Proteinkofaktoren

Funktion und Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen in Eukaryoten

ROLAND LILL
INSTITUT FÜR ZYTOBIOLOGIE UND ZENTRUM FÜR SYNTHETISCHE MIKROBIOLOGIE (SYNMIKRO), UNIVERSITÄT MARBURG

Iron-sulfur (FeS) clusters are versatile protein cofactors that fulfil numerous catalytic and regulatory functions in mitochondria, cytosol, and nucleus. Maturation of FeS proteins requires the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly (ISC) and the cytosolic iron-sulfur protein assembly (CIA) machineries for de novo cluster synthesis on scaffold proteins, cluster trafficking via transfer proteins, and cluster integration into recipient apoproteins. Here, I provide a cursory overview of FeS protein function and maturation.

DOI: 10.1007/s12268-020-1372-8
© Der Autor 2020

Eisen-Schwefel(FeS)-Cluster sind evolutionär alte Proteinkofaktoren, die zahlreiche biochemische Funktionen in der Zelle ausführen, z. B. Elektronentransfer, Katalysen, Schwefelmobilisierung, Genregulation und Proteindomänenstabilisierung. Die häufigsten Clustertypen sind rhombische [2Fe-2S]- und kubische [4Fe-4S]-Cluster. Vor etwa zwei Jahrzehnten wurde entdeckt, dass die Synthese der FeS-Cluster in Zellen nicht spontan erfolgt, sondern durch komplexe, konservierte Synthesemaschinerien bewerkstelligt wird [1, 2]. In eukaryotischen Zellen wie Humanzellen oder Pilzen wurden seither über 30 meist lebenswichtige Biogenesefaktoren in Mitochondrien und dem Cytosol identifiziert, die die mehr als 70 FeS-Proteine im Mitochondrium, Cytosol oder Zellkern mit dem FeS-Kofaktor versorgen (**Abb. 1**). In Algen und Pflanzen finden sich FeS-Proteine auch in Plastiden, die ein eigenes Biogenesesystem beherbergen [3]. In diesem kurzen Überblick sollen zunächst die zahlreichen Funktionen von FeS-Proteinen in Eukaryoten (ohne Plastiden) vorgestellt werden. Im Anschluss werden kursorisch die Komponenten und Hauptschritte der FeS-Proteinbiogenese im Mitochondrium und Cytosol erläutert, die vor allem an Hefe und menschlicher Zellkultur erarbeitet wurden (für tiefer gehende Zusammenfassungen siehe [4–7]).

