

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tomáš Temešinko

Mechanismy biogeneze železo-sirných klastrů u eukaryot
Mechanisms of iron-sulfur cluster biogenesis in eukaryotes

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 20. 4. 2023

.....
Tomáš Temešinko

Děkuji svému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za odborné konzultace a cenné rady při psaní této práce. Poděkování patří také členům naší laboratoře.

Abstrakt

Mnoho esenciálních proteinů v buňce využívá železo-sírné (Fe-S) klastry jako své kofaktory. Tyto proteiny slouží například jako enzymy, komponenty elektron-transportního řetězce nebo vnitrobuněčné sensory. Před vložením do proteinu musí být klaster nejprve sestaven, respektive syntetizován *de novo*. Eukaryotické buňky k tomu využívají celkem čtyři odlišné dráhy: ISC, CIA, SUF a NIF. Všechny dráhy jsou navíc schopny klaster doručit specifickému akceptorovému proteinu a tím ho maturovat. Porucha biosyntézy Fe-S klastrů je pro eukaryotickou buňku často letální a vede k selhání vývoje mnohobuněčných organismů. Přesto zůstávají základní principy těchto drah neobjasněné a jejich studium stále probíhá. Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o mechanismech biogeneze Fe-S klastrů u eukaryot, tedy poznatky ze savčích buněk, včetně lidí a z modelových organismů jako *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* a nakonec také parazitického prvoka *Giardia intestinalis*.

Klíčová slova: Fe-S klastry, ISC, CIA, SUF, NIF, plastid, mitochondrie, biosyntéza

Abstract

Many essential cellular proteins use iron-sulfur (Fe-S) clusters as cofactors. These proteins often serve as enzymes, components of the electron-transport chain or as intracellular sensors. Prior to the use of the cluster in a protein, it needs to be formed or created *de novo*. In total, four different mechanisms of Fe-S cluster biogenesis can be used by the eukaryotic cell – ISC, CIA, SUF and NIF. All of these pathways include a specific targeting system for delivering the cluster to its acceptor protein. Errors in biosynthesis of Fe-S clusters are mostly lethal and can lead to failure in development of multicellular organisms. Despite this a better characterization of these mechanisms is needed as research is currently still in progress. This bachelor's thesis provides current information regarding the mechanisms of Fe-S clusters biogenesis in eukaryotes acquired mostly from mammalian cells, including humans, and from well-known model organisms such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, and parasitic protist *Giardia intestinalis*.

Keywords: Fe-S clusters, ISC, CIA, SUF, NIF, plastid, mitochondria, biosynthesis

Obsah

1 Úvod	1
2 Železo-sirné klastry	2
2.1 <i>Struktura Fe-S klastrů</i>	2
2.2 <i>Funkce Fe-S klastrů</i>	3
3 Mechanismy biogeneze Fe-S klastrů u eukaryot.....	4
3.1 <i>ISC dráha</i>	4
3.1.1 De novo syntéza [2Fe-2S] klastru	4
3.1.2 Transfer [2Fe-2S] klastru k cílovým apoproteinům	7
3.1.3 ISC export	7
3.1.4 Stavba [4Fe-4S] klastrů a maturace cílových apoproteinů	8
3.2 <i>CIA dráha.....</i>	10
3.2.1 Vznik [2Fe-2S] a [4Fe-4S] klastrů	12
3.2.2 Maturace cílových [4Fe-4S] proteinů.....	13
3.3 <i>SUF dráha.....</i>	15
3.3.1 De novo syntéza klastrů	16
3.3.2 Přenos klastrů k cílovým apoproteinům.....	18
3.4 <i>NIF dráha.....</i>	19
4 Odlišnosti biogeneze Fe-S klastrů u <i>Giardia intestinalis</i>.....	20
5 Závěr	22
Seznam použitých zkratk	23
Seznam použité literatury	24

1 Úvod

Studium jednotlivých složek a poruch mechanismů biogeneze železo-simých (Fe-S) klastrů (nebo také center) u eukaryot je velmi důležité nejen z medicínského, evolučního a biochemického hlediska, ale i pro boj s některými parazity. Cílem této bakalářské práce je seznámit čtenáře právě s problematikou mechanismů biogeneze Fe-S klastrů u eukaryot na modelových organismech jako jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* nebo savčí tkáňové kultury. Zvláštní důraz je kladen na esenciální ISC a CIA dráhu. Jakožto organismus s redukovanou formou mitochondrie je uveden anaerobní parazit *Giardia intestinalis*, který představuje nejen dobrý modelový příklad, ale také předmět výzkumu naší laboratoře.

Fe-S klastry pravděpodobně představují jedny z evolučně prvních proteinových kofaktorů a jejich role v současných bakteriích, archeích i eukaryotech zůstává nezastupitelná. Využívání Fe-S klastrů s sebou přináší i problém jejich biogeneze a inkorporace do cílových proteinů. Bakterie žijící již před vznikem eukaryot vyvinuly za tímto účelem dráhy ISC, SUF a NIF, které se během eukaryogeneze dostaly do výbavy eukaryotických organismů. V plastidech jsou klastry dodávány SUF drahou a v mitochondriích ISC drahou, což odkazuje k endosymbiotickým událostem vedoucím ke vzniku těchto organel. Eukaryota během evoluce vyvinula ještě CIA dráhu, která probíhá v cytosolu a dodává klastry nejen cytosolickým, ale i jaderným Fe-S proteinům. CIA dráha ovšem není schopna fungovat zcela autonomně a vyžaduje komunikaci s mitochondriální ISC drahou, jejíž součástí je export dosud neznámé molekuly. Tímto se ISC dráha řadí k dalším procesům, pro které jsou mitochondrie klíčové. Důkazem je redukce všech mitochondriálních funkcí až na biosyntézu Fe-S klastrů u některých parazitických zástupců.

Dráhy biosyntézy Fe-S klastrů jsou poměrně komplexní a sestávají z mnoha proteinů. I přesto však fungují navzájem analogicky a principem se příliš neliší. Pro lepší přehlednost textu je až na specifické výjimky pro označení proteinů využita nomenklatura savčích buněk.

