

真核细胞中铁硫簇的组装机制及相关铁硫蛋白疾病

杜璟 李艳纯 任雪莹 谭国强* 吕建新*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 铁硫簇是一类古老而功能众多的蛋白质辅基, 在细胞中参与电子传递过程、酶促反应及感知内环境的变化而调节基因的表达等。虽然铁硫簇的组成元素和结构都较为简单, 但是铁硫簇的组装是需多种组装蛋白参与、有序进行的催化反应。直至近几年, 人们才逐渐阐明了在生命体中铁硫簇是如何组装并结合到未成熟的铁硫蛋白中的。如果线粒体中铁硫簇组装及转运过程发生障碍, 将严重影响细胞内铁的稳态及铁硫蛋白的功能, 由此可见, 线粒体中铁硫簇的组装功能使得线粒体成为细胞中必不可少的一类细胞器。该文重点概述了近十年来真核生物中铁硫簇组装机制的研究进展并阐述线粒体铁硫簇组装在人体中的重要作用及其组装障碍所引起的疾病。

关键词 铁硫簇; 铁硫蛋白; 铁调节; 铁硫蛋白病

Mechanisms of Iron-sulfur Clusters Assemble in Eukaryotes and Related Diseases

Du Jing, Li Yanchun, Ren Xueying, Tan Guoqiang*, Lü Jianxin*

(School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Iron-sulfur (Fe-S) cluster is an ancient protein cofactor which has been known with many functions, and it involves in many physiological processes, such as catalysis, electron transport and regulation of gene expression. Despite the simplicity of its structure and composition, Iron-sulfur cluster (ISC) has a complicated assembling process which is a well-organized catalytic reaction. Over the past years the mechanisms of the process of iron-sulfur clusters' assembly and incorporation into apoproteins have been gradually clarified. Defects in the mitochondrial Iron-sulfur cluster assembly and export systems have a powerful impact on cellular Iron-sulfur protein's function and intracellular iron distribution. These provided strong evidences for the indispensable role of mitochondrial in life. In this review, we have summarized our current knowledge about the ISC assembly machinery briefly, and presented an overview of various (Fe-S) protein assembly diseases.

Keywords iron-sulfur clusters; iron-sulfur protein; iron regulation; iron-sulfur protein diseases

线粒体作为真核细胞中重要的细胞器, 在人体生命活动中扮演着许多重要的角色。它们通过氧化磷酸化为机体提供能量, 参与脂肪酸氧化、尿素循

环和氨基酸生成等代谢过程。更重要的是, 线粒体还参与大量蛋白质辅基如亚铁血红素、生物素、硫辛酸等的生物合成^[1], 铁硫簇(iron-sulfur cluster)也是

收稿日期: 2015-04-20 接受日期: 2015-07-13

国家自然科学基金(批准号: 31200587)、浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(批准号: 2015R413083)、浙江省自然科学基金(批准号: LY12C05003)和浙江省“临床检验诊断技术”重点科技创新团队(批准号: 2010R50048-14)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: tgq@wmu.edu.cn, jxlu313@163.com

Received: April 20, 2015 Accepted: July 13, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31200587), College Students in Zhejiang Province Science and Technology Innovation Activity Plan (Planted Talent Plan) (Grant No.2015R413083), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY12C05003) and the Key Science and Technology Innovation Team of Zhejiang Province (Grant No.2010R50048-14)

*Corresponding authors. Tel: +86-577-86689805, E-mail: tgq@wmu.edu.cn, jxlu313@163.com

网络出版时间: 2015-09-18 17:02:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150918.1702.006.html>

其中很重要的一种,它们参与电子传递过程和酶促反应,并且在硫辛酸及生物素的合成中充当硫供体。铁硫簇有多种结构,其中最简单及普遍存在的形式就是菱形的[2Fe-2S]簇和立方形的[4Fe-4S]簇,也有[3Fe-4S]或更复杂的包含其他重金属离子的构型^[2]。在铁硫簇中,硫一般是以S²⁻形式存在,铁元素则可在Fe²⁺和Fe³⁺两种价态之间转换。铁硫簇一般都依靠铁与蛋白质中半胱氨酸或组氨酸残基结合嵌入到铁硫蛋白中。当然,在一些铁硫蛋白中铁硫簇也会与CO、CN、天冬氨酸、精氨酸、丝氨酸残基结合^[3]。所以,目前仍较难通过蛋白质序列去预测它是否能结合铁硫簇。

最早在二十世纪六十年代,研究者发现一些纯化的蛋白质有特征性的电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)信号,随后发现这个信号是蛋白质中结合的铁硫簇产生的。在六十年代晚期,研究者便开始设计实验,并成功地在体外将铁硫簇组装到蛋白质中。所以,当时的研究一度认为铁硫簇的组装可以自发地在蛋白质上合成^[4]。直到九十年代,科学家才通过细胞生物学和分子生物学实验在大肠杆菌和酵母中证实了生命体中铁硫簇的组装是需多种组装蛋白参与、有序进行的催化反应^[5],在这之后不断有新的铁硫簇组装蛋白被发现,铁硫簇组装机制才慢慢被人们了解。铁硫簇组装缺陷会影响一系列铁硫蛋白酶的功能,从而导致严重的神经退行性病变、代谢性疾病及血液系统疾病等^[6-7]。本文将重点概述近十年来真核生物中铁硫簇组装机制的研究进展,并阐述线粒体中铁硫簇组装在人体中的重要作用及其组装障碍所引起的疾病。

1 铁硫簇的生物学功能

生物体中含有铁硫簇的蛋白质一般称为铁硫蛋白(iron-sulfur protein),而铁硫蛋白的生物学特性一般都由铁硫簇决定。铁硫簇主要具有以下三方面的功能:(1)在生物体中铁硫簇最重要的功能之一就是电子传递,比如线粒体呼吸链复合体I-III、光合系统I和氢化酶等。铁硫簇电子传递功能主要取决于铁元素能在+2与+3价态之间转换,所以,铁硫簇能够充当很好的电子供体和电子受体^[8];(2)铁硫簇还能催化生化反应,典型的例子就是顺乌头酸酶(aconitase),它含有一个[4Fe-4S]簇,能协助柠檬酸脱去一个水分子变成异柠檬酸。又如生物素合酶(biotin synthase)

及硫辛酸合酶(lipoic acid synthase, LIAS),它们各含两个铁硫簇,其中一个铁硫簇在生物素或硫辛酸合成的过程中可以作为硫的供体^[9];(3)铁硫簇能够感应外界环境或细胞内稳态的变化而调节基因的表达,例如细菌中的转录因子FNR、IscR和SoxR可以分别感知细胞中O₂、铁硫簇和NO的变化,从而能在激活和抑制两种功能状态中转换^[10];再如人体中的铁调节蛋白1(iron regulatory protein 1, IRP1)在铁充足的情况下能结合[4Fe-4S]簇,而在缺铁的条件下会丢失铁硫簇变成脱辅基蛋白(apoproteins, Apo)形式^[11],Apo形式的IRP1可以与铁转运(转铁蛋白受体、铁转运蛋白)、铁存储(铁蛋白)及铁利用(顺乌头酸酶、血红素合成酶)相关蛋白质的mRNA结合,通过调节这些mRNA的稳定性或翻译活性来控制细胞内铁的平衡^[12-13]。在几千年的进化过程中,铁硫簇的这些功能被保留下来,始终精密地调节着机体的生命活动。