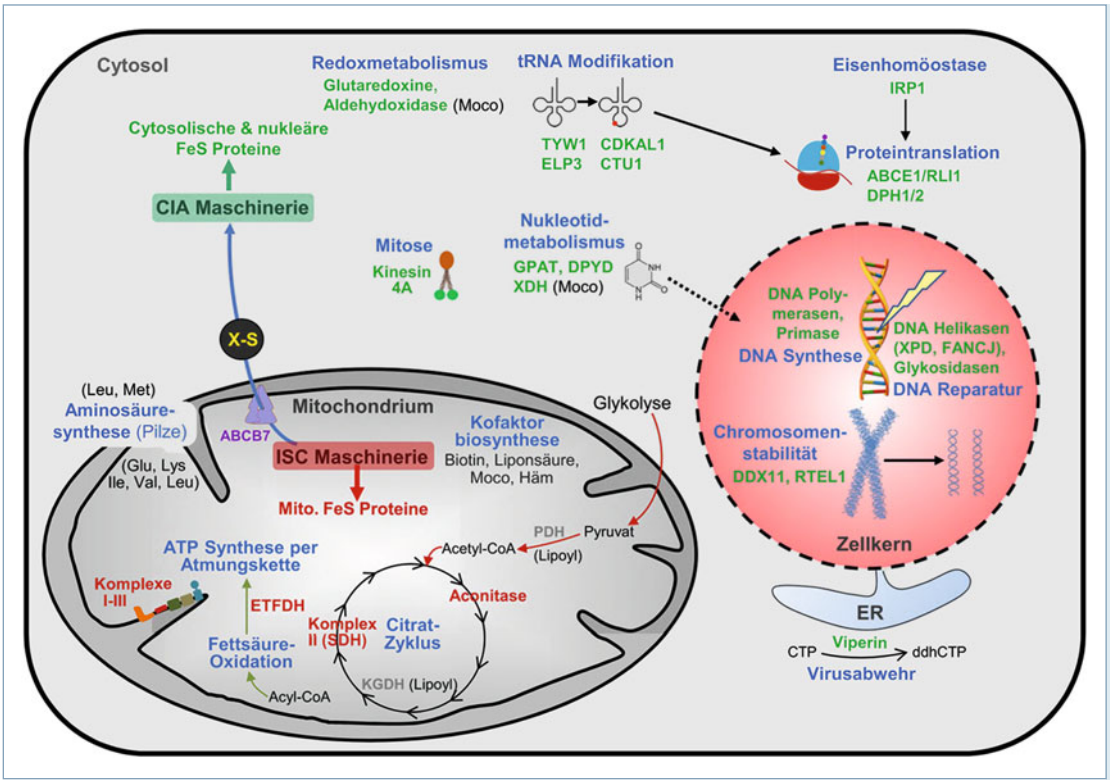


Abb. 1: Lokalisierung und Funktion wichtiger FeS-Proteine in Eukaryoten. Die Assemblierung mitochondrialer (rot) sowie cytosolischer und nukleärer (grün) FeS-Proteine wird von den ISC(*iron-sulfur cluster assembly*)- und CIA(*cytosolic iron-sulfur protein assembly*)-Maschinerien unterstützt. FeS-Proteine sind an vielen biosynthetischen Prozessen (Aminosäure-, Nukleotid- und Kofaktorsynthesen), der Bildung von ATP in den Mitochondrien, der cytosolischen Proteinbiosynthese und der nukleären Genomerhaltung beteiligt. Weitere FeS-Proteine unterstützen die Virenabwehr, die Mitose und die Eisenregulation. ER: endoplasmatisches Reticulum.