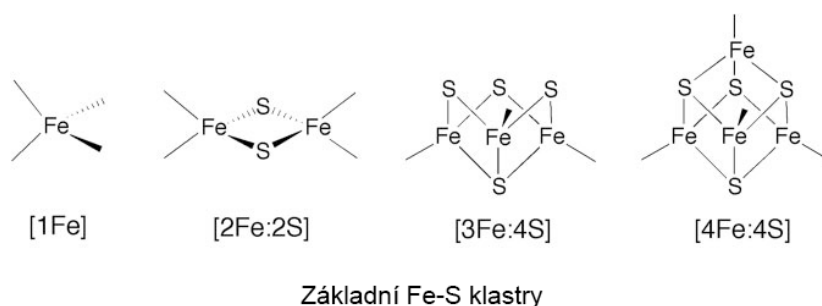
2 Železo-sírné klastry

Fe-S klastry byly poprvé popsány v roce 1960, kdy na základě měření elektronové paramagnetické rezonance (EPR) fragmentů membrán mitochondrií z buněk krysího a hovězího srdce byla pozorována přítomnost Fe^{2+} (Beinert and Lee, 1961). Během několika let byla ve feredoxinu identifikována druhá složka klastru – anorganická síra (Malkin and Rabinowitz, 1966). Pozdější práce ukázaly, že se jedná o jedny z nejvíce abundantních a nejpůvodnějších proteinových kofaktorů, vyskytujících se u všech organismů.

2.1 Struktura Fe-S klastrů

Fe-S klastry se vyskytují v přírodě nejčastěji jako rombické $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, kubické $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ a asymetrické $[3\text{Fe}-4\text{S}]$. Existují i jiné, atypické formy. Příkladem může být P-klastr nitrogenázy $[8\text{Fe}-7\text{S}]$. Klastry se stechiometrií 4:4 vznikají fúzí $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ klastrů, asymetrické klastry $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ vznikají odebráním atomu železa z $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastru. Klastry $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ lze tedy považovat za základní formu (Rees, 2002; Ohki et al., 2009).

Atomy železa vytváří ve struktuře klastru kovalentní vazbu s anorganickou sírou, kdy se počet takových vazeb odvíjí od typu daného klastru a nikdy není větší než tři. Pomocí zbývajících volných vazeb železa je Fe-S klastr koordinován ve struktuře proteinu, a to typicky vazbou na thiolovou skupinu Cys zbytku. Ve specifických příkladech může koordinace probíhat například i prostřednictvím His, Ser nebo Gln (**Obr. 1**). Například Rieskeho klastr je koordinován kombinací His a Cys v komplexu III elektron-transportního řetězce (ETC) na vnitřní membráně mitochondrií (Iwata et al., 1996; Moulis et al., 1996).



Obrázek 1: Geometrické vzorce zobrazující prostorové uspořádání atomů a jejich vazeb v nejběžnějších typech Fe-S klastrů a vazbě jednoho atomu Fe, tzv. Rubredoxinu. Klasický $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ klastr je téměř planární. Volné vazby koordinují klastry ve struktuře proteinů, nejčastěji vytvořením vazby s thiolovou skupinou Cys. Adaptováno podle Rees (2002).

2.2 Funkce Fe-S klastrů

Stěžejní vlastností Fe-S klastrů je jejich reaktivita umožňující katalýzu, nízký redoxní potenciál a možnost přecházet mezi různými oxidačními stavy. Některé vlastnosti lze během evoluce upravit pro specifickou funkci daného proteinu, například modifikací proteinového okolí klastru. Proteiny obsahující Fe-S centra byly u eukaryot lokalizovány především v mitochondriích, plastidech, cytosolu a jádře. Zásadní roli plní jako přenašeče elektronů v komplexech I, II a III ETC na vnitřní membráně mitochondrií.

V nedávné době byla popsána významná role Fe-S klastrů v metabolismu, replikaci a opravách DNA. [4Fe-4S] klastry byly charakterizovány například v C-terminální doméně replikativních polymeráz rodiny B kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, anebo v katalytické P-doméně DNA Pol ϵ (Netz et al., 2011; Beek et al., 2019). Konkrétní role těchto center je většinou neznámá. Při poškození klastru u DNA Pol δ došlo k zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M, respektive k neschopnosti buněk projít S fází, což vedlo k programované buněčné smrti (PCD). Důvodem je pravděpodobně velké poškození genomu vznikem aberantních struktur v chromozomech. Viabilitu buněk zvýšila větší míra exprese proteinů DNA opravných mechanismů (Chanet et al., 2021).

Fe-S klastry jsou využívány také ve vnímání intracelulární hladiny železa a oxidativního stresu. Při dostatku železa v savčí buňce nese IRP1 [4Fe-4S] klastr a funguje jako cytosolická akonitáza. Při jeho nedostatku IRP1 klastr ztrácí a získává schopnost vázat motivy iron response elements (IREs), nacházejících se na mRNA pro některé proteiny účastnící se metabolismu a transportu železa do buňky. Tímto IRP1 například reguluje translaci mRNA pro ferritin a receptor transferrinu, čímž reguluje intracelulární množství železa. IRP1 se váže na IREs i po poškození Fe-S klastru oxidem dusnatým. Klastry jsou také náchylné k poškození volnými kyslíkovými radikály (ROS) (Haile et al., 1992; Drapier et al., 1993; Flint et al., 1993).

Biotin syntáza využívá [2Fe-2S] klastr jako donor síry pro thioetherový kruh vznikajícího biotinu. To bylo zjištěno měřením EPR, protože během reakce dochází ke ztrátě klastru. Následně byla prokázána korelace mezi rychlostí syntézy biotinu a degradací klastru (Ugulava et al., 2001).

Například ve vodném roztoku se zásaditým pH, který obsahuje L-cystein, zdroj $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ a S^{2-} , se za anaerobních podmínek Fe-S klastry mohou skládat samovolně (Jordan et al., 2021). *In vivo* vznikají Fe-S klastry prostřednictvím proteinové biosyntézy, což umožňuje regulaci jejich vzniku dle aktuální potřeby buňky a specifickou maturaci cílových apoproteinů. Klastry jsou ve struktuře proteinů navíc chráněny před poškozujícími aerobními podmínkami, které ve většině eukaryotických buněk panují.