2 真核细胞中铁硫簇组装机制及铁硫蛋白的成熟

最初研究铁硫簇组装机制是在棕色固氮菌及大肠杆菌中进行的。在细菌中铁硫簇组装包含NIF(nitrogen fixation)、ISC(iron-sulfur cluster assembly machinery)、SUF(mobilization of sulfur)三个组装系统,其中NIF系统主要是为固氮菌中固氮酶提供铁硫簇,而ISC和SUF系统分别是细菌在正常条件和应激状态时为机体提供铁硫簇。在生物进化过程中,ISC系统逐渐演变为线粒体中铁硫簇组装系统,而SUF系统则逐渐演变成成为质体中铁硫簇的组装途径。由于铁硫簇的组装从原核生物到真核生物都高度保守,所以常选用酵母作为模式生物来研究真核生物中铁硫簇组装机制,据此得出的组装理论在人细胞系和铁硫蛋白病患者体内均已得到充分验证。

2.1 铁硫簇在线粒体中的组装涉及三个过程

以酵母为例,下面详细阐述真核系统中铁硫簇是如何在线粒体中组装并传递给靶蛋白、线粒体中铁硫簇是如何转运到细胞质中以及细胞质和细胞核中铁硫蛋白是如何成熟的。真核细胞线粒体中铁硫簇组装机制与大肠杆菌中ISC系统中铁硫簇组装机制高度类似,目前已知ISC组装系统由十个以上已知蛋白质构成。从功能上可以把铁硫簇生

物合成过程分为三步(图1)。首先, 在高度保守的支架蛋白(iron-sulfur cluster assembly protein 1, Isu1)(人类中为ISCU1)上合成[2Fe-2S]簇, Isu1为铁硫簇的形成提供组装平台及转运结合位点; 其次, Hsp70分子伴侣系统与Isu1结合并促进铁硫簇的释放及转运, 参与前两步的蛋白质构成ISC组装系统的核心成分并影响线粒体外铁硫蛋白的合成; 第三步是在ISC靶向组装因子的协助下, 铁硫簇与线粒体内未成熟铁硫蛋白的氨基酸残基结合整合到多肽链中, 使铁硫簇特异性定位到不同的铁硫蛋白中。铁硫簇组装的三步反应过程叙述如下。

2.1.1 在线粒体Isu1蛋白上从头合成[2Fe-2S]簇 在线粒体支架蛋白Isu1上组装[2Fe-2S]是ISC系统铁硫簇组装的起始, 有六个蛋白参与这个反应。其中, 半胱氨酸脱硫酶Nfs1-Isd11(人体中为NFS1-ISD11)复合体催化半胱氨酸脱硫形成丙氨酸及过硫化物中间体, 为Isu1支架蛋白上铁硫簇的组装提供硫; Yfh1(人体中为frataxin)可调节半胱氨酸脱硫酶活性; Yah1(人体中为ferredoxin)及Arh1(人体中为ferredoxin reductase)主要是为铁硫簇组装提供电子使Nfs1或Isu1上过硫化物硫(S^0)还原为铁硫簇上的硫(S^{2-})^[14]。在半胱氨酸脱硫酶复合体中, Isd11主要

起稳定复合体的作用^[15], 真正发挥催化功能的主要是Nfs1。细菌中, 与Nfs1同源的蛋白质有NifS、IscS及SufS。它们都能脱下半胱氨酸中的硫并以过硫化物形式结合在自身的半胱氨酸残基上。为避免过量硫化物对细胞产生毒性, Nfs1-Isd11上形成的过硫化物中间体会转运给Isu1进行铁硫簇组装。从形式上看, 铁硫簇组装必须将Nfs1或Isu1上过硫化物硫 S^0 还原为硫 S^{2-} , 现有研究多认为, 电子传递链Yah1及Arh1能将NAD(P)H中电子转移传递给 S^0 , 使其还原。Yah1蛋白是[2Fe-2S]结合蛋白, 在传递电子时, 电子更倾向于将它自身结合的[2Fe-2S]还原, 从而导致电子传递中断, 但已有研究证实, 参与电子传递的Yah1蛋白均处于还原状态, 从而可以顺利将电子传递给 S^0 。目前还不确定Yfh1蛋白的功能, Schmucker等^[16]认为, 它是Nfs1脱硫酶活性调节剂, 因为在实验中观察到它与Nfs1-Isd11复合体紧密结合, 且能显著提高Nfs1的活性, 所以认为Yfh1是铁硫簇形成起始步骤的变构调节蛋白。在Isu1上组装铁硫簇的铁主要由Mrs3/4转运进线粒体, 但是线粒体中的铁是如何组装到Isu1上还不清楚, 现有研究认为Isa^[17]或Yfh1都可作为潜在的铁供体, 但具体机制仍有待研究。

