *J. Mol. Biol.* 398 (2010) 614–622.
- [31] L. Brautigam, C. Johansson, K. Kubsch, M.A. McDonough, E. Bill, A. Holmgren, C. Berndt, An unusual mode of iron-sulfur-cluster coordination in a teleost glutaredoxin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436 (2013) 491–496.
- [32] S. Ceylan, V. Seidel, N. Ziebart, C. Berndt, N. Dirdjaja, R.L. Krauth-Siegel, The dithiol glutaredoxins of African trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 35224–35237.
- [33] J. Couturier, C.S. Koh, M. Zaffagnini, A.M. Winger, J.M. Gualberto, C. Corbier, P. Decottignies, J.P. Jacquot, S.D. Lemaire, C. Didierjean, N. Roubier, Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 9299–9310.
- [34] K.G. Hoff, S.J. Culler, P.Q. Nguyen, R.M. McGuire, J.J. Silberg, C.D. Smolke, In vivo fluorescent detection of Fe–S clusters coordinated by human GRX2, *Chem. Biol.* 16 (2009) 1299–1308.
- [35] L. Wang, B. Ouyang, Y. Li, Y. Feng, J.P. Jacquot, N. Roubier, B. Xia, Glutathione regulates the transfer of iron-sulfur cluster from monothiol and dithiol glutaredoxins to apo ferredoxin, *Protein Cell* 3 (2012) 714–721.
- [36] S. Bandyopadhyay, F. Gama, M.M. Molina-Navarro, J.M. Gualberto, R. Claxton, S.G. Naik, B.H. Huynh, E. Herrero, J.P. Jacquot, M.K. Johnson, N. Roubier, Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters, *EMBO J.* 27 (2008) 1122–1133.
- [37] W. Qi, J.A. Cowan, Mechanism of glutaredoxin-ISU [2Fe–2S] cluster exchange, *Chem. Commun. (Camb.)* 47 (2011) 4989–4991.
- [38] D.W. Lee, D. Kaur, S.J. Chinta, S. Rajagopalan, J.K. Andersen, A disruption in iron-sulfur center biogenesis via inhibition of mitochondrial dithiol glutaredoxin 2 may contribute to mitochondrial and cellular iron dysregulation in mammalian glutathione-depleted dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 2083–2094.
- [39] M.A. Comini, J. Retig, N. Dirdjaja, E.M. Hanschmann, C. Berndt, R.L. Krauth-Siegel, Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 27785–27798.
- [40] T. Iwema, A. Picciocchi, D.A. Traore, J.L. Ferrer, F. Chauvat, L. Jacquamet, Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin, *Biochemistry* 48 (2009) 6041–6043.
- [41] A. Picciocchi, C. Saguez, A. Boussac, C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat, CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe–2S] cluster, *Biochemistry* 46 (2007) 15018–15026.
- [42] L. Banci, D. Brancaccio, S. Ciofi-Baffoni, R. Del Conte, R. Gadeipalli, M. Mikolajczyk, S. Neri, M. Piccoli, J. Winkelmann, [2Fe–2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 6203–6208.
- [43] C. Johansson, A.K. Roos, S.J. Montano, R. Sengupta, P. Filipakopoulos, K. Guo, F. von Delft, A. Holmgren, U. Oppermann, K.L. Kavanagh, The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity, *Biochem. J.* 433 (2011) 303–311.
- [44] P. Haunhorst, C. Berndt, S. Eitner, J.R. Godoy, C.H. Lillig, Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (2010) 372–376.
- [45] B. Manta, C. Pavan, M. Sturlese, A. Medeiros, M. Crispo, C. Berndt, R.L. Krauth-Siegel, M. Bellanda, M.A. Comini, Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 665–682.
- [46] B. Zhang, S. Bandyopadhyay, P. Shakamuri, S.G. Naik, B.H. Huynh, J. Couturier, N. Roubier, M.K. Johnson, Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe3S4] + and [Fe4S4]2+ clusters in addition to [Fe2S2]2+ clusters: spectroscopic characterization and functional implications, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 15153–15164.
- [47] B. Hoffmann, M.A. Uzarska, C. Berndt, J.R. Godoy, P. Haunhorst, C.H. Lillig, R. Lill, U. Muhlenhoff, The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 19–30.
- [48] M.T. Rodríguez-Manzanque, J. Tamarit, G. Belli, J. Ros, E. Herrero, Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 1109–1121.
- [49] D. Shenton, G. Perrone, K.A. Quinn, I.W. Dawes, C.M. Grant, Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16853–16859.
- [50] J. Tamarit, G. Belli, E. Cabisco, E. Herrero, J. Ros, Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25745–25751.
- [51] U. Muhlenhoff, J. Gerber, N. Richhardt, R. Lill, Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p, *EMBO J.* 22 (2003) 4815–4825.
- [52] C. Camaschella, A. Campanella, L. De Falco, L. Boschetto, R. Merlini, L. Silvestri, S. Levi, A. Iolascon, The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload, *Blood* 110 (2007) 1353–1358.
- [53] R.A. Wingert, J.L. Galloway, B. Barut, H. Foott, P. Fraenkel, J.L. Axe, G.J. Weber, K. Dooley, A.J. Davidson, B. Schmid, B.H. Paw, G.C. Shaw, P. Kingsley, J. Palis, H. Schubert, O. Chen, J. Kaplan, L.I. Zon, Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis, *Nature* 436 (2005) 1035–1039.
- [54] H. Ye, S.Y. Jeong, M.C. Ghosh, G. Kovtunovich, L. Silvestri, D. Ortello, N. Uchida, J. Tisdale, C. Camaschella, T.A. Rouault, Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1749–1761.
- [55] P.R. Baker II, M.W. Friederich, M.A. Swanson, T. Shaikh, K. Bhattacharya, G.H. Sharer, J. Aicher, G. Creadon-Swindell, E. Geiger, K.N. MacLean, W.T. Lee, C. Deshpande, M.L. Freckmann, L.Y. Shih, M. Wasserstein, M.B. Rasmussen, A.M. Lund, P. Procopis, J.M. Cameron, B.H. Robinson, G.K. Brown, R.M. Brown, A.G. Compton, C.L. Dieckmann, R. Collard, C.R. Coughlin II, E. Spector, M.F. Wempe, J.L. Van Hove, Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in UAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5, *Brain* 137 (2014) 366–379.
- [56] R. Lill, B. Hoffmann, S. Molik, A.J. Pierik, N. Rietzschel, O. Stehling, M.A. Uzarska, H. Weber, C. Wilbrecht, U. Muhlenhoff, The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 1491–1508.
- [57] F. Colin, A. Martelli, M. Clemancey, J.M. Latour, S. Gambarelli, L. Zeppeieri, C. Birck, A. Page, H. Puccio, S. Ollagnier de Choudens, Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 733–740.
- [58] J.H. Kim, R.O. Frederick, N.M. Reinen, A.T. Troupis, J.L. Markley, [2Fe–2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 8117–8120.
- [59] R. Yan, P.V. Konarev, C. Iannuzzi, S. Adinolfi, B. Roche, G. Kelly, L. Simon, S.R. Martin, B. Py, F. Barras, D.J. Svergun, A. Pastore, Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 24777–24787.

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, *Biochim. Biophys. Acta* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

14

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

- [60] U. Mühlenhoff, N. Richter, O. Pines, A.J. Pierik, R. Lill, Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe–4S] proteins, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41205–41216.
- [61] A. Navarro-Sastre, F. Tort, O. Stehling, M.A. Uzarska, J.A. Arranz, M. Del Toro, M.T. Labayru, J. Landa, A. Font, J. Garcia-Villoria, B. Merinero, M. Ugarte, J.G. Gutierrez-Solana, J. Campistol, A. Garcia-Cazorla, J. Vaquerizo, E. Riudor, P. Briones, O. Elpeleg, A. Ribes, R. Lill, A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe–S proteins, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 656–667.
- [62] M.A. Uzarska, R. Dutkiewicz, S.A. Freibert, R. Lill, U. Mühlenhoff, The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation, *Mol. Biol. Cell* 24 (2013) 1830–1841.
- [63] P. Shakamuri, B. Zhang, M.K. Johnson, Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe2S2] clusters assembled on IscU scaffold proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 15213–15216.
- [64] F. Vilella, R. Alves, M.T. Rodriguez-Manzanque, G. Belli, S. Swaminathan, P. Sunnerhagen, E. Herrero, Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron–sulfur cluster assembly, *Comp. Funct. Genomics* 5 (2004) 328–341.
- [65] K.D. Kim, W.H. Chung, H.J. Kim, K.C. Lee, J.H. Roe, Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe–S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe–S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (2010) 467–472.
- [66] J.M. Cameron, A. Janer, V. Levandovskiy, N. Mackay, T.A. Rouault, W.H. Tong, I. Ogilvie, F.A. Shoubridge, B.H. Robinson, Mutations in iron–sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 488–495.
- [67] T.B. Haack, B. Rolinski, R. Haberberger, F. Zimmermann, J. Schum, V. Streckler, E. Graf, U. Athling, T. Hoppen, I. Wittig, W. Sperl, P. Freisinger, J.A. Mayr, T.M. Strom, T. Meitinger, H. Prokisch, Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings, *J. Inher. Metab. Dis.* 36 (2013) 55–62.
- [68] C. Gelling, I.W. Dawes, N. Richhardt, R. Lill, U. Mühlenhoff, Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 1851–1861.
- [69] L.K. Beltschmidt, H.M. Puccio, Mammalian Fe–S cluster biogenesis and its implication in disease, *Biochimie* 100 (2014) 48–60.
- [70] J.C. Rutherford, L. Ojeda, J. Balk, U. Mühlenhoff, R. Lill, D.R. Winge, Activation of the iron regulon by the yeast Atf1/Atf2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron–sulfur protein biogenesis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10135–10140.
- [71] J.Y. Lee, J.G. Yang, D. Zhirnitsky, O. Lewinson, D.C. Rees, Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter, *Science* 343 (2014) 1133–1136.
- [72] W. Qi, J. Li, J.A. Cowan, A structural model for glutathione-complexed iron–sulfur cluster as a substrate for ABCB7-type transporters, *Chem. Commun. (Camb.)* 50 (2014) 3795–3798.
- [73] V. Srinivasan, A.J. Pierik, R. Lill, Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1, *Science* 343 (2014) 1137–1140.
- [74] J. Balk, M. Pilon, Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants, *Trends Plant Sci.* 16 (2011) 218–226.
- [75] J. Balk, T.A. Schaefer, Iron cofactor assembly in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 65 (2014) 125–153.
- [76] J. Couturier, B. Touraine, J.F. Briat, F. Gaymard, N. Rouhier, The iron–sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 259.
- [77] N.H. Cheng, J.Z. Liu, A. Brock, R.S. Nelson, K.D. Hirschi, AtGRXcp, an Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26280–26288.
- [78] D.T. Mapolelo, B. Zhang, S. Randeniya, A.N. Albetel, H. Li, J. Couturier, C.E. Outten, N. Rouhier, M.K. Johnson, Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe–S cluster trafficking, *Dalton Trans.* 42 (2013) 3107–3115.
- [79] H. Gao, S. Subramanian, J. Couturier, S.G. Naik, S.K. Kim, T. Leustek, D.B. Knaff, H.C. Wu, F. Vignols, B.H. Huynh, N. Rouhier, M.K. Johnson, Arabidopsis thaliana Nfu2 accommodates [2Fe–2S] or [4Fe–4S] clusters and is competent for in vitro maturation of chloroplast [2Fe–2S] and [4Fe–4S] cluster-containing proteins, *Biochemistry* 52 (2013) 6633–6645.
- [80] N. Yeung, B. Gold, N.L. Liu, R. Prathapam, H.J. Sterling, E.R. Williams, G. Butland, The E. coli monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes, *Biochemistry* 50 (2011) 8957–8969.
- [81] G. Butland, J.M. Peregrin-Alvarez, J. Li, W. Yang, X. Yang, V. Canadien, A. Starostine, D. Richards, B. Beattie, N. Krogan, M. Davey, J. Parkinson, J. Greenblatt, A. Emili, Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli, *Nature* 433 (2005) 531–537.
- [82] F.W. Outten, O. Djamn, G. Storz, A suf operon requirement for Fe–S cluster assembly during iron starvation in Escherichia coli, *Mol. Microbiol.* 52 (2004) 861–872.
- [83] S. Boutigny, A. Saini, E.E. Baidoo, N. Yeung, J.D. Keasling, G. Butland, Physical and functional interactions of a monothiol glutaredoxin and an iron sulfur cluster carrier protein with the sulfur-donating radical S-adenosyl-L-methionine enzyme MiaB, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 14200–14211.
- [84] H.M. Bolstad, M.J. Wood, An in vivo method for characterization of protein interactions within sulfur trafficking systems of E. coli, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 6740–6751.
- [85] X.M. Xu, S.G. Moller, AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in Arabidopsis, *EMBO J.* 25 (2006) 900–909.
- [86] H. Ye, S.E. Abdel-Ghany, T.D. Anderson, E.A. Pilon-Smits, M. Pilon, CpSufE activates the cysteine desulfurase CpnifS for chloroplastic Fe–S cluster formation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8958–8969.
- [87] J. Couturier, H.C. Wu, T. Dhalenne, H. Pegéot, D. Sudre, J.M. Gualberto, J.P. Jacquot, F. Gaymard, F. Vignols, N. Rouhier, Monothiol glutaredoxin–Bola interactions: redox control of Arabidopsis thaliana Bola2 and SufE1, *Mol. Plant* 7 (2014) 187–205.
- [88] N.D. Lanz, S.J. Booker, Identification and function of auxiliary iron–sulfur clusters in radical SAM enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 1824 (2012) 1196–1212.
- [89] N. Isakov, S. Witte, A. Altman, PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 537–539.
- [90] Y. Babichev, N. Isakov, Tyrosine phosphorylation of PICOT and its translocation to the nucleus in response of human T cells to oxidative stress, *Adv. Exp. Med. Biol.* 495 (2001) 41–45.
- [91] N.H. Cheng, J.Z. Liu, X. Liu, Q. Wu, S.M. Thompson, J. Lin, J. Chang, S.A. Whitham, S. Park, J.D. Cohen, K.D. Hirschi, Arabidopsis monothiol glutaredoxin, AtGRX17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 20398–20406.
- [92] R. Lopreato, S. Facchin, G. Sartori, G. Arrigoni, S. Casonato, M. Ruzzene, L.A. Pinna, G. Carignani, Analysis of the interaction between pD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of Saccharomyces cerevisiae, and the Grx4 glutaredoxin, *Biochem. J.* 377 (2004) 395–405.
- [93] M.M. Molina, G. Belli, M.A. de la Torre, M.T. Rodriguez-Manzanque, E. Herrero, Nuclear monothiol glutaredoxins of Saccharomyces cerevisiae can function as mitochondrial glutaredoxins, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51923–51930.
- [94] H. Li, D.T. Mapolelo, N.N. Dingra, S.G. Naik, N.S. Lees, B.M. Hoffman, P.J. Riggs-Gelasco, B.H. Huynh, M.K. Johnson, C.E. Outten, The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe–2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation, *Biochemistry* 48 (2009) 9569–9581.
- [95] M. Jbel, A. Mercier, S. Labbe, Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1, *Eukaryot. Cell* 10 (2011) 629–645.
- [96] P. Vachon, A. Mercier, M. Jbel, S. Labbe, The monothiol glutaredoxin Grx4 exerts an iron-dependent inhibitory effect on Php4 function, *Eukaryot. Cell* 11 (2012) 806–819.
- [97] N. Pujol-Carrion, M.A. de la Torre-Ruiz, Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of Saccharomyces cerevisiae play a role in actin dynamics through their Trx domains, which contributes to oxidative stress resistance, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 7826–7835.
- [98] S. Witte, M. Villalba, K. Bi, Y. Liu, N. Isakov, A. Altman, Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 1902–1909.
- [99] C. Brynczka, P. Labhart, B.A. Merrick, NGF-mediated transcriptional targets of p53 in PC12 neuronal differentiation, *BMC Genomics* 8 (2007) 139.
- [100] D. Jeong, H. Cha, E. Kim, M. Kang, D.K. Yang, J.M. Kim, P.O. Yoon, J.G. Oh, O.Y. Berner, S. Sakata, T.T. Le, L. Cui, Y.H. Lee, H. Kim, S.H. Woo, R. Liao, R.J. Hajjar, W.J. Park, PICOT inhibits cardiac hypertrophy and enhances ventricular function and cardiomyocyte contractility, *Circ. Res.* 99 (2006) 307–314.
- [101] D. Jeong, J.M. Kim, H. Cha, J.G. Oh, J. Park, S.H. Yun, E.S. Ju, E.S. Jeon, R.J. Hajjar, W.J. Park, PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin–NFAT signaling, *Circ. Res.* 102 (2008) 711–719.
- [102] N.H. Cheng, W. Zhang, W.Q. Chen, J. Jin, X. Cui, N.F. Butte, L. Chan, K.D. Hirschi, A mammalian monothiol glutaredoxin, Grx3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis, *FEBS J.* 278 (2011) 2525–2539.
- [103] D.J. Netz, J. Mascarenhas, O. Stehling, A.J. Pierik, R. Lill, Maturation of cytosolic and nuclear iron–sulfur proteins, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 303–312.
- [104] U. Mühlenhoff, S. Molik, J.R. Godoy, M.A. Uzarska, N. Richter, A. Seubert, Y. Zhang, J. Stubbe, F. Pierrel, E. Herrero, C.H. Lillig, R. Lill, Cytosolic monothiol glutaredoxin function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron–sulfur cluster, *Cell Metab.* 12 (2010) 373–385.
- [105] Y. Zhang, L. Liu, X. Wu, X. An, J. Stubbe, M. Huang, Investigation of in vivo ferric tyrosyl radical formation in Saccharomyces cerevisiae Rnr2 protein: requirement of Rnr4 and contribution of Grx3/4 and Dre2 proteins, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41499–41509.
- [106] R. Lill, U. Mühlenhoff, Maturation of iron–sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases, *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 669–700.
- [107] P. Haunhorst, E.M. Hanschmann, L. Brautigam, O. Stehling, B. Hoffmann, U. Mühlenhoff, R. Lill, C. Berndt, C.H. Lillig, Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation, *Mol. Biol. Cell* 24 (2013) 1895–1903.
- [108] S.M. Benaymina, F. Baldacci-Cresp, J. Couturier, K. Chibani, J. Hopkins, A. Bekki, P. de Lajudie, N. Rouhier, J.P. Jacquot, G. Alloing, A. Pupo, P. Frendo, Two Sinorhizobium meliloti glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation, *Environ. Microbiol.* 15 (2013) 795–810.
- [109] C.E. Outten, A.N. Albetel, Iron sensing and regulation in Saccharomyces cerevisiae: Ironing out the mechanistic details, *Curr. Opin. Microbiol.* 16 (2013) 662–668.
- [110] C. Pimentel, C. Vicente, R.A. Menezes, S. Caetano, L. Carreto, C. Rodrigues-Pousada, The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability, *PLoS One* 7 (2012) e37434.
- [111] A. Kumanovics, O.S. Chen, L. Li, D. Bagley, E.M. Adkins, H. Lin, N.N. Dingra, C.E. Outten, G. Keller, D. Winge, D.M. Ward, J. Kaplan, Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron–sulfur cluster synthesis, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 10276–10286.
- [112] L. Ojeda, G. Keller, U. Mühlenhoff, J.C. Rutherford, R. Lill, D.R. Winge, Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Atf1 transcriptional activator in Saccharomyces cerevisiae, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 17661–17669.

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, *Biochim. Biophys. Acta* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2014.09.018>

ARTICLE IN PRESS

J. Couturier et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2014) xxx–xxx

15

- [113] N. Pujol-Carrion, G. Belli, E. Herrero, A. Nogues, M.A. de la Torre-Ruiz, Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 4554–4564.
- [114] L. Li, R. Miao, S. Bertram, X. Jia, D.M. Ward, J. Kaplan, A role for iron–sulfur clusters in the regulation of transcription factor Yap5-dependent high iron transcriptional responses in yeast, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 35709–35721.
- [115] P. Uetz, L. Giot, G. Cagney, T.A. Mansfield, R.S. Judson, J.R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadmodar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, J.M. Rothberg, A comprehensive analysis of protein–protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* 403 (2000) 623–627.
- [116] O.S. Chen, S. Hemenway, J. Kaplan, Inhibition of Fe–S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe–S cluster synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 12321–12326.
- [117] R. Ueta, N. Fujiwara, K. Iwai, Y. Yamaguchi-Iwai, Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression, *Mol. Cell. Biol.* 32 (2012) 4998–5008.
- [118] R. Ueta, N. Fujiwara, K. Iwai, Y. Yamaguchi-Iwai, Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 2980–2990.
- [119] Y. Yamaguchi-Iwai, R. Ueta, A. Fukunaka, R. Sasaki, Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18914–18918.
- [120] E. Lesuisse, S.A. Knight, M. Courel, R. Santos, J.M. Camadro, A. Dancs, Genome-wide screen for genes with effects on distinct iron uptake activities in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 169 (2005) 107–122.
- [121] H. Li, D.T. Mapolelo, N.N. Dingra, G. Keller, P.J. Riggs-Gelasco, D.R. Winge, M.K. Johnson, C.E. Outten, Histidine 103 in Fra2 is an iron–sulfur cluster ligand in the [2Fe–2S] Fra2–Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 867–876.
- [122] T. Roret, P. Tsan, J. Couturier, B. Zhang, M.K. Johnson, N. Rouhier, C. Didierjean, Structural and spectroscopic insights into BolA–glutaredoxin complexes, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 24588–24598.
- [123] C.B. Poor, S.V. Wegner, H. Li, A.C. Dlouhy, J.P. Schuermann, R. Sanishvili, J.R. Hinshaw, P.J. Riggs-Gelasco, C.E. Outten, C. He, Molecular mechanism and structure of the *Saccharomyces cerevisiae* iron regulator Aft2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 4043–4048.
- [124] S. Labbe, M.G. Khan, J.F. Jacques, Iron uptake and regulation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Curr. Opin. Microbiol.* 16 (2013) 669–676.
- [125] S. Labbe, B. Pelletier, A. Mercier, Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Biomol. J.* 20 (2007) 523–537.
- [126] A. Mercier, B. Pelletier, S. Labbe, A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Eukaryot. Cell* 5 (2006) 1866–1881.
- [127] A. Mercier, S. Watt, J. Bahler, S. Labbe, Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast, *Eukaryot. Cell* 7 (2008) 493–508.
- [128] W.H. Chung, K.D. Kim, J.H. Roe, Localization and function of three monothiol glutaredoxins in *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 604–610.
- [129] K.D. Kim, H.J. Kim, K.C. Lee, J.H. Roe, Multi-domain CGFS-type glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis via direct interaction with a repressor Fep1 in fission yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408 (2011) 609–614.
- [130] A. Mercier, S. Labbe, Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 20249–20262.
- [131] J.F. Jacques, A. Mercier, A. Brault, T. Mourer, S. Labbe, Fra2 is a co-regulator of fep1 inhibition in response to iron starvation, *PLoS One* 9 (2014) e98959.
- [132] M.A. Huynen, C.A. Spronk, T. Gabaldon, B. Snel, Combining data from genomes, Y2H and 3D structure indicates that BolA is a reductase interacting with a glutaredoxin, *FEBS Lett.* 579 (2005) 591–596.
- [133] A.L.M. Consortium, Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map, *Science* 333 (2011) 601–607.
- [134] C. Butland, M. Babu, J.J. Diaz-Mejia, F. Bohdana, S. Phanse, B. Gold, W. Yang, J. Li, A. Gagarinova, O. Pogoutse, H. Mori, B.L. Wanner, H. Lo, J. Wasniewski, C. Christopoulos, M. Ali, P. Venn, A. Safavi-Naini, N. Sourour, S. Caron, J.Y. Choi, L. Laigle, A. Nazarians-Armavil, A. Deshpande, S. Joe, K.A. Datsenko, N. Yamamoto, B.J. Andrews, C. Boone, H. Ding, B. Sheikh, G. Moreno-Hagelsieb, J.F. Greenblatt, A. Emili, eSGA: E. coli synthetic genetic array analysis, *Nat. Methods* 5 (2008) 789–795.
- [135] L. Giot, J.S. Bader, C. Brouwer, A. Chaudhuri, B. Kuang, Y. Li, Y.L. Hao, C.E. Ooi, B. Godwin, E. Vitols, G. Vijayadmodar, P. Pochart, H. Machineni, M. Welsh, Y. Kong, B. Zerhusen, R. Malcolm, Z. Varrone, A. Collis, M. Minto, S. Burgess, I. McDaniel, E. Stimpson, F. Spriggs, J. Williams, K. Neuraht, N. Ioime, A. Agee, E. Voss, K. Furtak, R. Renzulli, N. Aaensen, S. Carrolia, E. Bickelhaupt, Y. Lazovatsky, A. DaSilva, J. Zhong, C.A. Stanyon, R.L. Finley Jr., K.P. White, M. Braverman, T. Jarvie, S. Gold, M. Leach, J. Knight, R.A. Shinkets, M.P. McKenna, J. Chant, J.M. Rothberg, A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*, *Science* 302 (2003) 1727–1736.
- [136] Y. Ho, A. Gruhler, A. Heilbut, G.D. Bader, I. Moore, S.L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewmarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreau, B. Musk, C. Alfano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A.R. Willems, H. Sassi, P.A. Nielsen, K.J. Rasmussen, J.R. Andersen, L.E. Johansen, L.H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B.D. Sorensen, J. Matthiesen, R.C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M.F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C.W. Hogue, D. Figeys, M. Tyers, Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry, *Nature* 415 (2002) 180–183.
- [137] T. Ito, K. Tashiro, S. Muta, R. Ozawa, T. Chiba, M. Nishizawa, K. Yamamoto, S. Kuhara, Y. Sakaki, Toward a protein–protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 1143–1147.
- [138] N.J. Krogan, G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatenchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A.P. Tikuisis, T. Punna, J.M. Peregrin-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M.D. Robinson, A. Paccanaro, J.E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D.P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M.M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S.R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J.J. Ristone, K. Gandi, N.J. Thompson, G. Musso, P. St Onge, S. Ghanny, M.H. Lam, G. Butland, A.M. Altai-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O'Shea, J.S. Weissman, C.J. Ingles, T.R. Hughes, J. Parkinson, M. Gerstein, S.J. Wodak, A. Emili, J.F. Greenblatt, Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* 440 (2006) 637–643.
- [139] T. Dhalleine, N. Rouhier, J. Couturier, Putative roles of glutaredoxin–BolA heterodimers in plants, *Plant Signal. Behav.* 9 (2014).
- [140] H. Li, D.T. Mapolelo, S. Randeniya, M.K. Johnson, C.E. Outten, Human glutaredoxin 3 forms [2Fe–2S]-bridged complexes with human BolA2, *Biochemistry* 51 (2012) 1687–1696.
- [141] H. Li, C.E. Outten, Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe–2S] binding partners in iron homeostasis, *Biochemistry* 51 (2012) 4377–4389.
- [142] P. Willems, B.F. Wanschers, J. Esseling, R. Szklarczyk, U. Kudla, I. Duarte, M. Forkink, M. Nooteboom, H. Swarts, J. Gloerich, L. Nijtmans, W. Koopman, M.A. Huynen, BolA1 is an aerobic protein that prevents mitochondrial morphology changes induced by glutathione depletion, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 129–138.
- [143] A. Izquierdo, C. Casas, U. Muhlenhoff, C.H. Lillig, E. Herrero, *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway, *Eukaryot. Cell* 7 (2008) 1415–1426.
- [144] N. Mesecke, A. Spang, M. Deponte, J.M. Herrmann, A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 2673–2680.
- [145] C. Berndt, G. Poschmann, K. Stuhler, A. Holmgren, L. Brautigam, Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells, *Redox Biol.* 2 (2014) 673–678.
- [146] L. Brautigam, L.D. Jensen, G. Poschmann, S. Nystrom, S. Bannenberg, K. Dreij, K. Lepka, T. Prozorovski, S.J. Montano, O. Aktas, P. Uhlen, Y. Cao, A. Holmgren, C. Berndt, Glutaredoxin regulates vascular development by reversible glutathionylation of sirTun 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 20057–20062.
- [147] L. Brautigam, L.D. Schutte, J.R. Godoy, T. Prozorovski, M. Gellert, G. Hauptmann, A. Holmgren, C.H. Lillig, C. Berndt, Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 20532–20537.
- [148] C.H. Lillig, M.E. Lonn, M. Enoksson, A.P. Fernandes, A. Holmgren, Short interfering RNA-mediated silencing of glutaredoxin 2 increases the sensitivity of HeLa cells to doxorubicin and phenylarsine oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 13227–13232.
- [149] H. Wu, L. Lin, F. Giblin, Y.S. Ho, M.F. Lou, Glutaredoxin 2 knockout increases sensitivity to oxidative stress in mouse lens epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 2108–2117.
- [150] C. Riondet, J.P. Desouris, J.G. Montoya, Y. Chartier, Y. Meyer, J.P. Reichheld, A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2, *Plant Cell Environ.* 35 (2012) 360–373.
- [151] G.R. Linares, W. Xing, K.E. Govoni, S.T. Chen, S. Mohan, Glutaredoxin 5 regulates osteoblast apoptosis by protecting against oxidative stress, *Bone* 44 (2009) 795–804.
- [152] A.M. Sanchez-Riego, L. Lopez-Maury, F.J. Florencio, Glutaredoxins are essential for stress adaptation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 428.
- [153] N.H. Cheng, AtGRX4, an Arabidopsis chloroplastic monothiol glutaredoxin, is able to suppress yeast grx5 mutant phenotypes and respond to oxidative stress, *FEBS Lett.* 582 (2008) 848–854.
- [154] H. Cha, J.M. Kim, J.G. Oh, M.H. Jeong, C.S. Park, H.J. Jeong, B.K. Park, Y.H. Lee, D. Jeong, D.K. Yang, O.Y. Bernecker, H. Kim do, R.J. Hajjar, W.J. Park, PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45 (2008) 796–803.

Please cite this article as: J. Couturier, et al., The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions?, *Biochim. Biophys. Acta* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018>

II.B. La signature catalytique n'impose pas le type de dimérisation

II.B.1. La glutarédoxine C5 d'*Arabidopsis thaliana*

II.B.1.a. Introduction

Les glutarédoxines (Grx) sont des oxydoréductases présentes dans la plupart des organismes (Fernandes & Holmgren, 2004). En utilisant leur signature Cxx[C/S], les Grx sont impliquées dans la réduction de protéines glutathionylées et dans l'incorporation de centres Fe-S. Dans le cas des Grx de classe II, il y a intégration de centres Fe-S labiles et ceux-ci peuvent être transférés vers des protéines acceptrices (Rodríguez-Manzanque et al, 2002). La détermination tridimensionnelle de structures holodimériques avec un centre [2Fe-2S] indique que celui-ci est coordonné par la cystéine catalytique des deux monomères ainsi que par deux molécules de GSH (Iwema et al, 2009; Johansson et al, 2007; Johansson et al, 2011; Rouhier et al, 2007).

La capacité des Grx de classe I à incorporer des centres Fe-S a déjà été étudiée en détail par mutagenèse dirigée (Couturier et al, 2009b; Rouhier et al, 2007). Ces études semblent montrer que les résidus autour de la cystéine catalytique (position -1 et +1) sont déterminants. En particulier, deux Grx de signatures respectives YCPFC et YCPYC acquièrent la capacité à incorporer des centres fer-soufre lorsque la proline est remplacée par une glycine (Rouhier et al, 2007). La présence d'un tryptophane en position -1 semble également être un antidéterminant stérique. En effet la GrxS12 de peuplier de signature WCSYS n'a pas la capacité à s'holodimériser alors que la mutation du tryptophane en tyrosine permet l'incorporation d'un centre Fe-S (Couturier et al, 2009b). Etonnamment, la GrxC5 d'*A. thaliana* (AtGrxC5) de signature WCSYC et proche homologue de la PtGrxS12 s'holodimérise. A travers, les caractérisations biochimiques et structurales de cette protéine cette étude tente de préciser les facteurs moléculaires permettant aux Grx de s'holodimériser.

II.B.1.b. Résultats et discussion

Une étude phylogénétique réalisée sur l'AtGrxC5 (signature WC₂₉SYC₃₂) a révélé que cette isoforme n'est présente que chez les Brassicacées (importante famille de plantes dicotylédones) alors que son proche homologue, la GrxS12 (signature WCSYS, 70% d'identité), est présent chez toutes les plantes. Afin de déterminer la localisation cellulaire de la GrxC5 au sein d'*A. thaliana*, une étude par microscopie à fluorescence a été réalisée par fusion de la séquence d'adressage de l'AtGrxC5 avec la GFP (Green Fluorescent Protein). La GrxC5 est ainsi la quatrième Grx à être chloroplastique après les GrxS12, S14 et S16 de peuplier.