3 Mechanismy biogeneze Fe-S klastrů u eukaryot

3.1 ISC dráha

Iron-sulfur cluster assembly (ISC) byla objevena u prokaryot sekvenací genů *Azotobacter vinelandii*, jejichž produkty jsou homologní s již dříve objeveným NifS a NifU, které hrají roli při rekonstrukci ztracených Fe-S klastrů a maturaci nitrogenázy (viz 3.4). Tyto a další geny tvoří *isc* operon (Zheng et al., 1998). U *S. cerevisiae* byly následně objeveny homology některých z těchto prokaryotických proteinů, jejichž experimentální delece (*isu1*, *isu2* a *nful*) vedla k hromadění železa v mitochondriích (Garland et al., 1999; Schilke et al., 1999).

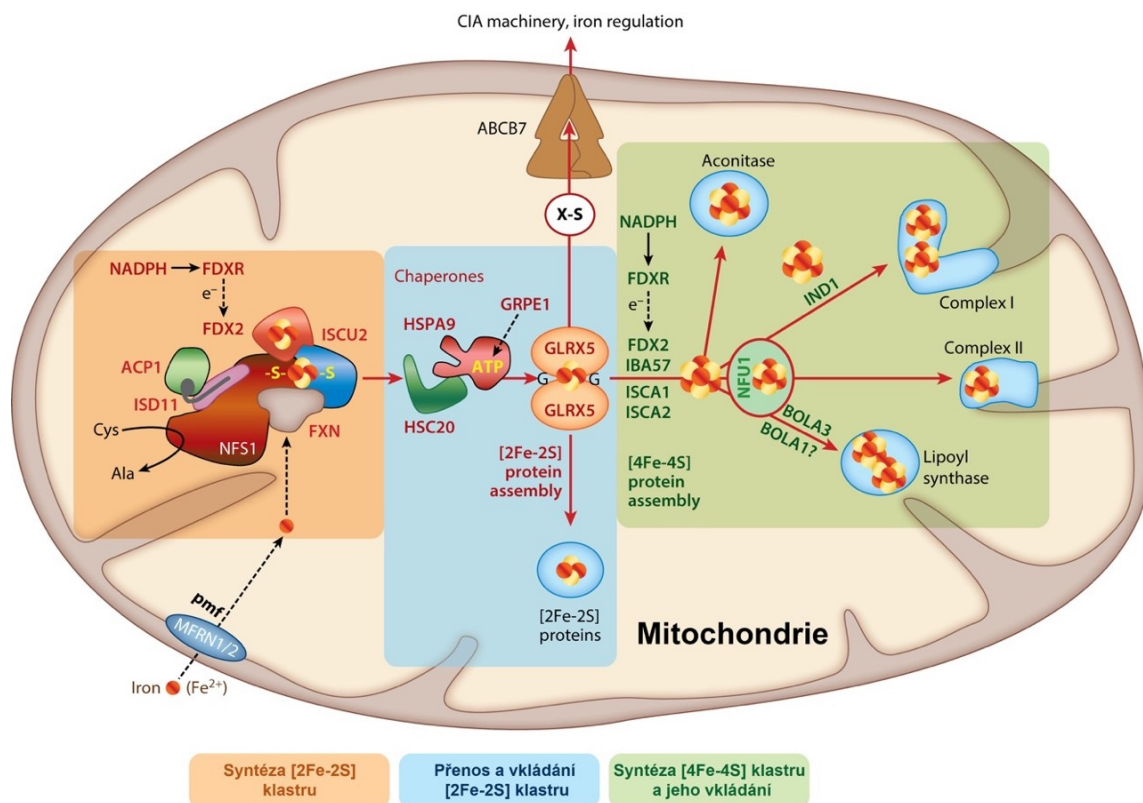
Dráha ISC a její proteiny jsou napříč prokaryotickým a eukaryotickým spektrem evolučně konzervovány. Mitochondrie zdědily ISC dráhu od svého prokaryotického předka, což zároveň odpovídá předpokládané existenci této biosyntetické dráhy u posledního společného předka všech eukaryotických organismů (LECA). Na druhé straně, ISC dráha funguje i v redukovaných mitochondriích (od mitochondrie odvozených organelách – MRO), například v mitosomech (Tovar et al., 2003; Freibert et al., 2017), u kterých zřejmě došlo ke ztrátě všech dalších mitochondriálních metabolických procesů.

ISC dráha může být rozdělena do tří fází: (1) *de novo* syntéza [2Fe-2S] klastru, (2) přenos [2Fe-2S] klastru s vložením do cílových apoproteinů a (3) syntéza [4Fe-4S] klastru a doprava do cílových apoproteinů (**Obr. 2**). Součástí je také ISC export system exportující zatím neznámou sloučeninu síry do cytosolu (Lill and Freibert, 2020). První fáze bývá také označována jako časná (early) ISC, třetí pak jako pozdní (late) ISC.

3.1.1 De novo syntéza [2Fe-2S] klastru

Železo se do mitochondrie obratlovců dostává pomocí Mitoferrinu 1 a 2 (MFRN1/2), které odpovídají homologním Mrs3/4 kvasinek (Shaw et al., 2006). Jedná se o proteiny z velké rodiny mitochondriálních přenašečů SLC25, které se specializují na přenos celé škály metabolitů a iontů přes vnitřní mitochondriální membránu (Wohlrab, 2005).

NFS1 je homologem prokaryotického NifS, SufS a IscS a stejně jako oni plní funkci pyridoxal 5'-fosfát (PLP) dependentní L-cystein desulfurázy. NFS1 je donorem síry pro biosyntézu mitochondriálních i cytosolických Fe-S klastrů (Biederbick et al., 2006; Fox et al., 2019).



Obrázek 2: Celkové schéma ISC dráhy probíhající v matrix mitochondrií. Dráha může být rozdělena do tří fází. První fází je *de novo* syntéza [2Fe-2S] klastru, druhou je přenos klastru a vložení do cílových apoproteinů. Poslední fází je vznik [4Fe-4S] klastrů a jejich vložení do cílových apoproteinů. ISC export system je tvořen ABC transportérem *Atm1* (v savčích buňkách *ABCB7*). Upraveno (Lill and Freibert, 2020).