2.1.2 在伴侣蛋白介导下[2Fe-2S]簇从Isu1上释放

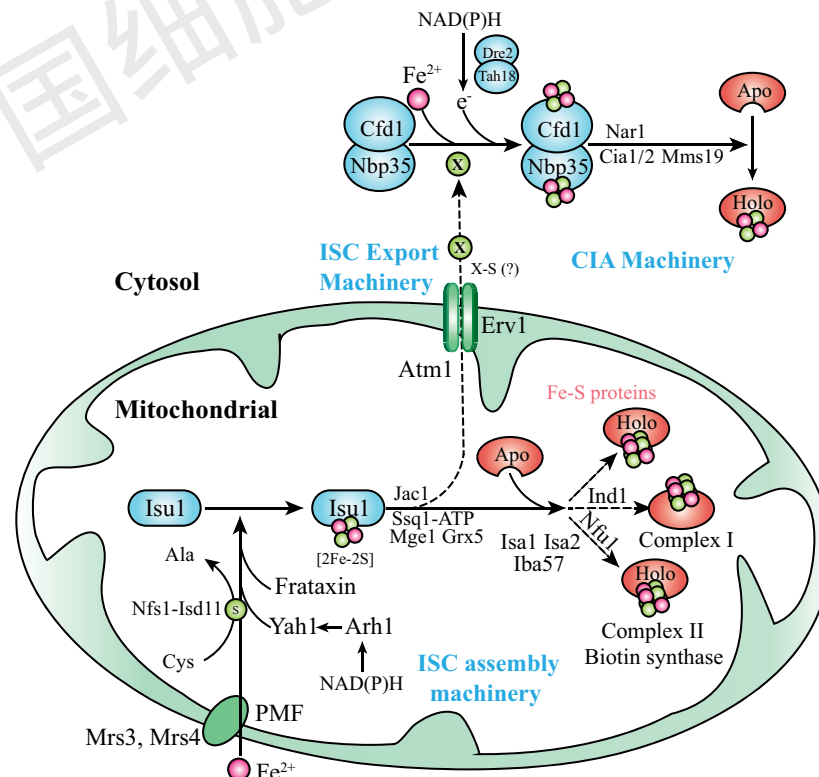


图1 真核细胞中铁硫簇组装机制

Fig.1 Mechanisms of Iron-sulfur clusters assemble in eukaryotic cells

线粒体内铁硫簇生物合成的第二步反应包括Isu1上合成铁硫簇的释放及其与转运蛋白的结合。铁硫簇从Isu1上释放需要Hsp70分子伴侣系统的介导。该系统主要由三个蛋白质组成,包括Jac1(the DnaJ-like cochaperone)、Ssq1(Hsp70 ATPase)及核苷酸交换因子Mge1(nucleotide exchange factor)^[18], Hsp70分子伴侣系统介导铁硫簇释放的分子机制与Hsp70在蛋白质折叠中发挥的作用类似^[19]。首先, Jac1通过C-端J型结构域与holo-Isu1特异性结合形成复合体^[20],该复合体能通过其多肽结构域与Isu1上保守的LPPVK环结合并募集Ssq1蛋白。Ssq1蛋白的结合会伴随ATP水解,使Isu1构象改变, Jac1被释放, Isu1与[2Fe-2S]的结合变疏松而与Ssq1结合变紧密^[21]。然后,铁硫簇从Isu1上释放还需要单巯基谷氧还蛋白5(monothiol glutaredoxin 5, Grx5)的参与, Grx5能与ADP-Ssq1蛋白Isu1结合域临近的多肽位点结合,形成在空间上高度接近的Isu1-Ssq1-Grx5复合体,从而有助于将[2Fe-2S]簇转移给Grx5^[22],随着最后一个伴侣蛋白核苷酸交换因子Mge1的加入,ATP的水解,所有组装因子包括转带有[2Fe-2S]的Grx5全部都解聚开,[2Fe-2S]顺利地由Isu1传递给Grx5,为线粒体内[2Fe-2S]型铁硫蛋白提供铁硫簇。分子伴侣系统的正常运作有利于Isu1及Ssq1参与下一循环中铁硫簇的合成及转运。

2.1.3 线粒体中组装成熟的铁硫簇特异性地定位到不同铁硫蛋白中 线粒体内铁硫蛋白生物合成第三步是铁硫簇通过亚铁离子与特异氨基酸配体结合而整合到目的蛋白多肽链中形成铁硫蛋白。随着在Isu1上组装成熟的[2Fe-2S]簇转移给Grx5,线粒体中所有[2Fe-2S]型铁硫蛋白都有了铁硫簇的来源。但是将[2Fe-2S]簇转变成[4Fe-4S]型铁硫簇仍需Isa1/2(iron-sulfur cluster assembly 1/2)及Iba57(iron-sulfur cluster assembly factor for biotin synthase and aconitase like mitochondrial proteins with a mass of 57 kDa)蛋白质的参与^[23-24]。可见,参与[2Fe-2S]型铁硫簇组装的ISC核心组装蛋白功能缺陷会抑制细胞内所有铁硫蛋白的成熟,而Isa1/2及Iba57蛋白功能缺陷只影响线粒体中如顺乌头酸酶、硫辛酸合酶等[4Fe-4S]型铁硫蛋白的成熟^[25],并不影响铁氧还蛋白Yah1、Rieske等[2Fe-2S]型铁硫蛋白的成熟^[23]。一些课题组发现,Isa1、Isa2和Iba57三个辅因子间相互作用,任何一个编码蛋白质的基因缺失都可导致相

似的表型,说明它们参与同一反应过程^[23-24,26]。但是它们是如何将Isu1上产生的[2Fe-2S]簇转变为[4Fe-4S]簇,[4Fe-4S]簇在生成的过程中,它们又是如何相互作用的仍有待进一步研究。

随着[4Fe-4S]簇的生成,线粒体中特异的ISC组装因子可将[4Fe-4S]簇靶向定位到不同的铁硫蛋白中。这些靶向组装因子与ISC核心组装成分不同,它们只参与铁硫簇定位,促进铁硫蛋白亚基成熟,对铁硫簇组装的其他过程作用不大。有些组装因子还具有重叠底物特异性,所以当某个组装因子缺失时表型相对不明显。例如,P-loop核苷水解酶Ind1参与呼吸链复合体I的成熟^[27],到目前为止,只发现Ind1这一个靶蛋白,它与CIA(cytosolic Fe-S protein assembly)蛋白Cfd1和Nbp35具有近源性,功能上相似,可以短暂性结合[4Fe-4S]簇并将其呈递给复合体I的铁硫蛋白亚基。与Ind1类似,ISC组装因子Nfu1也可结合一个[4Fe-4S]簇,并将其转运给靶蛋白^[28]。Nfu1靶蛋白种类较多包括呼吸链复合体I、复合体II及硫辛酸合酶^[29],但Nfu1不参与顺乌头酸酶的成熟^[28,30]。有趣的是,Nfu1的靶蛋白特异性是从其基因突变的病人生化表型上发现的,病人表现为复合体I/II缺陷、硫辛酸合酶活性降低,导致硫辛酸依赖的酶:丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)、 α -酮戊二酸脱氢酶(α -ketoglutarate dehydrogenase, α -KGDH)、支链酮酸脱氢酶(branched-chain keto acid dehydrogenase, BCKDH)及甘氨酸裂解系统H蛋白(H protein of the glycine cleavage system)活性下降^[30]。这说明,对于这些线粒体[4Fe-4S]型铁硫蛋白的合成,Nfu1是作为特异的靶向组装因子发挥作用的。同时,Nfu1传递[4Fe-4S]簇的特异性在酵母细胞中也得到证实,这表明,Nfu1的生物功能在真核生物中高度保守^[28]。

2.2 细胞质中铁硫簇的组装依赖于铁硫簇转运系统

ISC组装系统是线粒体外铁硫蛋白成熟必不可少的一部分,其功能的重要性依赖于各组分的完整及正确定位,但线粒体内铁硫簇组装系统是如何辅助线粒体外铁硫簇的组装及通过何种方式参与这个过程,这就需要另一个系统即铁硫簇输出系统(ISC export machinery)^[31]的介导,研究表明,该系统可能由三个转运蛋白质[Atm1、GSH(glutathione)及Erv1]组成。Atm1是ABC转运体,位于线粒体内膜,其ABC结构域朝向线粒体基质,是转运系统的核心成分,直接参与线粒体内物质的输出^[32]。Atm1的功能