La détermination de l'état redox de l'AtGrxC5 a également permis de mettre en évidence que la protéine apo peut être glutathionylée. Ainsi par le biais de la spectrométrie de masse couplée à de la mutagenèse nous avons mis en évidence que les cystéines C29 et C87 peuvent être glutathionylées. Bien que les GrxC5 et GrxS12 soient très similaires, la modification d'un seul résidu au niveau du site actif confère des propriétés différentes aux deux enzymes entre un mécanisme dithiol pour la GrxC5 et un mécanisme monothiol pour la GrxS12. L'activité enzymatique de l'AtGrxC5 a été étudiée avec le HED et l'activité DHAR. Les différentes expériences montrent que la C29 est la cystéine catalytique et que la C32 n'est pas essentielle pour le mécanisme réactionnel mais qu'elle influence la réactivité de la protéine. Par le biais d'autres tests nous avons montré que l'AtGrxC5 est également capable de réduire des protéines comme l'insuline, la méthionine sulfoxyde réductase B1 et la peroxyrédoxine IIE.

Lors des étapes de purification de l'AtGrxC5 une couleur brune fut observée indiquant la présence potentielle de la protéine en complexe avec un centre Fe-S. Cette observation a été confirmée par filtration sur gel où deux pics correspondant aux formes apo et holo de l'AtGrxC5 ont été observés. Ceci était totalement inattendu car il avait été supposé sur la base de la

PtGrxS12 que le tryptophane en position -1 empêchait l'incorporation d'un centre Fe-S. La nature du centre Fe-S incorporé au sein de l'AtGrxC5 a été identifiée comme étant un centre [2Fe-2S] coordonné uniquement par des atomes de soufre grâce à différentes méthodes spectroscopiques (absorption UV-visible/dichroïsme circulaire et résonance Raman) en comparant ses spectres avec ceux déjà caractérisés pour la PtGrxC1. Afin d'identifier les résidus impliqués dans la coordination du centre [2Fe-2S] des mutants ont été réalisés pour les quatre cystéines de l'AtGrxC5, montrant que les cystéines C29 et C32 sont indispensables pour l'incorporation du centre [2Fe-2S].

A la lumière de ces données j'ai donc essayé de cristalliser les formes apo et holo de l'AtGrxC5. Les cristaux des formes apo et holo de l'AtGrxC5, obtenus directement à partir du screen, ont été mesurés à l'ESRF de Grenoble et les données phasées par remplacement moléculaire à partir de la structure de la PtGrxS12 (code pdb 3FZ9). L'AtGrxC5 apo cristallise dans le groupe d'espace $P2_12_12$ et sa structure à 1,2Å de résolution révèle que sa cystéine catalytique C29 est glutathionylée. Comme attendu les structures de l'AtGrxC5 et de la PtGrxS12 sont très similaires (RMSD 0,5Å) avec un site de fixation du GSH semblable. Ainsi à partir des structures apo de l'AtGrxC5 et de la PtGrxS12 il est impossible de reconstruire par modélisation un dimère de classe I sans chocs stériques importants générés par les chaînes latérales des résidus se trouvant à l'interface. Il est donc impossible de dire pourquoi la PtGrxS12 est incapable d'incorporer un centre [2Fe-2S] sans la résolution de la structure de l'AtGrxC5 holo.

L'AtGrxC5 holo cristallise dans le groupe d'espace $R3$ et se présente sous la forme d'un dimère coordonnant un centre [2Fe-2S] avec le concours de deux molécules de GSH. Par superposition de sa structure à 2,4Å de résolution avec celles de la PtGrxC1 et de la HsGrx2, il s'avère que l'orientation relative entre les deux monomères est identique. Par contre, en

comparant les structures apo et holo de l'AtGrxC5 on peut remarquer une réorientation pour toutes les chaînes latérales des résidus du motif WCSYC excepté la cystéine catalytique. La modification la plus importante intervient pour le tryptophane qui voit sa chaîne latérale se retourner de 180° et être exposée au solvant. Ainsi une réorientation du tryptophane est possible et n'explique pas pourquoi la PtGrxS12 ne peut pas incorporer un centre Fe-S. Afin d'identifier quels résidus sont nécessaires pour l'incorporation du centre Fe-S par l'AtGrxC5 et ne sont pas présents au sein de la PtGrxS12 différents mutants ont été réalisés. Par analyse des résidus impliqués dans l'interface seuls deux résidus sont différents dans la PtGrxS12. Ces résidus sont deux sérines (WCSYS³²SE) qui remplacent une cystéine et une thréonine pour l'AtGrxC5 (WCSYC³²TE). Il s'avère que la C32 participe à la stabilisation du site actif de l'AtGrxC5 alors que la S32 de la PtGrxS12 est un peu trop éloignée. La réalisation du mutant C32S de l'AtGrxC5 ne permet plus d'incorporer le centre [2Fe-2S] alors que le mutant inverse S32C de la PtGrxS12 permet l'incorporation d'un centre Fe-S. Ce résultat n'était pas attendu car des structures de Grx de classe II (signature CGFS) possédant une sérine en position +3 ont été résolues en complexe avec des centres [2Fe-2S] (code pdb 2WCI et 2WUL). De plus la réalisation du même mutant C34S au sein de la PtGrxC1 permet d'incorporer un centre [2Fe-2S] qui est plus labile.

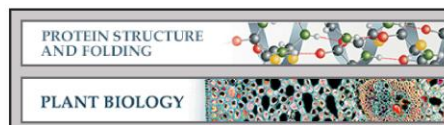
En conclusion, dans le cas de l'AtGrxC5 la cystéine en position +3 semble essentielle pour incorporer le centre [2Fe-2S] et l'effet défavorable du tryptophane en position -1 observé dans le cas de la PtGrxS12 est négligeable au vu de l'importance de la cystéine. Des informations plus détaillées sont présentées dans l'article (partie II.B.1.c.) ainsi que dans la Figure n°42.

II.B.1.c. Article

- *Arabidopsis Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins.*



Protein Structure and Folding:
***Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin C5**
as a Model to Explore Molecular
Determinants for Iron-Sulfur Cluster
Binding into Glutaredoxins



Jérémy Couturier, Elke Ströher, Angela-Nadia Albetel, Thomas Roret, Meenakumari Muthuramalingam, Lionel Tarrago, Thorsten Seidel, Pascale Tsan, Jean-Pierre Jacquot, Michael K. Johnson, Karl-Josef Dietz, Claude Didierjean and Nicolas Rouhier

J. Biol. Chem. 2011, 286:27515-27527.

doi: 10.1074/jbc.M111.228726 originally published online June 1, 2011

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M111.228726](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228726)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](https://www.jbc.org/).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2011/06/03/M111.228726.DC1.html>

This article cites 62 references, 22 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/286/31/27515.full.html#ref-list-1>

Arabidopsis* Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins^[5]

Received for publication, February 7, 2011, and in revised form, May 17, 2011. Published, JBC Papers in Press, June 1, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.228726

Jérémy Couturier^{1,6,1}, Elke Ströher^{6,1}, Angela-Nadia Albetel¹, Thomas Roret¹, Meenakumari Muthuramalingam⁵, Lionel Tarrago³, Thorsten Seidel⁶, Pascale Tsan¹, Jean-Pierre Jacquot², Michael K. Johnson⁶, Karl-Josef Dietz⁵, Claude Didierjean^{1,2}, and Nicolas Rouhier^{1,3}

From the ¹Unité Mixte de Recherches (UMR) 1136, Institut National de la Recherche Agronomique-Nancy Université, Interactions Arbres Microorganismes, Institut Fédératif de Recherche 110 Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Biomolécule et Alimentation, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France, ²Faculty of Biology-W5-134, University of Bielefeld, D-33501 Bielefeld, Germany, ³Department of Chemistry and Center for Metalloenzyme Studies, University of Georgia, Athens, Georgia 30602, and

⁴Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, Equipe Biocristallographie, UMR 7036 CNRS-Université Henri Poincaré Faculté des Sciences et Technologies, Nancy Université, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

Unlike thioredoxins, glutaredoxins are involved in iron-sulfur cluster assembly and in reduction of specific disulfides (*i.e.* protein-glutathione adducts), and thus they are also important redox regulators of chloroplast metabolism. Using GFP fusion, AtGrxC5 isoform, present exclusively in Brassicaceae, was shown to be localized in chloroplasts. A comparison of the biochemical, structural, and spectroscopic properties of *Arabidopsis* GrxC5 (WCSYC active site) with poplar GrxS12 (WCSYS active site), a chloroplastic paralog, indicated that, contrary to the solely apomonomeric GrxS12 isoform, AtGrxC5 exists as two forms when expressed in *Escherichia coli*. The monomeric apoprotein possesses deglutathionylation activity mediating the recycling of plastidial methionine sulfoxide reductase B1 and peroxiredoxin IIE, whereas the dimeric holoprotein incorporates a [2Fe-2S] cluster. Site-directed mutagenesis experiments and resolution of the x-ray crystal structure of AtGrxC5 in its holoform revealed that, although not involved in its ligation, the presence of the second active site cysteine (Cys³²) is required for cluster formation. In addition, thiol titrations, fluorescence measurements, and mass spectrometry analyses showed that, despite the presence of a dithiol active site, AtGrxC5 does not form any inter- or intramolecular disulfide bond and that its activity exclusively relies on a monothiol mechanism.

Glutaredoxins (Grxs)⁴ are thiol-disulfide oxidoreductases present in most prokaryotic and eukaryotic organisms and belonging to the thioredoxin (Trx) superfamily (1, 2). At the structural level, proteins of the Trx superfamily share the so-called Trx fold, which consists of four-stranded β -sheets surrounded by at least three α -helices (3). Using a CXXC or CXXS active site motif, Grxs are involved in the reduction of glutathionylated proteins. The regeneration of an active reduced form usually relies on glutathione (GSH), but some specific members such as human Grx2, *Escherichia coli* Grx4, and *Chlamydomonas reinhardtii* Grx3 are also or uniquely regenerated by thioredoxin reductases (4–6). This variation correlates with the type of Grx considered and depends on their redox potential and catalytic mechanism. Indeed, whereas classical Grxs have midpoint redox potentials between –170 and –230 mV (pH 7.0) (7, 8), *Chlamydomonas* Grx3 forms during its catalytic cycle an atypical intramolecular disulfide between the first active site cysteine and a second cysteine located in the C-terminal part of the protein (6). The more negative redox potential (–323 mV at pH 7.9) observed for this protein most likely explains its ability to receive electrons from ferredoxin:thioredoxin reductase but not from glutathione (6).

The initial Grx classification in non-plant organisms was first based on the active site sequences and resulted in defining two Grx types containing either a dithiol (CP(Y/F)C) or a monothiol (usually CGFS) active site motif (9). However, with the identification of new Grx sequences with more variable active site sequences, this classification has become insufficient. In particular, photosynthetic organisms possess a larger variety of Grxs with about 30 genes compared with two to seven in other prokaryotes or eukaryotes (10). An in-depth phylogenetic analysis of Grxs in photosynthetic organisms indicates that they are grouped into four classes (11). Class I includes “classical” Grxs with CPYC, CGYC, CPFC, or CSY(C/S) active sites and is sub-

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grant GM62524 (to M. K. J.). This work was also supported by the Alexander von Humboldt Foundation (to J. P. J.), Agence Nationale de la Recherche Grant JC07_204825 (to J. C. and N. R.), and Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Di346-14 (to K. J. D.).

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables 1–3 and Figs. 1–4.

The atomic coordinates and structure factors (codes 3RHB and 3RHC) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33383684879; E-mail: Claude.Didierjean@crm2.uhp-nancy.fr.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33383684225; E-mail: nrouhier@scbiol.uhp-nancy.fr.

⁴ The abbreviations used are: Grx, glutaredoxin; GSH, reduced glutathione; Trx, thioredoxin; At, *A. thaliana*; Pt, poplar; HED, 2-hydroxyethyl disulfide; CFP, cyan fluorescent protein; DTT_{red}, reduced DTT; DTT_{ox}, oxidized DTT; GSSG, oxidized glutathione; DHA, dehydroascorbate; Prx, peroxiredoxin; Cr, *C. reinhardtii*.

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

divided into five subgroups called GrxC1, -C2, -C3, -C4 and -C5/S12. Class II contains Grxs with a conserved CGFS active site and is divided into four subgroups called GrxS14, -S15, -S16, and -S17. In addition, class III, which contains Grxs with a CCXY active site motif, is found in terrestrial plants, and class IV, which consists of multidomain proteins containing in their N-terminal part a Grx module, is present in eukaryotic photosynthetic organisms (11).

Through their disulfide reductase activity, class I Grxs are involved in the stress response, catalyzing the reduction of dehydroascorbate (12), and the regeneration of type II peroxidoreductases (13) and 1-Cys methionine sulfoxide reductase B1 (14, 15). These regeneration mechanisms likely occur via a glutathionylation step. Although Trxs have been reported to catalyze deglutathionylation in some organisms (16), this reaction is generally considered to be specifically catalyzed by Grxs (17). Protein deglutathionylation can proceed via a monothiol or a dithiol pathway depending on the involvement of one or two cysteines in the catalytic mechanism (6, 18, 19).

Besides its disulfide reductase activity, a novel function assigned to some bacterial, yeast, human, and plant class II Grxs is their involvement in the iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly machinery most likely through their capacity to incorporate labile Fe-S clusters and transfer them to acceptor proteins (20–22). On the other hand, specific class I Grxs such as human Grx2 and plant GrxC1 also have the capacity to incorporate Fe-S clusters that are more stable than those found in class II Grxs (8, 23). Based on the observation that oxidized glutathione promotes cluster disassembly in human Grx2, it has been hypothesized that under defined redox conditions the release of Grxs in an active form might serve as a redox sensor in human cells (23).

The determination of the three-dimensional structure of poplar GrxC1 and human Grx2 indicated that the [2Fe-2S] cluster was ligated into a homodimer by the N-terminal active site cysteine of two monomers and two glutathione molecules (8, 24, 25). A similar ligation was observed for *E. coli* Grx4, a class II Grx, but the different orientation of the two monomers was proposed to be responsible for the differential cluster lability (26). The capacity of class I Grxs to bind an Fe-S cluster has been studied in detail by site-directed mutagenesis, and it was proposed that the nature of the residues adjacent to the first active site Cys determined this capacity (8, 27). In particular, for Grxs with a YCPFC or YCPYC active site, the replacement of the proline by a glycine, simulating GrxC1 (YCGYC), was sufficient to allow the incorporation of such a cluster (8). In addition, it has been hypothesized that the Trp residue adjacent to the catalytic cysteine residue in GrxS12 (WCSYS active site) prevented cluster incorporation because changing it into a Tyr allowed cluster incorporation (27).

A close paralog of GrxS12 having a WCSYC active site and named GrxC5 is present only in Brassicaceae. Here we have investigated the structure-function relationship of *Arabidopsis thaliana* GrxC5 (AtGrxC5) and compared it to poplar GrxS12 (PtGrxS12). The putative role of this Grx in plastids of Brassicaceae is discussed in the light of other functions identified so far for other Grx members.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—G25 columns were purchased from GE Healthcare. 2-Hydroxyethyl disulfide (HED) and 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid were from Acros Organics and Pierce, respectively. All other reagents were from Sigma.

Cloning and Construction of AtGrxC5 and PtGrxS12 Mutants by Site-directed Mutagenesis—The open reading frame sequence encoding *A. thaliana* GrxC5 (At4g28730) was amplified from leaf cDNA using AtGrxC5 forward and reverse primers (supplemental Table 1) and cloned into pET3d. The amplified sequence encodes a protein deprived of the first 63 amino acids corresponding to the putative targeting sequence and in which a methionine and an alanine have been added during cloning. The protein thus starts with the N-terminal sequence ¹MAFSGSRM⁸ and ends with ⁹⁸GKNGQS¹¹³ at the C terminus. Using two complementary mutagenic primers, the four cysteines of AtGrxC5 were individually substituted into serines. The mutated proteins are called AtGrxC5 C29S, C32S, C80S, and C87S. Various combinations of cysteine substitutions by serine were also introduced in GrxC5 (C29S/C32S and C80S/C87S). In addition, to mimic the active site of AtGrxC5, a PtGrxS12 S32C variant was produced with the serine in position 32 modified into a cysteine. The primers are listed in supplemental Table 1.

Expression and Purification of Recombinant Proteins—For protein production, the *E. coli* BL21(DE3) strain, containing the pSBET plasmid, was co-transformed with the different recombinant plasmids (28). Cultures were successively amplified up to 2.4 liters in LB medium supplemented with ampicillin and kanamycin (50 μ g·ml⁻¹) at 37 °C. Protein expression was induced at exponential phase by adding 100 μ M isopropyl β -D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37 °C. The cultures were then centrifuged for 15 min at 4,400 $\times$ g. The pellets were resuspended in 30 ml of Tris-NaCl (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl) buffer with 1 mM GSH, and the cells were stored at -20 °C.

Cell lysis was performed by sonication (3 $\times$ 1 min with intervals of 1 min), and the soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation for 30 min at 27,000 $\times$ g. The soluble part was then fractionated with ammonium sulfate in two steps, and the protein fraction precipitating between 40 and 80% saturation contained the recombinant protein as estimated by 15% SDS-PAGE. AtGrxC5 WT, C80S, and C87S and poplar GrxS12 S32C were purified by size exclusion chromatography after loading on an ACA44 (5 $\times$ 75-cm) column equilibrated in Tris-NaCl buffer usually supplemented with 100 μ M GSH. However, some purifications were achieved without GSH. The fractions containing the protein were pooled, dialyzed by ultrafiltration to remove NaCl, and loaded onto a DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose column (Sigma) equilibrated in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer. The recombinant proteins passed through the DEAE column, were concentrated by ultrafiltration under nitrogen pressure (Amicon, YM10 membrane), and were stored in the same buffer at -20 °C.

Because they were mainly insoluble in the above described culture conditions, the culture and purification conditions of AtGrxC5 C29S and C32S were slightly modified following a

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

procedure described previously (29). Protein purity was checked by SDS-PAGE, and protein concentrations were determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient at 280 nm of $8,730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for AtGrxC5 WT; $8,605 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for AtGrxC5 C29S, C32S, C80S, C87S, C29S/C32S, and C80S/C87S; and $10,095 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for PtGrxS12 S32C. PtGrxC1, PtGrxC3, PtGrxS12, PtTrxh1, AtMsrB1, and AtPrxII were purified as described previously (8, 14, 27, 30, 31).

Transcript Analysis—Four to 5-week-old plants were used for the analysis of transcript levels of the four plastidial Grxs (GrxC5, -S12, -S14, and -S16). *A. thaliana* ecotype Columbia was grown on soil under controlled conditions (10 h of light at $100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and 23°C and 14 h of darkness at 18°C ; 50% relative humidity). Four hours after the onset of light, selected stress treatments were started. Cold stress was performed at 4°C , and salt stress was applied by extensively watering the pots with 200 ml of 150 and 300 mM NaCl solution, respectively. A similar osmotic treatment was performed with 15% (w/v) PEG-5000 (same osmolarity as 150 mM NaCl). Complete rosettes of control and treated plants were harvested after 24 h, frozen immediately in liquid nitrogen, and stored at -80°C . RNA isolation and the subsequent cDNA synthesis were performed according to Wormuth *et al.* (32). **Supplemental Table 1** lists the combinations of primers used.

In Vivo Subcellular Localization by GFP Fusions—The putative targeting sequences of AtGrxC5, AtGrxC10 (At5g11930), AtGrxS12 (At2g20270), AtGrxS13 (At1g03850), AtGrxS14 (At3g54900), and AtGrxS16 (At2g38270) were cloned into the 35S-CFP-NosT or 35S-YFP-NosT vector between BamHI and AgeI restriction sites using primer combinations described in **supplemental Table 1**. The isolation, transfection of *A. thaliana* mesophyll protoplasts, and final fluorescence microscopy of protoplasts were performed according to Seidel *et al.* (33).

Electrospray Ionization-MS Analysis of Reduced and Oxidized Proteins—Three to 5 mg of proteins were reduced using 20 mM DTT_{red} for 15 min at 25°C followed by desalting on G25 columns pre-equilibrated with 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA (TE) buffer. Oxidized Grxs were prepared by incubating prerduced Grxs with either 1 mM GSSG or 20 mM DTT_{ox} for a 15-min or longer period at 25°C before desalting on G25 columns.

High resolution electrospray ionization-MS spectra of treated and untreated proteins were obtained on a Bruker microTOF-Q spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an Apollo II electrospray ionization source with an ion funnel and operated in the negative ion mode. A concentrated sample (around $100 \mu\text{l}$ at $100 \mu\text{M}$) in formic acid was injected at a flow rate of $10\text{--}20 \mu\text{l min}^{-1}$. The potential between the spray needle and the orifice was set to 4.5 kV. Before each run, the instrument was calibrated externally with the TunemixTM mixture (Agilent Technologies) in quadratic regression mode. Data were analyzed with DataAnalysis software (Bruker).

Fluorescence Properties of AtGrxC5—The intrinsic fluorescence of AtGrxC5 WT and mutants in the reduced and oxidized forms was recorded with a Cary Eclipse spectrofluorometer (Varian) with $10 \mu\text{M}$ samples in TE buffer and an excitation

wavelength fixed at 270 nm. Control spectra were run with buffer only for each sample and subtracted from the spectra.

Thioltransferase Activity (HED and Dehydroascorbate (DHA) Assays)—The HED reduction was measured at 25°C in steady-state conditions by following NADPH oxidation at 340 nm in the presence of a Grx reducing system. A $500\text{-}\mu\text{l}$ reaction mixture in 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA buffer contained $150 \mu\text{M}$ NADPH, 0.5 units of glutathione reductase from bakers' yeast, 2 mM GSH, 0.7 mM HED, and 400 nM Grx except for AtGrxC5 C32S (200 nM Grx). The dehydroascorbate reductase activity was measured using a similar method except that the test was performed in 100 mM phosphate pH 7.0 buffer with 1 mM DHA and $2 \mu\text{M Grx}$ ($1 \mu\text{M}$ for AtGrxC5 C32S). The reaction was started by adding Grx after a 2-min preincubation. Grx activity was determined by subtracting the spontaneous reduction rate observed in the absence of Grx. The activity was expressed as nmol of NADPH oxidized/nmol of Grx/min using a molar extinction coefficient of $6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm for NADPH. Three independent experiments were performed at each substrate concentration, and the apparent k_{cat} and K_m values were calculated by non-linear regression using the program GraphPad Prism 4.

Insulin Reduction—Insulin reduction was monitored spectrophotometrically at 30°C using $2 \mu\text{M Trx}$ or $10 \mu\text{M Grx}$ and a procedure described previously (29).

Glutaredoxin-dependent Peroxidase Activity of PrxII—Rates of peroxide reduction by PrxII were determined in an assay coupled with the glutaredoxin system by monitoring NADPH oxidation following absorbance at 340 nm. The assay typically contained $50 \mu\text{M t}$ -butyl hydroperoxide in 100 mM HEPES pH 8.0 buffer, 2 mM EDTA, 1 mM GSH, $150 \mu\text{M}$ NADPH, $2 \mu\text{M PrxII}$, and from 0.1 to $6 \mu\text{M Grx}$. The comparative mutant analysis was then performed with $1 \mu\text{M Grx}$.

Methionine Sulfoxide Reductase Activity Assay—The MsrB1 activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm in the presence of a Grx reducing system at 25°C . A $500\text{-}\mu\text{l}$ reaction mixture in 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, contained $200 \mu\text{M}$ NADPH, 0.5 units of glutathione reductase from bakers' yeast, 10 mM GSH, 2 mM *N*-acetylmethionine sulfoxide, $2.5 \mu\text{M}$ MsrB1, and $25 \mu\text{M AtGrxC5}$ corresponding to a saturating concentration. MsrB1 activity was calculated as described previously (14).

Analytical and Spectroscopic Methods—Analytical gel filtration analyses were performed with an   KTA Avant system (GE Healthcare). $150 \mu\text{l}$ at about $100 \mu\text{M}$ apo- and holoforms were separately loaded on a Superdex 75 HR 10/30 column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl and calibrated with gel filtration standards (Bio-Rad). Elution profiles were simultaneously recorded at 280 and 430 nm with a flow rate of 0.5 ml min^{-1} .

Protein concentrations were determined by using BSA as a standard using the Bio-Rad DC protein assay in conjunction with the microscale modified procedure of Brown *et al.* (34). Iron concentrations were determined colorimetrically by using bathophenanthroline under reducing conditions after digestion of the protein in 0.8% KMnO_4 , 0.2 M HCl (35). Fe-S cluster reconstitution experiments in AtGrxC5 C32S were carried out under anaerobic conditions following a procedure described

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

previously (20). UV-visible absorption and CD spectra were recorded at room temperature using a Shimadzu UV-3101PC spectrophotometer and Jasco J-715 spectropolarimeter, respectively. Resonance Raman spectra were recorded as described previously (36) using an Instruments SA Ramanor U1000 spectrometer coupled with a Coherent Sabre argon ion laser with 20- μ l frozen droplets of sample mounted on the cold finger of an Air Products Displex Model CSA-202E closed cycle refrigerator.

Crystallization, Data Collection, Structure Determination, and Crystallographic Refinement—Crystallization experiments were performed by the microbatch under oil (paraffin) method at 4 °C under aerobic conditions. Drops were prepared by mixing 1.5 μ l of protein solution with an equal volume of crystallization solution. Solutions of apo- and holoproteins had concentrations of 8.9 and 16.7 mg·ml⁻¹, respectively. Suitable crystals for x-ray diffraction were obtained without optimization using crystallization screen kits. The apoform crystallized in 1.6 M ammonium sulfate and 500 mM lithium chloride (Jena Biosciences, JBS 5-B4), whereas brownish crystals were obtained for the holoform by using 0.1 M HEPES, pH 7.5 and 70% 2-methyl-2,4-pentanediol solution (Hampton Research crystal screen 2-35). X-ray diffraction experiments were performed at 100 K with holoform crystals flash cooled directly from the drop and apoform crystals and soaked briefly in crystallization solution supplemented with 20% (v/v) glycerol. Apo- and holoform data sets were collected on beamlines BM30A and ID23-1 at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France), respectively. The data were indexed and processed using XDS (37) and scaled and merged with SCALA from the CCP4 program package (38, 39). Both structures were solved by molecular replacement with MOLREP (40) using the poplar GrxS12 coordinates (Protein Data Bank code 3FZ9). The models were refined using REFMAC version 5.4 (41) interspersed with manual inspection and corrections using COOT (42). In the final rounds of apoform refinement, anisotropic B-factors were included for selected atoms. The validation of both crystal structures was performed with MOLPROBITY (43). All figures were prepared with PyMOL. All statistics are available in Table 1.

RESULTS

AtGrxC5, the Fourth Plastidial Grx of *A. thaliana*—The *A. thaliana* Grx family is composed of 33 members, which are predicted to be distributed in different subcellular compartments (11). GrxS12, -S14, and -S16 in poplar as well as GrxS14 in *A. thaliana* (previously referred to as AtGRXcp) have already been confirmed as being located in plastids by GFP fusion (20, 27, 44). From localization prediction programs, only three additional *A. thaliana* Grxs exhibit a potential plastidial targeting sequence, namely AtGrxC5 (class I), AtGrxC10, and AtGrxC13 (class III) (10, 11). It is important to note that GrxC5 and GrxS12, which form a specific subgroup of class I Grxs, display about 70% identity when considering the mature form of the proteins. The phylogenetic analysis further indicated that whereas all plants analyzed possess a GrxS12 isoform only species of the Brassicaceae family possess both isoforms (supplemental Fig. 1).

TABLE 1
Statistics of x-ray diffraction data collection and model refinement

	Apoform	Holoform
Data collection		
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>R</i> 3
Cell dimensions <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	63.5, 39.0, 37.6	111.7, 111.7, 58.5
Resolution (Å)	33.25–1.2 (1.26–1.20) ^a	27.99–2.4 (2.53–2.4) ^a
<i>R</i> _{merge}	0.052 (0.221)	0.061 (0.33)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	21.9 (4.9)	15.5 (5.2)
Completeness (%)	94 (68)	99 (100)
<i>n</i> observations	211,463 (9,670)	60,442 (9,125)
Redundancy	7.5 (3.3)	5.7 (5.8)
Refinement		
Resolution (Å)	33.25–1.2 (1.23–1.2)	27.99–2.4 (2.46–2.4)
<i>n</i> reflections	26,715 (1288)	10,043 (740)
<i>R</i> _{int} (%) ^b	15.03 (18.6)	19.1 (24.3)
<i>R</i> _{free} (%) ^b	17.58 (24.1)	23.8 (28)
<i>n</i> residues		
Chain A	100 (6–105)	103 (3–105)
Chain B		103 (6–105)
<i>n</i> ligands	1 GSH, 3 SO ₄	2 GSH, 1 [2Fe-2S]
<i>n</i> water molecules	108	29
<i>n</i> atoms	978	1,662
Isotropic	122	1,662
Anisotropic	857	0
Average B-factor (Å ²)	18.5	57.6
Ramachandran statistics (%)		
Residues in preferred regions	100	97
Residues in allowed regions	0	3
Outlier residues	0	0
r.m.s. ^c deviations		
Bond length (Å)	0.025	0.021
Bond angle (°)	2.209	1.999

^a Values in parentheses are for highest resolution shell.

^b *R*_{int} was determined from all the reflections (working set + test set), whereas

*R*_{free} corresponds to a subset of 5% of reflections (test set).

^c Root mean square.

The N-terminal targeting sequences of the six putative plastidial Grxs of *A. thaliana* were fused in-frame to the green fluorescent protein variants CFP and YFP. The constructs were used to transform *A. thaliana* mesophyll protoplasts. Similarly to poplar isoforms, AtGrxS12, -S14 and -S16 are clearly located in plastids as indicated by the superimposition of the YFP or CFP signal with the chlorophyll autofluorescence in the merged images (Fig. 1). Concerning AtGrxC5, the reporter protein is also directed to the chloroplast with some dots of stronger signal within the organelle. Although the fluorescence signal for AtGrxC13 is more diffuse than for AtGrxC10, both proteins likely have a cytosolic localization at least under these experimental conditions. Therefore, these two Grxs were excluded from further analysis.

Transcript Analysis of Plastidial Grxs under Environmental Constraints—The transcript expression of AtGrxC5, -S12, -S14, and -S16 was measured using semiquantitative RT-PCR in leaves of plants grown under control and stress conditions, namely cold treatment at 4 °C, salt stress administered by watering with 150 and 300 mM NaCl solutions, and osmotic stress induced by 15% (w/v) PEG-5000 for 24 h, respectively. Under these stress conditions, the plants developed a pronounced stress phenotype (45). The signals were detected after 34 PCR cycles for GrxC5 and GrxS12, 32 cycles for GrxS14, and 30 cycles for GrxS16 (Fig. 2A), indicating that, in these growth conditions, GrxS16 transcripts are the most abundant within the plastidial Grx group in rosettes. Regarding environmental constraints, a significant response of the *grx* transcript level could not be observed except for a slight down-regulation under extreme salinity for AtGrxC14 and an up-regulation of AtGrxC5 in plants subjected to a cold treatment (Fig. 2B). Likewise only moderate

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

responses to diverse environmental stress conditions were found when analyzing the Affymetrix GeneChip data available via the Genevestigator tool (supplemental Table 2).

AtGrxC5 Exists in Two Forms upon Expression in E. coli—To characterize the structure-function relationship of *AtGrxC5*, the mature form of the protein was produced in *E. coli* as a

recombinant protein by removing the N-terminal 63 residues that constitute the putative targeting sequence. The final product comprises 113 amino acids with a predicted molecular mass of 12,482 Da. As observed for PtGrxC1, lysed bacterial cells had a slight but visible brownish color (8). Similarly, following gel filtration, the protein separated into two peaks, an apoform with an apparent size corresponding to a monomer and a holoform most likely containing an Fe-S center and with an apparent exclusion volume corresponding to a dimer (supplemental Fig. 2). This result was unexpected as *AtGrxC5* possesses the active site Trp residue, which was thought previously to prevent the incorporation of an Fe-S cluster in the close paralog PtGrxC12 (27).