Na NFS1 se nejprve váže ISD11 s ACP1. NFS1 poté interaguje s ISCU, načež se do kavity vzniklé mezi NFS1 a ISCU váže frataxin (FXN) současně s feredoxinem (FDX2). FDX2 se váže s vyšší afinitou v redukovaném stavu. Kvasinkové homology ISCU a FXN představují Isu1/2 a Yfh1. Dle kryo-elektronové mikroskopie (kryo-EM) tvoří všechny tyto proteiny po dvou kopiích dohromady ISC core komplex (často také cystein desulfurázový komplex). Symetrii tohoto komplexu udává centrální homodimer tvořený $(\text{NFS1-ISD11-ACP1})_2$ (Boniecki et al., 2017; Fox et al., 2019).

Prvním krokem ISC dráhy je přeměna L-cysteinu na L-alanin desulfurázovou aktivitou NFS1, při které se substrát váže na kofaktor PLP. Ten je situován hluboko ve struktuře NFS1. Cys383 na flexibilní Cys-smyčce v aktivním místě provádí nukleofilní atak vůči sulfhydrylové skupině substrátu, čímž dochází ke vzniku persulfidu (R-SSH) vázaného na Cys-smyčku. Poté dochází k přemístění Cys-smyčky k povrchu NFS1, do blízkosti tří evolučně konzervovaných Cys na ISCU. Molekulární detaily mechanismu vzniku persulfidu jsou známy především ze studia homologních desulfuráz vyskytujících se v jiných drahách biosyntézy Fe-S klastrů (například bakteriální SufS a NifS) (Pandey et al., 2012; Blahut et al., 2019; Lill and Freibert, 2020).

Funkce NFS1 je závislá na interakci s ISD11. Tato interakce nemá přímý vliv na aktivitu NFS1, ale bez ní přestává být NFS1 solubilní. V eukaryotické buňce má ISD11 esenciální význam, jelikož jeho deplece v *S. cerevisiae* snížila aktivitu jak mitochondriálních, tak cytosolických Fe-S proteinů, protože neměly klastr a došlo tak k významnému snížení celkové viability buněk. U prokaryot nebyl tento protein nalezen (Adam et al., 2006). Podobnou stabilizační funkci pravděpodobně plní ACP1 nasedající na ISD11. Při jeho deleci dochází ke zvýšené agregaci komplexů NFS1-ISD11 a snížení viability buněk. Samotný ACP1 váže přes prostetickou skupinu 4'-fosfopantetein (4'-PP), acylový řetězec, který je produktem mitochondriální syntézy mastných kyselin. Někteří autoři proto navrhnou model, kde ACP1 propojuje biosyntézu Fe-S klastrů se syntézou mastných kyselin. Jelikož jsou oba procesy energeticky náročné, ACP1 by pomocí 4'-PP mohl fungovat jako senzor energetického metabolismu buňky skrze acetyl-CoA. Acylovaný ACP1 vzniká pouze při dostatku acetyl-CoA, který zároveň aktivuje ETC. Ten je závislý také na aktivitě řady proteinů nesoucích Fe-S klastry, jejichž syntéza je přes acylovaný ACP1 pozitivně regulována (Van Vranken et al., 2016; Cory et al., 2017).

FXN působí jako allosterický regulátor urychlující asi 50x přesun persulfidu z Cys-smyčky na ISCU (Parent et al., 2015). Předchozí *in vitro* studie ukázaly, že FXN váže železo, proto byl navrhován alternativní model jeho funkce jako možného donoru železa pro tvorbu klastru na ISCU. Tento model je dnes méně pravděpodobný, protože neodpovídá získaným výsledkům *in vivo* (Yoon et al., 2012; Fox et al., 2019).

ISCU vytváří lešení, aneb scaffold pro sestavení [2Fe-2S] klastru. Přijímá persulfid z NFS1 a v jeho struktuře bylo detekováno místo vazby Fe^{2+} , respektive Zn^{2+} (vzájemně nahraditelné) blízko konzervovaných Cys přijímacích persulfid (Fox et al., 2019). V současné době existují dva odlišné modely fungování ISCU. Autoři prvního (Lewis et al., 2019) v jeho struktuře detekovali dvě místa vazby Fe^{2+} . Rozlišují je na aktivní (poblíž zmíněných Cys residuí) a na „loading“. Zinek se v jejich modelu může vázat do aktivního místa a tím inhibovat přenos persulfidu. Železo se dostává na scaffold neznámým mechanismem, nicméně se nejprve váže do loading místa, kde je koordinováno výhradně atomy kyslíku a dusíku. ISCU s takto koordinovaným železem se poté váže na NFS1, čímž dojde k přemístění železa do aktivního místa, kam se přemísťuje i persulfid. Autoři druhého modelu (Srouf et al., 2022) oponují tím, že ve struktuře ISCU je pouze jediné místo pro vazbu $\text{Fe}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, podobné aktivnímu místu z prvního modelu. Předchozí nález dvou míst vazby atomu kovu přisuzují vysoké koncentraci železa v roztoku, což může způsobit nespecifickou vazbu na ISCU. Některé zbytky aminokyselin koordinujících Fe (nebo Zn) vykazují při vazbě kovu značnou mobilitu. Jeden z těchto mobilních zbytků tak může být nahrazen Cys104, na který je transferován persulfid. Transfer persulfidu tedy ovlivňuje nejen vazba FXN, ale i vazba kovu. Dle

tohoto modelu ISCU může také nabývat dvou konformací – 1-Cys a 2-Cys. Obě jsou závislé na pH, přičemž 2-Cys je stabilní při hodnotách pH kolem 8, což odpovídá matrix mitochondrie. Konformace 1-Cys je zřejmě pouze přechodným stavem při vazbě kovu. Molekulární mechanismus vazby a původ železa je tedy zatím vysvětlený nejistě.

S⁰ persulfidu je poté na ISCU redukována na S²⁻, která je zabudována do klastru. Tuto redukci zajišťuje FDX2 (Gervason et al., 2019). Oxidovaný FDX2 je následně redukován feredoxin reduktázou FDXR. Ta k tomu využívá NADPH jako kofaktor (Shi et al., 2012). Samotný mechanismus vzniku [2Fe-2S] klastru po redukci persulfidu je nejasný. Nedávná práce (Freibert et al., 2021) popisuje evolučně konzervovaný Tyr35 na N-konci ISCU a navrhuje mechanismus, kdy přes tyto tyrosiny interagují dva ISCU, každý nesoucí po jednom atomu Fe a S, z jiných ISC core komplexů. Mezi nimi by pak mohl vzniknout [2Fe-2S] klastr.