缺失可导致多种异常现象包括生长缺陷、细胞色素缺失、呼吸异常及线粒体内铁累积等。Kuhnke等^[33]在体外纯化线粒体膜蛋白Atm1并对其进行功能重建,发现Atm1的ATP酶活性可以被包含游离巯基的复合物激活,尤其是被具有多个半胱氨酸残基的多肽激活,因此,可以推测Atm1向胞质转运的物质是一类含有自由巯基的肽类物质。Erv1是线粒体跨膜蛋白,在体外可催化巯基形成过硫化物^[34],在体内还不明确其具体的电子受体,但已知Erv1能参与含巯基类物质的氧化反应。Erv1蛋白缺失有类似Atm1缺失的表型,提示它参与线粒体外铁硫蛋白成熟及线粒体内铁代谢^[35]。此外,Erv1可与Mia40蛋白结合形成二硫化物,共同参与线粒体膜蛋白的定位。谷胱甘肽(GSH)是细胞内重要的氧化还原调节剂,Sipos等^[36]在GSH基因敲除的细胞模型中发现,只有添加二硫苏糖醇的细胞才能维持细胞内正常的氧化还原状态,并且在GSH缺失的细胞模型中,细胞质及细胞核内铁硫蛋白的成熟明显受阻,而线粒体内铁硫蛋白的成熟则不受影响,从而与Atm1和Erv1缺失的细胞表型一致。由此可见,GSH对细胞质内铁硫簇的组装也具有重要作用。虽然已发现Atm1、GSH及Erv1三个蛋白参与了线粒体铁硫簇的转运,但是对于铁硫簇转运蛋白是如何将铁硫簇转运到胞质以及转运到细胞质的是何种中间产物仍需进一步研究。

2.3 细胞质中铁硫簇组装机制

细胞质内铁硫簇的组装需要依赖转运系统将线粒体中合成的含硫复合物转运至细胞质中,并与细胞质中的亚铁离子在细胞质铁硫簇组装系统(the cytosolic Fe-S protein assembly machinery, CIA assembly machinery)的介导下组装成铁硫簇,最后组装成熟的铁硫簇再定位到各种未成熟的铁硫蛋白中(图1)。到目前为止,已发现八种蛋白质参与细胞质铁硫簇的组装,这些蛋白质包括Cfd1、Nbp35、Nar1、Tah18、Dre2、Cia1/2和Mms19。其中,Cfd1是一种P-loop核苷水解酶^[37],含有ATP/GTP酶结构域及四个保守性半胱氨酸伸展区,其中两个保守性半胱氨酸伸展区对Cfd1功能的发挥有重要作用。Cfd1基因突变可致胞质及核内铁硫蛋白功能异常,但对线粒体内铁硫蛋白无明显影响^[37]。Nbp35是另一种P-loop核苷水解酶,蛋白质序列中央及C-端与Cfd1相似^[38],在N-端五十个氨基酸残基以内可通过四个半胱氨酸残基耦合一个铁硫簇,去除其N-端或突

掉半胱氨酸残基可致Nbp35蛋白与铁硫簇结合障碍^[38]。Nbp35可与Cfd1结合形成四聚体复合物,该复合物可能是铁硫簇组装的主要功能形式。在ISC组装及转运系统协助下合成铁硫簇并通过其P-loop区与[4Fe-4S]簇短暂性结合,而电子传递链NADPH-Tah18-Dre2对于维持Cfd1-Nbp35复合体上铁硫簇的稳定性具有重要的作用。所以有观点认为,Cfd1-Nbp35复合体是胞质内铁硫簇组装的支架蛋白。但具体组装过程及分子机制仍不清。对于铁硫簇在Cfd1-Nbp35上组装后是如何转移给Apo蛋白的,目前认为,CIA蛋白Nar1与Nbp35相互作用可参与铁硫簇的转移^[39]。Nar1可以结合两个[4Fe-4S]簇^[40],它既是一个靶蛋白也是CIA机制的组成部分。Nar1上的铁硫簇组装不但依赖于线粒体ISC组装及输出系统,同时还需要Cfd1和Nbp35协助^[38]。很明显,对于CIA组装系统中的铁硫蛋白组分Nar1及Nbp35,其从头合成必然需要前期存在的铁硫簇组装系统,这种“鸡和蛋”的循环生物合成现象也出现在线粒体组装蛋白Yah1的组装过程中。由于CIA组装系统后期铁硫簇特异性的定位到不同的铁硫蛋白中不需要Nar1的参与,所以认为Nar1是CIA系统生物合成过程早期及后期作用的过渡体。近期发现的CIA组分Cia1、Cia2和Mms19可形成CIA靶向复合体,其中Cia1与Nar1特异性对接,这些蛋白既参与铁硫簇转运也参与铁硫簇靶向定位从而与大量多肽链整合^[41-44]。反应涉及CIA靶向复合体与Apo铁硫蛋白直接的物理作用。Cia1最初在裂殖酵母菌融合蛋白中被发现,在酵母中,Cia1缺失的表型与Cfd1、Nbp35和Nar1缺失表型不同,Cia1只影响终末目标铁硫蛋白(如Leu1、Rli1和Ntg2)的合成,对CIA组装系统中铁硫蛋白组分(如Nbp35和Nar1)无影响。由此可知,在CIA组装系统中,Cia1是在Nbp35和Nar1之后发挥作用。除了以上蛋白质外,胞质内谷氧还蛋白Grx3-Grx4对胞质及核内铁硫蛋白的合成也很重要^[45],它并非典型的CIA组装蛋白且作用广泛涉及胞内的铁代谢调节。目前,我们只能初步推测出线粒体外铁硫簇的组装机制,要深入了解还需大量的体内外实验验证各个CIA组装成分的具体功能及相互间的作用关系。

3 线粒体铁硫簇组装在生命体中的重要地位

酵母中的研究表明,一半以上的ISC组装蛋白

和几乎所有的CIA组装蛋白对酵母的存活都至关重要。但是,即使是对酵母生长影响不大的铁硫簇组装蛋白,其在人体中的同源蛋白质(例如NFU1^[28])功能受损后都会对人体健康产生严重的影响。因此,线粒体中铁硫簇的组装功能使得线粒体成为细胞中必不可少的一类细胞器。线粒体同时也是细胞中ATP产生的重要场所,它还具有脂肪酸氧化、三羧酸循环等重要功能,但是失去三羧酸循环和氧化磷酸化功能的细胞依旧能利用糖酵解产生能量(如Rho0细胞)^[46],而线粒体失去铁硫簇组装功能后,会影响细胞内所有的铁硫蛋白酶,例如胞质中核糖体组装蛋白Ril1^[47]、DNA修复过程中的解旋酶XPD^[48]、DNA复制过程中的引物酶Pri2^[49]及决定端粒长度的RTEL1^[43]等,它们将影响细胞的基因表达、蛋白质合成和基因组的稳态,从而导致细胞的死亡。此外,通过基因组测序及生物信息学分析发现,微孢子虫(microsporidia)、双滴虫(diplomonads)和变形虫(amoebzoa)等生物体中并没有线粒体的

存在^[50],取而代之的是另一种双层膜结构的纺锤剩体(mitosomes)或氢体(hydrogenosomes),纺锤剩体已经失去了线粒体几乎所有的经典功能,包括氧化磷酸化、三羧酸循环和血红素合成等,唯独还剩下铁硫簇的组装及转运功能,它承担起整个细胞铁硫簇组装及转运目的蛋白的功能。这从另一方面说明了相比线粒体的其他经典功能,线粒体铁硫簇组装更为重要。