The nature of the Fe-S center in holoGrxC5 was initially assessed using a combination of analytical and spectroscopic techniques. Iron and protein analyses of the holoform indicated 1.0 ± 0.2 iron/protein monomer consistent with one [2Fe-2S] cluster per dimer. This conclusion was unambiguously confirmed by the nearly identical UV-visible absorption/CD and resonance Raman spectra compared with those established for the structurally characterized PtGrxC1 (Fig. 3). Moreover, the close similarity of the spectroscopic properties of the [2Fe-2S]²⁺ centers in *AtGrxC5* and PtGrxC1 indicates analogous cluster coordination involving cysteinyl sulfur ligands from two GSHs and two Grxs. We have shown earlier by analyzing UV-visible absorption/CD and resonance Raman spectra that the Grx conformations are clearly distinct in class I and II Grxs, which both bind [2Fe-2S] clusters (8, 20, 26).

To determine how similar the ligation of the [2Fe-2S] cluster is to the one in PtGrxC1, the four cysteine residues of *AtGrxC5* in positions 29, 32, 80, and 87 were substituted by serine residues. The substitution of either Cys⁸⁰ or Cys⁸⁷ did not prevent the incorporation of the Fe-S cluster. In contrast, the single substitution of Cys²⁹ or Cys³² produced proteins that were devoid of the cluster, raising the question of the role of the second active site cysteine for cluster ligation or stability. Interestingly, a S32C variant of PtGrxC12, mimicking *AtGrxC5* active site sequence, incorporated an Fe-S cluster with a UV-visible absorption spectrum similar to *AtGrxC5* (supplemental Fig. 3). However, both the spectroscopic signature and the three-dimensional structure of holoGrxC5 (see below) showed that Cys³² is not a direct ligand for the Fe-S cluster. Next we wanted to determine whether the second cysteine is essential for cluster integration or only for its stability as observed previously for PtGrxC1. A PtGrxC1 C34S variant, although still

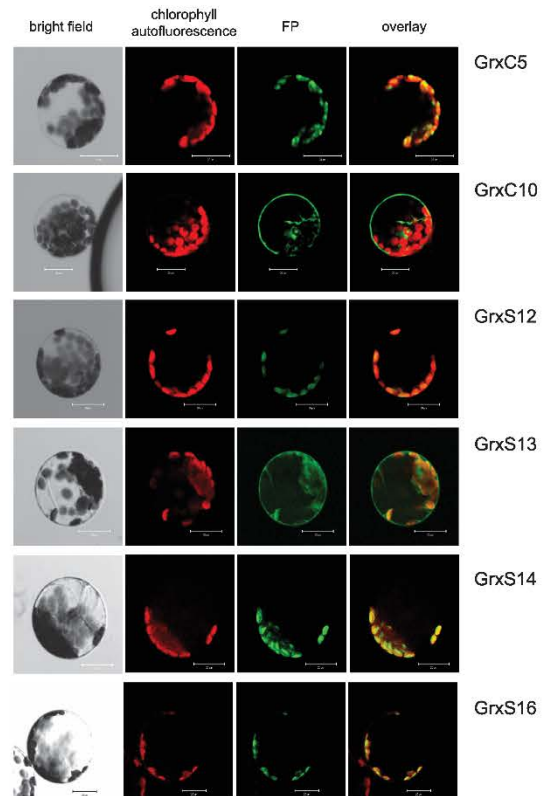


FIGURE 1. YFP/CFP localization of putative plastidial Grxs in *A. thaliana* mesophyll protoplasts. The sequences coding for the N-terminal extensions of *AtGrxC5*, *AtGrxC10*, *AtGrxC12*, *AtGrxC14*, *AtGrxC15*, and *AtGrxC16* were fused in-frame with the CFP/YFP coding sequence, mesophyll protoplasts were transfected, and accumulation of the fluorescent reporter was monitored as described under "Experimental Procedures." The scale bars correspond to 20 μ m.

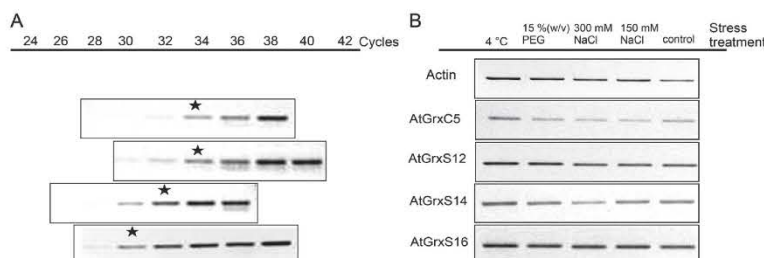


FIGURE 2. Transcript analysis of plastidial Grxs in rosettes of *A. thaliana* wild type plants. A, the abundance of Grx transcripts was semiquantified by RT-PCR. Stars indicate the number of cycles selected for the analysis of transcript abundance in response to the indicated stress conditions depicted in B. The pictures are from two independent experiments with two to three replicates with similar results.

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

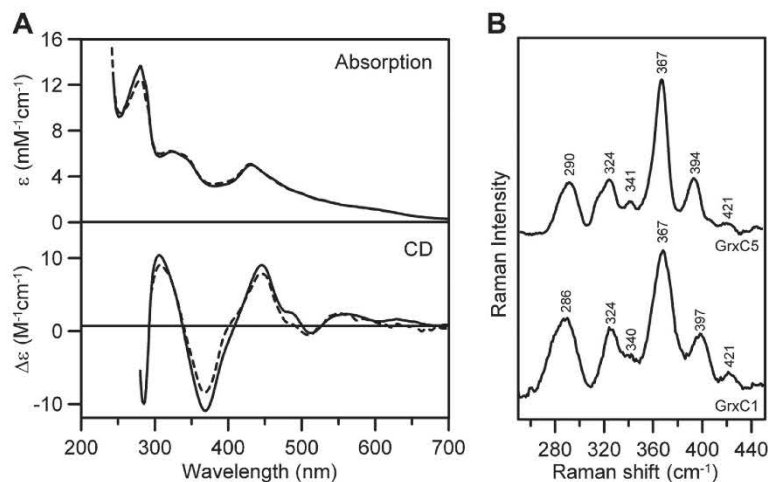


FIGURE 3. **Spectroscopic properties of AtGrxC5 holoform.** A, comparison of the UV-visible absorption and CD spectra of AtGrxC5 (solid line) and PtGrxC1 (broken line). ϵ and $\Delta\epsilon$ values are expressed per Grx monomer. B, comparison of the resonance Raman spectra of AtGrxC5 (solid line) and PtGrxC1 (broken line) obtained at 17 K with 457.9-nm laser excitation at 7 cm^{-1} spectral bandwidth. Bands due to lattice modes of ice were subtracted from the spectra shown.

able to bind an Fe-S cluster, contained a far less stable Fe-S cluster with only 0.19 ± 0.04 iron/monomer (8). However, no Fe-S cluster could be reconstituted in AtGrxC5 C32S under anaerobic conditions following a standard procedure using glutathione and catalytic amounts of *E. coli* IscS, indicating that, in this case, the cysteine is indispensable (data not shown).

Determination of AtGrxC5 Redox State—The presence of four cysteine residues led us to investigate the redox state of the protein to better understand the catalytic mechanism utilized by the apoform of GrxC5. Whereas Cys²⁹, Cys³², and Cys⁸⁷ are conserved in many class I Grxs, Cys⁸⁰ is not conserved even in other plant GrxC5 isoforms. Analysis by mass spectrometry of AtGrxC5 WT (purified or not in the presence of GSH) revealed the presence of three protein peaks with molecular masses of 12,348.2, 12,654.4, and $12,961.2 \pm 2$ Da (data not shown). Although the intensity of the different peaks varied slightly, similar results were obtained by treating prereduced AtGrxC5 with GSSG. The peak at 12,654.4 Da was generally predominant. The first peak is consistent with a protein where the methionine is cleaved. The other peaks, corresponding to mass increments of 306.2 and 613 Da, are consistent with proteins also deprived of the methionine but containing one or two glutathione adducts. After reduction with DTT, a single protein peak with a molecular mass of 12,350 Da was observed, further supporting that the protein is glutathionylated. The same three protein peaks were obtained for AtGrxC5 C80S, indicating that Cys⁸⁰ is not a glutathionylation site. Concerning the AtGrxC5 C87S mutant, we detected two protein peaks corresponding to a reduced protein and to an oxidized protein with only one glutathione adduct, indicating that Cys⁸⁷ is most likely one of the glutathionylation sites; the other site is either Cys²⁹ or Cys³². In the case of the AtGrxC5 C32S mutant, only two protein peaks corresponding to oxidized proteins with one or two glutathione adducts were detected, a result consistent with Cys²⁹ and Cys⁸⁷ being the two modified cysteines. For AtGrxC5

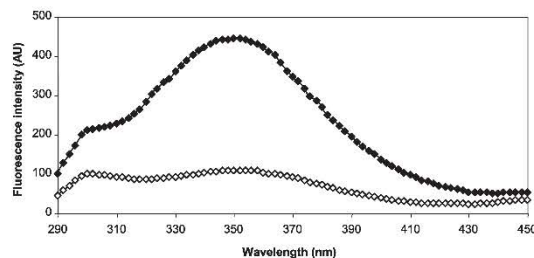


FIGURE 4. **Fluorescence spectra of AtGrxC5 under different redox states.** Emission spectra of reduced (black squares) and oxidized (white squares) apoforms of AtGrxC5 (excitation at 270 nm) were recorded with $10\text{ }\mu\text{M}$ protein at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in TE buffer. The reduced AtGrxC5 was obtained by treating the protein with 20 mM DTT before desalting on G25 columns. The prereduced AtGrxC5 was oxidized using 1 mM GSSG. AU, arbitrary units.

C29S, the protein is so unstable that we were not able to obtain reliable results confirming the loss of one glutathione adduct.

As AtGrxC5 possesses a single Trp residue as well as two Tyr residues very close to the active site at least in the primary sequence (IYSKTWC SYCT), the redox state of the apoform was also assessed by measuring its intrinsic fluorescence properties under reducing (GSH or DTT_{red}) or oxidizing (GSSG or DTT_{ox}) conditions. Reduced AtGrxC5 displayed an emission spectrum with two peaks at approximately 300 and 350 nm characteristic of a signal originating from Tyr and Trp residues, respectively (Fig. 4) (11). Addition of 1 mM GSSG but not DTT_{ox} led to the quenching of the fluorescence signal, whereas the subsequent addition of DTT_{red} restored the initial spectrum (Fig. 4 and data not shown). Because similar results were obtained for all monocysteine mutants except AtGrxC5 C29S and because DTT_{ox} had no effect on the AtGrxC5 redox state, the fluorescence quenching can be attributed to the glutathionylation of Cys²⁹.

Reductase Activity and Catalytic Mechanism of AtGrxC5—To clarify the catalytic mechanism used by AtGrxC5 and to

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

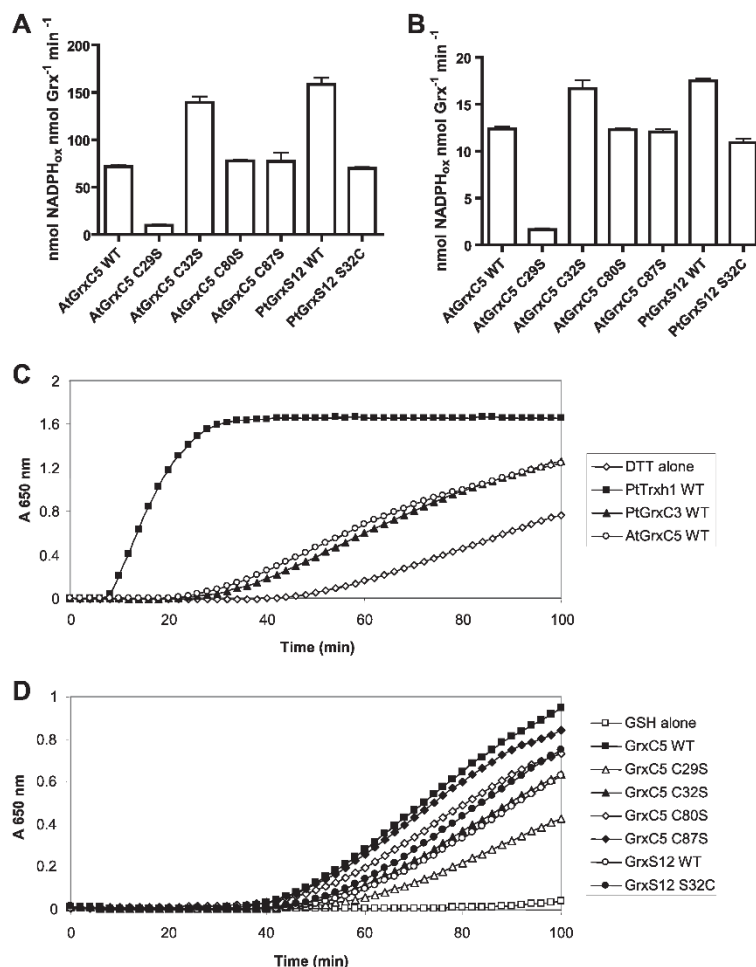


FIGURE 5. Comparison of reductase activity between AtGrxC5 and PtGrxS12 mutants. HED (A) and DHA (B) reduction was achieved, respectively, using 400 nM or 1 μ M Grx in the presence of 2 mM GSH and either 0.7 mM HED or 1 mM DHA. The data are represented as mean $\pm$ S.D. of three separate experiments. Insulin reduction was measured either using a DTT-based assay (C) in the presence of 2 μ M poplar Trxh1 or 10 μ M Grxs or using a GSH-based assay (D) containing a complete GSH regeneration system (NADPH/glutathione reductase/GSH) and WT or mutated versions of AtGrxC5 and PtGrxS12.

compare its efficiency with that of PtGrxS12, we first measured the activity of all protein variants using the conventional DHA and HED assays at a fixed enzyme concentration by following NADPH oxidation in the presence of a glutathione recycling system. In both assays, we obtained very similar results: AtGrxC5 C29S was inactive, whereas AtGrxC5 C80S and AtGrxC5 C87S appeared to be as efficient as the WT protein, and AtGrxC5 C32S was nearly 2 times more efficient (Fig. 5, A and B). Strikingly, the AtGrxC5 C32S mutant, mimicking the GrxS12 active site, was as efficient as PtGrxS12, and PtGrxS12 S32C, a protein variant mimicking the GrxC5 active site, had a lower efficiency comparable with AtGrxC5 WT (Fig. 5, A and B). These results indicate that Cys³² is not essential for the reaction mechanism but that it influences protein reactivity.

Following these experiments, we determined the catalytic parameters of AtGrxC5 WT and all monocysteine mutants in steady-state conditions (Table 2). During the initial preincubation time of the reaction mixture, HED and GSH give rise to a glutathionylated β -mercaptoethanol mixed disulfide (46). The kinetic analysis revealed an apparent K_m value of 0.20 ± 0.02 mM for glutathionylated β -mercaptoethanol and a k_{cat} of 1.21 ± 0.03 s⁻¹. These values are similar to those reported for human Grx2, which contains an SCSYC active site, but are lower by a factor 10–20 when compared with other class I Grxs including plant GrxC1 and -C4 (5).⁵ Concerning DHA reductase activity, the results provided an apparent K_m value of 0.21 ± 0.03 mM for

⁵ J. Couturier and N. Rouhier, unpublished data.

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

TABLE 2

Catalytic parameters for thioltransferase activity of AtGrxC5

The catalytic efficiency of AtGrxC5 WT and mutants was estimated using the HED and DHA activity assays under steady-state conditions following the procedures described under "Experimental Procedures." β -ME-SG, glutathionylated β -mercaptoethanol; ND, not determined.

Proteins	β -ME-SG			DHA			GSH		
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	mM	s ⁻¹	M ⁻¹ /s ⁻¹	mM	s ⁻¹	M ⁻¹ /s ⁻¹	mM	s ⁻¹	M ⁻¹ /s ⁻¹
GrxC5 WT	0.20 ± 0.02	1.21 ± 0.03	6.05 × 10 ³	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.01	1.10 × 10 ³	3.6 ± 0.8	0.69 ± 0.11	192
GrxC5 C29S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GrxC5 C32S	0.31 ± 0.03	3.39 ± 0.14	1.09 × 10 ⁴	0.26 ± 0.02	0.53 ± 0.02	2.04 × 10 ³	2.4 ± 0.4	1.49 ± 0.16	621
GrxC5 C80S	0.37 ± 0.05	1.43 ± 0.07	3.86 × 10 ³	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.01	1.28 × 10 ³	3.1 ± 0.4	0.61 ± 0.05	197
GrxC5 C87S	0.58 ± 0.07	1.83 ± 0.12	3.16 × 10 ³	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.01	1.04 × 10 ³	2.6 ± 0.4	0.53 ± 0.05	204

DHA and a k_{cat} of $0.23 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ (Table 2). These values are in the same order as those obtained for PtGrxS12 and CrGrx1 (6, 27). The apparent K_m value for GSH was determined by varying the amount of GSH in the DHA assay. AtGrxC5 WT possesses an apparent K_m value of $3.6 \pm 0.8 \text{ mM}$ for GSH similar to the one obtained for PtGrxS12 but also for other plant and non-plant Grxs in particular human Grx2 (5, 27). AtGrxC5 C80S and C87S possess catalytic parameters very similar to those of AtGrxC5 WT with only small variations observed in the affinity for glutathionylated β -mercaptoethanol. On the other hand, the AtGrxC5 C32S mutant displayed a better catalytic efficiency (about 2 times) compared with AtGrxC5 WT both in HED and DHA assays, originating from a better turnover number (Table 2).

In a second series of experiments, we used the classical insulin reduction assay to assess the disulfide reductase activity of AtGrxC5 (47). In the presence of DTT, AtGrxC5 and PtGrxC3, another dithiol Grx used for comparison, were able to reduce insulin but, as expected, with a lower efficiency than poplar Trxh1 (Fig. 5C). In alternative experiments, we measured the capacity of Grxs to reduce insulin by using an NADPH/glutathione reductase/GSH regeneration system (Fig. 5D). The ability of AtGrxC5 to reduce insulin was not improved compared with the DTT-based assay (Fig. 5D). Regarding the mutated proteins, as already observed for DHA and HED assays, AtGrxC5 C80S and AtGrxC5 C87S appeared almost as efficient as the WT protein, and AtGrxC5 C32S and PtGrxS12 S32C enzymatic activities were similar to PtGrxS12 WT and AtGrxC5 WT, respectively (Fig. 5D). Although delayed in time, AtGrxC5 C29S also surprisingly exhibited the capacity to slightly reduce insulin compared with the GSH alone control, possibly indicating some reactivity of the remaining cysteines toward insulin (Fig. 5D).

Next the capacity of AtGrxC5 to reduce putative physiological target proteins was evaluated by measuring the Grx-mediated recycling of MsrB1 and PrxIIIE, two plastidial enzymes, which are efficiently reduced by GrxS12 (14, 48). Hence, as already observed for previous activity tests, AtGrxC5 C80S was as efficient as AtGrxC5 WT for the regeneration of MsrB1, whereas AtGrxC5 C32S mutant was slightly more efficient (Fig. 6A). On the contrary, AtGrxC5 C87S mutant was significantly less efficient as already observed for PtGrxS12 C87S mutant (Fig. 6A) (14). Moreover, MsrB1 possesses an apparent K_m value of $2.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for AtGrxC5 WT (Fig. 6B), a value comparable with that obtained for PtGrxS12 (14). Strictly similar results were obtained with AtPrxIIIE (supplemental Fig. 4). These results are consistent with the previously described

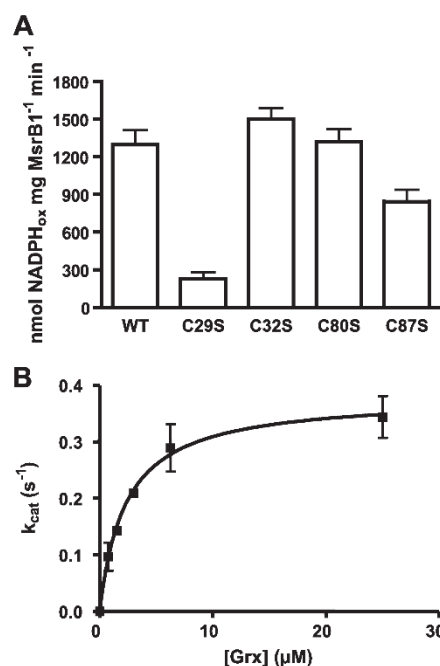


FIGURE 6. Regeneration of AtMsrB1 by AtGrxC5 variants. A, MsrB1 reduction was achieved using $25 \mu\text{M}$ GrxC5 variants. The data are represented as mean $\pm$ S.D. of three separate experiments. B, variation of the apparent turnover during *N*-acetylmethionine sulfoxide reduction catalyzed by $2.5 \mu\text{M}$ MsrB1 in the presence of GrxC5 WT at concentrations ranging from 0.75 to $25 \mu\text{M}$.

regeneration mechanism of these enzymes by class I Grxs (GrxC5 or -S12) through a monothiol mechanism (14), i.e. (i) the reduction of the sulfenic acid by GSH followed by (ii) the deglutathionylation of the glutathione adduct by the nucleophilic attack of AtGrxC5 catalytic cysteine and (iii) the glutathione-mediated reduction of glutathionylated AtGrxC5.

Structures of GrxC5 Apo- and Holoforms and Quality of Models—The crystallographic structures of apo- (GrxC5_{apo}) and holoforms (GrxC5_{holo}) of AtGrxC5 were solved to the resolution limits of 1.2 and 2.4 Å, respectively. AtGrxC5 in the apoform crystallizes in the space group $P2_12_12$ with one glutathionylated polypeptide chain in the asymmetric unit, whereas AtGrxC5 in the holoform crystallizes in the space group $R3$, and the asymmetric unit consists of two monomers and two glutathione molecules ligating one [2Fe-2S] cluster. AtGrxC5 adopts

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

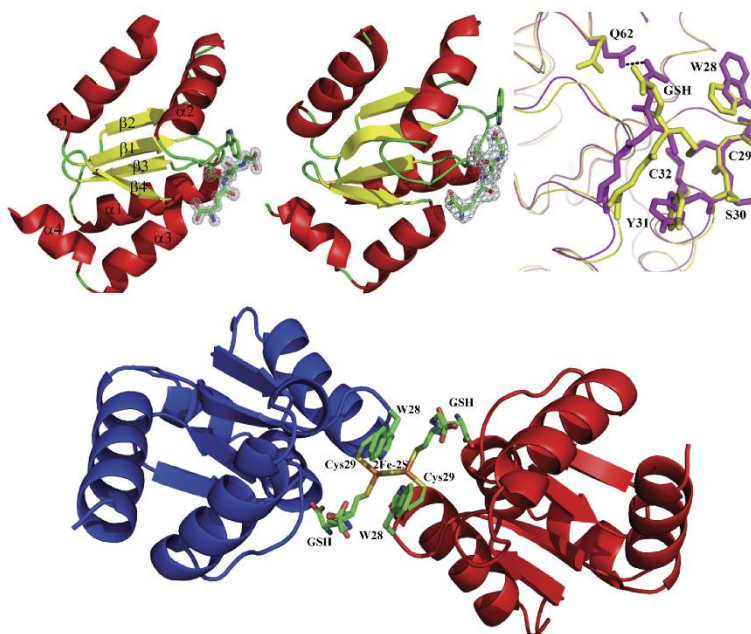


FIGURE 7. Schematic drawing of apo- and holoform AtGrxC5 structures. Upper left and middle, schematic representation of the overall fold of GrxC5_{apo} (left) and GrxC5_{holo} (middle). All α -helices are shown in red, β -strands are in yellow, and connecting loops are in green. Trp²⁸, Cys²⁹, and the GSH molecule are highlighted in sticks with final $2F_o - F_c$ electron densities (1.2σ level) covering chosen residues and ligands for clarity. Secondary structures are labeled in the left panel. Upper right, superimposition of the structures of the apoform (yellow) and holoform (magenta). The ²⁸WCYSC³² signature, Gln⁶², and the GSH molecule are highlighted in sticks. Bottom, α -carbon trace of the dimer of GrxC5_{holo}. Monomers A and B are colored blue and red, respectively. Trp²⁸, Cys²⁹, and the GSH molecules are represented as sticks.

TABLE 3

Rotamers of selected side chains in AtGrxC5, poplar GrxS12, poplar GrxC1, and human Grx2 crystal structures

The dashes for the glycyl residue indicate that no rotamer is defined because its side chain is a hydrogen atom. + represents a trans conformation, p represents a chi angle of $+60^\circ$, and m a chi angle of -60° . For Trp and Tyr residues, the numeric value corresponds to chi2 angle. For Glu residue, the numeric value corresponds to chi3 angle.

AtGrxC5			PtGrxS12			PtGrxC1			hGrx2		
apo	holo		apo	holo		apo	holo		apo	holo	
W28	p90		W28	p90		Y29	p90		S36	p	
C29	t		C29	t		C30	t		C37	t	
S30	p		S30	p		G31	-		S38	p	
Y31	m-85	m-30	Y31	m-85		Y32	m-85		Y39	m-85	m-30
C32	m	m	C32	t		C33	m		C40	m	
Q62	m60	m0	Q62	m60		Q62	m0		Q69	m0	

the classical Grx/Trx fold consisting of a four-stranded mixed β -sheet flanked by five α -helices (see nomenclature in Fig. 7). The crystal structures of AtGrxC5 and poplar GrxS12 are quite similar (root mean square deviation, 0.48 Å). The major difference between the two proteins concerns the presence of two additional cysteines (Cys³² and Cys⁸⁰) in AtGrxC5. The residue Cys⁸⁰, which is replaced by a Gly in PtGrxS12, is located in the loop between β 3 and β 4, and its lateral chain does not form any noticeable interaction. Cys³² is replaced by a serine in PtGrxS12. Both lateral chains exhibit different rotamers (Table 3). In GrxC5_{apo}, the thiol group of Cys³² is in the vicinity of the catalytic cysteine (Cys²⁹) and interacts with the backbone NH group of Lys²⁶, whereas in PtGrxS12, the side chain of Ser³² points toward the hydroxyl group of Ser²⁵.

In GrxC5_{apo}, the glutathione molecule is covalently bound to Cys²⁹, and its binding mode is identical to that of PtGrxS12 and very similar to that of other known glutathionylated Grx structures (25, 49–52). (i) The carboxylate of the glycyl residue forms a salt bridge with the side chain of His⁷² from the loop α 2- β 3. (ii) The NH and carbonyl groups of the cysteinyl residue are hydrogen-bonded to the main chain of Val⁷⁴, a generally conserved residue that precedes the *cis*-Pro⁷⁵ found in Trx superfamily members. (iii) The carboxylate of the γ -glutamate interacts with both NH groups of Cys⁸⁷ and Thr⁸⁸ from helix α 3. The high resolution of the electron density maps allowed us to observe two conformations for the lateral chain of Thr⁸⁸. Only in conformer m ($\chi_1 = -61^\circ$) is the hydroxyl group within hydrogen bond distance from the γ -Glu carboxylate. The other possible hydrogen bond donors and acceptors of the GSH moiety interact with water molecules or symmetry-related molecules.

In the dimeric GrxC5_{holo}, each iron atom of the Fe-S cluster is tetracoordinated by sulfur atoms: two from the cluster, one from the catalytic Cys²⁹, and one from glutathione. A comparative structural analysis of GrxC5_{apo} and GrxC5_{holo} illustrates the conformational changes upon Fe-S cluster binding. All the lateral chains of the residues of the ²⁸WCYSC³² signature but those of the cysteines adopt different rotamers in the apo- and holoforms with Trp²⁸ exhibiting flipped rotamers (Table 3). The side chain is located on the molecular surface, partially buried by a symmetry-related molecule in the apoform. Previ-

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

ous analyses of the PtGrxS12 crystal structure led to the conclusion that Trp²⁸ cannot adopt this p-90 conformation in the dimer because of steric conflicts (27). In GrxC5_{holo}, the Trp²⁸ rotamer observed is p90 where the NH group of the pyrrole moiety points toward the Fe-S cluster, whereas the phenyl ring is solvent-exposed (Fig. 7). The two residues Tyr³⁰ and Ser³¹ also present in the signature of human (hGrx2) undergo the same conformational rearrangement upon Fe-S cluster binding in both enzymes (Table 3) (25). Gln⁶² is the last residue that attracted our attention. Indeed, in GrxC5_{apo}, the lateral chain participates in the stabilization of the loop α_2 - β_3 containing the ⁷³TVP⁷⁵ motif involved in GSH binding, whereas it adopts another rotamer in GrxC5_{holo}, interacting with the GSH C-terminal carboxylate group, which also undergoes a conformational change. When GrxC5_{apo} and GrxC5_{holo} are superposed, one noticeable difference is the backward movement of the loops α_2 - β_3 and β_4 - α_3 , of the N-terminal part of the helix α_4 , and of the glutathione molecule to accommodate the Fe-S cluster and to preserve their interactions (Fig. 7). In addition to its interaction with the carboxamide of Gln⁶², the GSH C-terminal group is involved in a salt bridge to Lys³⁶. The rest of the new GSH/protein interactions are quaternary in nature, involving hydrogen bond donors or acceptors of the ²⁸WCSYC³² signature of monomer B for the GSH molecule of monomer A. These interactions are similar to those observed in the crystal structure of the holoform of hGrx2 (25).

DISCUSSION

GrxC5 Is the Fourth Plastidial Grx in A. thaliana—Trxs and Grxs are key players of the chloroplast redox network. Although considerable knowledge has been accumulated on chloroplastic Trx isoforms (53), the investigation of the roles of chloroplastic Grxs still lags behind. Hence, the characterization of AtGrxC5 is part of a more comprehensive work aimed at deciphering whether Grxs have specialized or redundant functions in plants and particularly in plastids.

The phylogenetic analysis of the GrxC5/S12 subgroup indicates that this subgroup is specific to land plants and that the GrxC5 isoforms are restricted to a specific plant family, the Brassicaceae, likely indicating that a single gene has been duplicated in the last common ancestor of this family. The fact that both genes have been retained suggested that they have developed specialized functions. At the transcript level, although AtGrxS12 shows slightly more expression than AtGrxC5 in rosettes, the expression of these two genes is relatively unaffected in *A. thaliana* leaves subjected to environmental constraints. Thus, despite having similar subcellular localization and transcript expression pattern, the replacement of a single amino acid in the AtGrxC5 active site cysteine conferred it specific properties.

Based on these results and on the previous characterization of GrxS12, GrxS14, and GrxS16, a model summarizing their mode of reduction and possible functions in the chloroplast has been established (Fig. 8). Importantly, GrxC5, GrxS14, and GrxS16 could exist as both apo- and holoforms, which exhibit different functionalities. From the literature on plant Grxs, it is likely that all proteins, except GrxS16, possess the capacity to deglutathionylate protein substrates, making them potential

central components regulating many plastidial metabolic pathways as several glutathionylated proteins have been identified in chloroplasts (6, 54, 55). However, this reaction is likely to be preferentially carried out by class I Grxs as only GrxC5 and -S12 have the capacity to efficiently regenerate target proteins, which uses only one cysteine for catalysis, such as PrxIIIE and MsrB1 (14, 48).⁶ Another major difference is that the reductase activity of GrxC5 and -S12 is dependent on GSH, whereas by analogy to the work achieved with *C. reinhardtii* Grx3, GrxS14 and presumably GrxS16 may be reduced by ferredoxin-thioredoxin reductase but not glutathione (6).

Regarding the role of the holoforms, it has been suggested from experimental data or by analogy to results obtained in yeast that class II Grxs (GrxS14 and -S16), which incorporate air-labile and transferable clusters, play a role in Fe-S cluster assembly machineries or in iron sensing (56). On the contrary, AtGrxC5, which binds a more stable Fe-S cluster that cannot be transferred for example to an apoferredoxin (data not shown), should play a different role. As initially suggested for human Grx2, it could act as a redox sensor, responding to oxidative conditions (23).