3.1.2 Transfer [2Fe-2S] klastru k cílovým apoproteinům

Z ISCU je klastr přenesen chaperony na centrální protein ISC dráhy, GLRX5. Nejprve dochází k vazbě ko-chaperonu HSC20 na ISCU. Ko-chaperon tím navádí ISCU pro vazbu chaperonu HSPA9, který může vázat také apo-GLRX5. Interakce mezi HSC20 a HSPA9 je důležitá i pro ATPázovou aktivitu HSPA9. Přenesený [2Fe-2S] klastr je poté v aktivním místě GLRX5 koordinován pomocí dvou zbytků Cys a interakcí s dvěma glutathiony (GSH). Tato vazba je poměrně labilní, což umožňuje následný přenos klastru do cílových [2Fe-2S] proteinů (Dutkiewicz et al., 2004; Uzarska et al., 2013).

Popis mechanismu přesunu klastru na GLRX5 je na molekulární úrovni z části závislý na výsledcích výzkumu bakteriální ISC dráhy. Tam bylo pozorováno, že vazba chaperonu s ATP změnil konformaci ISCU, čímž dojde k destabilizaci a uvolnění klastru (Bonomi et al., 2011). Poté je ATP na HSPA9 hydrolyzováno, čímž se zvyšuje afinita pro vazbu s apo-GLRX5. Následnou výměnu ADP za ATP zprostředkovává GRPE1. Tato výměna způsobuje disociaci chaperonu od ISCU a HSPA9 je tak dostupný pro další funkční cyklus (Uzarska et al., 2013).

3.1.3 ISC export

Porucha první fáze syntézy klastrů v mitochondrii se promítá i do maturace cytosolických Fe-S proteinů. Propojení mezi mitochondriální ISC a cytosolickou CIA dráhou zprostředkovává u *S. cerevisiae* ABC transportér Atm1 ve vnitřní mitochondriální membráně. Delece, případně deplece Atm1 ovlivňuje maturaci cytosolických, nikoliv však mitochondriálních Fe-S proteinů (Kispal et al., 1999). V literatuře se uvažuje o dvou možných exportovaných molekulách. Jednou z nich je dosud neznámá molekula obsahující síru, často označovaná jako X-S nebo také S_{int}

(intermediát obsahující síru). Tato síra pocházející z desulfurace Cys na NFS1 je poté využita i pro cytosolickou thiolaci tRNA. Cesta této molekuly se od ISC dráhy odděluje nejspíše v místě ISCU, jelikož HSPA9 není pro thiolaci tRNA vyžadován. Avšak deplece Atm1 činí thiolaci tRNA neefektivní (Pandey et al., 2018). Druhou možností je transport komplexu obsahující samotný [2Fe-2S] klastr. Ten je dle modelu koordinován čtyřmi molekulami GSH. Takto koordinovaný klastr je v matrix stabilní. V části Atm1 otevřené do matrix byla identifikována pozitivně nabitá oblast, která by mohla interagovat s negativně nabitým komplexem GSH s navázaným [2Fe-2S] klastrem a ATP (Li et al., 2022).

3.1.4 Stavba [4Fe-4S] klastrů a maturace cílových apoproteinů

Klastry syntetizované v časně ISC dráze mohou pokračovat dále do pozdní ISC dráhy, kde podstupují fúzi za vzniku 4Fe-4S klastrů.

Dimer GLRX5 transferuje [2Fe-2S] klastr také na mitochondriální ISCA1 a ISCA2 (Banci et al., 2014). ISCA1, ISCA2 a IBA57 tvoří komplex generující [4Fe-4S] klastry pro mitochondriální [4Fe-4S] proteiny. Všechny tři proteiny jsou pro funkčnost komplexu zásadní a účastní se pouze pozdní ISC dráhy (Mühlenhoff et al., 2011).

Přesný mechanismus vzniku [4Fe-4S] klastrů však není znám. Současné poznání implikuje fúzi dvou [2Fe-2S] klastrů (jednoho na ISCA1 s druhým na ISCA2). Následuje předání klastru dalším proteinům specificky interagujícím s cílovými Fe-S proteiny a regenerace apo-ISCA1/2 opětovným transferem dvou [2Fe-2S] klastrů z GLRX5. Pro fúzi dvou [2Fe-2S]²⁺ na [4Fe-4S]²⁺ klastr je nutná redukce dvěma elektrony. Tyto elektrony dodává heterodimeru ISCA1-ISCA2 systém FDX2-FDXR-NADPH, stejně jako při redukci síry během *de novo* syntézy [2Fe2S] klastrů. Heterodimer ISCA1-ISCA2 za přítomnosti tohoto elektronového řetězce může přímo maturovat mitochondriální Fe-S proteiny, které k tomu nevyžadují další specifický přenosový protein, tedy tzv. „carrier“ protein (Weiler et al., 2020; Suraci et al., 2021).

Většina mitochondriálních [4Fe-4S] proteinů ale vyžaduje pro svou maturaci specifický carrier protein. Mechanismus maturace takových proteinů ovšem není dosud zcela pochopen. NFU1 specificky dodává [4Fe-4S] klastr například syntetáze kyseliny lipoové (LIAS) nebo komplexu I a II ETC. Pro maturaci LIAS byl v nedávné době navržen následující mechanismus. Klastr je nejprve koordinován v heterodimeru ISCA1-NFU1, ale C-doména NFU1 má vyšší afinitu pro vazbu LIAS, tedy při kontaktu s LIAS ISCA1 disociuje a NFU1 dodává klastr pomocí C-koncové domény. Klastr je tímto způsobem chráněn před oxidativními podmínkami matrix mitochondrie (Lill and Freibert, 2020; Saudino et al., 2022).

K maturaci některých mitochondriálních Fe-S proteinů nejspíše přispívají také BOLA1 a BOLA3. Oba proteiny tvoří heterodimer holo-GLRX5-BOLA1/3, kdy vazba s BOLA1 je výrazně stabilnější. BOLA3 tvoří stabilní heterodimer s holo-NFU1. Oba BOLA proteiny plní velmi podobné funkce, snížená aktivita jejich cílových proteinů je nejvýraznější při mutaci obou isoformů zároveň. Mutacemi jsou ovlivněny komplex II (u lidí při mutaci BOLA3 i komplex I) ETC a LIAS (Uzarska et al., 2016). Výsledky novější studie (Warui et al., 2022) ukazují, že BOLA3 nevytváří pevnou vazbu a neregeneruje klastr LIAS, zatímco silněji se vázající NFU1 ano. Pro přesnou definici role proteinů BOLA v ISC dráze je potřeba dalšího výzkumu.