4 细胞内铁硫簇组装障碍引起的铁硫蛋白病

铁硫簇组装从低等生物如大肠杆菌到人类都高度保守,目前的研究表明,它们的功能对于生命体的生长代谢至关重要。在人体发育过程中,ISC系统中任何组装蛋白功能缺失都会导致胚胎的死亡^[51]。到目前为止,已知有十几种与铁硫簇组装蛋白基因突变相关的遗传性疾病,这些基因包括: *FXN*、*ISCU*、*FDX2*、*LYRM4*、*GLRX5*、*IBA57*、*NFU1*、*BOLA3*、

表1 铁硫簇组装蛋白功能缺陷导致的相关疾病

Table 1 Diseases linked to defects in iron-sulfur clusters assemble protein

疾病 Diseases	影响的基因 Affected gene	参考文献 References
1 Fe/S diseases associated with mitochondrial iron accumulation		
1.1 Friedreich's ataxia (FRDA)	<i>FXN</i> (Frataxin)	[54]
1.2 Hereditary myopathy with lactic acidosis (HML)	<i>ISCU</i>	[55]
1.3 Mitochondrial muscle myopathy with deficiency of ferredoxin 2	<i>FDX1L</i> (Ferredoxin 2)	[56]
1.4 Combined oxidative phosphorylation defect with ISD11 deficiency	<i>LYRM4</i> (<i>ISD11</i>)	[57]
1.5 Sideroblastic anemias		
1.5.1 Inherited sideroblastic anemias		
1.5.1.1 Sideroblastic anemia with deficiency of glutaredoxin 5	<i>GLRX5</i>	[58]
1.5.1.2 X-linked sideroblastic anemia with cerebellar ataxia (XLSA/A)	<i>ABCB7</i>	[59]
1.5.2 Acquired sideroblastic anemias		
1.5.2.1 Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)	<i>ABCB7</i>	[60]
1.5.2.2 Refractory anemia with ring sideroblasts and isodicentric (X)(q13) chromosome	<i>ABCB7</i>	[61]
2 Fe-S diseases without mitochondrial iron accumulation		
2.1 Multiple mitochondrial dysfunction syndromes		
2.1.1 Juvenile encephalomyopathy with deficiency of IBA57 (MMDS3)	<i>IBA57</i>	[62]
2.1.2 Multiple mitochondrial dysfunction syndrome with functional NFU1 deficiency (MMDS1)	<i>NFU1</i>	[30]
2.1.3 Multiple mitochondrial dysfunction syndrome with functional BOLA3 deficiency (MMDS2)	<i>BOLA3</i>	[63]
2.2 Mitochondrial encephalomyopathy with deficiency of INDI	<i>NUBPL</i> (<i>IND1</i>)	[64]
2.3 Infantile neurodegenerative	<i>ISCA2</i>	[65]
3 Variant erythropoietic protoporphyria with abnormal expression of mitoferrin 1	<i>SLC25A37</i> (Mitoferrin 1, <i>MFRN1</i>)	[66]

IND1、*ABC7*等, 相关的铁硫蛋白病见表1。这些遗传性疾病中很大一部分发病早, 多数发生在幼年时期, 并且都是致命的, 这一点也反映了铁硫簇的正确组装在机体中是不可或缺的。通过在模式生物中研究铁硫簇的组装及转运机制可为人类铁硫蛋白病的发现及认识奠定坚实的理论基础, 例如早在人们发现*ISCU*、*GLRX5*和*IND1*基因突变的患者前, 就已经认识了这些蛋白质的具体功能, 从而临床能较容易地发现这类铁硫蛋白病患者的突变位点及解释其代谢改变^[52]。同时, 在铁硫簇组装蛋白基因敲除的酵母、斑马鱼中的研究结果最后也在相关基因突变的患者中得到了验证^[6], 这也充分证实了铁硫簇组装机制的正确性。目前, 对铁硫蛋白病进行分类多根据其是否造成线粒体铁的累积来进行。线粒体中血红素及铁硫簇的合成是细胞内消耗铁的主要过程, 并且铁硫簇的组装又调节着细胞内铁的平衡, 所以线粒体中铁硫簇组装及转运相关蛋白功能异常后都会造成线粒体中铁的累积^[53]。因此, 通过检测线粒体中铁是否累积从而可以大致判断铁硫蛋白病中异常的蛋白质是铁硫簇核心组装成分还是胞质组装蛋白。

4.1 Friedreich共济失调

目前研究最多的铁硫蛋白病就是Friedreich共济失调(Friedreich's ataxia, FRDA), 现认为该疾病是ISC系统中*FXN*基因第一个外显子中GAA重复序列过度扩增所致^[67]。患者出现神经及心肌的退行性病变, 同时多伴有耳聋和失明。铁硫簇组装蛋白frataxin在铁硫簇合成的早期发挥重要功能, 它的功能异常, 导致FRDA患者线粒体和胞质中铁硫蛋白不能转变为成熟形式, 从而影响细胞中许多生命活动。例如, 线粒体内呼吸链复合体I-III及顺乌头酸酶(aconitase)活性降低, 氧化磷酸化减弱, 细胞能量产生减少^[68]; 细胞核中DNA复制及修复的引物酶Pri2和解旋酶XPB活性降低^[54], 导致患者血液中游离DNA增加、细胞中DNA损伤不能及时修复^[69]; 细胞质中aconitase失去铁硫簇转变为IRP1, 导致线粒体中铁累积, 过量的铁因为ROS生成增加又可以进一步破坏铁硫簇的结构, 使疾病恶化^[70]。因此, FRDA患者全身多器官中铁硫蛋白功能受损, 影响众多代谢过程, 使得FRDA成为一种严重的全身性疾病。

4.2 乳酸酸中毒性遗传性肌病

乳酸酸中毒性遗传性肌病(hereditary myopathy

with lactic acidosis, HML)是一种罕见的常染色体隐性遗传性疾病, 患者多以肌无力发病, 随着病情的发展, 患者出现运动量不耐受、乳酸酸中毒等症状^[71], 说明细胞内氧化磷酸化功能严重缺陷, 此外患者还多因横纹肌溶解出现肌红蛋白尿。两项独立的研究都发现, 在HML患者中*ISCU*基因的5号外显子中有单一碱基的G>C的突变, 使得*ISCU*基因mRNA剪接异常^[52], 骨骼肌细胞中*ISCU*蛋白水平显著降低, 受其影响, 患者骨骼肌细胞中铁硫簇的组装受到抑制, 导致线粒体呼吸链I-III活性降低, 氧耗减少, 糖酵解增强, 细胞质中aconitase失去铁硫簇转变成IRP1。但是, HML患者病变组织仅局限在骨骼肌组织, 可能与骨骼肌中特异性转录因子表达有关^[72]。在骨骼肌细胞中, frataxin蛋白水平却升高^[72], 说明机体在铁硫簇组装障碍时会启动一些代偿机制。