Minimum Requirement for Fe-S Cluster Assembly in Grxs—The discovery that AtGrxC5 can assemble an Fe-S cluster was initially unexpected. Our results demonstrate that, among the two additional candidate cysteines present in AtGrxC5 compared with PtGrxS12, Cys³² determines the ability of GrxC5 to incorporate an Fe-S cluster and also influences protein activity, whereas Cys⁸⁰ has no impact on both properties. Previous characterization of PtGrxS12 led us to conclude that the presence of a Trp residue in the active site signature prevented the incorporation of an Fe-S cluster as its replacement by a Tyr residue was sufficient to allow Fe-S center assembly (27). The present mutagenesis experiments conducted on both paralogs and their structural interpretation pointed to the importance of Cys³², which is indispensable for AtGrxC5 to integrate a cluster, despite the presence of the *a priori* unfavorable Trp²⁸. Interestingly, the comparison of the crystallographic structures of PtGrxS12 and GrxC5_{apo} with GrxC5_{holo} showed that Trp²⁸ adopts a different conformation in GrxC5_{holo}, with the hydrophobic part of its side chain being strikingly solvent-exposed. The beneficial effect of Cys³² on Fe-S cluster incorporation is likely attributed to its ability to form a hydrogen bond with the main chain of Lys²⁶ ($d(S-HN) = 3.46 \text{ \AA}$ where d is the bond distance), which would stabilize the loop containing residues 26–32 essential for Fe-S cluster binding. A serine at position 32 adopting the same conformation as Cys³² could not stabilize this loop because $d(O-HN)$ would exceed $3.5 \text{ \AA}$. This observation is consistent with the results obtained for the PtGrxC1 C34S mutant (³⁰YCGYS³⁴ active site) that incorporates a much more labile cluster than the WT. In this case, however, we believe that the mutant kept the ability to integrate a cluster due to the presence of Tyr³⁰, which participates in GSH stabilization.

From all these observations and the work published to date on other Fe-S-containing Grxs, it seems that, in addition to the

⁶ J. Couturier and N. Rouhier, unpublished results.

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

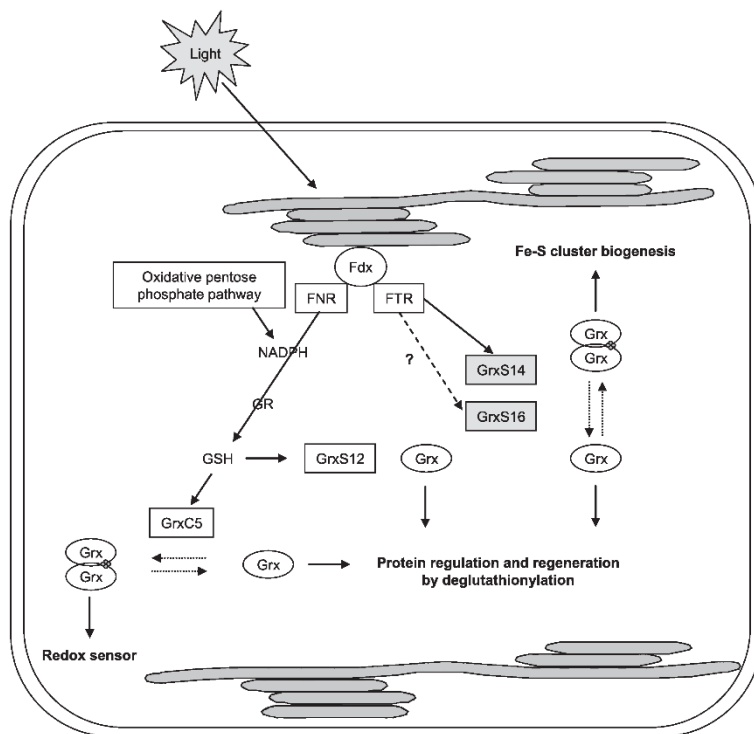


FIGURE 8. **Confirmed or potential roles for plastidial Grxs.** Grxs of class I are depicted in white, and those of class II are in gray. When the reduction pathway is not clearly demonstrated, broken lines are used. GrxC5, GrxS14, and GrxS16 possibly oscillate between an apomonomer and a holodimer state binding an Fe-S cluster. Fdx, ferredoxin; FNR, ferredoxin:NADP⁺ reductase; FTR, ferredoxin-thioredoxin reductase; GR, glutathione reductase.

catalytic cysteine that is absolutely required for the [2Fe-2S] incorporation, there are at least three crucial residues at positions -1 , $+1$, and $+3$ of the Cys, but they are not necessarily of the same weight (supplemental Table 3). Usually, when two residues at any of these positions have a positive effect, the protein can assemble a cluster. This is exemplified by this study where the stabilizing role of the second active site Cys in AtGrxC5, compared with PtGrxS12, could compensate for the *a priori* unfavorable effect of the Trp, which has to change its conformation without really participating in the cluster or GSH stabilization or in the dimerization.

Nevertheless, the recently identified trypanosome Grx possessing a TCPYC active site is able to incorporate an Fe-S cluster, whereas previous mutagenesis studies had suggested that the presence of the proline prevented Fe-S cluster assembly in plant and human Grxs with a YCPYC active site sequence. This indicates that an additional factor should be considered (8, 57, 58).

Role of Second Active Site Cysteines in Dithiol Grxs—Besides its importance for Fe-S cluster assembly in some Grxs, the role of the second active site Cys residue in the catalytic mechanism of dithiol Grxs remains an important open question. Its mutation affects Grx activity. However, whereas an increase in activity was observed for some yeast and mammalian dithiol Grxs (e.g. yeast Grx1, human Grx1 and Grx2, and pig Grx) mutated

on this second active site cysteine, other studies revealed a decrease in activity as in the case of yeast Grx2 and *E. coli* Grx1 and Grx3 (5, 18, 19, 50, 52, 59–62). The difference observed between yeast Grx1 and Grx2 has been attributed, at least partially, to the nature of two residues (59). The replacement in yeast Grx2 of Ser by Ala at position 23 and of Gln by Glu at position 52 was proposed to stabilize the glutathionylated form compared with yeast Grx1. However, the absence of conservation of these two residues in other studied proteins prevents the generalization of this hypothesis.

Another recent analysis conducted with several dithiol Grxs has demonstrated that the second active site cysteine determined the glutathione specificity of the second step of peptide deglutathionylation (*i.e.* the reduction of a glutathionylated Grx by a second GSH molecule) in *E. coli* Grx1 but not in human and yeast Grx1 (61). Alternatively, the formation of an intramolecular disulfide bond between the two active site cysteines could constitute a sort of side reaction, which might serve as a protective mechanism for Grx thiol groups in some conditions, although it would certainly at the same time decrease the catalytic efficiency by slowing down Grx regeneration and thus its specific activity. However, this explanation is consistent only for yeast Grx1 and mammalian Grxs but not for yeast Grx2 and *E. coli* Grx1 and Grx3, for which, by extrapolation of the work achieved with *E. coli* Grx1, one can assume that the decrease in

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

activity observed is correlated to a change in glutathione recognition, binding, or affinity.

Our mutagenesis results and activity measurements clearly demonstrate that AtGrxC5 falls in the same group as mammalian Grxs and yeast Grx1, which might indicate that the second active site cysteine is not involved in the specificity of the second step of the deglutathionylation reaction either (this has yet to be experimentally confirmed) but that an intramolecular disulfide can be formed and can decrease protein reactivity. Contrary to this expectation, we were not able to find conditions allowing the formation of such an intramolecular disulfide. Instead, we found that both Cys²⁹ and Cys⁸⁷ can be stably, at least partially, glutathionylated. This is for instance very similar to PtGrxS12, a monothiol Grx, where Cys²⁹ was shown to be glutathionylated and Cys⁸⁷ was bound to a β -mercaptoethanol molecule resulting from an HED pretreatment (27). Overall, this indicates that AtGrxC5 likely functions through a monothiol mechanism involving only Cys²⁹, but it does not clarify the role of Cys³².

A comparison between structures of reduced and glutathionylated forms of PtGrxC1 and human Grx2 (although GSH is not covalently linked in this case), which are both dithiol Grxs, shows that thiol groups of the active site cysteines do not adopt the same conformers in both forms (8, 24, 25). Whereas the cysteines are distant and not oriented in the same direction in the reduced forms, the thiol groups of both active site cysteines come closer upon glutathionylation, which might allow formation of an intramolecular bridge if no other unfavorable factor exists. Structural inspection of GrxC5_{apo} revealed that the thiol group of Cys³² is present in the direct environment of Cys²⁹ (Fig. 7), whereas in PtGrxS12, the side chain of Ser³² does not point toward Cys²⁹ and would be unchanged between reduced and oxidized forms. This structural characteristic might well be responsible for the difference of a factor 2 in catalytic efficiency observed between AtGrxC5 WT or PtGrxC5 S32C, which possess a Cys, and AtGrxC5 C32S or PtGrxC5 S12, which do not. Hence, although not forming an intramolecular disulfide, it is likely that during the catalytic cycle the proximity of Cys³² modifies the chemical environment of Cys²⁹, which might decrease the catalytic efficiency measured under our steady-state conditions.

Acknowledgment—Technical support from Alexandre Kriznik of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires of Nancy University is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Fernandes, A. P., and Holmgren, A. (2004) *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 63–74
- Rouhier, N., Lemaire, S. D., and Jacquot, J. P. (2008) *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 143–166
- Martin, J. L. (1995) *Structure* **3**, 245–250
- Fernandes, A. P., Fladvad, M., Berndt, C., Andréen, C., Lillig, C. H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., and Vlamis-Gardikas, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 24544–24552
- Johansson, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 7537–7543
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P., and Lemaire, S. D. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 8868–8876
- Aslund, F., Berndt, K. D., and Holmgren, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30780–30786
- 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., and Jacquot, J. P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7379–7384
- Rodríguez-Manzanique, M. T., Ros, J., Cabiscol, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 8180–8190
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J. P. (2004) *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1266–1277
- Couturier, J., Jacquot, J. P., and Rouhier, N. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2539–2557
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J. P. (2002) *FEBS Lett.* **511**, 145–149
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Sautiere, P. E., Brun, A., Laurent, P., Tagu, D., Gerard, J., de Fay, E., Meyer, Y., and Jacquot, J. P. (2001) *Plant Physiol.* **127**, 1299–1309
- Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Maréchal, P., Rouhier, N., Lemaire, S. D., and Rey, P. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 18963–18971
- Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E., Rouhier, N., and Rey, P. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 4371–4376
- Greetham, D., Vickerstaff, J., Shenton, D., Perrone, G. G., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (2010) *BMC Biochem.* **11**, 3
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., and Milzani, A. (2009) *Trends Biochem. Sci.* **34**, 85–96
- Bushweller, J. H., Aslund, F., Wüthrich, K., and Holmgren, A. (1992) *Biochemistry* **31**, 9288–9293
- Peltoniemi, M. J., Karala, A. R., Juvansuu, J. K., Kinnula, V. L., and Rudnick, L. W. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 33107–33114
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gualberto, J. M., Claxton, R., Naik, S. G., Huynh, B. H., Herrero, E., Jacquot, J. P., Johnson, M. K., and Rouhier, N. (2008) *EMBO J.* **27**, 1122–1133
- Molina-Navarro, M. M., Casas, C., Piedrafitá, L., Belli, G., and Herrero, E. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 2273–2280
- Rodríguez-Manzanique, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109–1121
- Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., and Holmgren, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 8168–8173
- Feng, Y., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J. P., Jin, C., and Xia, B. (2006) *Biochemistry* **45**, 7998–8008
- Johansson, C., Kavanagh, K. L., Gileadi, O., and Oppermann, U. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3077–3082
- Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D. A., Ferrer, J. L., Chauvat, F., and Jacquamet, L. (2009) *Biochemistry* **48**, 6041–6043
- Couturier, J., Koh, C. S., Zaffagnini, M., Winger, A. M., Gualberto, J. M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J. P., Lemaire, S. D., Didierjean, C., and Rouhier, N. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 9299–9310
- Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes, R., and Steinbiss, H. H. (1995) *Bio-Techniques* **19**, 196–198, 200
- Couturier, J., Didierjean, C., Jacquot, J. P., and Rouhier, N. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **403**, 435–441
- Behm, M., and Jacquot, J. P. (2000) *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 363–369
- Horling, F., Lamkemeyer, P., König, J., Finkemeier, L., Kandlbinder, A., Baier, M., and Dietz, K. J. (2003) *Plant Physiol.* **131**, 317–325
- Wormuth, D., Baier, M., Kandlbinder, A., Scheibe, R., Hartung, W., and Dietz, K. J. (2006) *BMC Plant Biol.* **6**, 15
- Seidel, T., Gollack, D., and Dietz, K. J. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 4374–4382
- Brown, R. E., Jarvis, K. L., and Hyland, K. J. (1989) *Anal. Biochem.* **180**, 136–139
- Fish, W. W. (1988) *Methods Enzymol.* **158**, 357–364
- Crouse, B. R., Sellers, V. M., Finnegan, M. G., Dailey, H. A., and Johnson, M. K. (1996) *Biochemistry* **35**, 16222–16229
- Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800
- CCP4: Collaborative Computational Project. Number 4 (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763
- Evans, P. (2006) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82
- Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022–1025

Plastidial GrxC5 Is an Iron-Sulfur Protein

41. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
42. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501
43. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21
44. Cheng, N. H., Liu, J. Z., Brock, A., Nelson, R. S., and Hirschi, K. D. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 26280–26288
45. Ströher, E., Wang, X. J., Roloff, N., Klein, P., Husemann, A., and Dietz, K. J. (2009) *Mol. Plant* **2**, 357–367
46. Luthman, M., and Holmgren, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6686–6690
47. Holmgren, A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9627–9632
48. Gama, F., Bréhélin, C., Gelhaye, E., Meyer, Y., Jacquot, J. P., Rey, P., and Rouhier, N. (2008) *Physiol. Plant* **133**, 599–610
49. Nikkola, M., Gleason, F. K., Saarinen, M., Joelson, T., Björnberg, O., and Eklund, H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16105–16112
50. Nordstrand, K., slund, F., Holmgren, A., Otting, G., and Berndt, K. D. (1999) *J. Mol. Biol.* **286**, 541–552
51. Xia, T. H., Bushweller, J. H., Sodano, P., Billeter, M., Björnberg, O., Holmgren, A., and Wüthrich, K. (1992) *Protein Sci.* **1**, 310–321
52. Yang, Y., Jao, S., Nanduri, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J., and Qin, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 17145–17156
53. Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F., and Reichheld, J. P. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 589–600
54. Gao, X. H., Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Michelet, L., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P., and Lemaire, S. D. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 2242–2248
55. Michelet, L., Zaffagnini, M., Vanacker, H., Le Maréchal, P., Marchand, C., Schroda, M., Lemaire, S. D., and Decottignies, P. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 21571–21578
56. Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M. K., and Jacquot, J. P. (2010) *Trends Biochem. Sci.* **35**, 43–52
57. Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E. M., Axelsson, R., Holmgren, A., and Lillig, C. H. (2007) *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 151–157
58. Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., and Krauth-Siegel, R. L. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 35224–35237
59. Discola, K. F., de Oliveira, M. A., Rosa Cussiol, J. R., Monteiro, G., Bárcena, J. A., Porras, P., Padilla, C. A., Guimarães, B. G., and Netto, L. E. (2009) *J. Mol. Biol.* **385**, 889–901
60. Gallogly, M. M., Starke, D. W., Leonberg, A. K., Ospina, S. M., and Mieyal, J. J. (2008) *Biochemistry* **47**, 11144–11157
61. Saaranen, M. J., Salo, K. E., Latva-Ranta, M. K., Kinnula, V. L., and Rud-dock, L. W. (2009) *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1819–1828
62. Yang, Y. F., and Wells, W. W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12759–12765

name	sequence
Protein expression	
AtGrxC5 WT for	5' CCCCCCATGGCTTCCTTTGGATCGAGAATG 3'
AtGrxC5 WT rev	5' CCCC GGATCCTCAACTCTGACCGTTTTTACC 3'
AtGrxC5 C29S for	5' TACTCCAAAACCTGGT CCT CATACTGTACTGAA 3'
AtGrxC5 C29S rev	5' TTCAGTACAGTATGAG GACCA AGTTTGGAGTA 3'
AtGrxC5 C32S for	5' ACTTGGTGCTCATACT CT ACTGAAGTGAAGACA 3'
AtGrxC5 C32S rev	5' TGTCTTCACTTCAGT AG AGTATGAGCACCAAGT 3'
AtGrxC5 C29S C32S for	5' TACTCCAAAACCTGGT CCT CATACT CT ACTGAAGTGAAGACA 3'
AtGrxC5 C29S C32S rev	5' TGTCTTCACTTCAGT AG AGTATGAG GACCA AGTTTGGAGTA 3'
AtGrxC5 C80S for	5' CCTAATGTTTTTCGTAT CT TGGCAAGCACATTGGT 3'
AtGrxC5 C80S rev	5' ACCAATGTGCTTGCC AG ATACGAAAACATTAGG 3'
AtGrxC5 C87S for	5' AAGCACATTGGTGGCTCCACAGATACAGTGAAG 3'
AtGrxC5 C87S rev	5' CTC ACT GTATCTGT GG AGCCACCAATGTGCTT 3'
GrxS12 S32C for	5' ACTTGGTGTTTCGTATT GT TCTGAGGTGAAGTCT 3'
GrxS12 S32C rev	5' AGACTTCACCTCAGAA CA ATACGAACACCAAGT 3'
GFP localization	
AtGrxC5 SP <i>Bam</i> HI	5' CTCCGGATCCATGGCAGTCACAGCATT 3'
AtGrxC5 SP <i>Age</i> I	5' CTCCACCGGTATAGCTCGAACAGAACAT 3'
AtGrxC10 SP <i>Bam</i> HI	5' CTCCGGATCCATGCGAGGTTTACGAAAC 3'
AtGrxC10 SP <i>Age</i> I	5' CTCCACCGGTGAGACTGTTGATGGTGCT 3'
AtGrxS13 SP <i>Bam</i> HI	5' CTCCGGATCCATGCAAAAAAGCAATTCTGA 3'
AtGrxS13 SP <i>Age</i> I	5' CTCCACCGGTACCACCACAGCATTCTCC 3'
RT PCR	
AtGrxC5 RT for	5' TATGTGGCAAGCACATTGGT 3'
AtGrxC5 RT rev	5' ACTTTCCAAGCTCCGTATGC 3'
AtGrxS12 RT for	5' TCTAGAGATGAACTGGTTGGTGA 3'
AtGrxS12 RT rev	5' AACCCAGCATGACTCATTGAC 3'
AtGrxS14 RT for	5' TGAGGCGTTTAAGACTGGAGA 3'
AtGrxS14 RT rev	5' CAACCACAACTCTGAAACATCA 3'
AtGrxS16 RT for	5' TGGGATTCTTGAAAGCCAAG 3'
AtGrxS16 RT rev	5' TGGCAAGTTCACCATTTTCA 3'

Supplemental Table 1: Primers used for cloning and site-directed mutagenesis experiments, for C/YFP localization and RT-PCR expression analysis

The *Nco*I, *Age*I and *Bam*HI cloning restriction sites are underlined in the primers. The mutagenic codons are in bold.

Stress	GrxS12			GrxS14			GrxS16		
	Mean	SE	Ratio	Mean	SE	Ratio	Mean	SE	Ratio
<i>cold</i>	1225	227	0.72	2880	692	0.85	844	115	0.74
control	1703	306		3385	820		1135	161	
<i>drought</i>	1459	260	0.86	2730	664	0.81	1110	134	0.98
control	1703	306		3385	820		1135	161	
<i>genotoxic</i>	1621	280	0.95	2858	699	0.84	1273	170	1.12
control	1703	306		3385	820		1135	161	
<i>heat</i>	1744	248	1.02	3309	670	0.98	1509	152	1.33
control	1703	306		3385	820		1135	161	
<i>osmotic</i>	993	208	0.58	1540	317	0.45	1532	210	1.35
control	1703	306		3385	820		1135	161	
<i>oxidative</i>	1571	299	0.92	2397	464	0.71	1613	288	1.42
control	1703	306		3385	820		1135	161	
<i>salt</i>	1495	342	0.88	2438	628	0.72	1225	149	1.08
control	1703	306		3385	820		1135	161	
<i>wounding</i>	1344	228	0.79	2721	592	0.80	967	139	0.85
control	1703	306		3385	820		1135	161	

Supplemental Table 2. Transcript regulation of plastidial Grxs using the tool “ResponseViewer” of the genevestigator database (<https://www.genevestigator.ethz.ch>). Depicted are transcript abundances in response to selected abiotic stress conditions. Data are not available for GrxC5. Mean, standard error and the ratio of treated and non-treated transcript amount are given (Colour code for the ratios: > 0.74: green; 0.75 to 0.86: yellow; 0.87 to 1.15: no colour; 1.16 to 1.41: orange; < 1.42: red).

Protein name	Active site sequence					Capacity to integrate an Fe-S cluster	References
	-1		+1		+3		
PtGrxC1 WT	Y	C	G	Y	C	Yes	8
PtGrxC1 C34S	Y	C	G	Y	S	Yes but less stable	8
PtGrxC1 G32P	Y	C	P	Y	C	No	8
PtGrxC4 WT	Y	C	P	Y	C	No	8
PtGrxC4 P28G	Y	C	G	Y	C	Yes	8
PtGrxS12 WT	W	C	S	Y	S	No	27
PtGrxS12 S32C	W	C	S	Y	C	Yes	This work
PtGrxS12 W28Y	Y	C	S	Y	S	Yes	27
PtGrxS12 S30G	W	C	G	Y	S	No	8
PtGrxS12 W28Y/S30G/S32C	Y	C	G	Y	C	Yes	27
AtGrxC5 WT	W	C	S	Y	C	Yes	This work
AtGrxC5 C32S	W	C	S	Y	S	No	This work
ScGrx6 WT	T	C	S	Y	S	Yes	63
HsGrx1 WT	T	C	P	Y	C	No	57
HsGrx1 P23S	T	C	S	Y	C	Yes	57
HsGrx2 WT	S	C	S	Y	C	Yes	57
HsGrx2 C40S	S	C	S	Y	S	Yes	57
HsGrx2 S38P	S	C	P	Y	C	Yes after reconstitution	57
TbGrx1 WT	T	C	P	Y	C	Yes	58

Supplemental Table 3: Active site sequence requirements for the incorporation of an Fe-S cluster into class I glutaredoxins.

All mutants (not reported here) for the first active site cysteine lose their ability to incorporate Fe-S clusters. From our results and those obtained previously it seems that amino acids, at position -1, +1 and +3 from catalytic cysteine, are most crucial for the ability of class I Grxs to incorporate an Fe-S cluster.

Regarding the position -1, where Tyr, Thr and Ser are favorable residues, the presence of a Trp residue prevents Fe-S cluster incorporation as observed in PtGrxS12 WT, PtGrxS12 S30G and AtGrxC5 C32S, unless this negative effect is counterbalanced by the presence of favourable residues at other important positions. This is particularly clear when comparing the effect of Ser to Cys exchange at position +3 of AtGrxC5 and PtGrxS12. We attributed this effect to a stabilizing role of the second active site cysteine. This is consistent with the cluster instability observed for the PtGrxC1 C34S variant compared to the WT protein.

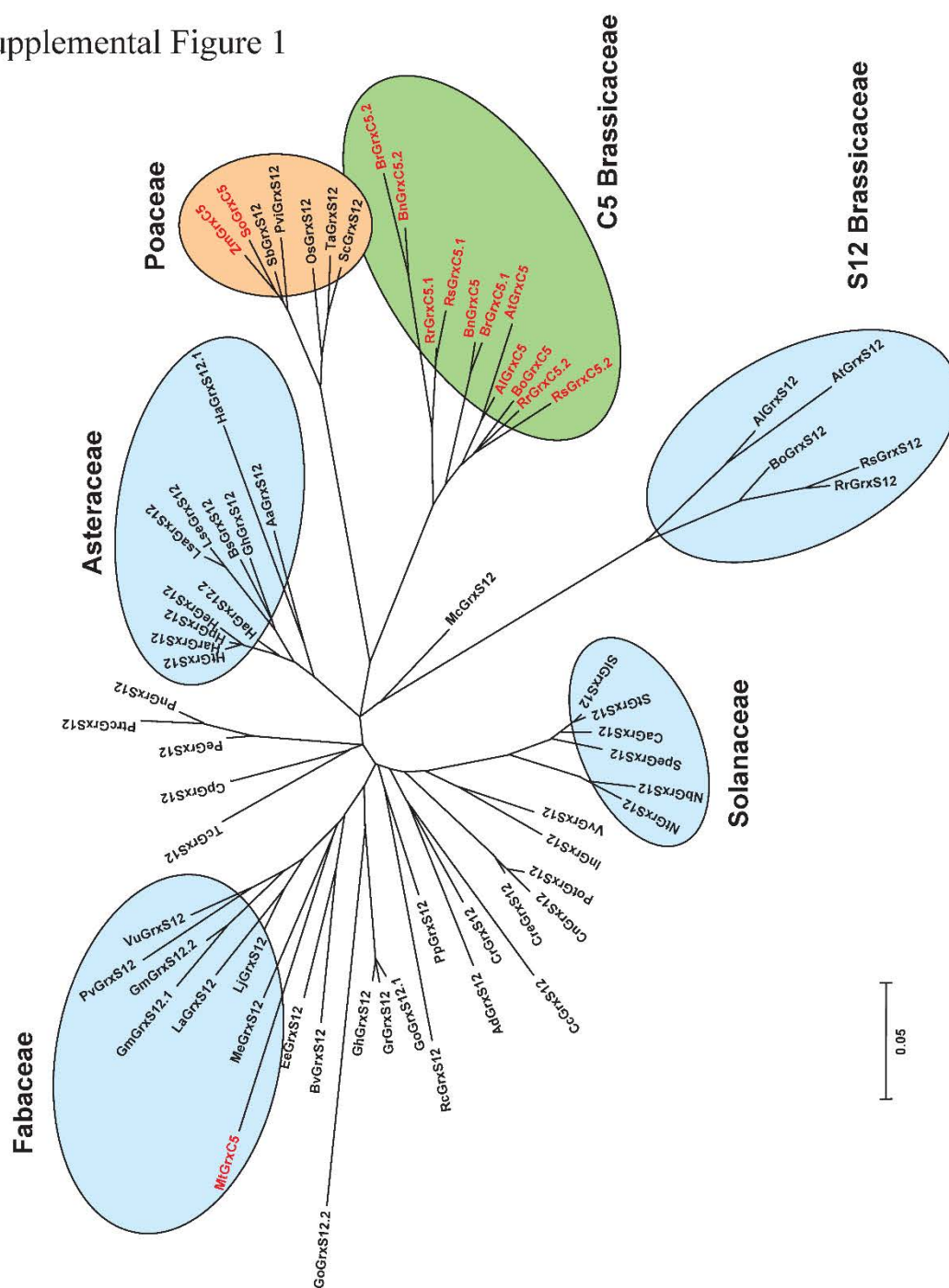
Concerning the position +1, it was concluded from previous mutagenesis work achieved on plant Grxs and human Grx1, that a Pro residue at this position prevented Fe-S incorporation into class I Grxs. However, the recent demonstration that *Trypanosoma brucei* Grx1, possessing a similar TCPYC active site than human Grx1, was able to incorporate an Fe-S cluster, led us to conclude that another structural factor is important in this case.

Pt stands for *Populus trichocarpa*, At for *Arabidopsis thaliana*, Sc for *Saccharomyces cerevisiae*, Hs for *Homo sapiens* and Tb for *Trypanosoma brucei*.

Additional reference

63. Luo, M., Jiang, Y. L., Ma, X. X., Tang, Y. J., He, Y. X., Yu, J., Zhang, R. G., Chen, Y., and Zhou, C. Z. (2010) *J Mol Biol* **398**, 614-622

Supplemental Figure 1

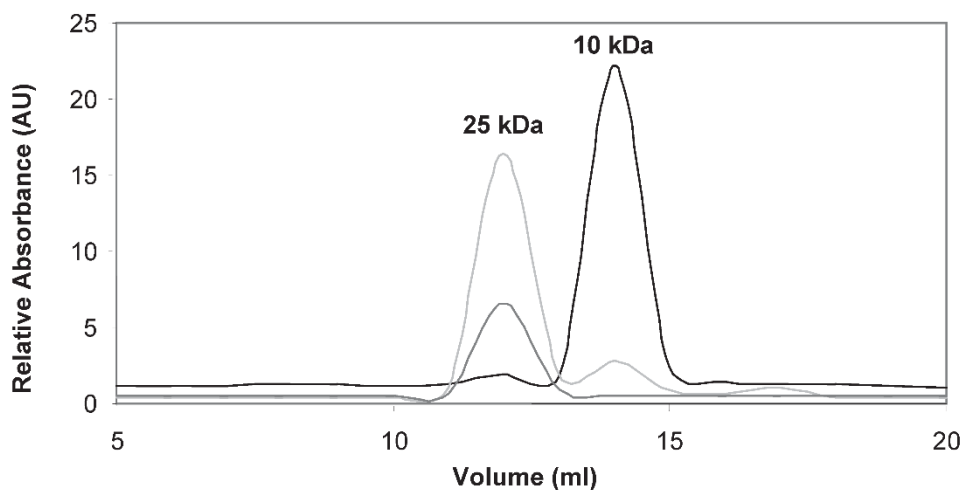


Supplemental Figure 1: Unrooted Neighbor-Joining (NJ)-based tree of the C5/S12 Grx group in higher plants.

The amino acid sequence alignments were done using CLUSTALW after removing the targeting sequences and imported into the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package 4.1. Phylogenetic analyses were conducted using the NJ method implemented in MEGA, with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, and with the Poisson correction model for distance computation. Bootstrap tests were conducted using 1,000 replicates. Branch lengths are proportional to phylogenetic distances. Some monocots (*Zea mays*, *Saccharum officinarum* and *Medicago sativa*) possess a single isoform with a WCSYC active site and thus have been named GrxC5 but their clustering with GrxS12 isoforms suggests that it has likely arisen from a punctual mutation.

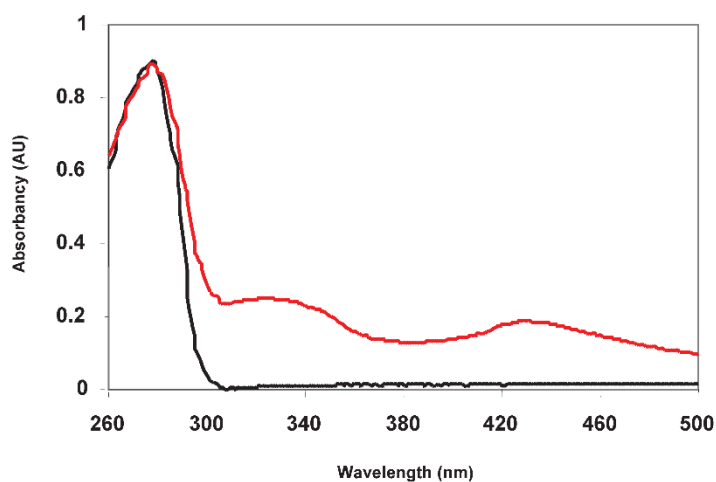
Except the sequences from *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Vitis vinifera*, *Sorghum bicolor* and *Oryza sativa*, all other sequences represent translated EST sequences. Accession numbers: AaGrxS12 EY063707: *Artemisia annua*, AdGrxS12 FG403273: *Actinidia deliciosa*, AlGrxC5 fgenesh2_kg.7_1317_AT4G28730.1: *Arabidopsis lyrata*, AlGrxS12 scaffold_303807.1: *Arabidopsis lyrata*, AtGrxC5 At4g28730: *Arabidopsis thaliana*, AtGrxS12 At2g20270: *Arabidopsis thaliana*, BnGrxC5.1 EV043783: *Brassica napus*, BnGrxC5.2 CD842978: *Brassica napus*, BoGrxC5 ES939795: *Brassica oleracea*, BoGrxS12 EH416953: *Brassica oleracea*, BrGrxC5.1 EX087267: *Brassica rapa*, BrGrxC5.2 BQ790866: *Brassica rapa*, BsGrxS12 GE530115: *Barnadesia spinosa*, BvGrxS12 BQ490131: *Beta vulgaris*, CaGrxS12 CO907008: *Capsicum annuum*, CcGrxS12 DV666461: *Coffea canephora*, CnGrxS12 EY751928: *Citrus sinensis*, CpGrxS12 EX280424: *Carica papaya*, CreGrxS12 EY786178: *Citrus reticulata*, CrGrxS12 FD415703: *Catharantus roseus*, EeGrxS12 DV131135: *Euphorbia esula*, GhGrxS12 AJ757568: *Gerbera hybrid*, GhiGrxS12 DW505594: *Gossypium hirsutum*, GmGrxS12.1 TC253242: *Glycine max*, GmGrxS12.2 TC253242: *Glycine max*, GoGrxS12.1 TC128843: *Gossypium*, GoGrxS12.2 ES834524: *Gossypium*, GrGrxS12 CO131590: *Gossypium raimondi*, HaGrxS12.1 DY919880: *Helianthus annuus*, HaGrxS12.2 CD858304: *Helianthus annuus*, HarGrxS12 EE627246: *Helianthus argophyllus*, HeGrxS12 EE661091: *Helianthus exilis*, HpGrxS12 EL486532: *Helianthus paradoxus*, HtGrxS12 EL469396: *Helianthus tuberosus*, InGrxS12 CJ753446: *Ipomoea nil*, LaGrxS12 FF836658: *Lupinus albus*, LjGrxS12 TC33319: *Lotus japonicus*, LsaGrxS12 TC22237: *Lactuca sativa*, LseGrxS12 TC3523: *Lactuca serriola*, McGrxS12 TC7972: *Mesembryanthemum crystallinum*, MeGrxS12 DV443557: *Manihot esculenta*, MtGrxC5 TC120163: *Medicago truncatula*, NbGrxS12 TC15077: *Nicotiana benthamiana*, NtGrxS12 TC18952: *Nicotiana tabacum*, OsGrxS12 Os08g45140: *Oryza sativa*, PeGrxS12 AJ773733: *Populus euphratica*, PnGrxS12 DB884942: *Populus nigra*, PotGrxS12 EY818955: *Poncirus trifoliata*, PpGrxS12 TC2238: *Prunus persica*, PtreGrxS12 fgenes4_pg.C_LG_II002543: *Populus trichocarpa*, PvGrxS12 TC7395: *Phaseolus vulgaris*, PviGrxS12 FL849775: *Panicum virgatum*, RcGrxS12 EG697409: *Ricinus communis*, RrGrxC5.1 FD974154: *Raphanus raphanistrum*, RrGrxC5.2 FD536988: *Raphanus raphanistrum*, RrGrxS12 EW737691: *Raphanus raphanistrum*, RsGrxC5.1 EY932268: *Raphanus sativus*, RsGrxC5.2 EW735466: *Raphanus sativus*, RsGrxS12 EW737691: *Raphanus sativus*, SbGrxS12 Sb07g023540: *Sorghum bicolor*, ScGrxS12 TC3840: *Secale cereale*, SIGrxS12 TC193367: *Solanum lycopersicum*, SoGrxC5 TC78105: *Saccharum officinarum*, SpeGrxS12 AW618580: *Solanum pennellii*, StGrxS12 TC166319: *Solanum tuberosum*, TaGrxS12 TC283276: *Triticum aestivum*, TeGrxS12 CU482458: *Theobroma cacao*, VuGrxS12 FF555518: *Vigna unguiculata*, VvGrxS12 GSVIVP00028455001: *Vitis vinifera*, ZmGrxC5 TC384612: *Zea mays*.