Mezi carrier proteiny se řadí také kvasinkový IND1 (někdy také NUBPL) maturující komplex I (Bych et al., 2008a).

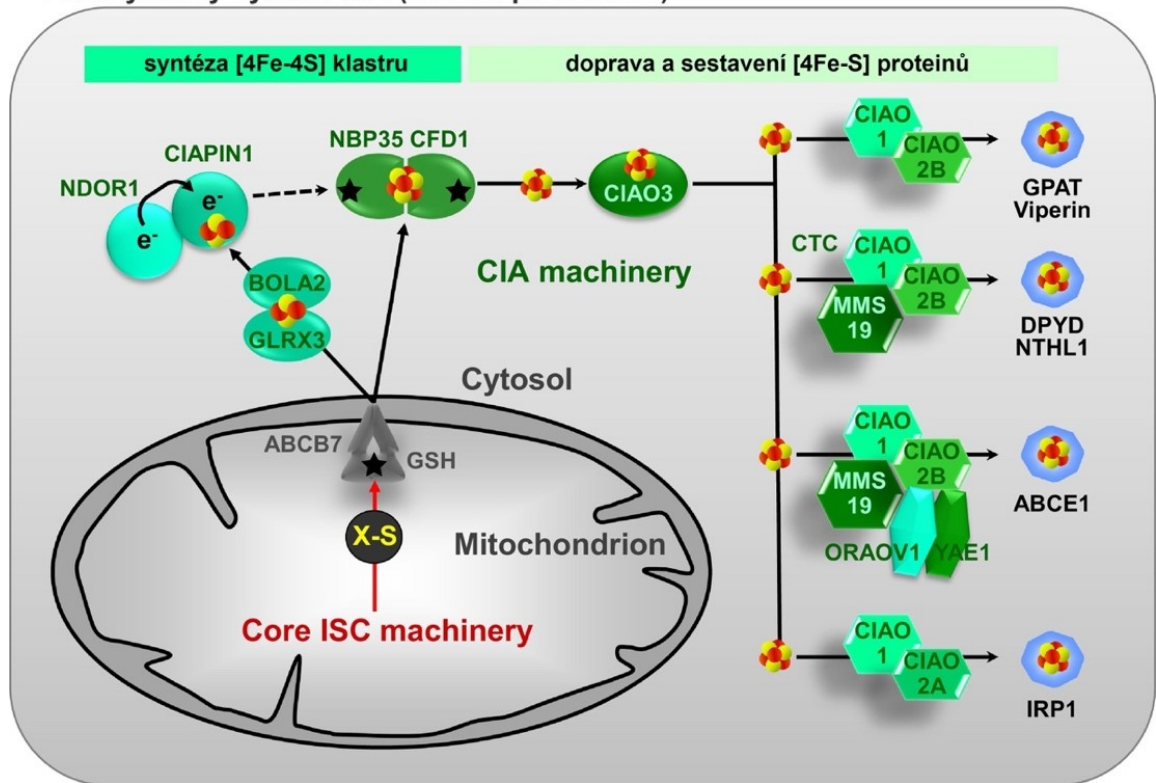
3.2 CIA dráha

Maturaci cytosolických a jaderných Fe-S proteinů zajišťuje dráha cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA). Ta je závislá na exportu neznámé molekuly X-S, respektive $(\text{Fe-S})_{\text{int}}$ z matrix mitochondrie do cytosolu (viz 3.1.3) a nemůže tak samostatně generovat klastry *de novo*. Pro maturaci cytosolického [4Fe-4S] proteinu Leu1 (a téměř všech ostatních) je proto esenciální přítomnost NFS1, HSPA9 a Atm1 ISC exportní dráhy. Cytoplazma obsahující exportovanou molekulu X-S je schopna generovat klastry již bez přítomnosti mitochondrie (Pandey et al., 2023).

V intermembránového prostoru mitochondrie *S. cerevisiae* hraje důležitou roli sulfhydryl oxidáza Erv1, jejíž inaktivace způsobuje výrazný pokles maturace cytosolických Fe-S proteinů a hromadění železa v matrix. Erv1 dle navrženého modelu hraje roli spolu s GSH právě v návaznosti na Atm1. Jeho interakce s Fe-S klastry, či jinými proteiny dráhy CIA, však nebyla pozorována (Lange et al., 2001). Pozdější rozsáhlejší studie (Ozer et al., 2015) ukázala, že k poklesu maturace cytosolických Fe-S proteinů dochází pouze u jednoho specificky mutovaného kmenu *S. cerevisiae*. V tomto kmenu byla nalezena další teplotně sensitivní mutace v genu pro protein GSH1 účastnící se biosyntézy GSH. Přidáním externího GSH došlo k odstranění mutantního fenotypu. Přímý význam pro dráhu CIA má tedy GSH, nikoliv Erv1. Nepřímý vliv Erv1 na maturaci Fe-S proteinů byl popsán u *Trypanosoma brucei*, kde jeho eliminací došlo k celkové poruše ISC i CIA dráhy. Pozměněná byla i morfologie mitochondrií, z důvodu interakce Erv1s Mia40, který se účastní mitochondriálního importu proteinů a dle autorů mohlo dojít ke ztrátě membránového potenciálu (Haindrich et al., 2017).

Většina publikací věnujících se CIA dráze se věnuje pouze mechanismu biogeneze [4Fe-4S] klastrů, zatímco mechanismus biogeneze a transport [2Fe-2S] klastrů k cílovým apoproteinům jsou prakticky neznámé. V literatuře se CIA dráha často rozděluje na dvě fáze: vznik [4Fe-4S] klastru a jeho transport k cílovým apoproteinům (**Obr. 3**). Zde je důležité zmínit, že někteří autoři uvažují o alternativní dráze biosyntézy cytosolických Fe-S klastrů vedle CIA, a sice o cytosolické ISC dráze (c-ISC). Důkazem je lokalizace cytosolických isoform proteinů schopných sestavit obdobu ISC core komplexu (viz 3.1.1). Centrálním proteinem propojujícím c-ISC s CIA (viz 3.2.2) by mohl být cytosolický ko-chaperon HSC20, který interaguje s ISCU1 a HSPA9. Heterodimer ISCU1-HSC20 je možná schopen dodat *de novo* v cytosolu generované klastry jak na CIA scaffold komplex, tak proteinům, které specificky maturují cílové apoproteiny (viz 3.2.1).