4.3 ISD11缺失的氧化磷酸化缺陷

通过对两例ISD11缺失的氧化磷酸化缺陷患者(combined oxidative phosphorylation defect with ISD11 deficiency)外显子测序发现编码ISD11蛋白的基因*LYRM4*发生了错义突变, 使得肽链中68位氨基酸由精氨酸突变为亮氨酸^[73], 导致ISD11蛋白水平在骨骼肌、平滑肌及肝脏细胞中明显降低。酵母中的研究证明68位的精氨酸对于其维持半胱氨酸脱硫酶稳定性至关重要。患者因ISD11蛋白功能缺失, 线粒体呼吸链复合体活性显著降低, 氧耗减少, 出现严重的乳酸酸中毒及呼吸窘迫症状。更严重的患者血中酮体增加, 说明因为铁硫蛋白硫辛酸合酶活性的降低导致丙酮酸脱氢酶及 α -酮戊二酸脱氢酶缺乏辅基而活性减弱。令人惊奇的是, 有一个*LYRM4*基因突变患者在幼年发病的危机中存活下来, 并且发育良好^[57]。对ISD11基因*LYRM4*的表达情况进行分析发现, 其主要在幼年时期表达并发挥功能, 在青年期达到高峰并随后逐渐下降^[74]。所以, ISD11突变对成年人的影响较小。然而, Jablensky等^[74-75]的研究发现, 在成年人中*LYRM4*基因表达降低可能会导致一些精神性疾病如精神分裂症等。

4.4 铁粒幼细胞性贫血

铁粒幼细胞性贫血(sideroblastic anemias, SAs)是一类遗传或获得性线粒体内铁代谢紊乱导致的疾病。病人血红素生成障碍表现为红细胞内血红蛋白不足, 骨髓红系造血细胞线粒体内铁沉积并绕核成环状表型, 因此称为环形铁粒幼细胞^[76]。到目前为

止发现两种先天性SAs, 一种是由于ISC组装核心蛋白*GLRX5*基因1号外显子最后一个密码子突变, 蛋白表达异常所致^[77]。尽管*GLRX5*在多种细胞中均有表达, 但在红细胞中表达量最高, 说明该疾病具有一定的组织特异性, 临床表现为贫血、肝脾肿大、2型糖尿病及肝硬化。但有些患者*GLRX5*基因突变后也可不表现为贫血^[6]。另一种铁粒幼细胞性贫血是由于线粒体铁硫簇转运蛋白*ABCB7*基因发生错义突变, 胞质中铁硫蛋白合成受阻所致^[59]。*ABCB7*在全身多种组织中都有表达, 其中在红细胞及周围神经系统中表达量较高。这类患者临床表现为早发性脊髓小脑综合征, 小脑出现萎缩及运动障碍, 低色素性小细胞性贫血及组织内铁超载。*ABCB7*也与骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)获得性SAs有关^[59]。在血红素合成过程中, [2Fe-2S]依赖的亚铁螯合酶催化亚铁离子嵌入到原卟啉IX中形成血红素, 该反应是血红素合成最后的关键一步。*ALAS2*(the erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase 2)催化甘氨酸和琥珀酰辅酶A的结合, 生成5-氨基酮戊酸, 是血红素合成的限速酶。*ALAS2*基因定位于X染色体, 其mRNA 5'端有铁反应元件IRE(iron-responsive element), 受IRP的调节。亚铁螯合酶及*ALAS2*的功能需要正常铁硫簇组装及铁稳态来维持, 线粒体铁硫簇组装及转运系统功能异常可导致包括亚铁螯合酶在内的铁硫蛋白酶功能失常, IRP1被激活, *ALAS2*表达受到抑制, 线粒体中铁不能合成血红素而在线粒体中积累。但仅凭铁代谢紊乱不足以解释SAs病人所有表型, *FRDA*和*HML*患者也可致线粒体内铁聚集, 且在*FRDA*中铁调节蛋白IRP1/2都可干扰*ALAS2*基因表达, 但都没有发展为SAs。所以, 可能是在特定组织如造血干细胞中发生特定的铁硫簇组装蛋白功能缺陷才会导致SAs的发生^[77], 但其分子机制还需进一步研究。

4.5 多发性线粒体功能障碍综合征

多发性线粒体功能障碍综合征(multiple mitochondrial dysfunctions syndrome, MMDS)是由*IBA57*、*NFU1*和*BOLA3*基因突变、线粒体代谢通路及能量产生异常而引起的一类多功能障碍综合性疾病^[30]。临床表现为, 肌张力减退、呼吸功能不足、脑病、脑畸形及神经退行性变; 生化检测发现, 患者多伴代谢性酸中毒、高甘氨酸血症及酮症酸中毒; 患者骨骼肌细胞中呼吸链复合体I-IV活性降

低, 硫辛酸依赖的酶: 丙酮酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、支链酮酸脱氢酶及甘氨酸裂解系统H蛋白减少^[28]。通过*IBA57*和*NFU1*基因突变的组织细胞模型研究发现, 线粒体内[4Fe-4S]型铁硫蛋白(如呼吸链复合体I/II)成熟受到抑制, 而[2Fe-2S]型及线粒体外铁硫蛋白能发挥正常的功能, 这与早期在酵母及Hela细胞中用RNA干扰*IBA57*和*NFU1*基因的研究结果一致^[28,78]。证明*IBA57*和*NFU1*蛋白是线粒体铁硫簇组装过程中的靶向组装因子, 当功能性*NFU1*和*BOLA3*的表达量减少时, [4Fe-4S]型铁硫簇特异性的靶向定位功能受到明显影响, 细胞呼吸链复合体I中的铁硫蛋白亚基*NDUFS1*和*NDUFV1*^[27], 复合体II中的铁硫蛋白亚基*SDHA*及复合体III中的铁硫蛋白亚基*UQCRC1*的蛋白水平显著下降^[79]。此外, *MMDS*累及的[4Fe-4S]型铁硫蛋白如电子转移黄素蛋白脱氢酶(electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase, ETFDH)、硫辛酸合酶(lipoic acid synthase, *LIAS*)也参与了脂代谢^[80], 其中*LIAS*是疾病发生发展的主要影响因素, 使得细胞内硫辛酸含量显著降低, 影响了硫辛酸依赖性代谢酶的正常成熟。

5 展望

在真核细胞内, 铁硫簇组装及定位到不同的铁硫蛋白是一个复杂且受精密调控的过程。细胞中成熟的铁硫蛋白参与了细胞中各种生命活动, 如物质代谢、能量产生、DNA复制及修复、基因转录及翻译等等。所以, 铁硫簇组装任何一个环节出现问题都会严重影响细胞正常的生命活动。而线粒体作为铁硫簇组装最重要的场所, 不但调节着整个细胞铁硫簇的水平, 而且还维持着细胞内铁的稳态, 使其成为细胞中不可或缺的一类细胞器。随着铁硫簇组装机制不断被阐明, 越来越多的铁硫蛋白病也被发现。通过对铁硫簇组装机制的深入了解, 临床上能较容易地发现这类铁硫蛋白病患者的突变位点并解释其代谢改变。未来的研究主要是通过更有效的细胞生物学技术进一步深入探讨每个组装蛋白的详细信息, 并解析出这些组装元件的晶体结构, 从而更清晰地阐述铁硫簇的组装过程。此外, 虽然目前的研究已经发现了大部分铁硫簇组装蛋白, 但是铁硫簇组装是一个复杂的过程, 细胞中肯定还存在着未知的组装蛋白在等待研究者的发现。