Supplemental Figure 2

**Supplemental Figure 2: Gel filtration chromatography of apo- and holoform of AtGrxC5**

Absorbance at 280 nm of apo- and holoforms of GrxC5 are depicted in black and light grey respectively. In addition, the presence of the Fe-S cluster in the dimeric holoGrxC5 has been detected by the absorbance at 430 nm (grey line). From molecular masses of protein standards used for calibration and from the elution volumes, the deduced apparent molecular masses of apo- and holoform were 10 kDa and 25 kDa respectively.

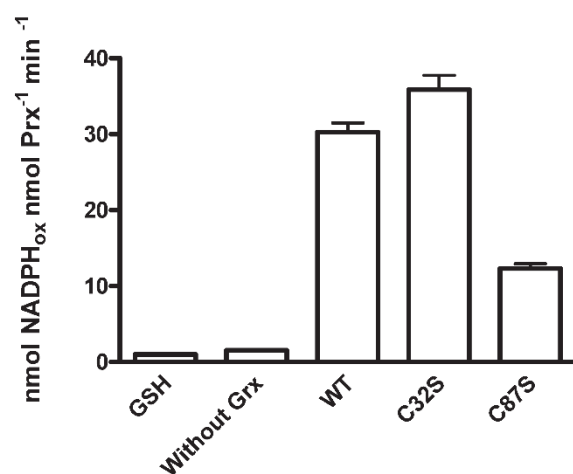
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 3: Comparison of the UV-visible absorption spectra of PtGrxS12 WT (black line) and the holoform of PtGrxS12 S32C (red line).

Spectra were recorded after an aerobic purification in 30 mM Tris-HCl pH 8.0. The PtGrxS12 S32C spectrum is very similar to those recorded for other plant class I Grxs with two absorption bands in the 300-500 nm region centered at 320 nm and 432 nm and is uniquely characteristic of a $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ center (8,20).

Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4: Regeneration of chloroplast PrxII by GrxC5. PrxII peroxidase activity was recorded towards tBOOH and the efficiency of GrxC5 variants was evaluated. Data are means $\pm$ SD from n=3.

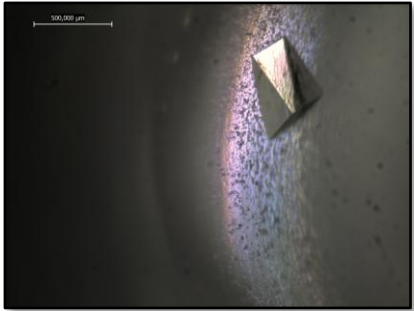
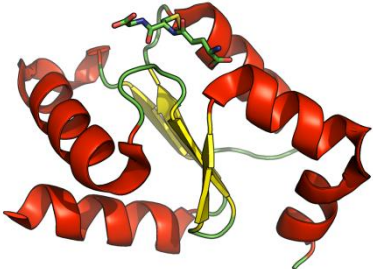
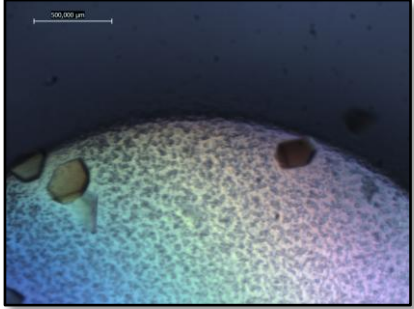
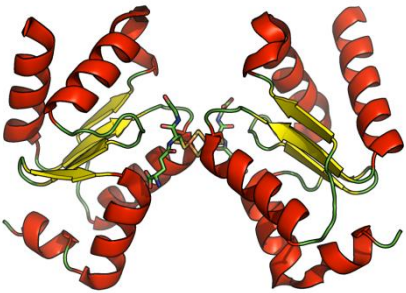
AtGrxC5 apo	 Cristallographie des rayons X – 1,2Å	
AtGrxC5 holo	 Cristallographie des rayons X – 2,4Å	

Figure n°42 Récapitulatif des différentes structures présentes au sein de l'article « *Arabidopsis Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins* ».

II.B.2. La glutarédoxine 2 de *Chlamydomonas reinhardtii*

II.B.2.a. Introduction

Les glutarédoxines (Grx) sont des petites oxydoréductases thermostables utilisées pour maintenir l'homéostasie redox des thiols en fonction du pouvoir réducteur du NADPH (Prinz et al, 1997). En plus de leur fonction dans la défense bactérienne et anti-oxydante, des études récentes semblent montrer que les Grx de classe I (Lillig et al, 2005) ou les Grx de classe II (Ojeda et al, 2006; Rodríguez-Manzanque et al, 2002) sont impliquées dans l'homéostasie et dans le transport du fer. Ces Grx ont notamment la capacité de coordonner un centre [2Fe-2S] par le biais de leur cystéine catalytique avec le concours du GSH au sein d'un homodimère (Couturier et al, 2011; Iwema et al, 2009; Johansson et al, 2007; Johansson et al, 2011; Rouhier et al, 2007). Pendant longtemps il a été pensé que certaines Grx de classe I étaient incapables d'incorporer des centres Fe-S, notamment celles ayant une signature catalytique CPYC (Bandyopadhyay et al, 2008; Johansson et al, 2007; Mesecke et al, 2008; Rouhier et al, 2007). Cette observation venait du fait que toutes les Grx-CPYC étaient purifiées sous forme apo et que la forme holodimérique n'était jamais observée. Il a été supposé que la proline de la signature pouvait être un antidéterminant stérique dans la formation de l'holodimère. Cette hypothèse a ainsi ensuite été étendue à toutes les Grx possédant une proline juste après la cystéine catalytique (Izquierdo et al, 2008; Rouhier et al, 2007).

Très récemment, la Grx1 de *Trypanosoma brucei* (TpGrx1) possédant une signature CPYC a été montré capable d'incorporer un centre [2Fe-2S]. toutefois l'holodimère résultant est très instable (Ceylan et al, 2010). Après la découverte de la première Grx-CPYC capable d'incorporer un centre Fe-S, l'équipe du professeur Nicolas Rouhier a montré que la Grx2 de *C. reinhardtii* (CrGrx2) possédant aussi une signature CPYC était capable d'incorporer un centre

Fe-S. Afin de déterminer les spécificités structurales de la CrGrx2 lui permettant d'incorporer un centre Fe-S, sa structure sous forme apo a été résolue par cristallographie des rayons X. Les différentes observations réalisées par le biais d'une étude phylogénétique et par comparaison de sa structure avec celles déjà résolues sont présentées.

II.B.2.b. Résultats et discussion

• Etude phylogénétique

Pendant longtemps les Grx-CPYC ont été considérées comme incapable de lier des centres Fe-S à cause de la présence d'une proline. Afin de vérifier s'il existe un sous-groupe spécifique dans lequel il y a la CrGrx2 et la TpGrx1, une étude phylogénétique a été réalisée. L'arbre présenté ci-dessous (Figure n°43) a été réalisé uniquement avec des Grx-CPYC pour lesquelles la structure a été déterminée que ce soit par RMN ou par cristallographie des rayons X.

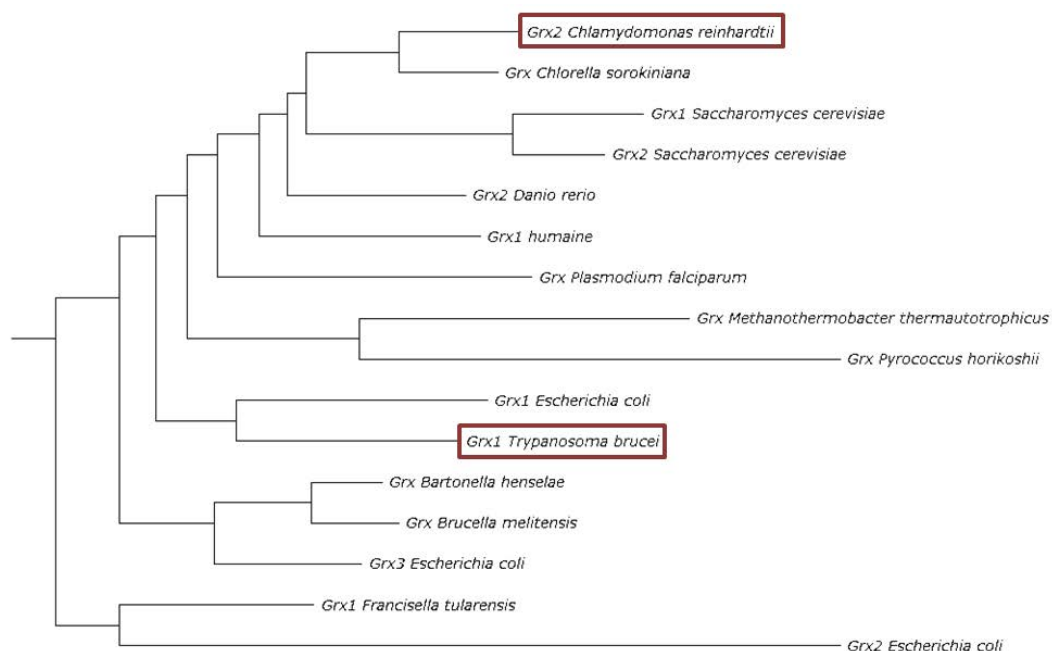


Figure n°43 Arbre phylogénétique des différentes glutarédoxines CPYC dont la structure est connue auxquelles a été ajoutée la TpGrx1. Sont entourées en rouge la CrGrx2 et la TpGrx1 ayant la capacité d'incorporer un centre Fe-S.

Dans pratiquement tous les cas la purification est effectuée en aérobie ce qui peut causer l'oxydation du centre Fe-S et par conséquent la dissociation prématurée de la forme holodimérique. Ainsi, en absence d'observations sur la capacité de certaines Grx-CPYC à incorporer un centre Fe-S (Discola et al, 2009; Li et al, 2010; Yogavel et al, 2014; Yu et al, 2008), on partira du principe que la CrGrx2 et la TpGrx1 sont les seules Grx de ce groupe à pouvoir incorporer un centre Fe-S de façon sûre. Toutefois, même si les formes holodimériques de la TpGrx1 et de la CrGrx2 sont observées celles-ci ne sont pas très stables. Pour les 16 Grx-CPYC recensées on remarque que la CrGrx2 et la TpGrx1 sont relativement éloignées l'une de l'autre au sein de l'arbre (Figure n°43). De plus, aucun groupe spécifique regroupant la CrGrx2 et la TpGrx1 n'apparaît clairement et les différentes Grx-CPYC sont surtout séparées selon qu'elles proviennent d'un organisme eucaryote ou procaryote. Ainsi, il apparaît difficile de discriminer entre les Grx-CPYC qui peuvent fixer un centre Fe-S et celles qui ne le peuvent pas juste à partir de la séquence. De plus, l'absence d'informations complique considérablement la détermination des résidus essentiels. Afin d'obtenir une réponse et de différencier les différentes Grx-CPYC nous avons réalisé la caractérisation structurale par cristallographie des rayons X de la CrGrx2.

- Cristallisation et affinement de la structure

Une première expérience de cristallisation de la CrGrx2 a été réalisée suite à la purification de la forme holodimérique de la protéine dans un tampon Tris 30mM à pH 8. Contre toute attente des cristaux transparents de la CrGrx2 ont été obtenus à partir de plusieurs conditions de cristallisation alors qu'une coloration brune était attendue (Figure n°44). La protéine a été cristallisée dans le groupe d'espace $P3_221$ par la méthode de microbatch en goutte à l'huile à 4°C. Afin d'obtenir les cristaux A (CrGrx2-A), 1 μ L de la protéine à 8,5 mg.mL⁻¹ a été mélangé avec 1 μ L de la condition de cristallisation numéro 28 du kit commercial Hampton I

(Hampton Research). La condition de cristallisation contient un mélange de 30% PEG8000, d'acétate de sodium à 0,2M et de cacodylate de sodium à 100mM pH 6,5. Les cristaux B (CrGrx2-B) sont obtenus en mélangeant 1 μ L de la protéine à 20,8 mg.mL⁻¹ avec 1 μ L de la condition de cristallisation numéro 15 du kit commercial Hampton I (Hampton Research). Cette condition de cristallisation possède le même agent précipitant et le même tampon que la condition n°28. Seule la nature du sel est différente. L'acétate de sodium est remplacé dans ce cas par du sulfate d'ammonium à la même concentration de 0,2M. Les plus beaux cristaux ont ensuite été cryo-protégés par une solution contenant la condition de cristallisation et 20% (v/v) de glycérol avant de les stocker et de les faire diffracter à 100K sur le diffractomètre SuperNova de notre laboratoire ou sur la ligne FIP-BM30A de l'ESRF.

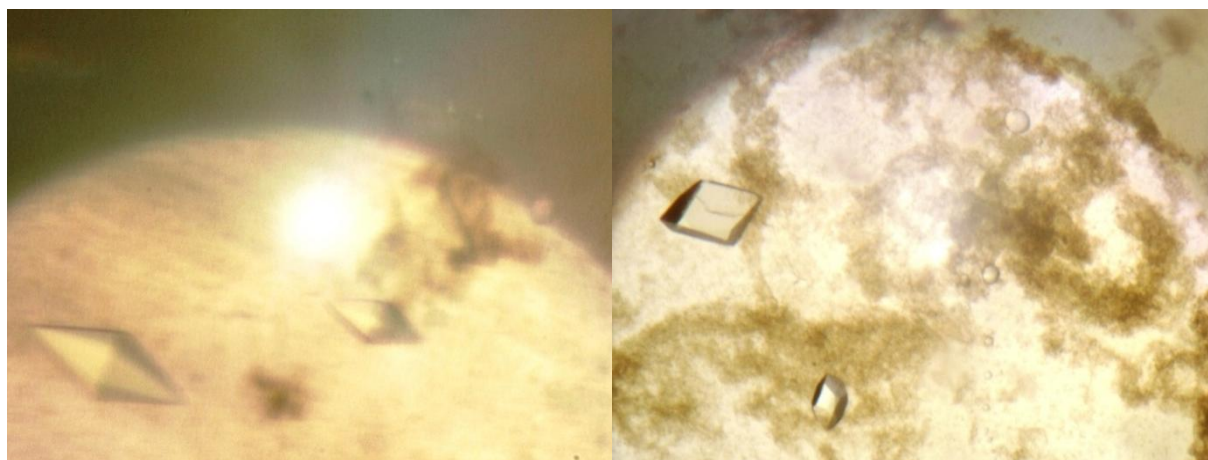


Figure n°44 Photographies des cristaux obtenus pour la Grx2 de *C. reinhardtii*. A gauche figure un cristal mesuré sur la ligne FIP-BM30A de l'ESRF et à droite un cristal mesuré sur la diffractomètre SuperNova de notre laboratoire.

Les données obtenues à 1,5Å de résolution à l'ESRF pour la CrGrx2-A ont ensuite été traitées de façon classique en utilisant XDS (Kabsch, 2010) pour l'intégration puis Scala (Evans, 2005) provenant de la suite CCP4 (Winn et al, 2011) pour la mise à l'échelle et la réduction des données. Les données obtenues sur le diffractomètre SuperNova de notre laboratoire pour la

CrGrx2-B à 2,4Å de résolution ont été intégrées et mises à l'échelle à l'aide du logiciel CrysAlisPro (Agilent). Les deux structures ont ensuite été résolues par remplacement moléculaire en utilisant Molrep (Vagin & Teplyakov, 2009) à partir de la structure cristallographique de la glutarédoxine 2 humaine (code pdb 2FLS). Chaque macrocycle d'affinement est constitué d'un d'affinement automatique réalisé par la biais du module phenix.refine de PHENIX (Adams et al, 2010) suivi d'un affinement manuel en utilisant le logiciel graphique Coot (Emsley et al, 2010). Les structures finales (Tableau n°10) sont ensuite analysées par MolProbity (Chen et al, 2010).

Collecte des données	CrGrx2-A	CrGrx2-B
Ligne synchrotron	FIP-BM30A	-
Groupe d'espace	$P3_221$	$P3_221$
Paramètre de maille (Å)	45,63 x 45,63 x 104,65 $\alpha = \beta = 90^\circ \gamma = 120^\circ$	45,38 x 45,38 x 104,24 $\alpha = \beta = 90^\circ \gamma = 120^\circ$
Résolution (Å)	39,52-1,50 (1,58-1,50)	14,70-2,40 (2,53-2,40)
Réflexions uniques	20186 (2951)	5212 (723)
Redondance moyenne	3,7 (3,6)	6,0 (3,4)
Complétude (%)	96,5 (97,1)	99,1 (97,1)
R_{merge}	0,043 (0,356)	0,108 (0,378)
R_{meas}	0,049 (0,414)	0,118 (0,435)
R_{pim}	0,023 (0,202)	0,046 (0,206)
I/ σ (I) moyen	12,7 (2,2)	12,3 (3,0)
Affinement		
Résolution (Å)	39,52-1,50	14,70-2,40
$R_{\text{free}}/R_{\text{work}}$	19,78/17,43	23,11/18,57
Nombre total d'atomes	991	899
Nombre de molécules d'eau	166	106
Facteur B moyen	39,39	
Ramachandran favorable	97,22%	97,14%
Ramachandran défavorable	0,00%	0,00%
R.m.s déviations		
Liaisons	0,017	0,006
Angles	1,673	0,919
MolProbity analyse		
Clashscore, tous atomes	1,2 (99%)	2,51 (100%)
MolProbity score	0,98 (100%)	1,26 (100%)

Tableau n°10 Tableau récapitulatif des statistiques cristallographiques de la glutarédoxine 2 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les valeurs indiquées entre parenthèses pour la collecte des données correspondent à la couronne de plus haute résolution.

- Analyse structurale de la CrGrx2

Contrairement à la forme holo attendue, la CrGrx2-A/B (107 acides aminés) se présente sous une forme monomérique au sein de l'unité asymétrique qui contient environ 56% de solvant. Cette observation va dans le sens de la coloration des cristaux indiquant que la forme holo n'est pas stable dans un environnement aérobie. Toutefois, l'analyse de la structure de la CrGrx2 apo peut apporter des réponses quant à sa capacité à incorporer des centres Fe-S. La structure de la CrGrx2 présente le repliement classique des glutarédoxines (Figure n°45) qui est du type $\alpha 1\beta 1\alpha 2\beta 2\alpha 3\beta 3\beta 4\alpha 4\alpha 5$. La structure tridimensionnelle de la protéine s'agence autour d'un feuillet β composé des 4 brins dont le brin $\beta 3$ est antiparallèle aux autres. Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont positionnées d'un côté du feuillet alors que les hélices $\alpha 2$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ sont situées de l'autre côté. La cystéine catalytique C27 se situe au niveau N-terminal de l'hélice $\alpha 2$. Les différents motifs essentiels dans la stabilisation du GSH sont également présents comme le motif SVP situé entre l'hélice $\alpha 3$ et le brin $\beta 3$ ainsi que le motif GG réalisant la jonction entre le brin $\beta 4$ et l'hélice $\alpha 4$.

L'étude structurale des CrGrx2-A et CrGrx2-B permet de mettre en évidence l'état d'oxydation des différentes cystéines de la protéine. Au sein de la CrGrx2-A, la distance entre les deux atomes S γ des cystéines de la signature CPYC est de 3,1Å. Par contre, un pont disulfure est observé pour la CrGrx2-B (Figure n°46) avec une distance de 2,1Å. Cette observation permet de montrer que ce pont disulfure a été progressivement cassé lors de la collecte de données par des dégâts d'irradiation provenant des rayons X de la ligne synchrotron. De plus, la présence d'un pont disulfure au niveau du site actif montre que ces cystéines sont facilement oxydables. Cette constatation est renforcée par le fait qu'un pont disulfure est également observé (ou cassé) dans les structures des Grx-CPYC qui ont été mesurées sur une ligne synchrotron (code pdb 3LGC, 3MSZ, 4KX4, 4MZB, 4MZC, 3D4M, 4I2T, 4I2U et 1JO8).

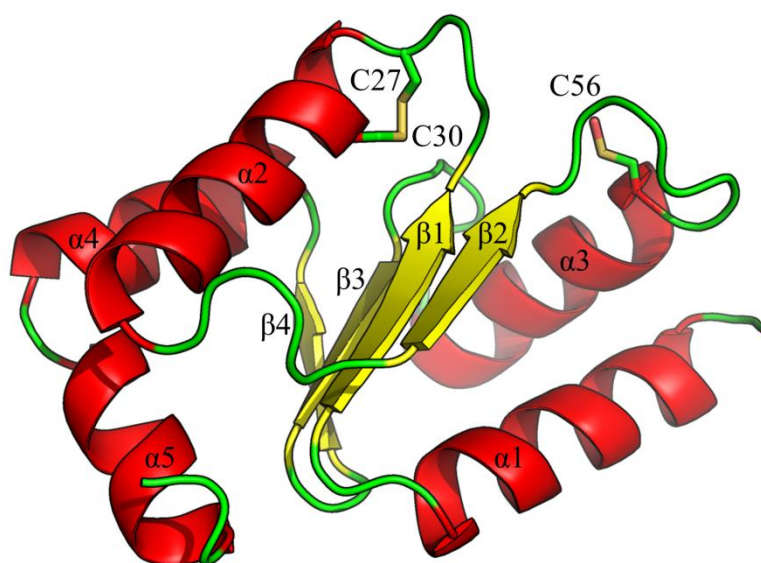


Figure n°45 Représentation en mode ruban et flèche de la structure de la protéine CrGrx2-B. Les structures secondaires sont annotées et les trois cystéines sont représentées en bâtons. Les cystéines 27 et 30 du motif CPYC forment un pont disulfure et la cystéine 56 est sous la forme d'un acide sulfénique.

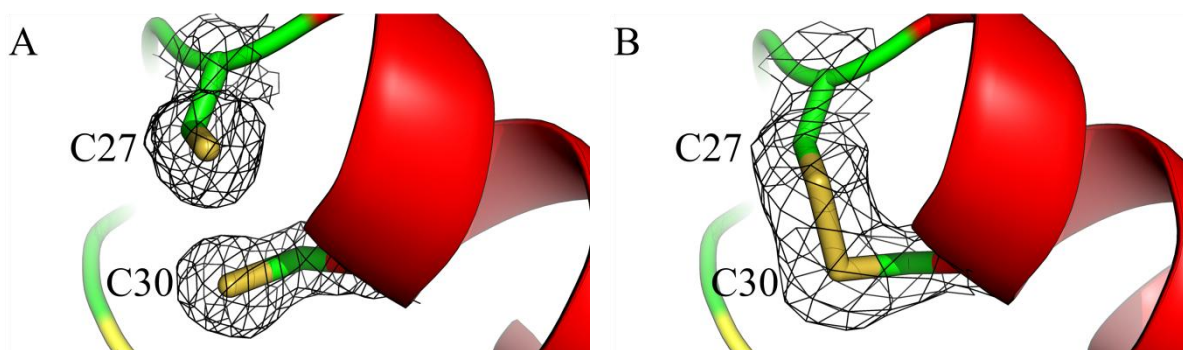


Figure n°46 Influence du rayonnement synchrotron sur le pont disulfure de la CrGrx2. (A) Site actif de la CrGrx2-A à 1,5Å de résolution où le clivage du pont disulfure a été induit par le faisceau de rayons X synchrotron. (B) Site actif de la CrGrx2-B à 2,4Å de résolution mesuré sur le diffractomètre SuperNova (Agilent) de notre laboratoire avec un faisceau moins intense. La densité électronique est représentée par une carte σ_A 2mFo-DFc avec un contour de $1,2\sigma$.

Pour renforcer l'idée que la protéine CrGrx2 a été suroxydée avant la cristallisation et que la forme holodimérique s'est dissociée, on peut observer que la densité électronique de la cystéine C56 correspond à une forme oxydée RS-OH (Figure n°47). La densité électronique à proximité de l'atome S γ de la cystéine C56 ne peut pas correspondre à une molécule d'eau car la distance observée entre le S γ et l'oxygène est de 1,7Å. Bien que l'état d'oxydation exacte du résidu cystéine n'ait pas été déterminé, la carte de densité électronique est plus en adéquation avec un état acide sulfénique.

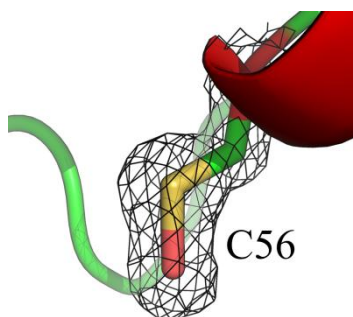


Figure n°47 Représentation de la densité électronique de la cystéine 56. La densité électronique permet d'observer l'état d'oxydation de la C56 se présentant sous la forme d'un acide sulfénique. La distance entre le S γ et l'O δ est de 1,7Å ce qui est incompatible avec une molécule d'eau. La densité électronique est représentée par une carte σA 2mFo-DFc avec un contour de 1,2 σ .

L'analyse des deux structures résolues pour la CrGrx2 révèle que celle-ci est oxydée et qu'aucune molécule de GSH n'est retrouvée au niveau de son site de fixation habituel. Par contre, dans le cas de la CrGrx2-A on retrouve une molécule d'acétate provenant de la condition de cristallisation à la position habituellement occupée par la fonction acide carboxylique de la partie γ -glutamyle du GSH (Figure n°48). Les chaînes principales des résidus G85 et D86, situés juste après le motif GG, participent à la stabilisation de l'acétate par le biais de liaison hydrogène. Ces positions sont celles usuellement retrouvées dans la stabilisation de la partie γ -glutamyle du GSH.

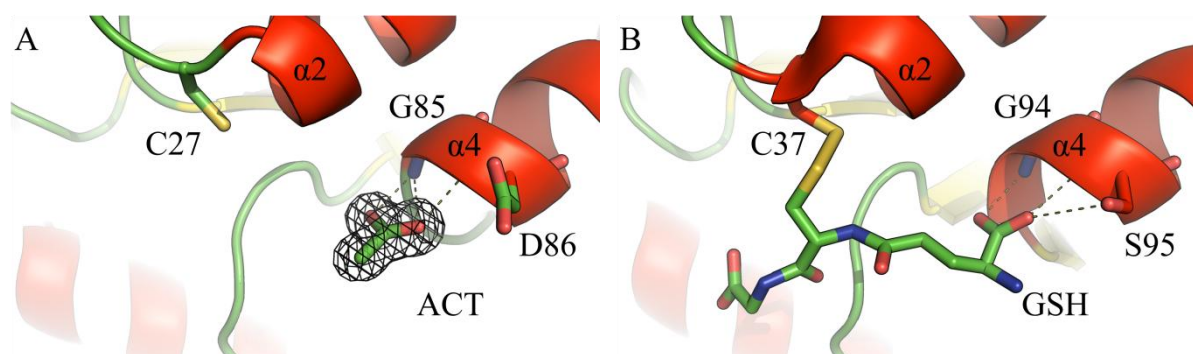


Figure n°48 Représentation en mode ruban et flèche du site de fixation habituel du glutathion. (A) Au sein de la CrGrx2-A, une molécule d'acétate est retrouvée dans la densité électronique. La densité électronique est représentée par une carte σ_A 2mFo-DFc avec un contour de $1,2\sigma$. (B) Site de fixation du glutathion au sein de la glutarédoxine 2 de *Danio rerio* (code pdb 3UIW). Les principaux résidus impliqués dans la stabilisation de l'acétate et du glutathion sont représentés par des bâtons.

- Comparaison avec les structures connues de Grx-CPYC

La CrGrx2 ne présente pas de particularités notables ni au niveau de sa séquence, ni au niveau de sa structure qui est très similaire à celles des autres Grx-CPYC avec un RMSD moyen de $1,2\text{\AA}$ (Figure n°49). Une analyse structurale des holodimères de Grx de classe I (code pdb 2HT9, 2E7P et 3RHC) a permis d'identifier les résidus impliqués dans la stabilisation du GSH et dans la création de liaison hydrogène entre les deux monomères (Figure n°50). La comparaison de ces résidus avec ceux de la CrGrx2 et de la TpGrx1 ne montre pas de réelle différence. Cette observation est aussi valable avec les résidus de la GrxC3 et GrxC4 d'*A. thaliana* qui ne peuvent pas incorporer un centre Fe-S (Rouhier et al, 2007).

En absence de la structure holodimérique de la CrGrx2 ou de la TpGrx1 il n'est pas possible à partir des données actuelles de savoir pourquoi ces deux Grx-CPYC peuvent incorporer un centre Fe-S alors que les autres semblent en être incapables.



Figure n°49 Superposition de toutes les Grx-CPYC dont la structure a été résolue par cristallographie des rayons X. La chaîne principale est représentée sous la forme d'un fil.

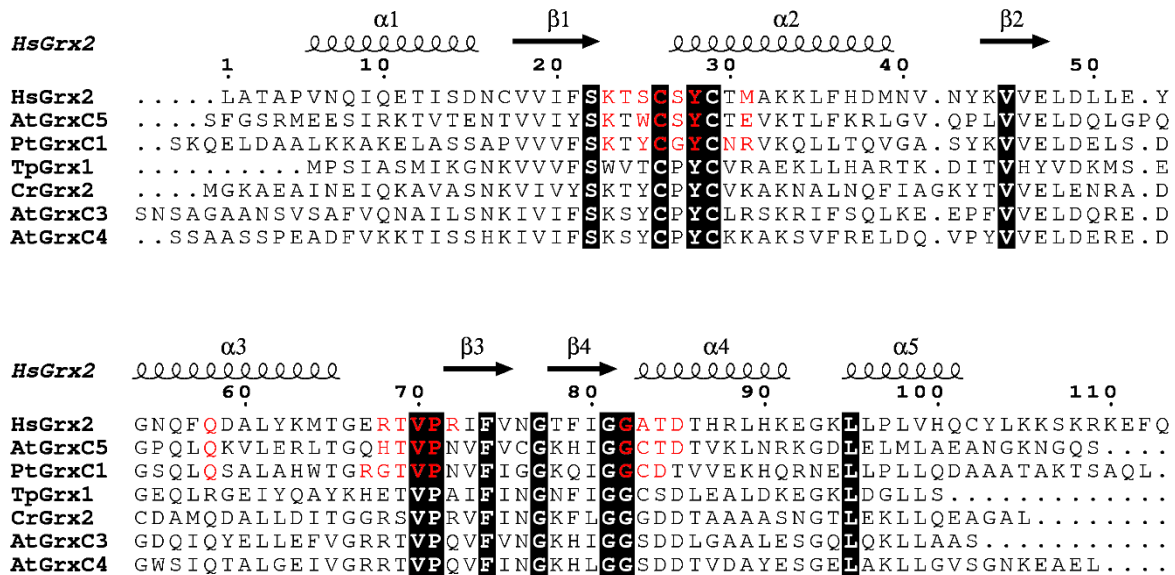


Figure n°50 Alignement structural de glutarédoxines à partir des logiciels STRAP (Gille & Frömmel, 2001) et ESPript (Gouet et al, 1999). Sont représentés les trois glutarédoxines dont la structure holo a été résolue (HsGrx2, AtGrxC5 et PtGrxC1), la TpGrx1, la CrGrx2 et enfin l'AtGrxC3 et l'AtGrxC4 étant incapable de prendre en charge un centre Fe-S. Les résidus invariants sont encadrés par une boîte noire alors que les résidus impliqués dans l'holodimérisation sont en rouge. Hs : Homo sapiens ; At : Arabidopsis thaliana ; Pt : Populus tremuloides ; Tp : Trypanosoma brucei et Cr : Chlamydomonas reinhardtii.