Die vielseitigen Funktionen von FeS-Proteinen

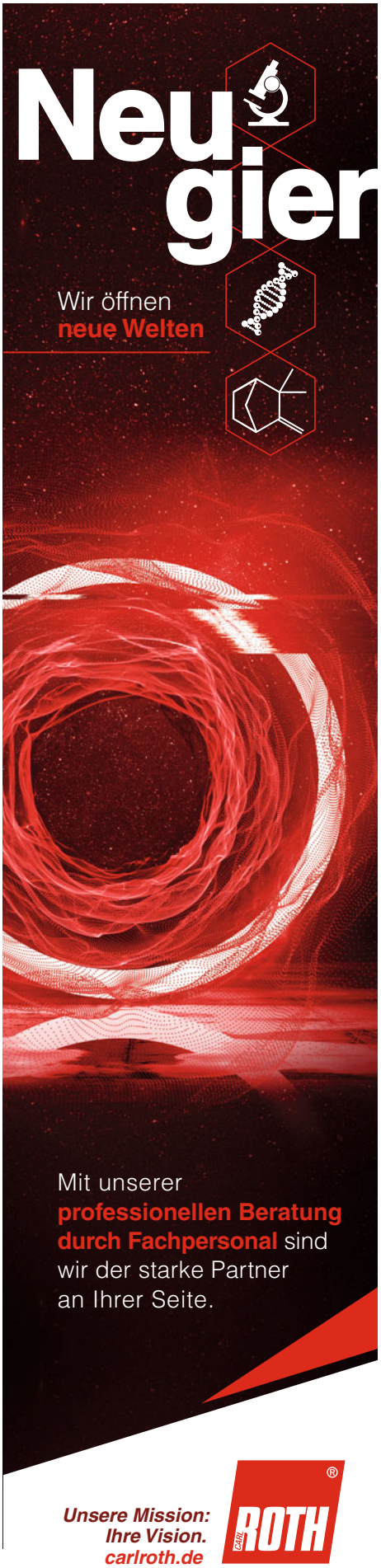
Die bekanntesten FeS-Proteine sind im Mitochondrium lokalisiert, wo sie z. B. an Elektronentransferreaktionen innerhalb der Atmungskettenkomplexe I–III oder der β-Oxidation von Fettsäuren (ETF-Dehydrogenase) beteiligt sind (**Abb. 1**, [6]). Als Katalysatoren wirken die FeS-Cluster in der Aconitase des Citratzyklus oder in Enzymen der Biosynthese anderer Kofaktoren, wie dem Molybdän-Kofaktor (Moco) oder Häm. In der Biotin- oder Lipoylsynthase dient je einer der beiden FeS-Cluster dieser Enzyme als Schwefeldonor für den Biotin- bzw. Lipoyl-Kofaktor. All diese FeS-abhängigen Kofaktoren sind wiederum selbst an zahlreichen Zellfunktionen beteiligt, was die lebenswichtige Rolle von FeS-Clustern unterstreicht (**Abb. 1**). Cytosolische FeS-Proteine erfüllen wichtige katalytische Funktionen im Aminosäure- und Nukleotidstoffwechsel sowie bei verschiedenen Aspekten der Proteintranslation, wie z. B. bei tRNA-Modifikationen oder der Ribosomenfunktion (ABCE1-Rli1) [6]. Das *iron regulatory protein 1* (IRP1) übernimmt eine regulatorische Funktion als Eisensensor in der Eisenhomöostase. Erst kürzlich wurden das für die Mitose und Cytokinese bedeutsame cytosolische, FeS-haltige Kinesin 4A und das Radikal-SAM-FeS-Protein Viperin, das als Teil der angeborenen Immunantwort zur Virusabwehr den RNA-Synthese-Inhibitor ddhCTP synthetisiert, entdeckt. Im Zellkern sind essenzielle FeS-Proteine, wie z. B. die DNA-Polymerasen POLD1, POLZ sowie die Primase, an verschiedenen Aspekten des Nukleinsäurestoffwechsels beteiligt. DNA-Helikasen und andere FeS-haltige Enzyme unterstützen die DNA-Reparatur, Chromosomendynamik und Telomerlängenregulierung [8]. Aus dieser (unvollständigen) Zusammenstellung wird deutlich, dass FeS-Cluster zentrale und vielseitige Proteinkofaktoren für zahlreiche zelluläre Prozesse darstellen. Diese universelle Bedeutung könnte zumindest teilweise auf die vermutete katalytische Funktion von FeS-Clustern bei der Entstehung des Lebens zurückzuführen sein.