Eukaryotický systém CIA (od hub po člověka)



Obrázek 3: Schematické znázornění eukaryotické dráhy CIA probíhající v cytosolu. Dráha je závislá na exportu molekuly X-S z mitochondriální dráhy ISC a dále jí lze dělit na dvě fáze. První fází je vznik [4Fe-4S] klastru, druhou transfer klastru a maturace cílových cytosolických a jaderných Fe-S proteinů. Dráha CIA je patrně evolučně konzervovaná od hub po člověka. Adaptováno podle *Braymer et al., (2021)*.

Při eliminaci cytosolické isoformy HSC20 nedošlo k maturaci některých cytosolických Fe-S proteinů. Knock-down scaffold proteinů CIA dráhy neměl na maturaci těchto proteinů vliv (Kim et al., 2018). Alternativa k dráze CIA je nicméně velmi nepravděpodobná, jelikož existuje řada důkazů proti. Jedním z nich je například neschopnost komplementovat maturaci jak mitochondriální, tak cytosolických Fe-S proteinů expresí cytosolické isoformy NFS1 v buňkách, kterým chybí mitochondriální isoforma NFS1 (Biederbick et al., 2006) a otázkou je také pozorovaná esencialita exportu molekuly X-S z mitochondrie.

3.2.1 Vznik [2Fe-2S] a [4Fe-4S] klastrů

Mechanismem je dráha CIA velmi podobná dráze ISC. Většina výzkumu byla provedena na *S. cerevisiae* a charakterizace CIA dráhy u dalších organismů včetně člověka je značně neúplná. Jelikož je přítomnost jednotlivých CIA komponent mezi eukaryoty evolučně konzervovaná, lze u většiny organismů předpokládat stejný mechanismus.

I přes nedostatek informací o vzniku [2Fe-2S] klastrů v CIA dráze některá data ukazují na to, že by heterodimer GLRX3-BOLA2 mohl fungovat jako scaffold pro stavbu těchto klastrů *de novo* za využití molekuly X-S exportované z mitochondrie a dodání železa na BOLA2 prostřednictvím PCBP1. Spolu s GSH váže PCBP1 železo svou doménou KH3. Při interakci s BOLA2 je železo předáno na stejné aminokyselinové zbytky potřebné pro koordinaci [2Fe-2S] klastru v komplexu GLRX3-BOLA2 (Patel et al., 2019). Další důkazy napovídající o funkci GLRX3 a BOLA2 ve stavbě [2Fe-2S] klastrů jsou obsaženy v textu níže.

Na rozdíl od [2Fe-2S] klastrů je znalost vzniku [4Fe-4S] klastrů a jejich přenosu k cílovým apoproteinům značná. Scaffold komplex pro vznik [4Fe-4S] klastru tvoří heterotetramer NBP35-CFD1 (někdy také NUBP1-NUBP2). Vznikají dva klastry, které jsou koordinovány mezi heterodimery dvěma konzervovanými Cys na C-terminální doméně každého z proteinů. Oba scaffold proteiny patří mezi P-loop NTPasy. CFD1 je schopen vázat klastr pouze na C-koncové doméně, kdežto NBP35 váže ještě druhý na N-terminální doméně (Netz et al., 2012). Obě tyto NTPasy mohou vázat ATP nebo GTP, přičemž specifická vazba NTP není u obou proteinů pravděpodobně konzervována. U jednoho druhu tak může daný protein vázat preferenčně ATP, kdežto u druhého GTP. Oba proteiny také mohou vázat klastr i jako homodimery (Stehling et al., 2018). U rostlin ani u zelených řas nebyl protein CFD1 nalezen a jeho funkci plně zastává NBP35 jakožto homodimer. NBP35 je schopen dimerizovat i bez přemostujícího klastru, tedy v apo formě (Bych et al., 2008b).

Mimo zmíněného předpokladu, kde GLRX3 slouží spolu s BOLA2 jako scaffold pro stavbu [2Fe-2S] klastrů, funguje GLRX3 také jako chaperon a transportuje [2Fe-2S] klastr právě k NBP35. Homodimer GLRX3 s pomocí GSH koordinuje dva [2Fe-2S] klastry. Ty poté předává jak na C, tak i N-terminální doménu NBP35, kde jsou fúzovány za dodání elektronů na [4Fe-4S] klastr. Klastr na C-terminální doméně je labilní. Druhý na N-terminální doméně je stabilní a plní nejspíše elektron-transportní nebo strukturální funkci. *In vitro* je elektrony potřebné pro fúzi schopen dodat GSH (Camponeschi et al., 2020).

In vivo elektrony dodává heterodimer NDOR1-CIAPIN1 (u kvasinek se jedná o homologní Tah18 a Dre2). NDOR1 vyžaduje dva kofaktory, a to FAD a FMN. Na ně postupně přenáší dva

elektrony z NADPH. Poté jsou elektrony transferovány na [2Fe-2S] klastr proteinu CIAPIN1. Ten interaguje s NBP35 a dodává tak elektrony potřebné pro vznik [4Fe-4S] klastru (Netz et al., 2010). Chaperonový komplex přenášející [2Fe-2S] klastr na CIAPIN1 tvoří GLRX3 interagující s BOLA2, který přispívá ke koordinaci klastru svým His zbytkem. Vznik heterodimeru GLRX3-BOLA2 je závislý na přítomnosti Fe-S centra a bez něj nemůže na rozdíl od homodimeru GLRX3 vzniknout (Frey et al., 2016).

3.2.2 Maturace cílových [4Fe-4S] proteinů

Nově sestavený [4Fe-4S] klastr je v dalším kroku nutné přenést k cílovým apoproteinům, čehož se účastní několik dalších proteinů CIA dráhy. Prvním krokem je přenos klastru ze scaffold komplexu na CIAO3 (dříve IOP1). CIAO3 koordinuje celkem dva [4Fe-4S] klastry pomocí osmi konzervovaných Cys – jeden téměř na povrchu proteinu u N-konce a druhý hluboko ve struktuře proteinu. N-koncový klastr je vázán labilně, což umožňuje jeho další transfer. Experimentální mutace narušující vazbu těchto klastrů v CIAO3 způsobily defekt v maturaci cílových cytosolických a jaderných apoproteinů (Netz et al., 2007; Urzica et al., 2009).