III. Chapitre n°3 : la cystéine désulfurase AtNfs2

III.A.1. Introduction

Les cystéine désulfurases sont des enzymes dépendantes du phosphate de pyridoxal (PLP) et catalysent la désulfuration de la L-cystéine en L-alanine (Zheng et al, 1993). Elles fournissent l'atome de soufre nécessaire à la synthèse de diverses molécules telles que la thiamine et les thionucléosides de l'ARN mais aussi dans les quatre machineries connues pour l'assemblage et le transport de centres Fe-S (Johnson et al, 2005; Mihara et al, 2002; Mühlenhoff et al, 2004). Au sein de ces machineries on distingue deux groupes de cystéine désulfurases : Nifs et IscS composent le groupe I alors que SufS et CsdA forment le groupe II (Mueller, 2006). Des différences entre ces groupes sont observées au niveau du site actif bien que le repliement global de ces protéines soit relativement similaire (Mihara & Esaki, 2002). Une fois l'atome de soufre récupéré de la cystéine substrat, la cystéine catalytique des CD se retrouve sous la forme d'un intermédiaire persulfide (RS-SH). Le soufre sera ensuite délivré dans une machinerie permettant la synthèse de centres Fe-S ou récupéré par une sulfurtransférase qui se chargera de son transport (Shi et al, 2010).

Deux gènes codant pour des cystéine désulfurases (Nfs1 et Nfs2) sont retrouvés chez *A. thaliana*. AtNfs1 est mitochondriale et appartient au groupe I alors qu'AtNfs2 est chloroplastique et appartient au sous-groupe SufS (groupe II). Comme c'est le cas pour beaucoup de CD, il a été montré d'une part que l'activité cystéine désulfurase d'AtNfs2 peut être améliorée en présence d'une sulfurtransférase (SufE1, SufE2 et SufE3 chez *A. thaliana* (Léon et al, 2002; Narayana Murthy et al, 2007; Ye et al, 2006)). D'autre part, AtNfs2 présente une très forte activité sélénocystéine lyase en l'absence d'une sulfurtransférase (Pilon-Smits et al, 2002). Ce travail présente la première structure cristallographique d'une CD eucaryote de groupe II (AtNfs2) ainsi

qu'une analyse comparative avec les structures de CD connues. Une étude par *docking* a également été entreprise pour proposer un modèle d'un complexe entre AtNfs2 et le domaine sulfurtransférase d'AtSufE1.

III.A.2. Résultats et discussion

L'obtention de cristaux pour cette protéine a permis d'obtenir la première structure d'une CD eucaryote de groupe II. Ainsi les deux formes d'AtNfs2 (wt et C384S) cristallisent dans le groupe d'espace $P2_1$ et les données ont été respectivement collectées sur les lignes FIP-BM30A (ESRF) et PROXIMA1 (SOLEIL). Après phasage par remplacement moléculaire, il s'avère que la structure d'AtNfs2 se trouve sous sa forme biologique dimérique au sein de l'unité asymétrique et présente le repliement classique des CD. La haute résolution de la structure d'AtNfs2 wt (1,7Å) met en évidence les liaisons covalentes entre le PLP et la lysine 241 et entre le S γ de la cystéine catalytique et un atome de soufre indiquant la présence de l'intermédiaire persulfide. Cette observation est confirmée par la structure du mutant C384S obtenue à une résolution de 1,9Å dans laquelle il n'y a pas de densité électronique additionnelle à côté de l'atome O γ de la sérine.

Une analyse comparative de toutes les CD caractérisées a ensuite été réalisée permettant de mettre en évidence les spécificités structurales des groupes I et II. Ainsi au sein du groupe I, la boucle comprenant la cystéine catalytique est plus grande de 9 acides aminés que celle observée au sein du groupe II. Cette boucle, très flexible dans le groupe I, comprend trois petites hélices une fois structurée. Dans les CD de groupe II, cette boucle ne comprend qu'une seule hélice mais est beaucoup plus stable. Cette stabilité accrue s'explique par la présence dans le groupe II d'un motif épingle à cheveux venant du deuxième monomère et qui participe à la stabilisation du site actif.

Afin d'étudier les modes d'interaction des CD avec leurs protéines partenaires, les quatre structures de complexes déjà résolues ont été analysées. Pour le groupe I, les structures des complexes IscS-IscU d'*E. coli* et d'*Archaeoglobus fulgidus* ont été obtenues (Marinoni et al, 2012; Shi et al, 2010). La position d'IscU (protéine échafaudage) au sein du complexe est identique en présence ou en absence d'un centre [2Fe-2S]. La structure d'IscS d'*E. coli* en complexe avec la sulfurtransférase TusA a également été déterminée (Shi et al, 2010). Dans ce cas le mode de fixation de la protéine partenaire est différent même s'il y a rapprochement des cystéines catalytiques d'IscS et TusA. Dans le groupe II, seule la structure du couple CsdA-CsdE d'*E. coli* a été publiée révélant un nouveau mode de fixation pour la protéine partenaire, ici la sulfurtransférase CsdE (Kim & Park, 2013). Dans les groupes I et II le transfert de l'atome de soufre vers la protéine partenaire nécessite des réarrangements structuraux. De façon intéressante, il semble que dans le groupe I, c'est la CD qui les subit alors que c'est la protéine acceptrice dans le groupe II. Ceci peut s'expliquer par la flexibilité de la région contenant la cystéine catalytique au sein des CD de groupe I alors que cette région est contrainte dans les CD du groupe II. Dans ce cas le partenaire biologique doit être flexible pour prendre le soufre au sein du site actif.

La cristallisation du complexe AtNfs2-SufE1 ne donnant pas de cristaux, une approche par *docking* a été utilisée pour apporter un premier modèle d'interaction entre ces deux protéines. Dans un premier temps une structure tridimensionnelle d'AtSufE1 a été déterminée par homologie avec CsdE. AtSufE1 présente la particularité de posséder un domaine BolA du côté C-terminale de fonction inconnue et n'interagissant pas à priori avec AtNfs2. Ainsi, seul le domaine sulfurtransférase ^{SufE}AtSufE1 a été modélisé. La procédure de *docking* semble montrer que AtNfs2 et ^{SufE}AtSufE1 forment un complexe similaire à celui de CsdA-CsdE indiquant sans doute le même genre d'oligomérisation pour les CD de groupe II en présence d'une sulfurtransférase.

Des informations plus détaillées sur tous ces résultats sont présentées dans l'article suivant (partie III.A.3.) et dans la Figure n°51.

III.A.3. Article

- *X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from Arabidopsis thaliana.*



electronic reprint

Acta Crystallographica Section F
**Structural Biology
Communications**
ISSN 2053-230X

X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*

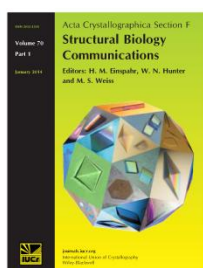
Thomas Roret, Henri Pégeot, Jérémy Couturier, Guillermo Mulliert, Nicolas Rouhier and Claude Didierjean

Acta Cryst. (2014). **F70**, 1180–1185

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Reproduction of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>



Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. Articles are available online when ready, making publication as fast as possible, and include unlimited free colour illustrations, movies and other enhancements. The editorial process is completely electronic with respect to deposition, submission, refereeing and publication.

Crystallography Journals **Online** is available from journals.iucr.org

Acta Cryst. (2014). **F70**, 1180–1185

Roret *et al.* · Nfs2

structural communications

Acta Crystallographica Section F

Structural Biology
Communications

ISSN 2053-230X

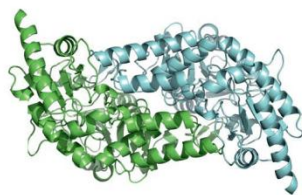
Thomas Roret,^{a,b} Henri
Pégeot,^{c,d} Jérémy Couturier,^{c,d}
Guillermo Mulliert,^{a,b}
Nicolas Rouhier^{c,d} and
Claude Didierjean^{a,b*}

^aUniversité de Lorraine, UMR 7036
CRM2, BioMod Group, BP 70239,
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France,
^bCNRS, UMR 7036 CRM2, BioMod Group,
BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy,
France, ^cUniversité de Lorraine, UMR 1136
Interactions Arbres Microorganismes,
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France, and
^dINRA, UMR 1136 Interactions Arbres
Microorganismes, 54280 Champenoux, France

Correspondence e-mail:
claude.didierjean@univ-lorraine.fr

Received 30 April 2014
Accepted 23 July 2014

PDB references: AtNfs2_C384S, 4q76; AtNfs2,
4q75



© 2014 International Union of Crystallography
All rights reserved

X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine
desulfurase from *Arabidopsis thaliana*

The chloroplastic *Arabidopsis thaliana* Nfs2 (AtNfs2) is a group II pyridoxal 5'-phosphate-dependent cysteine desulfurase that is involved in the initial steps of iron-sulfur cluster biogenesis. The group II cysteine desulfurases require the presence of sulfurtransferases such as SufE proteins for optimal activity. Compared with group I cysteine desulfurases, proteins of this group contains a smaller extended lobe harbouring the catalytic cysteine and have a β -hairpin constraining the active site. Here, two crystal structures of AtNfs2 are reported: a wild-type form with the catalytic cysteine in a persulfide-intermediate state and a C384S variant mimicking the resting state of the enzyme. In both structures the well conserved Lys241 covalently binds pyridoxal 5'-phosphate, forming an internal aldimine. Based on available homologous bacterial complexes, a model of a complex between AtNfs2 and the SufE domain of its biological partner AtSufE1 is proposed, revealing the nature of the binding sites.

1. Introduction

Cysteine desulfurases (CDs) are pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzymes that catalyze the desulfuration of L-cysteine to L-alanine (Zheng *et al.*, 1993). Their physiological function is to provide the elemental sulfur required for the synthesis of diverse molecules such as thiamine and RNA thionucleosides or for the formation of iron-sulfur [Fe-S] clusters (Mihara *et al.*, 2002; Mühlhoff *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005). There are several [Fe-S] cluster-assembly machineries, namely NIF (nitrogen fixation), ISC (iron-sulfur cluster), SUF (sulfur mobilization) and CSD (cysteine sulfinate decarboxylase), all of which require the activity of a CD (Mueller, 2006). CDs have been classified into two groups: group I with NifS and IscS as prototypes and group II with SufS and CsdA as prototypes (Mueller, 2006). Although the group I and II CDs share a similar fold and dimeric assembly, they exhibit structural differences in the loop containing the catalytic cysteine residue (Mihara & Esaki, 2002). The desulfuration reaction leads to the formation of a persulfide intermediate (Cys-S-SH) before sulfur transfer to an acceptor protein, with the latter being either a [Fe-S] cluster scaffold protein or a sulfurtransferase (Shi *et al.*, 2010). The characterized sulfurtransferases (TusA, SufE and CsdE from *Escherichia coli*) have been shown to increase the activity of their associated CDs (Outten *et al.*, 2003; Loiseau *et al.*, 2005; Ikeuchi *et al.*, 2006; Layer *et al.*, 2007).

In *Arabidopsis thaliana* there are two CDs: the mitochondrial Nfs1 and the chloroplastic Nfs2 (Léon *et al.*, 2002; Couturier *et al.*, 2013). Their activity is significantly enhanced upon interaction with the sulfurtransferase AtSufE1 (Xu & Möller, 2006; Ye *et al.*, 2006; Couturier *et al.*, 2014). The activity of AtNfs2 may also be increased by interaction with two other chloroplastic SufE-type proteins: AtSufE2 and AtSufE3 (Narayana Murthy *et al.*, 2007). In contrast to nonplant SufE counterparts, plant SufE1s contain an additional C-terminal BolA domain, the function of which remains to be determined (Ye *et al.*, 2006). In the absence of AtSufE1, AtNfs2 exhibits an efficient *in vitro* selenocysteine lyase activity that is 300-fold higher than the CD activity (Pilon-Smits *et al.*, 2002).

In this study, we report the first X-ray crystal structures of a eukaryotic SufS-like protein, AtNfs2. Our data allowed a comparative analysis with other CD structures and *in silico* modelling of an *A. thaliana* Nfs2-SufE1 complex.

structural communications

2. Materials and methods

2.1. Cloning, expression and purification

The open reading frame sequence encoding AtNfs2 (At1g08490) was amplified from *A. thaliana* leaf cDNA using AtNfs2 forward and reverse primers and was cloned into the *NdeI* and *BamHI* restriction sites of pET-15b vector to yield an N-terminally His-tagged protein (AtNfs2-Fw, 5'-CCCCCCCCATATGCGCCGCGCCGCTTCCTC-CGCCACC-3'; AtNfs2-Rv, 5'-CCCCGGATCCTTATTGAAAG-AGTGAAGAAGCTCACAGTGTC-3'). The amplified sequence encodes a protein deprived of the first 35 amino acids corresponding to the putative targeting sequence (Pilon-Smits *et al.*, 2002). Using site-directed mutagenesis, the catalytic cysteine at position 384 was substituted with a serine using two complementary primers (AtNfs2_C384S-Fw, 5'-AGGTCAGGACACCACAGCGCACAGC-CACCTCAC-3'; AtNfs2_C384S-Rv, 5'-GTGGAGTGGCTGTGCG-CTGTGGTGTCTGACCT-3'). For protein expression, the *E. coli* BL21 (DE3) strain containing the pSBET plasmid bearing the sequence coding for the tRNA recognizing the AGA and AGG codons poorly used in *E. coli* was transformed with each recombinant plasmid. Cultures were successively amplified to 2.4 l in Luria-Bertani medium at 37°C supplemented with 50 µg ml⁻¹ ampicillin or kanamycin (added for the pET-15b construct and pSBET plasmid). Protein expression was induced at the exponential phase by the addition of 100 µM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside and incubation for 4 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation at 4 400g for 15 min. The pellets were resuspended in 20 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole and the resuspended cells were stored at -20°C. Cell lysis was performed by sonication (3 × 1 min with intervals of 1 min) and the soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 27 000g for 30 min. The lysate was loaded onto Ni²⁺ HiTrap chelating resin (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) for metal-affinity chromatography. After extensive washing, the proteins were eluted with a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole. The recombinant proteins were dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer and concentrated by ultrafiltration under nitrogen pressure (Amicon YM10 membrane). Protein purity was checked by SDS-PAGE and protein concentrations were determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient at 280 nm of 40 590 M⁻¹ cm⁻¹ for AtNfs2 WT and AtNfs2_C384S as determined from the primary sequences using the *ProtParam* tool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

2.2. Crystallization

AtNfs2 and AtNfs2_C384S were crystallized using the microbatch-under-oil method at 278 K. AtNfs2 (11.7 mg ml⁻¹) was crystallized by mixing 2 µl protein solution and 2 µl crystallization solution (Wizard I condition No. 28 consisting of 20% PEG 3000, 0.2 M sodium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5; Rigaku Reagents). AtNfs2_C384S (12.5 mg ml⁻¹) was crystallized by mixing 1 µl protein solution and 2 µl of the same crystallization solution.

2.3. X-ray data collection, processing, structure determination and refinement

Crystals were flash-cooled in liquid nitrogen after a quick soak in crystallization solution premixed with 20% glycerol as the cryoprotectant. X-ray diffraction experiments were performed at 100 K on beamline FIP-BM30A at ESRF for AtNfs2 and on beamline PROXIMA1 at SOLEIL for AtNfs2_C384S (Table 1). Data sets extending to 1.7 and 1.9 Å resolution, respectively, were indexed and

Table 1

Data collection and processing.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

	AtNfs2	AtNfs2_C384S
Diffraction data		
Diffraction source	FIP-BM30A, ESRF	PROXIMA1, SOLEIL
Detector	ADSC Q315r CCD	PILATUS
Wavelength (Å)	0.978542	0.980111
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 81.57, b = 68.21, c = 87.07, \beta = 94.8$	$a = 81.72, b = 68.39, c = 87.58, \beta = 94.8$
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Resolution range (Å)	45.85–1.70 (1.80–1.70)	46.02–1.90 (2.00–1.90)
Total No. of reflections	336324 (28871)	284408 (40116)
No. of unique reflections	97828 (11087)	75742 (10920)
Average multiplicity	3.4 (2.6)	3.8 (3.7)
Mean $I/\sigma(I)$	13.8 (3.5)	7.2 (3.1)
Completeness (%)	95.0 (75.0)	99.7 (99.4)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0.054 (0.187)	0.103 (0.374)
$R_{\text{meas}}^{\ddagger}$	0.064 (0.227)	0.120 (0.439)
$R_{\text{pim}}^{\S}$	0.033 (0.127)	0.061 (0.226)
$CC_{1/2}^{\P}$	0.997 (0.940)	0.989 (0.818)
Wilson B factor (Å ²)	17.7	21.8
Refinement		
Resolution range (Å)	45.85–1.70 (1.73–1.70)	46.02–1.90 (1.93–1.90)
$R_{\text{work}}^{\dagger\dagger}$	0.202 (0.297)	0.233 (0.328)
$R_{\text{free}}^{\dagger\dagger}$	0.233 (0.341)	0.262 (0.362)
No. of protein atoms	6494	6453
No. of waters	854	678
R.m.s.d.††, bond lengths (Å)	0.007	0.004
R.m.s.d.††, bond angles (°)	1.13	0.85
Ramachandran favoured (%)	97.95	97.08
Ramachandran outliers (%)	0.24	0.12
Average B factor (Å ²)		
Protein	21.1	25.6
Solvent	33.5	30.0
<i>MolProbity</i> rotamer outliers (%)	1.15	1.57
<i>MolProbity</i> clashscore ^{§§}	3.41	3.67
<i>MolProbity</i> score ^{¶¶}	1.29	1.37
PDB entry	4q75	4q76

[†] $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$; [‡] $R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \{N(hkl)/[N(hkl) - 1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$; [§] R_{pim} is the correlation coefficient of the mean intensities between two random half-sets of data (Karplus & Diederichs, 2012); [¶] $CC_{1/2} = \frac{\sum_{hkl} |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} |I_i(hkl)|}$; 5% of the reflections were selected for R_{free} calculation; ^{††} Root-mean-square deviation from ideal values (Engh & Huber, 1991); ^{§§} The *MolProbity* clashscore is the number of serious clashes per 1000 atoms (Chen *et al.*, 2010); ^{¶¶} The *MolProbity* score is a log-weighted combination of the clashscore, percentage Ramachandran not favoured and percentage bad side-chain rotamers (Chen *et al.*, 2010).

processed using *XDS* (Kabsch, 2010) and scaled and merged with *SCALA* (Evans, 2006) from the *CCP4* program package (Winn *et al.*, 2011). The AtNfs2 structure was solved by molecular replacement with *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 2010) using the coordinates of *Synechocystis* sp. SufS (PDB entry 1t3i) as a search model (Tirupati *et al.*, 2004). Structures were refined (Table 1) with *PHENIX* (Adams *et al.*, 2010) with visual inspection and manual correction in *Coot* (Emsley *et al.*, 2010). Validation of both crystal structures was performed using *MolProbity* (Chen *et al.*, 2010).

2.4. AtNfs2–SufE1 modelling

The SufE domain sequence of AtSufE1 (Q84W65; residues 86–215; SufE^{AtSufE1}) was extracted from the UniProt database and structurally modelled based on the structure of CsdE (PDB entry 4lw4) using the *I-TASSER* server (Zhang, 2008; Kim & Park, 2013). The *in silico* structure of SufE^{AtSufE1} was similar to CsdE, with a C-score of 0.89 and a root-mean-square deviation (r.m.s.d.) of 0.39 Å over 101 structurally equivalent C^α atoms. A biological AtNfs2–SufE^{AtSufE1} complex was obtained using the *ClusPro* protein–protein docking server (Comeau *et al.*, 2004a,b; Kozakov *et al.*, 2006, 2013). An AtNfs2 dimer was used as the receptor and SufE^{AtSufE1} was used as the

structural communications

ligand. *ClusPro* includes a fast Fourier transform-based rigid docking program that provides 1000 low-energy ligand positions. The 1000 positions are clustered with a 9 Å C α r.m.s.d. radius and ranked according to their cluster sizes. The *ClusPro* models were visualized using *PyMOL* (Schrödinger). Finally, an energy refinement using the YAMBER force field from *YASARA* (Krieger *et al.*, 2009) was applied to the best *ClusPro* AtNfs2-SuffE-AtSufE1 model. This energy-refinement procedure imposed only small conformational changes.

3. Results and discussion

3.1. Overall fold

AtNfs2 and its C384S variant crystallized in space group $P2_1$ with one homodimer (429 residues per monomer) per asymmetric unit (PDB entries 4q75 and 4q76, respectively). Their high-resolution structures (1.7 and 1.9 Å, respectively) are quite similar with an r.m.s.d. of 0.11 Å over 754 C α atoms. The first 16 N-terminal residues were not visible in the electron-density maps.

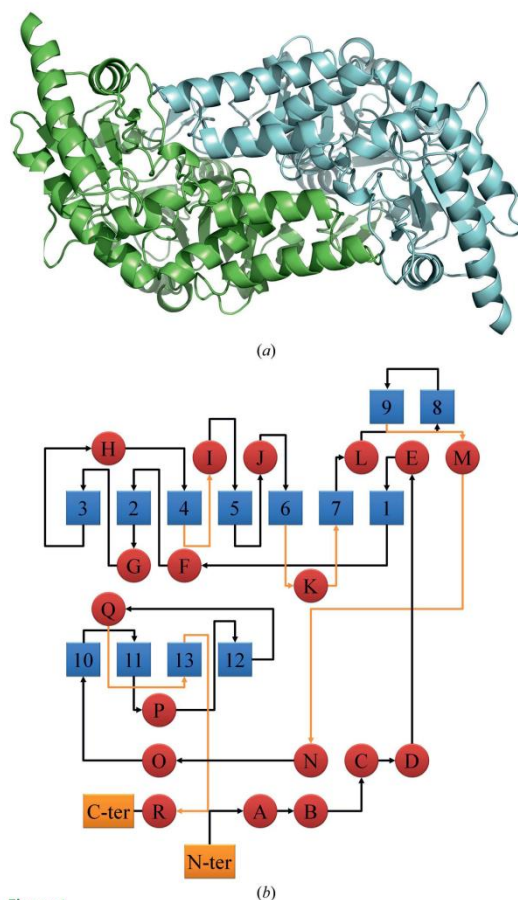


Figure 1

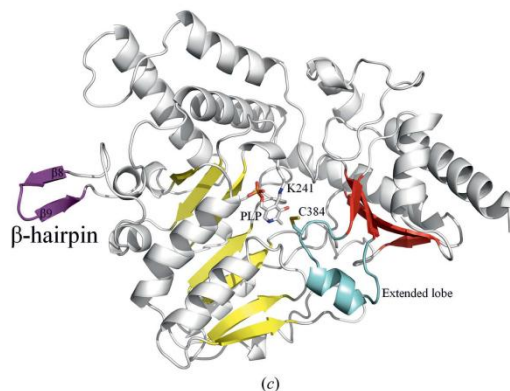
Structure of AtNfs2. (a) Ribbon representation of AtNfs2. Protomers A and B are coloured green and blue, respectively. (b) Topology diagram of secondary structures. Helices (letters) are shown in red and β -strands (numbers) are shown in blue. The N-terminal and C-terminal extremities are shown in orange. (c) AtNfs2 monomer. The seven-stranded β -sheet, the four-stranded β -sheet and the β -hairpin are shown in yellow, red and purple, respectively. The extended lobe between β 12 and β 13 is in cyan. The PLP cofactor covalently bound to the Lys241 and the catalytic site Cys384 are shown as sticks.

As shown in Fig. 1(a), AtNfs2 exhibits the canonical dimeric organization of CDs (Pilon-Smits *et al.*, 2002). Upon dimer formation, 21% of the surface area of each monomer is buried in the dimer interface (3600 Å²) through several hydrophobic and hydrophilic interactions involving 101 residues per monomer. A protomer is composed of 18 helices and 13 β -strands (Fig. 1b). Each subunit folds into two parts corresponding to two conserved β -sheets with additional helices located at the N-terminal and C-terminal ends. The first is a seven-stranded β -sheet scaffold with β 7 antiparallel to the others and surrounded by nine helices (E–M; residues 100–288). This part contains the PLP-binding site, in which the cofactor is covalently bound to Lys241 (helix K). This part also includes an additional β -hairpin loop (β 8– β 9) specific to group II which is in the neighbourhood of the active site of the other monomer. The second part is composed of a four-stranded β -sheet flanked by two helices (P–Q; residues 337–401). It contains the conserved catalytic residue (Cys384) located in an extended lobe between β 12 and β 13 that includes a short helix Q (Fig. 1c).

3.2. Comparison between group I and group II CDs

Currently, six crystal structures of CDs from group I and four from group II (AtNfs2, CsdA and CsdB from *E. coli* and slr0077 from *Synechocystis* sp.) are known (Table 2). In each group, the structures are very similar to each other, as shown by mean r.m.s.d.s of 1.03 and 0.77 Å for the group I and II CDs, respectively. Despite a relatively small r.m.s.d. for the group II CDs, a structural difference may however be noticed near the active site. In AtNfs2, CsdB and slr0077 helix D is straight with its N-terminal end near to the active site. The loop between helices B and C in CsdA is shorter by five residues and helix D has a different conformation. This modification kinks its N-terminal end (Kim & Park, 2013) and makes the active site more exposed to the solvent.

A structural comparison between members of groups I and II revealed a mean r.m.s.d. of 1.81 Å. The main differences lie at the active site, as described previously (Mihara *et al.*, 2002). For group II enzymes, the β -hairpin β 8– β 9 between helices L and M of monomer B partly covers the active site of monomer A, stabilizing the extended



structural communications

Table 2

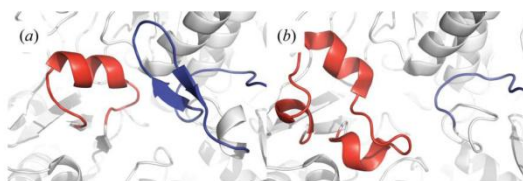
List of cysteine desulfurase crystal structures available in the PDB (April 2014).

Group	PDB code	Organism	Sequence identity to AtNfs2 (%)	UniProtKB accession No.	R.m.s.d. on C $^{\alpha}$ atoms	No. of equivalent residues to AtNfs2
CsdA-SufS group II	4q75	<i>Arabidopsis thaliana</i>		Q93WX6		
	4q76					
	1t3i	<i>Synechococcus</i> sp.	59.9	Q55793	0.467	343
	1c0n	<i>Escherichia coli</i>	44.8	P77444	0.590	340
	1i29					
	1j19					
IscS-NifS group I	1kmj					
	1kmk					
	4lw2	<i>Escherichia coli</i>	37.4	Q46925	0.736	306
	4lw4					
	1ecx	<i>Thermotoga maritima</i>	20.7	Q9X218	1.446	239
	1eg5					
	1p3w	<i>Escherichia coli</i>	20.0	P0A6B7	1.500	252
	3lvj					
	3lvk					
	3vl					
	3lvm					
	3gzc	<i>Homo sapiens</i>	20.6	Q96115	1.618	247
	3gzd					
	4eb5	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	20.7	Q29689	1.627	250
	4eb7					
	4hvk					
	4ix0	<i>Rickettsia africae</i>	20.7	C3PNQ7	1.687	218
	3a9x	<i>Rattus norvegicus</i>	20.1	Q68FT9	2.159	263
	3a9y					
	3aqz					

lobe between $\beta 12$ and $\beta 13$ containing the catalytic cysteine residue (Fig. 2a). In the group I enzymes the area between helices *L* and *M* is shorter (the mean number of residues between helices *L* and *M* is eight in group I CDs and 24 in group II CDs) and does not interact with the extended lobe (Fig. 2b). Hence, in most crystal structures of group I CDs parts of the lobe are not modelled and are therefore highly disordered. When modelled, it folds into three helices (the mean number of residues in the lobe is 26 in group I enzymes and 17 in group II enzymes).

3.3. Active site

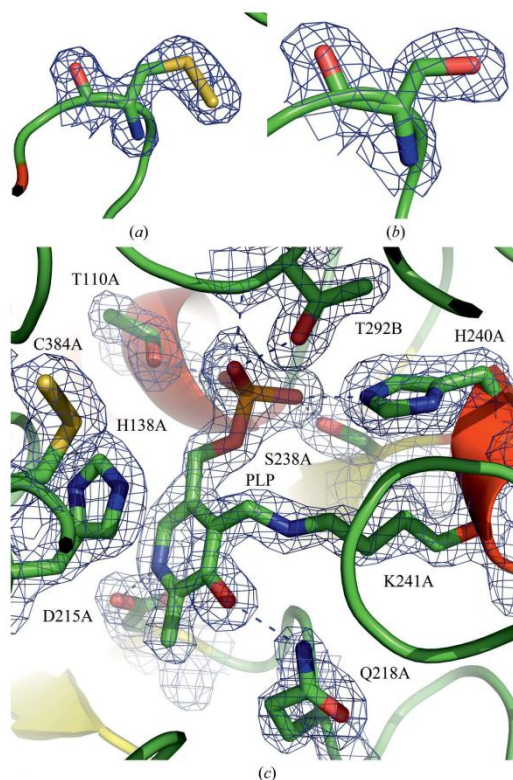
As in other CDs, the AtNfs2 homodimer has one active site per monomer. In each subunit, the extended lobe between $\beta 12$ and $\beta 13$ allows the active-site Cys384 to be in the proximity of the PLP cofactor. The electron density close to the S atom of Cys384 (Fig. 3a) suggests a modification of the cysteine side chain by an additional atom. This additional electron-density cloud is not present in the C384S variant (Fig. 3b) mimicking the resting state of the enzyme.

**Figure 2**

Comparison between group I and group II cysteine desulfurases. (a) Active site of AtNfs2, a SufS-like group II CD. (b) Active site of IscS from *A. fulgidus* (PDB entry 4eb7), a group I CD. Monomers *A* and *B* are coloured white. The loop corresponding to a β -hairpin (in group II CDs) is coloured blue and the region containing the conserved cysteine residue (referred to as the 'extended loop') is coloured red.

Similar densities attached to the S atom have previously been reported in group I and II CDs and were interpreted as a cysteine-persulfide (Lima, 2002; Collins *et al.*, 2012). The refinement of our high-resolution structure of AtNfs2 clearly favours the presence of a persulfide with full occupancy (Fig. 3a). The catalytic cysteine is buried in all SufSs except CsdA, in which the environment of this residue is more open and solvent-exposed (see above).