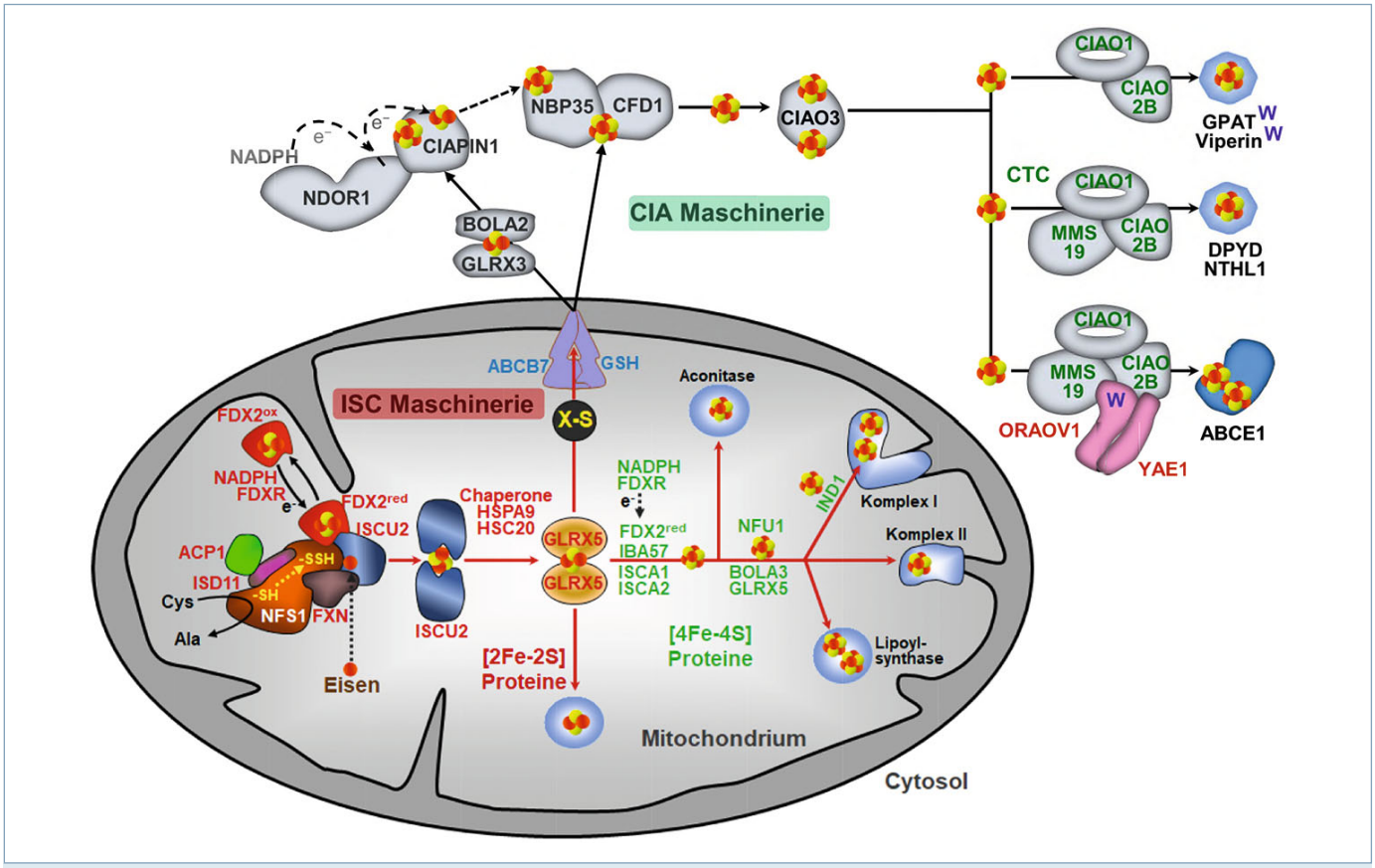
Biogenese mitochondrialer FeS-Proteine

Die Biogenese mitochondrialer FeS-Proteine wird von der *iron-sulfur cluster assembly*(ISC)-Maschinerie bewerkstelligt, die darüber hinaus auch für die Reifung extramitochondrialer Proteine verantwortlich ist (siehe unten). Das ISC-System besteht aus 18 Proteinen und katalysiert die Biogenese in drei Hauptschritten: (1) Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters auf einem Gerüstprotein; (2) Transfer des Clusters zu einem Glutaredoxin und nachfolgende Insertion in Apoproteine; (3) Synthese eines [4Fe-4S]-Clusters, gefolgt von der Insertion in Apoproteine. Der erste Schritt wird von einem dynamischen Dodecamer aus 2×6 Proteinen durchgeführt, dessen Struktur bekannt ist (**Abb. 2**, [9, 10]). Dabei erzeugt zunächst der Cysteindesulfurase-Subkomplex NFS1-ISD11-ACP1 aus freiem Cystein ein enzymgebundenes Persulfid (-SSH), das dann auf das Eisen-bindende Gerüstprotein ISCU2 übertragen wird. Der Persulfidtransfer wird vom Protein Frataxin (FXN) unterstützt, das in der Friedreich-Ataxie, einer neurodegenerativen Erkrankung, funktionell gestört ist. Das sechste Komplexprotein Ferredoxin FDX2 bindet in reduzierter Form an die anderen ISC-Proteine und überträgt dabei Elektronen auf das Persulfid, das dadurch zu Sulfid reduziert wird. Die Reduktion des dann oxidierten FDX2 erfolgt durch NADPH und die Ferredoxinreduktase FDXR. Auf dem ISCU2-Gerüstprotein entsteht der [2Fe-2S]-Cluster entweder durch eine Wiederholung dieser Reaktionen oder durch Interaktion zweier Komplexe. Das Produkt ist schließlich ein ISCU2-Dimer, das durch den [2Fe-2S]-Cluster verbrückt ist.