参考文献 (References)

- 1 Lill R, Srinivasan V, Muhlenhoff U. The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Curr Opin Microbiol* 2014; 22: 111-9.
- 2 Peters JW, Broderick JB. Emerging paradigms for complex iron-sulfur cofactor assembly and insertion. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 429-50.
- 3 Lanz ND, Booker SJ. Identification and function of auxiliary iron-sulfur clusters in radical SAM enzymes. *BBA-Proteins Proteomics* 2012; 1824(11): 1196-212.
- 4 Malkin R, Rabinowitz JC. The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 23(6): 822-7.
- 5 Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* 2005: 247-81.
- 6 Camaschella C, Campanella A, de Falco L, Boschetto L, Merlini R, Silvestri L, *et al.* The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 2007; 110(4): 1353-8.
- 7 Sheftel A, Stehling O, Lill R. Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21(5): 302-14.
- 8 Meyer J. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J Biol Inorg Chem* 2008; 13(2): 157-70.
- 9 Booker SJ, Cicchillo RM, Grove TL. Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr Opin Chem Biol* 2007; 11(5): 543-52.
- 10 Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 755-76.
- 11 Volz K. The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol* 2008; 18(1): 106-11.
- 12 Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *BBA-Mol Cell Res* 2012; 1823(9): 1468-83.
- 13 Thompson JW, Bruick RK. Protein degradation and iron homeostasis. *BBA-Mol Cell Res* 2012; 1823(9): 1484-90.
- 14 Sheftel AD, Stehling O, Pierik A J, Elsässer HP, Muehlenhoff U, Weber H, *et al.* Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(26): 11775-80.
- 15 Terali K, Bevil RL, Pickersgill RW, van der Giezen M. The effect of the adaptor protein Isd11 on the quaternary structure of the eukaryotic cysteine desulphurase Nfs1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440(2): 235-40.
- 16 Schmucker S, Martelli A, Colin F, Page A, Wattenhofer-Donze M, Reutenauer L, *et al.* Mammalian frataxin: An essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* 2011; 6(1): e16199.
- 17 Lu J, Bitoun J P, Tan G, Wang W, Min W, Ding H. Iron-binding activity of human iron-sulfur cluster assembly protein hIscA1. *Biochem J* 2010; 428: 125-31.
- 18 Dutkiewicz R, Marszalek J, Schillke B, Craig EA, Lill R, Muhlenhoff U. The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p. *J Biol Chem* 2006; 281(12): 7801-8.
- 19 Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(8): 579-92.
- 20 Ciesielski SJ, Schilke BA, Osipiuk J, Bigelow L, Mulligan R, Majewska J, *et al.* Interaction of J-protein co-chaperone Jac1 with Fe-S scaffold isu is indispensable *in vivo* and conserved in evolution. *J Mol Biol* 2012; 417(1): 1-12.
- 21 Vickery LE, Cupp-Vickery JR. Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42(2): 95-111.
- 22 Uzarska MA, Dutkiewicz R, Freibert SA, Lill R, Muehlenhoff U. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol Biol Cell* 2013; 24(12): 1830-41.
- 23 Sheftel AD, Wilbrecht C, Stehling O, Niggemeyer B, Elsaesser HP, Muehlenhoff U, *et al.* The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for 4Fe-4S protein maturation. *Mol Biol Cell* 2012; 23(7): 1157-66.
- 24 Muehlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R. Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial 4Fe-4S proteins. *J Biol Chem* 2011; 286(48): 41205-16.
- 25 Tan G, Lu J, Bitoun JP, Huang H, Ding H. IscA/SufA paralogues are required for the 4Fe-4S cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions. *Biochem J* 2009; 420: 463-72.
- 26 Waller JC, Alvarez S, Naponelli V, Lara-Nunez A, Blaby IK, Da Silva V, *et al.* A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(23): 10412-7.
- 27 Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJ, Kerscher S, Elsaesser HP, *et al.* Human Ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol Cell Biol* 2009; 29(22): 6059-73.
- 28 Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Antonio Arranz J, del Toro M, *et al.* 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* 2011; 89(5): 656-67.
- 29 Tong WH, Jameson GN, Huynh BH, Rouault T A. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(17): 9762-7.
- 30 Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V, Mackay N, Rouault TA, Tong WH, *et al.* 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* 2011; 89(4): 486-95.
- 31 Balk J, Lill R. The cell's cookbook for iron-sulfur clusters: Recipes for fool's gold? *Chembiochem* 2004; 5(8): 1044-9.
- 32 Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 1999; 18(14): 3981-9.
- 33 Kuhnke G, Neumann K, Muehlenhoff U, Lill R. Stimulation of the ATPase activity of the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1p by thiol compounds. *Mol Membr Biol* 2006; 23(2): 173-84.
- 34 Lee JE, Hofhaus G, Lisowsky T. Erv1p from *Saccharomyces*