In both the AtNfs2 and the AtNfs2_C384S structures the PLP cofactor (C4' atom) is linked to the side chain of Lys241A (N $^{\epsilon}$ atom), forming an internal aldimine. It is stabilized by residues interacting with the pyridine ring (Fig. 3c) such as His138A, which uses π -stacking interactions with its imidazole ring. Furthermore, Asp215A and Gln218A form hydrogen bonds to the pyridine N1 and O3 atoms of PLP. Other contacts are made by the main chain and side chain of Thr110A and Thr292B, and the side-chain atoms of Ser238A and His240A involved in the stabilization of the PLP phosphate group (Fig. 3c). Asp215 is an invariant residue, whereas Lys241, His138, Gln218, Thr110, Thr292, Ser238 and His240 are well conserved

**Figure 3**

Active site of AtNfs2. (a) Electron density around the catalytic residue (Cys384) in wild-type AtNfs2. The map shown is a σ_A -weighted $2mF_o - DF_c$ map contoured at 1.2σ (0.44 e^-). (b) Electron density around Ser384 in the C384S variant. The map shown is a σ_A -weighted $2mF_o - DF_c$ map contoured at 1.2σ (0.42 e^-). (c) Representation of the PLP-binding site with $2mF_o - DF_c$ electron density (1.2σ and 0.44 e^-) around the cofactor and side chain of Lys241A. The PLP cofactor is covalently bound to Lys241A. Numerous residues are involved in the stabilization of the PLP cofactor, i.e. Thr110A, Ser238A, His240A and Thr292B for the phosphate group and Asp215A and Gln218A for the pyridine ring.

structural communications

(62–90% conservation) and serve to stabilize PLP as observed in known CD structures.

3.4. AtNfs2^{SufE}AtSufE1 model

Complexes between prokaryotic group I CDs and their biological partners have been characterized previously: for example, the IscS–IscU complex from *Archaeoglobus fulgidus* (Marinoni *et al.*, 2012) and the IscS–IscU and IscS–TusA complexes from *E. coli* (Shi *et al.*, 2010). The comparison of group I CD structures alone (Kaiser *et al.*, 2000; Cupp-Vickery *et al.*, 2003; Omi *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2012; Yamanaka *et al.*, 2013) and in complex revealed that the catalytic cysteine does not occupy the same position during the different steps of the catalysis, *i.e.* cysteine desulfuration and sulfur transfer (Shi *et al.*, 2010; Marinoni *et al.*, 2012). The flexible extended loop between β 12 and β 13 can promote conformational changes, positioning the

cysteine in an suitable position to deliver the S atom of the persulfide intermediate to the corresponding biological partners. Moreover, analysis of the IscS–TusA and IscS–IscU complexes indicated that sulfur-acceptor proteins (IscU or TusA) do not need flexibility to receive the sulfur element. Notably, IscS uses different binding surfaces for interaction with these two acceptors (Fig. 4).

Recently, complexes involving *E. coli* group II CDs were studied by X-ray crystallography for the CsdA–CsdE complex (Fig. 4; Kim & Park, 2013) and by deuterium-exchange experiments for SufS–SufE (Singh *et al.*, 2013). These studies revealed that the conformation of the CD alone and in complex with the sulfurtransferase was similar. In contrast, the sulfur-accepting cysteine of CsdE (or SufE) was buried in a hydrophobic cavity in the free enzyme and was out of the groove in an exposed conformation suitable for sulfur capture (Kim & Park, 2013; Singh *et al.*, 2013). We attempted to build a model of AtNfs2^{SufE}AtSufE1 (Fig. 4) using the ClusPro docking server

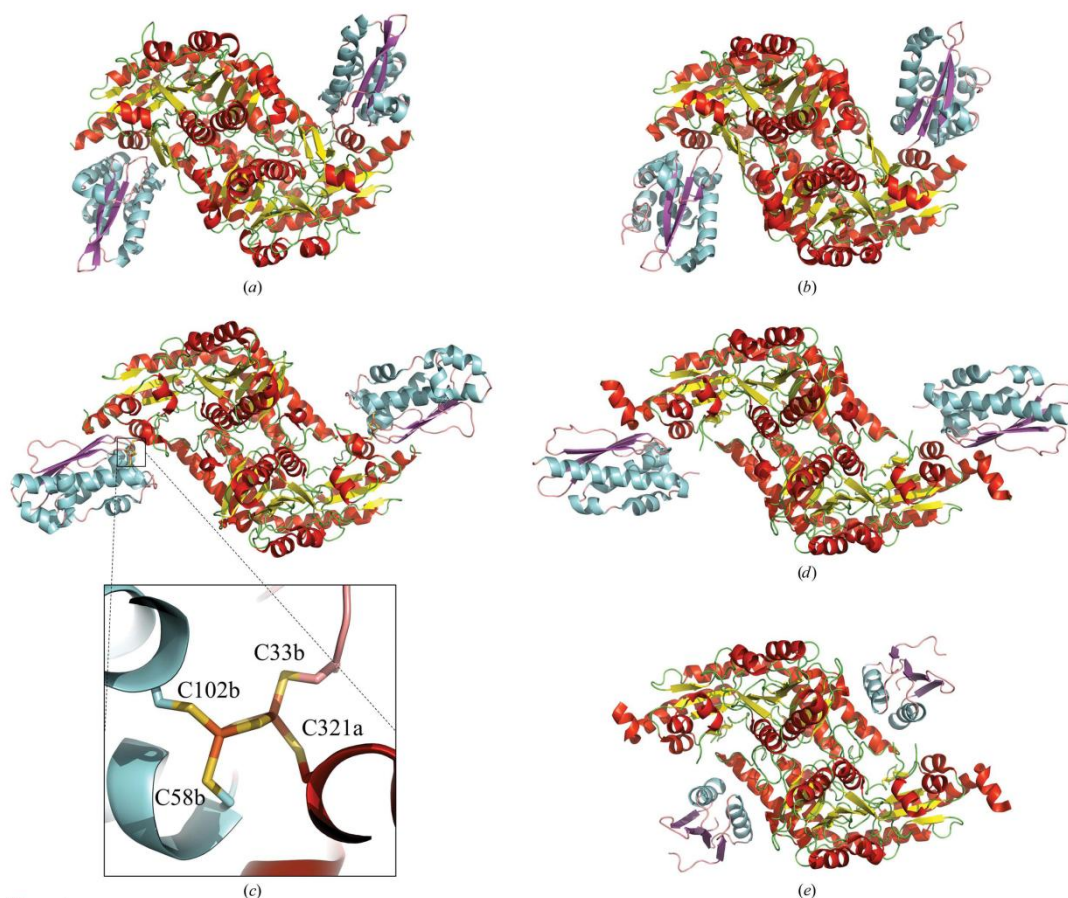


Figure 4 Cysteine desulfurase and sulfur-acceptor complexes. The CD–sulfurtransferase (SufE, CsdE and TusA) complexes and the CD–scaffold protein (IscU) complex are represented as ribbons. CDs are coloured red, yellow and green, and CD partners are coloured cyan, purple and pink. (a) Model of the Nfs2^{SufE}AtSufE1 complex from *A. thaliana* and the X-ray crystal structures of (b) CsdA–CsdE from *E. coli*, (c) Fe₂S₂ coordinated by three sulfurtransferase residues (Cys33, Cys58 and Cys102) and by one cysteine desulfurase residue (Cys321) in the IscS–IscU complex from *A. fulgidus*, (d) IscS–IscU from *E. coli* and (e) IscS–TusA from *E. coli* (PDB entries 4lw4, 4eb5, 3lv1 and 3lvj, respectively).

structural communications

(Comeau *et al.*, 2004a,b; Kozakov *et al.*, 2006, 2013). An atomic model of AtSufE1 was derived by a homology-modelling approach. A notable feature of plant SufE1 is the presence of a C-terminal BolA domain linked by 61 residues to the N-terminal SufE domain (Ye *et al.*, 2006). Assuming that the BolA domain of AtSufE1 does not interact with AtNfs2 and considering that this long linker will provide too much flexibility to obtain a reliable model, only the ^{SufE}AtSufE1 domain was used in modelling. The docking procedure was initially performed with the AtNfs2 dimer and one ^{SufE}AtSufE1 model by using the default *ClusPro* parameters. Whereas in models of the first six ranked clusters the AtNfs2 and ^{SufE}AtSufE1 catalytic cysteine residues were at a distance of more than 37 Å, the seventh model corresponded to a model superimposable on the CsdA–CsdE crystal structure. The docking process was reiterated by imposing attraction of AtNfs2 and ^{SufE}AtSufE1 catalytic residues. In this case, the best *ClusPro* AtNfs2–^{SufE}AtSufE1 model was similar to that of CsdA–CsdE. Thus, despite the unique conformation of helix *D* (and the loop between helices *C* and *D*; see above) in CsdA, the modes of interaction should be very similar in AtNfs2–^{SufE}AtSufE1 and CsdA–CsdE. The positions of the putative hydrogen bonds between the two partners are retained, although the residues involved in the interactions are not strictly conserved.

4. Conclusion

AtNfs2 has the canonical dimeric structure of group II CDs, with the catalytic cysteine residue located in an extended lobe stabilized by a β -hairpin from the other monomer. While CDs from group I and II share similar catalytic properties (Kessler, 2006), the sulfur-transfer step is nevertheless very distinct. In group I, the long extended lobe is sufficiently flexible to transfer the sulfur moiety to the biological partner, which does not need flexibility. Recent studies show that this is opposite to the case in group II CDs (Kim & Park, 2013; Singh *et al.*, 2013). Indeed, in the latter a β -hairpin constrains the enzyme active site in a 'closed conformation'. For this reason, the biological partner (SufE) needs flexibility to acquire the S atom. Likewise, AtNfs2 needs AtSufE1 to enhance its activity and to efficiently deliver S atoms to scaffold proteins.

Access to the X-ray diffraction facilities of the Université de Lorraine is appreciated. We are grateful to the staff members of the PROXIMA1 beamline at the SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France) and of the BM30A beamline at ESRF (Grenoble, France). The authors thank Dr C. S. Koh for helpful suggestions.

References

- Adams, P. D. *et al.* (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 213–221.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 12–21.
- Collins, R., Johansson, A. L., Karlberg, T., Markova, N., van den Berg, S., Olesen, K., Hammarström, M., Flores, A., Schüller, H., Schiavone, L. H., Brzezinski, P., Arnér, E. S. & Högbom, M. (2012). *PLoS One*, **7**, e30581.
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. & Camacho, C. J. (2004a). *Bioinformatics*, **20**, 45–50.
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. & Camacho, C. J. (2004b). *Nucleic Acids Res.* **32**, 96–99.
- Couturier, J., Touraine, B., Briat, J., Gaymard, F. & Rouhier, N. (2013). *Front. Plant Sci.* **4**, 259.
- Couturier, J., Wu, H.-C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J. M., Jacquot, J.-P., Gaymard, F., Vignols, F. & Rouhier, N. (2014). *Mol. Plant*, **7**, 187–205.
- Cupp-Vickery, J. R., Urbina, H. & Vickery, L. E. (2003). *J. Mol. Biol.* **330**, 1049–1059.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 486–501.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). *Acta Cryst.* **A47**, 392–400.
- Evans, P. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 72–82.
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A. & Suzuki, T. (2006). *Mol. Cell*, **21**, 97–108.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. (2005). *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 247–281.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.
- Kaiser, J. T., Clausen, T., Bourenkow, G. P., Bartunik, H. D., Steinbacher, S. & Huber, R. (2000). *J. Mol. Biol.* **297**, 451–464.
- Karplus, P. A. & Diederichs, K. (2012). *Science*, **336**, 1030–1033.
- Kessler, D. (2006). *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 825–840.
- Kim, S. & Park, S. (2013). *J. Biol. Chem.* **288**, 27172–27180.
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R. & Vajda, S. (2013). *Proteins*, **81**, 2159–2166.
- Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R. & Vajda, S. (2006). *Proteins*, **65**, 392–406.
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D. & Karplus, K. (2009). *Proteins*, **77**, 114–122.
- Layer, G., Gaddam, S. A., Ayala-Castro, C. N., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Fontecave, M. & Outten, F. W. (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 13342–13350.
- Léon, S., Touraine, B., Briat, J.-F. & Lobreux, S. (2002). *Biochem. J.* **366**, 557–564.
- Lima, C. D. (2002). *J. Mol. Biol.* **315**, 1199–1208.
- Loiseau, L., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M. & Barras, F. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 26760–26769.
- Marinoni, E. N., de Oliveira, J. S., Nicolet, Y., Raulfs, E. C., Amara, P., Dean, D. R. & Fontecilla-Camps, J. C. (2012). *Angew. Chem.* **51**, 5439–5442.
- Mihara, H. & Esaki, N. (2002). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 12–23.
- Mihara, H., Fujii, T., Kato, S., Kurihara, T., Hata, Y. & Esaki, N. (2002). *J. Biochem.* **131**, 679–685.
- Mueller, E. G. (2006). *Nature Chem. Biol.* **2**, 185–194.
- Mühlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J. T., Sipos, K., Kispal, G. & Lill, R. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 36906–36915.
- Narayana Murthy, U., Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Abdel-Ghany, S., Rousset, C., Ye, H., Fontecave, M., Pilon-Smits, E. & Pilon, M. (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 18254–18264.
- Omi, R., Kurokawa, S., Mihara, H., Hayashi, H., Goto, M., Miyahara, I., Kurihara, T., Hirotsu, K. & Esaki, N. (2010). *J. Biol. Chem.* **285**, 12133–12139.
- Outten, F. W., Wood, M. J., Munoz, F. M. & Storz, G. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 45713–45719.
- Pilon-Smits, E. A., Garifulina, G. F., Abdel-Ghany, S., Kato, S., Mihara, H., Hale, K. L., Burkhead, J. L., Esaki, N., Kurihara, T. & Pilon, M. (2002). *Plant Physiol.* **130**, 1309–1318.
- Shi, R., Proteau, A., Villarroja, M., Moukadir, I., Zhang, L., Trempe, J., Matte, A., Armengod, M. & Cygler, M. (2010). *PLoS Biol.* **8**, 1–18.
- Singh, H., Dai, Y., Outten, F. W. & Busenlehner, L. S. (2013). *J. Biol. Chem.* **288**, 36189–36200.
- Tirupati, B., Vey, J. L., Drennan, C. L. & Bollinger, J. M. (2004). *Biochemistry*, **43**, 12210–12219.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.
- Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.
- Xu, X. M. & Möller, S. G. (2006). *EMBO J.* **25**, 900–909.
- Yamanaka, Y., Zeppieri, L., Nicolet, Y., Marinoni, E. N., de Oliveira, J. S., Odaka, M., Dean, D. R. & Fontecilla-Camps, J. C. (2013). *Dalton Trans.* **42**, 3092–3099.
- Ye, H., Abdel-Ghany, S. E., Anderson, T. D., Pilon-Smits, E. A. & Pilon, M. (2006). *J. Biol. Chem.* **281**, 8958–8969.
- Zhang, Y. (2008). *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. & Dean, D. R. (1993). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 2754–2758.

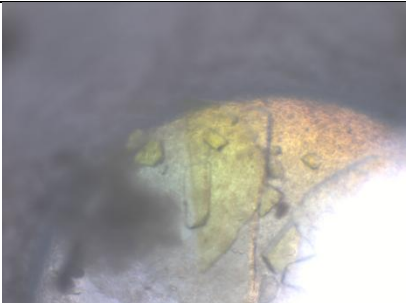
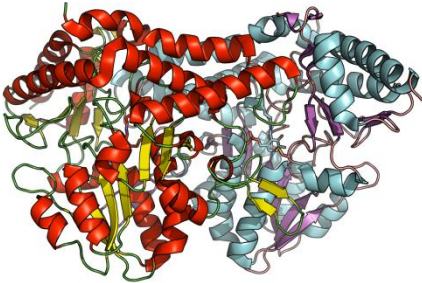
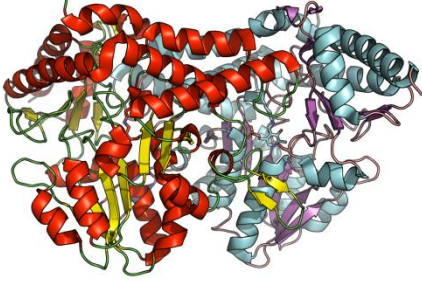
AtNfs2 wt	 Cristallographie des rayons X – 1,7Å	
AtNfs2 C384S	 Cristallographie des rayons X – 1,9Å	

Figure n°51 Récapitulatif des différentes structures présentes au sein de l'article « X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana* ».

Conclusion et perspectives

Le fer, oligoélément essentiel à la vie, est notamment impliqué dans diverses réactions biologiques au sein de très nombreux centres métalliques (Johnson et al, 2005). Cependant, il peut être toxique à cause de sa tendance à catalyser la formation de radicaux libres (Stohs & Bagchi, 1995). A l'heure actuelle beaucoup d'informations sont connues au niveau de la régulation de « l'opéron du fer » (stockage et entrée dans la cellule) ainsi qu'au niveau de l'assemblage et du transport du fer au sein de biomolécules (Johnson et al, 2005; Wang & Pantopoulos, 2011). Cependant, les données structurales concernant ces métalloprotéines sont encore trop peu nombreuses pour avoir une vue d'ensemble des différents mécanismes.

Le fer peut notamment être combiné avec du soufre inorganique au sein de machineries complexes (CSD, ISC, NIF et SUF) pour la biosynthèse des centres Fe-S (Fontecave & Ollagnier-de-Choudens, 2008; Lill, 2009). Le soufre inorganique est récupéré la plupart du temps à partir d'une L-cystéine par le biais d'une cystéine désulfurase (CD) (Zheng et al, 1993) et il est ensuite pris en charge soit par une protéine échafaudage (Agar et al, 2000), soit par une sulfurtransférase jusqu'au lieu de synthèse du centre Fe-S (Outten et al, 2003). Ces deux types de complexes impliquant une cystéine désulfurase ont déjà été caractérisés structuralement chez la bactérie. Cependant, aucune information structurale n'était connue au sein des organismes eucaryotes. Pour remédier à ce manque d'informations structurales nous avons étudié la cystéine désulfurase Nfs2 (SufS) d'*A. thaliana* et le complexe AtNfs2 avec la sulfurtransférase SufE1, ces deux protéines ayant déjà été caractérisées biologiquement (Léon et al, 2002; Ye et al, 2006). Même si la structure cristallographique d'AtNfs2 est similaire à celles des SufS bactériennes, cette étude nous a permis, par comparaisons structurales, de mettre en avant les deux types d'interactions qu'utilisent les cystéine désulfurases pour interagir avec leurs partenaires. Nous

avons dans ce cadre modélisé par *docking* le complexe fonctionnel de désulfuration entre Nfs2 et le domaine SufE de SufE1 qui s'avère être très proche de celui observé entre la cystéine désulfurase CsdA et la sulfurtransférase CsdE d'*E. coli* (Kim & Park, 2013). Cependant, seule la structure cristallographique du complexe Nfs2-SufE1 dans son intégralité permettra de cartographier précisément les résidus mis en jeu dans l'interaction.

Une fois que le centre Fe-S est synthétisé par la machinerie, il peut être directement pris en charge par une protéine comme les glutarédoxines par exemple (Lillig et al, 2008). Les Grx de classe I (signature catalytique du type Cxx[C/S]), comme la Grx2 humaine (Johansson et al, 2007), prennent en charge uniquement des centres [2Fe-2S]. Les Grx de classe II (signature catalytique du type CGFS), comme la Grx5 de levure (Zhang et al, 2013), peuvent incorporer des centres [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S]. Etant donné que le centre [2Fe-2S] semble être beaucoup plus stable dans un homodimère de classe I (forme dite holo), il est supposé que le centre Fe-S joue un rôle de senseur de l'état redox de la cellule au sein d'une forme holo inactive et permettrait la libération d'une forme apo (monomérique) active suite à la destruction du centre Fe-S en cas de stress oxydant (Lillig et al, 2005). Les Grx de classe II, quant à elles, participeraient plutôt à son transport et à la maturation de protéines à centre Fe-S (Rodríguez-Manzaneque et al, 2002). Cependant, la fonction réelle des Grx dans la machinerie d'assemblage, dans le transport ainsi que dans la maturation des protéines à centres Fe-S n'est pas très claire. Il est donc nécessaire d'identifier les différentes fonctions et de caractériser structuralement les différents complexes avec un centre Fe-S impliquant une Grx.

Parmi toutes les Grx de classe I, il s'avère que certaines sont incapables d'incorporer des centres Fe-S à cause d'acides aminés situés autour de la cystéine catalytique (position 0). Ces acides aminés sont un tryptophane (position -1) et une sérine (position +3) dans le cas de la

GrxS12 (WCSYS) de peuplier (Couturier et al, 2009b) et une proline (position +1) dans le cas des Grx-CPYC (Izquierdo et al, 2008; Rouhier et al, 2007). A partir de ces données, nous avons étudié structuralement la GrxC5 d'*A. thaliana* (WCSYC) et la Grx2 de *C. reinhardtii* (CPYC) qui toutes deux ont la capacité inattendue d'incorporer un centre [2Fe-2S]. Nous avons montré dans le cas de l'AtGrxC5 à partir des structures cristallographiques sous forme apo et holo que le tryptophane n'empêche pas l'holodimérisation comme supposé. La comparaison des structures des formes apo et holo a permis de montrer que ce tryptophane a la capacité d'adopter une conformation particulière dans la forme holo en exposant sa partie hydrophobe au solvant. La présence de la cystéine en position +3 permet une stabilisation de la région autour du motif. Cette cystéine joue probablement un rôle clé dans la capacité de l'AtGrxC5 à incorporer un centre [2Fe-2S] puisque sa mutation en sérine ne le permet plus. Dans le cas de la CrGrx2 nous avons réussi à déterminer sa structure cristallographique sous forme apo. En l'absence de la structure holo, il n'a pas été possible de façon évidente d'expliquer pourquoi cette Grx est capable d'incorporer un centre [2Fe-2S]. L'utilisation d'un environnement anaérobie devrait permettre la stabilisation de la forme holo et ainsi sa cristallisation. Dans tous les cas des différences structurales importantes sont attendues par rapport aux holodimères connus de Grx de classe I.

Dans le cas des Grx de classe II, il s'avère que la propriété de ces protéines en complexe avec un centre Fe-S peut être modifiée suite à la formation d'un complexe Grx-BolA holo-hétérodimérique (Li et al, 2009a). L'intervention et le rôle exact des protéines BolA au sein de l'homéostasie du fer n'est pas très bien connu car que récemment étudié chez la levure et *E. coli* (Kumánovics et al, 2008; Yeung et al, 2011). Néanmoins, chez la levure il semble que la formation d'un tel complexe permet la signalisation intracellulaire de la concentration en fer via la translocation du facteur de transcription Aft1/2 impliqué dans la régulation de l'entrée du fer

(Kumánovics et al, 2008; Li et al, 2011a; Li et al, 2009a; Poor et al, 2014). L'étude des protéines BolA d'*A. thaliana* que nous avons réalisée a permis de mettre en évidence la formation de deux complexes Grx-BolA distincts dépendant de la présence (holo) ou non (apo) de fer. Le complexe Grx-BolA apo, déjà observé *in vitro* (Li et al, 2009a; Yeung et al, 2011), a été modélisé à partir de nos résultats de RMN tandis que le complexe Grx-BolA holo, impliquant pour la première fois une BolA_H, a été caractérisé par modélisation et par différentes études spectroscopiques. Au sein du complexe Grx-BolA holo, le centre [2Fe-2S] est coordonné par les deux histidines conservées des BolA_H et par deux cystéines (GSH et cystéine catalytique de la Grx). Ces deux complexes Grx-BolA sont très différents car le complexe apo met en jeu le site prédit de fixation à l'ADN pour les protéines BolA ainsi que l'extrémité C-terminale de la Grx qui est impliquée dans la régulation de facteurs de transcription (Hoffmann et al, 2011; Li et al, 2011b). Il est donc possible que la commutation entre les complexes Grx-BolA apo et holo permettent une signalisation pour le facteur de transcription Aft1 de levure au niveau de l'entrée ou du stockage du fer dans la cellule. Néanmoins, aucune information biologique n'est connue sur un facteur de transcription similaire au sein d'*A. thaliana*. De plus, bien que le complexe Grx-BolA apo soit observé *in vitro*, aucune fonction biologique ne lui a été attribuée. Par ailleurs, les structures cristallographiques des deux complexes apo et holo (impliquant une BolA_H et une BolA_C) sont nécessaires afin de proposer un modèle précis permettant d'identifier les interactions entre les deux partenaires. Il serait également intéressant de mesurer l'affinité des BolA et d'Aft1/2 pour (le site de fixation sur) la Grx et d'étudier l'existence ou non de compétition entre elles.

Le couple Grx-BolA, impliqué au sein de l'homéostasie du fer, n'est pas le seul complexe que peuvent former les protéines BolA. En effet, bien que celles-ci soient en mesure d'interagir avec de l'ADN chez *C. reinhardtii*, *E. coli* et *E. chaffeensis* (Cheng et al, 2011; Freire et al, 2009;

Guinote et al, 2011; Shukla et al, 2012), les protéines BolA sont également capables de former des homodimères (Couturier et al, 2014; Shukla et al, 2012). J'ai réussi à cristalliser la protéine BolA2 d'*A. thaliana*, qui est une BolA_C, sous une forme oxydée dimérique. De façon intéressante, le dimère covalent observé au sein de la structure cristallographique d'AtBolA2 est très différent de celui observé pour la BolA de *B. bovis* (code pdb 3O2E) permettant de mettre en évidence une très grande flexibilité entre les deux monomères. Il a été supposé récemment que l'état d'oxydation de la cystéine d'AtBolA2, réductible par son partenaire biologique l'AtGrxS17, serait une forme de régulation (Couturier et al, 2014). Étonnamment, l'empilement cristallin d'AtBolA2 montre la formation d'un dimère non covalent dans lequel le site supposé de fixation à l'ADN se retrouve à l'interface. Ceci pourrait correspondre au dimère formé par les BolA_H comme celui observé dans le cas d'Uvi31⁺ de *C. reinhardtii* qui possède une activité endonucléase (Shukla et al, 2012). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour attribuer à ces deux formes homodimériques des BolA une fonction cellulaire précise.

Il a été démontré que les protéines BolA peuvent interagir avec des protéines, des acides nucléiques mais également avec certains métaux. Elles fixent du fer au sein du complexe Grx-BolA holo afin de permettre la régulation de la concentration en fer chez la levure (Li et al, 2011a; Li et al, 2009a) et elles fixent du magnésium pour exercer une activité endonucléase chez *C. reinhardtii* (Singh et al, 2014b). L'étude de la protéine YrbA de *S. meliloti* avait été entreprise car celle-ci possède des particularités au niveau de sa séquence et aucune structure cristallographique d'YrbA n'était connue. La structure cristallographique que nous avons obtenue a permis de mettre en évidence que SmYrbA peut coordonner du nickel et du cuivre via les deux histidines conservées des BolA_H avec une position atypique occupée par l'histidine invariante des BolA. Aucune information biologique n'a relié SmYrbA et des métaux à l'heure actuelle.

Différentes pistes peuvent être explorées pour SmYrbA car chez *S. cerevisiae* le gène codant pour BolA est surexprimé en présence de certains métaux lourds (Lehembre et al, 2013). Il serait également intéressant de tester l'activité endonucléase de SmYrbA car certaines endonucléases fonctionnent avec du nickel coordonné par des histidines (Doudeva et al, 2006).

Pour conclure, ce travail de thèse présente les structures à l'échelle atomique de presque toutes les protéines de la famille BolA d'*A. thaliana* permettant ainsi d'établir une classification précise des BolA_H et des BolA_C. Par le biais de la cristallographie des rayons X, de la RMN et de diverses méthodes spectroscopiques nous avons pu mettre en avant dans ce travail pas moins de 8 états différents des BolA (Figure n°52). Parmi tous ces états caractérisés, nous avons montré, de façon remarquable, que le couple BolA-glutarédoxine a la capacité de former deux hétérodimères distincts dépendants de la présence ou non d'un centre [2Fe-2S]. Environ 25 ans après les premières études sur les BolA, la fonction précise de ces protéines reste inconnue. Toutefois, la grande majorité des formes caractérisées peut être associée à un mécanisme de régulation ou une réaction biologique. En particulier, les deux états oligomériques du couple BolA-glutarédoxine jouent un rôle important dans la régulation de la concentration intracellulaire en fer.

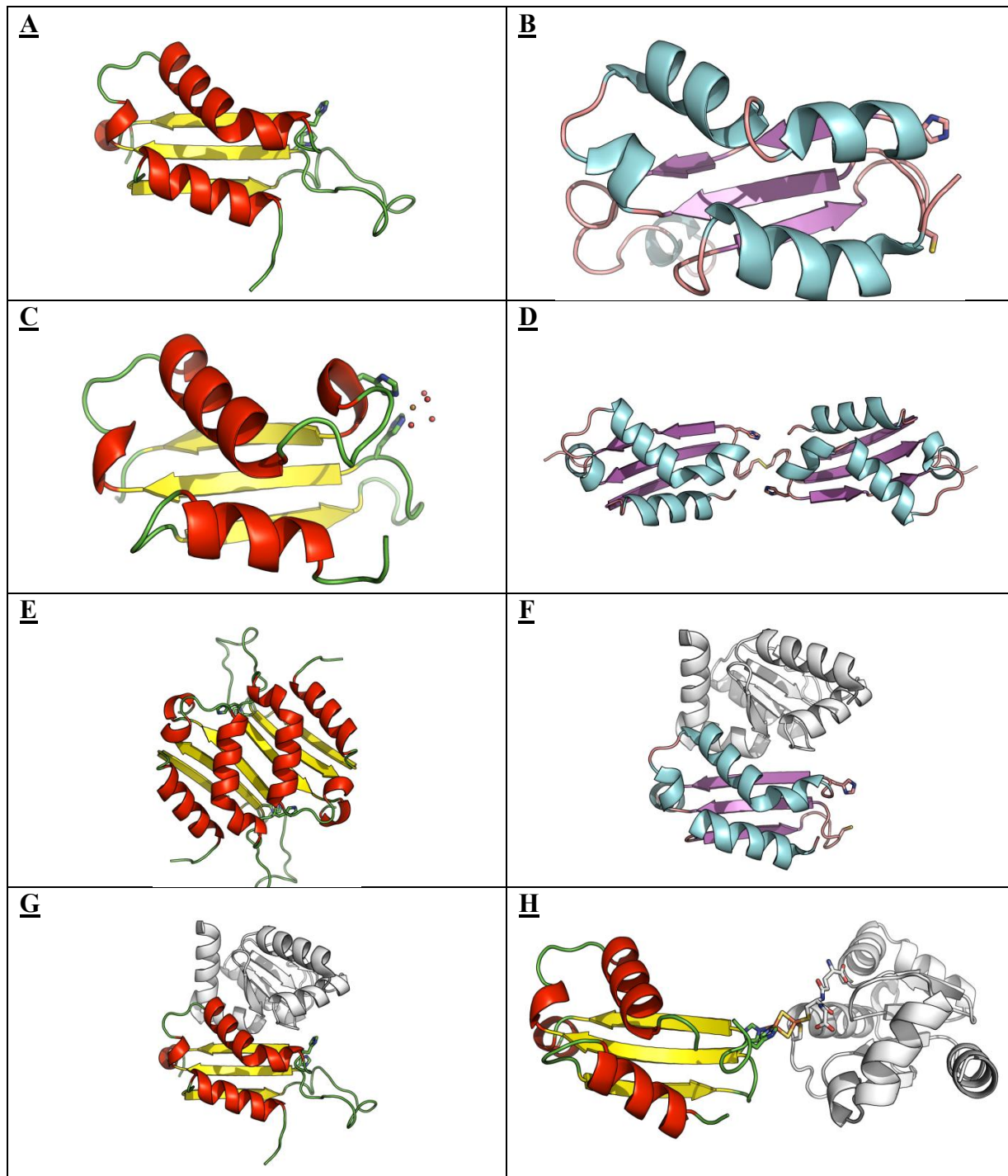


Figure n°52 Représentation des différentes formes caractérisées pour les protéines BOLA. Les BOLA_H (rouge et jaune), les BOLA_C (cyan et violet) ainsi que la Grx (blanc) sont représentées en mode ruban et flèche. (A) AtBOLA1 monomérique. (B) AtBOLA2 monomérique. (C) SmYrbA en complexe avec des métaux. (D) Dimère covalent d'AtBOLA2. (E) Dimère non covalent d'AtBOLA1. (F) AtGrxS14-BOLA2 apo-hétérodimère. (G) AtGrxS14-BOLA1 apo-hétérodimère. (H) AtGrxS14-BOLA1 holo-hétérodimère.