Im zweiten Schritt wird der ISCU2-gebundene Cluster durch ein spezifisches HSP40-HSP70-Chaperonsystem auf das Monothiol Glutaredoxin GLRX5 übertragen (**Abb. 2**). Dazu bindet zunächst das J-Protein HSC20 (Hefe Jac1) an ISCU2, um dadurch das mitochondriale HSP70 (HSPA9; Hefe Ssq1) an diesen Komplex anzudocken. Nach ATP-Hydrolyse wird ISCU2 fest an HSPA9 gebunden, wodurch der [2Fe-2S]-Cluster vom ISCU2-Dimer dissoziiert und auf GLRX5 übertritt. Die direkte Bindung des GLRX5 an HSPA9 unterstützt diese Transferreaktion. Nun kann der auf GLRX5 gebundene [2Fe-2S]-Cluster direkt auf Ziel-Apoproteine übertragen werden, was den zweiten Schritt abschließt.

Der dritte Schritt beinhaltet die Synthese eines [4Fe-4S]-Clusters und dessen Insertion in Zielproteine (**Abb. 2**). Dazu wird der [2Fe-2S]-Cluster des GLRX5 auf die ISCA1-ISCA2-Proteine übertragen und dort zu einem [4Fe-4S]-Cluster fusioniert. Hierzu wird nochmals die Elektronentransportkette NADPH-FDXR-FDX2 benötigt. Unter Beteiligung des Proteins IBA57 wird der gebildete [4Fe-4S]-Cluster dann auf Zielproteine über-





▲ **Abb. 2:** Modell zur Biogenese von eukaryotischen FeS-Proteinen durch die ISC- und CIA-Maschinerien. Die Biosynthese beginnt in Mitochondrien mit der Freisetzung von Schwefel aus Cystein durch den NFS1-Cysteindesulfurase-Komplex und der *de novo*-Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters (rote und gelbe Kreise) auf dem Gerüstprotein ISCU2. Nach dem Transfer des Clusters mittels verschiedener ISC-*trafficking*-Proteine und der Synthese eines [4Fe-4S]-Clusters werden die Kofaktoren in mitochondriale Apoproteine eingebaut. Die Assemblierung cytosolischer und nukleärer FeS-Proteine benötigt ein durch den mitochondrialen ABC-Transporter ABCB7 exportierten schwefelhaltigen Faktor (X-S) sowie die CIA-Maschinerie. Nach der Synthese eines [4Fe-4S]-Clusters auf dem CFD1-NBP35-Gerüstkomplex wird der Cluster über mehrere Schritte spezifisch in Apoproteine eingebaut.

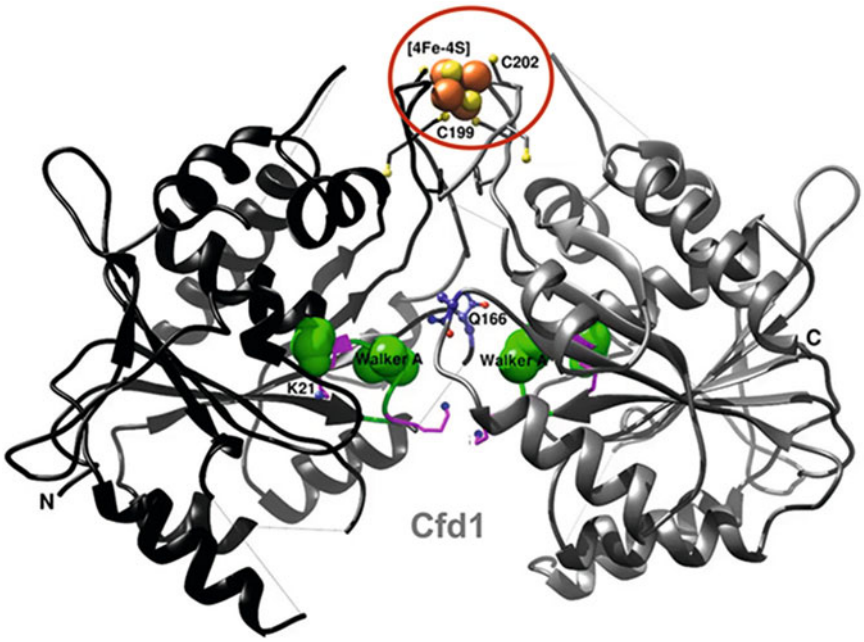
tragen. Dies kann wie im Falle der Aconitase ohne weitere ISC-Proteine erfolgen oder benötigt zusätzliche ISC-Transferproteine, die den [4Fe-4S]-Cluster transient binden und spezifisch in die Polypeptidkette des Zielproteins einsetzen. Ein hochspezifisches Transferprotein ist die P-Loop-ATPase IND1, die für die Assemblierung des Komplexes I der Atmungskette verantwortlich ist. Eine breitere Substratspezifität weist das ISC-Protein NFU1 auf, das bei der Reifung der Komplexe I und II sowie der Lipoylsynthase hilft. Für letzteres FeS-Protein wird schließlich noch das BOLA3, vermutlich im Komplex mit GLRX5, benötigt.