- cerevisiae is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett* 2000; 477(1): 62-6.
- 35 Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Mühlenhoff U, Kispal G, Lill R. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* 2001; 2(8): 715-20.
- 36 Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, Kispal G. Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* 2002; 277(30): 26944-9.
- 37 Roy A, Solodovnikova N, Nicholson T, Antholine W, Walden WE. A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *EMBO J* 2003; 22(18): 4826-35.
- 38 Hausmann A, Netz DJA, Balk J, Pierik A J, Mühlenhoff U, Lill R. The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: An essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(9): 3266-71.
- 39 Song D, Lee FS. A role for IOP1 in mammalian cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 2008; 283(14): 9231-8.
- 40 Urzica E, Pierik AJ, Muehlenhoff U, Lill R. Crucial role of conserved cysteine residues in the assembly of two iron-sulfur clusters on the CIA protein Nar1. *Biochemistry* 2009; 48(22): 4946-58.
- 41 Srinivasan V, Netz DJA, Weibert H, Mascarenhas J, Pierik AJ, Michel H, *et al.* Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure* 2007; 15(10): 1246-57.
- 42 Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, *et al.* Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 2010; 468(7325): 790-5.
- 43 Gari K, Ortiz AM, Borel V, Flynn H, Skehel JM, Boulton SJ. MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science* 2012; 337(6091): 243-5.
- 44 Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, Jonsson ZO, Sharma T, Netz DJA, *et al.* MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* 2012; 337(6091): 195-9.
- 45 Muehlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, *et al.* Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* 2010; 12(4): 373-85.
- 46 Stehling O, Lill R. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2013; 5(8): a011312.
- 47 Becker T, Franckenberg S, Wickles S, Shoemaker CJ, Anger AM, Armache JP, *et al.* Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* 2012; 482(7386): 501-6.
- 48 Liu H, Rudolf J, Johnson K A, McMahon SA, Oke M, Carter L, *et al.* Structure of the DNA repair helicase XPD. *Cell* 2008; 133(5): 801-12.
- 49 Klinge S, Hirst J, Maman JD, Krude T, Pellegrini L. An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(9): 875-7.
- 50 Goldberg AV, Molik S, Tsaousis AD, Neumann K, Kuhnke G, Delbac F, *et al.* Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 2008; 452(7187): 624-8.
- 51 Nordin A, Larsson E, Thornell LE, Holmberg M. Tissue-specific splicing of ISCU results in a skeletal muscle phenotype in myopathy with lactic acidosis, while complete loss of ISCU results in early embryonic death in mice. *Hum Genet* 2011; 129(4): 371-8.
- 52 Olsson A, Lind L, Thornell LE, Holmberg M. Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum Mol Genet* 2008; 17(11): 1666-72.
- 53 Cavadini P, Biasotto G, Poli M, Levi S, Verardi R, Zanella I, *et al.* RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood* 2007; 109(8): 3552-9.
- 54 Thierbach R, Drewes G, Fusser M, Voigt A, Kuhlow D, Blume U, *et al.* The Friedreich's ataxia protein frataxin modulates DNA base excision repair in prokaryotes and mammals. *Biochem J* 2010; 432: 165-72.
- 55 Kollberg G, Tulinius M, Melberg A, Darin N, Andersen O, Holmgren D, *et al.* Clinical manifestation and a new ISCU mutation in iron-sulphur cluster deficiency myopathy. *Brain* 2009; 132: 2170-9.
- 56 Spiegel R, Saada A, Halvardson J, Soiferman D, Shaag A, Edvardson S, *et al.* Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Eur J Hum Genet* 2014; 22(7): 902-6.
- 57 Lim S C, Friemel M, Marum JE, Tucker EJ, Bruno DL, Riley LG, *et al.* Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes. *Hum Mol Genet* 2013; 22(22): 4460-73.
- 58 Baker PR, Friederich MW, Swanson MA, Shaikh T, Bhattacharya K, Schärer GH, *et al.* Variant nonketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5. *Brain* 2014; 137(Pt2): 366-79.
- 59 Boulwood J, Pellagatti A, Nikpour M, Pushkaran B, Fidler C, Cattan H, *et al.* The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts. *PLoS One* 2008; 3(4): e1970.
- 60 Nikpour M, Scharenberg C, Liu A, Conte S, Karimi M, Mortera-Blanco T, *et al.* The transporter ABCB7 is a mediator of the phenotype of acquired refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia* 2013; 27(4): 889-96.
- 61 Paulsson K, Haferlach C, Fonatsch C, Hagemeyer A, Andersen MK, Slovak ML, *et al.* The idic(X)(q13) in myeloid malignancies: Breakpoint clustering in segmental duplications and association with TET2 mutations. *Hum Mol Genet* 2010; 19(8): 1507-14.
- 62 Bolar NA, Vanlander AV, Wilbrecht C, van der Aa N, Smet J, de Paepe B, *et al.* Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy. *Hum Mol Genet* 2013; 22(13): 2590-602.
- 63 Haack TB, Rolinski B, Haberberger B, Zimmermann F, Schum J, Strecker V, *et al.* Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *J Inher Metab Dis* 2013; 36(1): 55-62.
- 64 Tenisch EV, Lebre AS, Grevent D, de Lonlay P, Rio M, Zilbovicius M, *et al.* Massive and exclusive pontocerebellar damage in mitochondrial disease and NUBPL mutations.

- Neurology 2012; 79(4): 391.
- 65 Al-Hassnan ZN, Al-Dosary M, Alfadhel M, Faqeih EA, Alsagob M, Kenana R, *et al.* ISCA2 mutation causes infantile neurodegenerative mitochondrial disorder. *J Med Genet* 2015; 52(3): 186-94.
- 66 Wang Y, Langer NB, Shaw GC, Yang G, Li L, Kaplan J, *et al.* Abnormal mitoferrin-1 expression in patients with erythropoietic protoporphyria. *Exp Hematol* 2011; 39(7): 784-94.
- 67 Martelli A, Napierala M, Puccio H. Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis Model Mech* 2012; 5(2): 165-76.
- 68 Li K, Besse EK, Ha D, Kovtunovych G, Rouault TA. Iron-dependent regulation of frataxin expression: Implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 2008; 17(15): 2265-73.
- 69 Haugen AC, Di Prospero NA, Parker JS, Fannin RD, Chou J, Meyer JN, *et al.* Altered gene expression and DNA damage in peripheral blood cells from Friedreich's ataxia patients: Cellular model of pathology. *PLoS Genet* 2010; 6(1): e1000812.
- 70 Armstrong JS, Khdour O, Hecht SM. Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *Faseb J* 2010; 24(7): 2152-63.
- 71 Drugge U, Holmberg M, Holmgren G, Almay B, Linderholm H. Hereditary myopathy with lactic acidosis, succinate dehydrogenase and aconitase deficiency in northern Sweden: A genealogical study. *J Med Genet* 1995; 32(5): 344-7.
- 72 Crooks DR, Jeong SY, Tong WH, Ghosh MC, Olivier H, Haller RG, *et al.* Tissue specificity of a human mitochondrial disease. *J Biol Chem* 2012; 287(48): 40119-30.
- 73 Thorburn DR. Practical problems in detecting abnormal mitochondrial function and genomes. *Hum Reprod* 2000; 15 (Suppl 2): 57-67.
- 74 Jablensky A, Angelicheva D, Donohoe GJ, Cruickshank M, Azmanov DN, Morris DW, *et al.* Promoter polymorphisms in two overlapping 6p25 genes implicate mitochondrial proteins in cognitive deficit in schizophrenia. *Mol Psychiatr* 2012; 17(12): 1328-39.
- 75 Anglin RE, Garside SL, Tarnopolsky MA, Mazurek MF, Rosebush PI. The psychiatric manifestations of mitochondrial disorders: A case and review of the literature. *J Clin Psychiatry* 2012; 73(4): 506-12.
- 76 Sheftel AD, Richardson DR, Prchal J, Ponka P. Mitochondrial Iron Metabolism and Sideroblastic Anemia. *Acta Haematol* 2009; 122(2/3): 120-33.
- 77 Ye H, Jeong SY, Ghosh MC, Kovtunovych G, Silvestri L, Ortillo D, *et al.* Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J Clin Invest* 2010; 120(5): 1749-61.
- 78 Sheftel AD, Wilbrecht C, Stehling O, Niggemeyer B, Elsasser HP, Muhlenhoff U, *et al.* The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol Biol Cell* 2012; 23(7): 1157-66.
- 79 Stehling O, Wilbrecht C, Lill R. Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 2014; 100: 61-77.
- 80 Rosenbohm A, Süßmuth SD, Kassubek J, Müller HP, Pontes C, Abicht A, *et al.* Novel ETFDH mutation and imaging findings in an adult with glutaric aciduria type II. *Muscle Nerve* 2014; 49(3): 446-50.