*Références
bibliographiques*

- Achebach S, Tran Q, Vlamis-Gardikas A, Müllner M, Holmgren A, Unden G (2004) Stimulation of Fe-S cluster insertion into apoFNR by *Escherichia coli* glutaredoxins 1, 2 and 3 in vitro. *FEBS Lett* **565**: 203-206
- Adams P, Afonine P, Bunkóczi G, Chen V, Davis I, Echols N, Headd J, Hung L, Kapral G, Grosse-Kunstleve R, McCoy A, Moriarty N, Oeffner R, Read R, Richardson D, Richardson J, Terwilliger T, Zwart P (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 213-221
- Addy C, Ohara M, Kawai F, Kidera A, Ikeguchi M, Fuchigami S, Osawa M, Shimada I, Park S, Tame J, Heddle J (2007) Nickel binding to NikA: an additional binding site reconciles spectroscopy, calorimetry and crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**: 221-229
- Adnan M, Morton G, Hadi S (2011) Analysis of rpoS and bolA gene expression under various stress-induced environments in planktonic and biofilm phase using 2(-ΔΔCT) method. *Mol Cell Biochem* **357**: 275-282
- Adnan M, Morton G, Singh J, Hadi S (2010) Contribution of rpoS and bolA genes in biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Mol Cell Biochem* **342**: 207-213
- Agar J, Krebs C, Frazzon J, Huynh B, Dean D, Johnson M (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**: 7856-7862
- Aldea M, Garrido T, Hernández-Chico C, Vicente M, Kushner S (1989) Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of bolA, an *Escherichia coli* morphogene. *EMBO J* **8**: 3923-3931
- Aldea M, Garrido T, Pla J, Vicente M (1990) Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters. *EMBO J* **9**: 3787-3794
- Aldea M, Hernández-Chico C, de la Campa A, Kushner S, Vicente M (1988) Identification, cloning, and expression of bolA, an ftsZ-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 5169-5176
- Alkim C, Benbadis L, Yilmaz U, Cakar Z, François J (2013) Mechanisms other than activation of the iron regulon account for the hyper-resistance to cobalt of a *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by evolutionary engineering. *Metallomics* **5**: 1043-1060
- Anderson B, Dawson J, Jones D, Wilson K (1991) *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* **29**: 2838-2842
- Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu M, Iyer L (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 231-262

Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6161-6165

Atlung T, Ingmer H (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* **24**: 7-17

Ayer A, Tan S, Grant C, Meyer A, Dawes I, Perrone G (2010) The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. *Free Radic Biol Med* **49**: 1956-1968

Balk J, Pilon M (2011) Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci* **16**: 218-226

Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro M, Gualberto J, Claxton R, Naik S, Huynh B, Herrero E, Jacquot J, Johnson M, Rouhier N (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J* **27**: 1122-1133

Banerjee R, Ragsdale S (2003) The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* **72**: 209-247

Bittner F, Oreb M, Mendel R (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**: 40381-40384

Blattner F, Plunkett Gr, Bloch C, Perna N, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner J, Rode C, Mayhew G, Gregor J, Davis N, Kirkpatrick H, Goeden M, Rose D, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462

Bushweller J, Aslund F, Wüthrich K, Holmgren A (1992) Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* **31**: 9288-9293

Butland G, Babu M, Díaz-Mejía J, Bohdana F, Phanse S, Gold B, Yang W, Li J, Gagarinova A, Pogoutse O, Mori H, Wanner B, Lo H, Wasniewski J, Christopoulos C, Ali M, Venn P, Safavi-Naini A, Sourour N, Caron S, Choi J, Laigle L, Nazarians-Armavil A, Deshpande A, Joe S, Datsenko K, Yamamoto N, Andrews B, Boone C, Ding H, Sheikh B, Moreno-Hagelseib G, Greenblatt J, Emili A (2008) eSGA: *E. coli* synthetic genetic array analysis. *Nat Methods* **5**: 789-795

Butland G, Peregrín-Alvarez J, Li J, Yang W, Yang X, Canadien V, Starostine A, Richards D, Beattie B, Krogan N, Davey M, Parkinson J, Greenblatt J, Emili A (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**: 531-537

Cameron J, Janer A, Levandovskiy V, Mackay N, Rouault T, Tong W, Ogilvie I, Shoubridge E, Robinson B (2011) Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a

fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am J Hum Genet* **89**: 486-495

Cao G, Sarkar N (1997) Stationary phase-specific mRNAs in *Escherichia coli* are polyadenylated. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 46-50

Carmel-Harel O, Storz G (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* **54**: 439-461

Ceylan S, Seidel V, Ziebart N, Berndt C, Dirdjaja N, Krauth-Siegel R (2010) The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *J Biol Chem* **285**: 35224-35237

Chen V, Arendall Wr, Headd J, Keedy D, Immormino R, Kapral G, Murray L, Richardson J, Richardson D (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 12-21

Cheng Z, Miura K, Popov V, Kumagai Y, Rikihisa Y (2011) Insights into the CtrA regulon in development of stress resistance in obligatory intracellular pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. *Mol Microbiol* **82**: 1217-1234

Chin K, Lin F, Hu Y, Sze K, Lyu P, Chou S (2005) NMR structure note--solution structure of a bacterial BolA-like protein XC975 from a plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Biomol NMR* **31**: 167-172

Collinson E, Grant C (2003) Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J Biol Chem* **278**: 22492-22497

Collinson E, Wheeler G, Garrido E, Avery A, Avery S, Grant C (2002) The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **277**: 16712-16717

Couturier J, Jacquot J, Rouhier N (2009a) Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2539-2557

Couturier J, Koh C, Zaffagnini M, Winger A, Gualberto J, Corbier C, Decottignies P, Jacquot J, Lemaire S, Didierjean C, Rouhier N (2009b) Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J Biol Chem* **284**: 9299-9310

Couturier J, Ströher E, Albetel A, Roret T, Muthuramalingam M, Tarrago L, Seidel T, Tsan P, Jacquot J, Johnson M, Dietz K, Didierjean C, Rouhier N (2011) Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins. *J Biol Chem* **286**: 27515-27527

Couturier J, Wu H, Dhalleine T, Pégeot H, Sudre D, Gualberto J, Jacquot J, Gaymard F, Vignols F, Rouhier N (2014) Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of Arabidopsis thaliana BolA2 and SufE1. *Mol Plant* **7**: 187-205

Cupp-Vickery J, Urbina H, Vickery L (2003) Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **330**: 1049-1059

Discola K, de Oliveira M, Rosa Cussiol J, Monteiro G, Bárcena J, Porras P, Padilla C, Guimarães B, Netto L (2009) Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **385**: 889-901

Doudeva L, Huang H, Hsia K, Shi Z, Li C, Shen Y, Cheng Y, Yuan H (2006) Crystal structural analysis and metal-dependent stability and activity studies of the ColE7 endonuclease domain in complex with DNA/Zn²⁺ or inhibitor/Ni²⁺. *Protein Sci* **15**: 269-280

Du Z, Lee J, Fenn S, Tjhen R, Stroud R, James T (2007) X-ray crystallographic and NMR studies of protein-protein and protein-nucleic acid interactions involving the KH domains from human poly(C)-binding protein-2. *RNA* **13**: 1043-1051

Emsley P, Lohkamp B, Scott W, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 486-501

Engh R, Huber R (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr A* **A47**: 392-400

Evans G, Pettifer R (2001) CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J Appl Cryst* **34**: 82-86

Evans P (2005) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 72-82

Fernandes A, Fladvad M, Berndt C, Andréen C, Lillig C, Neubauer P, Sunnerhagen M, Holmgren A, Vlamis-Gardikas A (2005) A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **280**: 24544-24552

Fernandes A, Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* **6**: 63-74

Flint D (1996) *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J Biol Chem* **271**: 16068-16074

Fontecave M, Ollagnier-de-Choudens S (2008) Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch Biochem Biophys* **474**: 226-237

Frazzon A, Ramirez M, Warek U, Balk J, Frazzon J, Dean D, Winkel B (2007) Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly. *Plant Mol Biol* **64**: 225-240

Freire P, Amaral J, Santos J, Arraiano C (2006a) Adaptation to carbon starvation: RNase III ensures normal expression levels of bolA1p mRNA and sigma(S). *Biochimie* **88**: 341-346

Freire P, Moreira R, Arraiano C (2009) BolA inhibits cell elongation and regulates MreB expression levels. *J Mol Biol* **385**: 1345-1351

Freire P, Vieira H, Furtado A, de Pedro M, Arraiano C (2006b) Effect of the morphogene bolA on the permeability of the Escherichia coli outer membrane. *FEMS Microbiol Lett* **260**: 106-111

Gille C, Frömmel C (2001) STRAP: editor for STRuctural Alignments of Proteins. *Bioinformatics* **17**: 377-378

Giot L, Bader J, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao Y, Ooi C, Godwin B, Vitols E, Vijayadamodar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrolla S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon C, Finley RJ, White K, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets R, McKenna M, Chant J, Rothberg J (2003) A Protein Interaction Map of Drosophila melanogaster. *Science* **302**: 1727-1736

Gouet P, Courcelle E, Stuart D, Métoz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308

Grant C (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* **39**: 533-541

Grishin N (2001) KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res* **29**: 638-643

Grishin N, Phillips M, Goldsmith E (1995) Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci* **4**: 1291-1304

Guinote I, Matos R, Freire P, Arraiano C (2011) BolA affects cell growth, and binds to the promoters of penicillin-binding proteins 5 and 6 and regulates their expression. *J Microbiol Biotechnol* **21**: 243-251

Guinote I, Moreira R, Freire P, Arraiano C (2012) Characterization of the BolA homolog IbaG: a new gene involved in acid resistance. *J Microbiol Biotechnol* **22**: 484-493

Hall J (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1-11

Hallez R, Bellefontaine A, Letesson J, De Bolle X (2004) Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**: 361-365

Haunhorst P, Berndt C, Eitner S, Godoy J, Lillig C (2010) Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem Biophys Res Commun* **394**: 372-376

Hengge-Aronis R (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 373-395

Hoffmann B, Uzarska M, Berndt C, Godoy J, Haunhorst P, Lillig C, Lill R, Mühlhoff U (2011) The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. *Antioxid Redox Signal* **15**: 19-30

Holmgren A (1976) Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 2275-2279

Holmgren A (2000) Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* **2**: 811-820

Holmgren A, Aslund F (1995) Glutaredoxin. *Methods Enzymol* **252**: 283-292

Huynen M, Spronk C, Gabaldón T, Snel B (2005) Combining data from genomes, Y2H and 3D structure indicates that BolA is a reductase interacting with a glutaredoxin. *FEBS Lett* **579**: 591-596

Ito A, May T, Kawata K, Okabe S (2008) Significance of rpoS during maturation of Escherichia coli biofilms. *Biotechnol Bioeng* **99**: 1462-1471

Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1143-1147

Iwema T, Picciocchi A, Traore D, Ferrer J, Chauvat F, Jacquamet L (2009) Structural basis for delivery of the intact [Fe₂S₂] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry* **48**: 6041-6043

Izquierdo A, Casas C, Mühlhoff U, Lillig C, Herrero E (2008) Saccharomyces cerevisiae Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryot Cell* **7**: 1415-1426

Jacobson M, Cash V, Weiss M, Laird N, Newton W, Dean D (1989) Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from Azotobacter vinelandii. *Mol Gen Genet* **219**: 49-57

Jerman B, Butala M, Zgur-Bertok D (2005) Sublethal concentrations of ciprofloxacin induce bacteriocin synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3087-3090

Johansson C, Kavanagh K, Gileadi O, Oppermann U (2007) 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

Johansson C, Roos A, Montano S, Sengupta R, Filippakopoulos P, Guo K, von Delft F, Holmgren A, Oppermann U, Kavanagh K (2011) The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem J* **433**: 303-311

Johnson D, Dean D, Smith A, Johnson M (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**: 247-281

Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125-132

Kaiser J, Clausen T, Bourenkow G, Bartunik H, Steinbacher S, Huber R (2000) Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. *J Mol Biol* **297**: 451-464

Kasai T, Inoue M, Koshiba S, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Seki E, Matsuda T, Matsuda N, Tomo Y, Shirouzu M, Terada T, Obayashi N, Hamana H, Shinya N, Tatsuguchi A, Yasuda S, Yoshida M, Hirota H, Matsuo Y, Tani K, Suzuki H, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kigawa T, Yokoyama S (2004) Solution structure of a BolA-like protein from *Mus musculus*. *Protein Sci* **13**: 545-548

Kim M, Kim H, Lee J, Lee C, Park S (2002) Regulation of septation and cytokinesis during resumption of cell division requires uvi31+, a UV-inducible gene of fission yeast. *Mol Cells* **14**: 425-430

Kim S, Kim M, Lee J, Kim M, Jin Y, Seong R, Hong S, Joe C, Park S (1997) Identification and expression of uvi31+, a UV-inducible gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Environ Mol Mutagen* **30**: 72-81

Kim S, Park S (2013) Structural changes during cysteine desulfurase CsdA and sulfur acceptor CsdE interactions provide insight into the trans-persulfuration. *J Biol Chem* **288**: 27172-27180

Kiyasu T, Asakura A, Nagahashi Y, Hoshino T (2000) Contribution of cysteine desulfurase (NifS protein) to the biotin synthase reaction of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 2879-2885

Koch B, Nybroe O (2006) Initial characterization of a bolA homologue from *Pseudomonas fluorescens* indicates different roles for BolA-like proteins in *P. fluorescens* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **262**: 48-56

Krogan N, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis A, Punna T, Peregrín-Alvarez J, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson M, Paccanaro A, Bray J,

Sheung A, Beattie B, Richards D, Canadien V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete M, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins S, Chandran S, Haw R, Rilstone J, Gandi K, Thompson N, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam M, Butland G, Altaf-Ul A, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman J, Ingles C, Hughes T, Parkinson J, Gerstein M, Wodak S, Emili A, Greenblatt J (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-643

Kumánovics A, Chen O, Li L, Bagley D, Adkins E, Lin H, Dingra N, Outten C, Keller G, Winge D, Ward D, Kaplan J (2008) Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem* **283**: 10276-10286

Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, Davey M, Papenbrock J, De Rycke R, Engler G, Stephan U, Lange H, Kispal G, Lill R, Van Montagu M (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter Stal leads to dwarfism and chlorosis in the Arabidopsis mutant starik. *Plant Cell* **13**: 89-100

Lange R, Hengge-Aronis R (1991) Growth phase-regulated expression of bolA and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol* **173**: 4474-4481

Lauhon C, Kambampati R (2000) The iscS gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *J Biol Chem* **275**: 20096-20103

Layer G, Gaddam S, Ayala-Castro C, Ollagnier-de Choudens S, Lascoux D, Fontecave M, Outten F (2007) SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **282**: 13342-13350

Lee K, Lee J, Yoo J, Jang H, Moon J, Jung B, Chi Y, Park S, Lee S, Lim C, Yun D, Cho M, Lee S (2002) GSH-dependent peroxidase activity of the rice (*Oryza sativa*) glutaredoxin, a thioltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 1152-1156

Lehembre F, Doillon D, David E, Perrotto S, Baude J, Foulon J, Harfouche L, Vallon L, Poulain J, Da Silva C, Wincker P, Oger-Desfeux C, Richaud P, Colpaert J, Chalot M, Fraissinet-Tachet L, Blaudez D, Marmeisse R (2013) Soil metatranscriptomics for mining eukaryotic heavy metal resistance genes. *Environ Microbiol* **15**: 2829-2840

Lemaire S (2004) The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynth Res* **79**: 305-318

Léon S, Touraine B, Briat J, Lobréaux S (2002) The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem J* **366**: 557-564

Li H, Mapolelo D, Dingra N, Keller G, Riggs-Gelasco P, Winge D, Johnson M, Outten C (2011a) Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast. *J Biol Chem* **286**: 867-876

- Li H, Mapolelo D, Dingra N, Naik S, Lees N, Hoffman B, Riggs-Gelasco P, Huynh B, Johnson M, Outten C (2009a) The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* **48**: 9569-9581
- Li H, Mapolelo D, Randeniya S, Johnson M, Outten C (2012) Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BolA2. *Biochemistry* **51**: 1687-1696
- Li H, Outten C (2012) Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry* **51**: 4377-4389
- Li L, Kaplan J (2004) A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *J Biol Chem* **279**: 33653-33661
- Li S, Gutsche N, Zachgo S (2011b) The ROXY1 C-terminal L**LL motif is essential for the interaction with TGA transcription factors. *Plant Physiol* **157**: 2056-2068
- Li S, Lauri A, Ziemann M, Busch A, Bhawe M, Zachgo S (2009b) Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**: 429-441
- Li W, Yu J, Ma X, Teng Y, Luo M, Tang Y, Zhou C (2010) Structural basis for the different activities of yeast Grx1 and Grx2. *Biochim Biophys Acta* **1804**: 1542-1547
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838
- Lillig C, Berndt C, Holmgren A (2008) Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1304-1317
- Lillig C, Berndt C, Vergnolle O, Lönn M, Hudemann C, Bill E, Holmgren A (2005) 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
- Liu X, Liu S, Feng Y, Liu J, Chen Y, Pham K, Deng H, Hirschi K, Wang X, Cheng N (2013) Structural insights into the N-terminal GIY-YIG endonuclease activity of *Arabidopsis* glutaredoxin AtGRXS16 in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 9565-9570
- Loiseau L, Ollagnier-de-Choudens S, Nachin L, Fontecave M, Barras F (2003) Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J Biol Chem* **278**: 38352-38359
- Loiseau L, Ollagnier-de Choudens S, Lascoux D, Forest E, Fontecave M, Barras F (2005) Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 26760-26769

Lopreiato R, Facchin S, Sartori G, Arrigoni G, Casonato S, Ruzzene M, Pinna L, Carignani G (2004) Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem J* **377**: 395-405

Luikenhuis S, Perrone G, Dawes I, Grant C (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **9**: 1081-1091

Luo M, Jiang Y, Ma X, Tang Y, He Y, Yu J, Zhang R, Chen Y, Zhou C (2010) Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. *J Mol Biol* **398**: 614-622

MacRae I, Doudna J (2007) Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 138-145

Margolin W (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 862-871

Marinoni E, de Oliveira J, Nicolet Y, Raulfs E, Amara P, Dean D, Fontecilla-Camps J (2012) (IscS-IscU)₂ complex structures provide insights into FeS₂ biogenesis and transfer. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**: 5439-5442

Mesecke N, Mittler S, Eckers E, Herrmann J, Deponte M (2008) Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry* **47**: 1452-1463

Mihara H, Esaki N (2002) Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 12-23

Mihara H, Fujii T, Kato S, Kurihara T, Hata Y, Esaki N (2002) Structure of external aldimine of *Escherichia coli* CsdB, an IscS/NifS homolog: implications for its specificity toward selenocysteine. *J Biochem* **131**: 679-685

Mihara H, Kurihara T, Watanabe T, Yoshimura T, Esaki N (2000a) cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* **275**: 6195-6200

Mihara H, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N (2000b) Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J Biochem* **127**: 559-567

Mihara H, Kurihara T, Yoshimura T, Soda K, Esaki N (1997) Cysteine sulfinatase, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *J Biol Chem* **272**: 22417-22424

- Mihara H, Maeda M, Fujii T, Kurihara T, Hata Y, Esaki N (1999) A nifS-like gene, csdB, encodes an Escherichia coli counterpart of mammalian selenocysteine lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. *J Biol Chem* **274**: 14768-14772
- Molina M, Bellí G, de la Torre M, Rodríguez-Manzanque M, Herrero E (2004) Nuclear monothiol glutaredoxins of Saccharomyces cerevisiae can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem* **279**: 51923-51930
- Moreira R, Dressaire C, Domingues S, Arraiano C (2011) A new target for an old regulator: H-NS represses transcription of bolA morphogene by direct binding to both promoters. *Biochem Biophys Res Commun* **411**: 50-55
- Mueller E (2006) Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol* **2**: 185-194
- Mühlenhoff U, Balk J, Richhardt N, Kaiser J, Sipos K, Kispal G, Lill R (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **279**: 36906-36915
- Murmu J, Bush M, DeLong C, Li S, Xu M, Khan M, Malcolmson C, Fobert P, Zachgo S, Hepworth S (2010) Arabidopsis basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. *Plant Physiol* **154**: 1492-1504
- Narayana Murthy U, Ollagnier-de-Choudens S, Sanakis Y, Abdel-Ghany S, Rousset C, Ye H, Fontecave M, Pilon-Smits E, Pilon M (2007) Characterization of Arabidopsis thaliana SufE2 and SufE3: functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and Nad synthesis. *J Biol Chem* **282**: 18254-18264
- Ndamukong I, Abdallat A, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C (2007) SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J* **50**: 128-139
- Nikaido H (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593-656
- Nooren IM, Thornton JM (2003) Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* **22**: 3486-3492
- Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford J, Lill R, Winge D (2006) 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

Outten F, Djaman O, Storz G (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **52**: 861-872

Outten F, Wood M, Munoz F, Storz G (2003) The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 45713-45719

Piccicocchi A, Douce R, Alban C (2003) The plant biotin synthase reaction. Identification and characterization of essential mitochondrial accessory protein components. *J Biol Chem* **278**: 24966-24975

Pilon-Smits E, Garifullina G, Abdel-Ghany S, Kato S, Mihara H, Hale K, Burkhead J, Esaki N, Kurihara T, Pilon M (2002) Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiol* **130**: 1309-1318

Pilon M, Cohu C, Ravet K, Abdel-Ghany S, Gaymard F (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 347-357

Pingoud A, Jeltsch A (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **29**: 3705-3727

Poor C, Wegner S, Li H, Dlouhy A, Schuermann J, Sanishvili R, Hinshaw J, Riggs-Gelasco P, Outten C, He C (2014) Molecular mechanism and structure of the *Saccharomyces cerevisiae* iron regulator Aft2. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Prinz W, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**: 15661-15667

Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A, de la Torre-Ruiz M (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **119**: 4554-4564

Qi W, Cowan J (2011) Structural, Mechanistic and Coordination Chemistry of Relevance to the Biosynthesis of Iron-Sulfur and Related Iron Cofactors. *Coord Chem Rev* **255**: 688-699

Rahlfs S, Fischer M, Becker K (2001) *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *J Biol Chem* **276**: 37133-37140

Rodríguez-Manzanique M, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8180-8190

Rodríguez-Manzanque M, Tamarit J, Bellí 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

Rouhier N, Couturier J, Jacquot J (2006) Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *J Exp Bot* **57**: 1685-1696

Rouhier N, Couturier J, Johnson M, Jacquot J (2010) Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* **35**: 43-52

Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot J (2004) Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell Mol Life Sci* **61**: 1266-1277

Rouhier N, Lemaire S, Jacquot J (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 143-166

Rouhier N, Unno H, Bandyopadhyay S, Masip L, Kim S, Hirasawa M, Gualberto J, Lattard V, Kusunoki M, Knaff D, Georgiou G, Hase T, Johnson M, Jacquot J (2007) 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

Russo F, Silhavy T (1991) EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J Mol Biol* **222**: 567-580

Santos J, Freire P, Mesquita F, Mika F, Hengge R, Arraiano C (2006) Poly(A)-polymerase I links transcription with mRNA degradation via sigmaS proteolysis. *Mol Microbiol* **60**: 177-188

Santos J, Freire P, Vicente M, Arraiano C (1999) The stationary-phase morphogene bolA from Escherichia coli is induced by stress during early stages of growth. *Mol Microbiol* **32**: 789-798

Santos J, Lobo M, Matos A, De Pedro M, Arraiano C (2002) The gene bolA regulates dacA (PBP5), dacC (PBP6) and ampC (AmpC), promoting normal morphology in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **45**: 1729-1740

Schwartz C, Djaman O, Imlay J, Kiley P (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9009-9014

Sendra M, Ollagnier de Choudens S, Lascoux D, Sanakis Y, Fontecave M (2007) The SUF iron-sulfur cluster biosynthetic machinery: sulfur transfer from the SUFS-SUFE complex to SUFA. *FEBS Lett* **581**: 1362-1368

Shearer H, Wang L, DeLong C, Despres C, Fobert P (2009) NPR1 enhances the DNA binding activity of the Arabidopsis bZIP transcription factor TGA7. *Botany* **87**: 561-570

Shenton D, Perrone G, Quinn K, Dawes I, Grant C (2002) Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **277**: 16853-16859

Shi R, Proteau A, Villarroya M, Moukadiri I, Zhang L, Trempe J, Matte A, Armengod M, Cygler M (2010) Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol* **8**: 1-18

Shukla M, Minda R, Singh H, Tirumani S, Chary K, Rao B (2012) UVI31+ is a DNA endonuclease that dynamically localizes to chloroplast pyrenoids in *C. reinhardtii*. *PLoS One* **7**: 1-13

Singh H, Dai Y, Outten F, Busenlehner L (2013a) Escherichia coli SufE sulfur transfer protein modulates the SufS cysteine desulfurase through allosteric conformational dynamics. *J Biol Chem* **288**: 36189-36200

Singh H, Raghavan V, Shukla M, Rao B, Chary K (2014a) ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of S114A mutant of UVI31+ from Chlamydomonas reinhardtii. *Biomol NMR Assign* **8**: 71-74

Singh H, Rao B, Chary K (2013b) ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR assignments of a mutant of UV inducible transcript (S55A-UVI31+) from Chlamydomonas reinhardtii. *Biomol NMR Assign*

Singh H, Verma D, Rao B, Chary K (2014b) ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR assignments of Mg 2+ bound form of UV inducible transcript protein (UVI31+) from Chlamydomonas reinhardtii. *Biomol NMR Assign*

Stohs S, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**: 321-336

Tamarit J, Belli G, Cabiscol E, Herrero E, Ros J (2003) Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J Biol Chem* **278**: 25745-25751

Terwilliger T, Adams P, Read R, McCoy A, Moriarty N, Grosse-Kunstleve R, Afonine P, Zwart P, Hung L (2009) Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**: 582-601

Terwilliger T, Grosse-Kunstleve R, Afonine P, Moriarty N, Zwart P, Hung L, Read R, Adams P (2008) Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**: 61-69

Toledano M, Delaunay A, Monceau L, Tacnet F (2004) Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* **29**: 351-357

Trotter V, Vinella D, Loiseau L, Ollagnier de Choudens S, Fontecave M, Barras F (2009) The CsdA cysteine desulphurase promotes Fe/S biogenesis by recruiting Suf components and participates to a new sulphur transfer pathway by recruiting CsdL (ex-YgdL), a ubiquitin-modifying-like protein. *Mol Microbiol* **74**: 1527-1542

Tu C, Zhou X, Tarasov S, Tropea J, Austin B, Waugh D, Court D, Ji X (2011) The Era GTPase recognizes the GAUACCUC sequence and binds helix 45 near the 3' end of 16S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 10156–10161

Turowski V, Busi M, Gomez-Casati D (2012) Structural and functional studies of the mitochondrial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **5**: 1001-1010

Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y (2007) Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**: 2980-2990

Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y (2012) Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. *Mol Cell Biol* **32**: 4998-5008

Vagin A, Teplyakov A (2009) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 22-25

Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**: 1-40

Valverde R, Edwards L, Regan L (2008) Structure and function of KH domains. *FEBS J* **275**: 2712-2726

Van Hoewyk D, Abdel-Ghany S, Cohu C, Herbert S, Kugrens P, Pilon M, Pilon-Smits E (2007) Chloroplast iron-sulfur cluster protein maturation requires the essential cysteine desulfurase CpNifS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5686-5691

Veidis M, Schreiber G, Gough T, Palenik G (1969) Jahn-Teller distortions in octahedral copper(II) complexes. *J Am Chem Soc* **91**: 1859-1860

Vieira H, Freire P, Arraiano C (2004) Effect of *Escherichia coli* morphogene bolA on biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5682-5684

Vinogradov S, Sharma P, Walz D (1991) Iron and heme contents of the extracellular hemoglobins and chlorocruorins of annelids. *Comp Biochem Physiol B* **98**: 187-194

Wang J, Pantopoulos K (2011) Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* **434**: 365-381

Weeratunga S, Lovell S, Yao H, Battaile K, Fischer C, Gee C, Rivera M (2010) Structural studies of bacterioferritin B from *Pseudomonas aeruginosa* suggest a gating mechanism for iron uptake via the ferroxidase center. *Biochemistry* **49**: 1160-1175

White-Ziegler C, Um S, Pérez N, Berns A, Malhowski A, Young S (2008) Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **154**: 148-166

Willems P, Wanschers B, Esseling J, Szklarczyk R, Kudla U, Duarte I, Forkink M, Nooteboom M, Swarts H, Gloerich J, Nijtmans L, Koopman W, Huynen M (2013) BOLA1 is an aerobic protein that prevents mitochondrial morphology changes induced by glutathione depletion. *Antioxid Redox Signal* **18**: 129-138

Wingert R, Galloway J, Barut B, Foott H, Fraenkel P, Axe J, Weber G, Dooley K, Davidson A, Schmid B, Paw B, Shaw G, Kingsley P, Palis J, Schubert H, Chen O, Kaplan J, Zon L (2005) Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**: 1035-1039

Winn M, Ballard C, Cowtan K, Dodson E, Emsley P, Evans P, Keegan R, Krissinel E, Leslie A, McCoy A, McNicholas S, Murshudov G, Pannu N, Potterton E, Powell H, Read R, Vagin A, Wilson K (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**: 235-242

Xu X, Möller S (2006) AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*. *EMBO J* **25**: 900-909

Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 18914-18918

Yamamoto K, Nagura R, Tanabe H, Fujita N, Ishihama A, Utsumi R (2000) Negative regulation of the bolA1p of *Escherichia coli* K-12 by the transcription factor OmpR for osmolarity response genes. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 257-262

Ye H, Abdel-Ghany S, Anderson T, Pilon-Smits E, Pilon M (2006) CpSufE activates the cysteine desulfurase CpNifS for chloroplastic Fe-S cluster formation. *J Biol Chem* **281**: 8958-8969

Yeung N, Gold B, Liu N, Prathapam R, Sterling H, Williams E, Butland G (2011) The *E. coli* monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes. *Biochemistry* **50**: 8957-8969

Yogavel M, Tripathi T, Gupta A, Banday M, Rahlfs S, Becker K, Belrhali H, Sharma A (2014) Atomic resolution crystal structure of glutaredoxin 1 from *Plasmodium falciparum* and comparison with other glutaredoxins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**: 91-100

Yu J, Zhang N, Yin P, Cui P, Zhou C (2008) Glutathionylation-triggered conformational changes of glutaredoxin Grx1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins* **72**: 1077-1083

Yuvaniyama P, Agar J, Cash V, Johnson M, Dean D (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 599-604

Zhang B, Bandyopadhyay S, Shakamuri P, Naik S, Huynh B, Couturier J, Rouhier N, Johnson M (2013) Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe₃S₄]⁺ and [Fe₄S₄]²⁺ clusters in addition to [Fe₂S₂]²⁺ clusters: spectroscopic characterization and functional implications. *J Am Chem Soc* **135**: 15153-15164

Zhang W, Urban A, Mihara H, Leimkuhler S, Kurihara T, Esaki N (2010) IscS functions as a primary sulfur-donating enzyme by interacting specifically with MoeB and MoaD in the biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **285**: 2302-2308

Zhang Y, Tessaro M, Lassner M, Li X (2003) Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* **15**: 2647-2653

Zheng L, Dean D (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J Biol Chem* **269**: 18723-18726

Zheng L, White R, Cash V, Jack R, Dean D (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2754-2758

Zhou Y, Cao J, Wan B, Wang X, Ding G, Zhu H, Yang H, Wang K, Zhang X, Han Z (2008) hBolA, novel non-classical secreted proteins, belonging to different BolA family with functional divergence. *Mol Cell Biochem* **317**: 61-68

Les interactions intermoléculaires au sein des êtres vivants sont complexes et permettent de véhiculer l'information nécessaire à la survie de l'organisme à un moment donné. Il arrive même que certains intervenants soient impliqués à différents stades d'un même processus. Parmi les très nombreux processus biologiques présents au sein des cellules, la biogénèse des centres fer-soufre apparaît être très complexe. Cette complexité est probablement reliée à la toxicité cellulaire du fer libre et du soufre libre. Ainsi les différentes étapes de la création des centres fer-soufre doivent être étroitement régulées. Des études récentes semblent montrer que les protéines BolA et les glutarédoxines de classe II sont impliquées dans l'homéostasie du fer en intervenant seules ou de manière concertée. Cependant, la fonction réelle de ces protéines notamment aux différents stades de la biogénèse des centres fer-soufre reste encore que très peu connue.

Afin de mieux comprendre la capacité des protéines BolA et glutarédoxines à jouer leur fonction biologique, nous avons étudié à travers ce travail de thèse la capacité des protéines BolA et glutarédoxines à former des homodimères et des hétérodimères au sein de l'organisme *Arabidopsis thaliana*. Pour ce faire, la cristallographie des rayons X, la résonance magnétique nucléaire et d'autres méthodes spectroscopiques ont été utilisées pour caractériser structuralement les différents états oligomériques de ces deux protéines.

Mots clés : BolA, centre fer-soufre, cristallographie des rayons X, glutarédoxines, résonance magnétique nucléaire.