Biogenese cytosolischer und nukleärer FeS-Proteine

Die Assemblierung cytosolischer und nukleärer FeS-Proteine hängt von der Funktion der ISC-Proteine der ersten beiden Schritte ab [7]. Diese ISC-Proteine synthetisieren eine Substanz (X-S in **Abb. 2**), die sich bisher der genauen Identifizierung entzogen hat. Da mitochondriales NFS1 auch den Schwefel für extramitochondriale FeS-Proteine zur Verfügung stellt, handelt es sich um eine schwefelhaltige Verbindung, die nach neueren Untersuchungen eventuell sogar Eisen enthält [11]. Diese Substanz wird durch den mitochondrialen ABC-Transporter ABCB7 (Hefe Atm1) aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert. Da in der Atm1-Röntgenstruktur ein Glutathion (GSH) gebunden ist [12] und die cytosolische FeS-Proteinbiogenese von GSH abhängig ist, könnte X-S auch GSH enthalten.

Im Cytosol werden FeS-Proteine durch 13 Mitglieder der lebenswichtigen CIA(*cytosolic iron-sulfur protein assembly*)-Maschinerie assembliert. Das derzeitige Modell zum CIA-Mechanismus beruht vorwiegend auf *in vivo*-Studien in Hefe und menschlicher Zellkultur. Demnach wird zunächst unter Nutzung von X-S ein [4Fe-4S]-Cluster *de novo* auf dem P-Loop-ATPase-Komplex CFD1-NBP35 synthetisiert (**Abb. 2**). Der neu gebildete Cluster wird von je zwei Cysteinen zweier Monomere in einer exponierten Domäne koordiniert, was sowohl für die Synthese als auch die leichte Weitergabe des Clusters eine ideale Position zu sein scheint (**Abb. 3**, [13]). Für die Synthese des [4Fe-4S]-Clusters auf CFD1-NBP35 wird ferner die Elektronentransportkette der Flavinoxidoreduktase NDOR1 (Hefe Tah18) und des FeS-Proteins CIAPIN1 (Hefe Dre2) benötigt. Dessen zwei FeS-Cluster werden von einem [2Fe-2S]-haltigen Heterokomplex aus cytosolischem GLRX3 und BOLA2 assembliert.

Im nächsten Schritt wird der [4Fe-4S]-Cluster von CFD1-NBP35 mithilfe weiterer CIA-Proteine auf Apoproteine transferiert. Dazu gehört das FeS-Protein CIAO3 (Hefe Nar1) und der *CIA targeting complex* (CTC), der aus dem WD40-Protein CIAO1, CIAO2B und MMS19 besteht (**Abb. 2**). Während CIAO3 generell für alle [4Fe-4S]-Zielproteine benötigt wird, zeigen die drei CTC-Proteine



▲ **Abb. 3:** Kristallstruktur der P-Loop-ATPase CFD1. Das CFD1-Dimer (PDB-ID: 6G2G; [13]) dient als Modell für den cytosolischen Gerüstproteinkomplex CFD1-NBP35. Der *de novo* synthetisierte [4Fe-4S]-Cluster ist an der Spitze zweier Monomere durch je zwei konservierte Cysteinreste koordiniert.

eine klare Zielproteinspezifität. Vermutlich wird der [4Fe-4S]-Cluster transient am CTC gebunden, der die Zielproteine direkt bindet und den Cluster transferiert. Eine Besonderheit stellt die Reifung des FeS-Proteins ABCE1 (Hefe Rli1) dar. Dessen Apoform wird vom CIA-Adapterkomplex ORAOV1-YAE1 (Hefe Lto1-Yae1) zum CTC für die Clusterübertragung rekrutiert. Dieser indirekte Bindungsvorgang hängt essenziell von einem konservierten C-terminalen Phenylalanin oder Tryptophan (W in **Abb. 2**) im ORAOV1-Lto1 ab. Interessanterweise besitzen einige FeS-Proteine selbst solche konservierten C-terminalen Tryptophane. Im Falle von Viperin ist dieser Aminosäurerest essenziell für die CTC-Bindung, FeS-Cluster-Insertion und Funktion in der Virusabwehr.

Die weitere mechanistische Aufklärung der FeS-Proteinbiogenese ist nicht nur von akademischem Interesse, da Mutationen in den meisten *ISC*-Genen zu schwerwiegenden Krankheiten mit neurologischen, hämatologischen und metabolischen Phänotypen führen [14].

Danksagung

Unsere Arbeiten wurden unter anderem von DFG, EU, German-Israeli Foundation (GIF) und der Alexander-von-Humboldt-, Behring-Röntgen- und Volkswagen-Stiftung großzügig gefördert.

Literatur

[1] Kispal G, Csere P, Prohl C et al. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. Embo J 18:3981–3989
[2] Schilke B, Voisine C, Beinert H et al. (1999) Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 96:10206–10211
[3] Balk J, Schaedler TA (2014) Iron cofactor assembly in plants. Annu Rev Plant Biol 65:125–153
[4] Braymer JJ, Lill R (2017) Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. J Biol Chem 292:12754–12763
[5] Ciofi-Baffoni S, Nasta V, Banci L (2018) Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. Metallomics 10:49–72
[6] Lill R, Freibert SA (2020) Mechanisms of mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. Annu Rev Biochem, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111540
[7] Paul VD, Lill R (2015) Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. Biochim Biophys Acta 1853:1528–1539
[8] Barton JK, Silva RMB, O'Brien E (2019) Redox chemistry in the genome: emergence of the [4Fe4S] cofactor in repair and replication. Annu Rev Biochem 88:163–190
[9] Boniecki MT, Freibert SA, Muhlenhoff U et al. (2017) Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. Nat Commun 8:1287
[10] Fox NG, Yu X, Feng X et al. (2019) Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. Nat Commun 10:2210
[11] Pandey AK, Pain J, Dancis A et al. (2019) Mitochondria export iron-sulfur and sulfur intermediates to the cytoplasm for iron-sulfur cluster assembly and tRNA thiolation in yeast. J Biol Chem 294:9489–9502
[12] Srinivasan V, Pierik AJ, Lill R (2014) Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. Science 343:1137–1140
[13] Stehling O, Jeoung JH, Freibert SA et al. (2018) Function and crystal structure of the dimeric P-loop ATPase CFD1 coordinating an exposed [4Fe-4S] cluster for transfer to apoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 115:E9085–E9094
[14] Stehling O, Wilbrecht C, Lill R (2014) Mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis and human disease. Biochimie 100:61–77

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de.

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Roland Lill
Institut für Zytobiologie
Philipps-Universität Marburg
Robert-Koch-Straße 6
D-35032 Marburg
Lill@staff-uni-marburg.de

AUTOR

Roland Lill
1976–1981 Chemiestudium an den Universitäten Ulm und München. **1986** Promotion in Biochemie an der LMU München bei Prof. Dr. W. Wintermeyer. **1987–1989** DFG-Stipendiat an der University of California, Los Angeles, USA bei Prof. Dr. W. T. Wickner. **1990–1996** Gruppenleiter an der LMU München bei Prof. Dr. W. Neupert. Seit **1996** Professor für Zellbiologie am Institut für Zytobiologie, Universität Marburg; seit **2000** dessen Leiter. **2009–2014** Fellow der Max-Planck-Gesellschaft.