CIAO3 interaguje s komplexy proteinů, které specificky maturují cílové Fe-S proteiny. Takovým komplexem je heterotrimer CIAO1-CIAO2B-MMS19 označovaný jako CIA targeting complex (CTC). CIAO3 interaguje s CTC prostřednictvím CIAO1 (Seki et al., 2013). MMS19 je v CTC klíčový pro maturaci některých Fe-S proteinů účastnících se replikace a oprav DNA. Při mutaci v MMS19 je negativně ovlivněna stabilita genomu, včetně telomer. Cílovými Fe-S proteiny MMS19 jsou například katalytická podjednotka DNA Pol δ POLD1, dihydropyrimidin dehydrogenáza DPYD a helikáza XPD, účastnících se mimo jiné nukleotidové excizní reparace DNA (NER) (Stehling et al., 2012). Jak CIAO1, tak i CIAO2B se vážou na MMS19 prostřednictvím jeho HEAT repetice. Tento motiv je často využíván pro interakce protein-protein. Zdá se, že jedna z možných regulací CTC spočívá v ochraně CIAO2B před degradací právě vazbou s MMS19. Pro interakci s cílovými apoproteiny je potřeba kompletně sestavený CTC. Výjimkou je vazba XPD, která je závislá pouze na HEAT motivu N-konce MMS19 (Odermatt and Gari, 2017).

Pro maturaci ATPasy ABCE1 je navíc ještě vyžadována vazba adaptorového komplexu na CTC. Tento adaptér tvoří heterodimer ORAOV1-YAE1D1 (Paul et al., 2015). Specifická maturace cílových apoproteinů spočívá v různých kombinacích a interakcích jednotlivých složek CTC. Příkladem je maturace antivirálního proteinu viperinu, prováděná proteinem CIAO1. CIAO2B a MMS19 zde mají v komplexu pouze stabilizační efekt, který není esenciální pro vlastní přenos klastru. CIAO2B i MMS19 se vážou na C-konec viperinu. Dalším proteinem, který může být součástí CTC je CIAO2A. Ten se váže na N-konec viperinu, a to zcela nezávisle na ostatních

proteinech CTC. Role CIAO2A je v tomto případě neznámá (Upadhyay et al., 2017). Lépe prozkoumanou funkci zastupuje při maturaci IRP1, kde vytváří komplex s CIAO1. Na tento komplex se je schopen vázat CIAO3 s [4Fe-4S] klastrem. Jelikož CIAO3 dodává klastry na komplexy maturující své cílové apoproteiny, je pravděpodobně posledním proteinem CIA dráhy účastnící se maturace všech cytosolických a jaderných Fe-S proteinů (Maione et al., 2020).

3.3 SUF dráha

Dráha mobilizace síry (sulfur mobilization pathway – SUF) byla objevena u *Escherichia coli* v roce 2002. V bakteriích je dráha kódována operonem *suf*. Objev iniciovalo pozorování maturace malého množství Fe-S proteinů i při vyřazení bakteriální ISC dráhy. Ke vzniku dráhy SUF došlo u fotosyntetizujících bakterií pravděpodobně za účelem podpořit funkce tzv. housekeeping dráhy ISC při oxidativních podmínkách fotosyntézy. Takové podmínky mohou klastry poškozovat. Dráha SUF patrně může být při odpovědi na takové poškození upregulována. S objevem bakteriální dráhy SUF byly postupně objeveny homologní proteiny i u archeí a eukaryot. Dráha SUF probíhá u eukaryot pouze v plastidech, kam se dostala od bakteriálního předka. Geny pro SUF jsou u eukaryot kódovány přímo v plastidových genomech, anebo v jaderném genomu, kam se z plastidu přesunuly. SUF dodává Fe-S klastry plastidovým Fe-S proteinům a stala se tak v pořadí třetí známou drahou biogeneze Fe-S klastrů (po ISC a NIF) (Takahashi and Tokumoto, 2002).

Kromě klasických plastidů funguje SUF také v apikoplastech parazitických apikomplex, kam patří například *Plasmodium* spp. způsobující malárii nebo *Toxoplasma gondii* způsobující toxoplazmózu. Pro dokončení jejich životního cyklu je SUF esenciální (Haussig et al., 2014). Apikoplast je již nefotosyntetizující redukovaný plastid vzešlý ze sekundární endosymbiozy Rhodophyt (Fast et al., 2001). Většina poznatků o eukaryotické dráze SUF však pochází z rostlinného modelového organismu *Arabidopsis thaliana*.

Narozdíl od popsané interakce mezi CIA a ISC drahou, není u eukaryot v současnosti známé propojení se systémem SUF, který zřejmě funguje zcela autonomně. Možným vysvětlení této situace by mohl být fakt, že k vytvoření plastidu z endosymbiotické bakterie došlo až po vzniku mitochondrie, a tedy až po propojení mezi cytosolickou CIA a mitochondriální ISC drahou (Bernard et al., 2013). Odlišná situace je ale u bakterií, kde dráhy SUF a ISC běží vedle sebe a jejich funkce jsou z velké části stejné. Z mechanismu regulace jejich indukce vyplývá, že dráha ISC plní housekeeping funkci. To znamená, že se stará o maturaci naprosté většiny Fe-S proteinů za standardních podmínek a upregulace nastává pouze při celkové poruše biosyntézy Fe-S klastrů v buňce. Dráha SUF je silně aktivní zejména jako odpověď na oxidativní stres nebo nedostatek železa (Outten et al., 2004).

Výjimkou striktně plastidové lokalizace je eukaryotický jednobuněčný parazit *Blastocystis*, který využívá v cytosolu vedle CIA právě SUF, respektive její část – fúzní protein SufCB. *Blastocystis* nemá klasickou mitochondrii, nýbrž její redukovanou formu – MRO. Tato organela ale stejně jako klasická mitochondrie syntetizuje Fe-S klastry ISC drahou. Fúzní protein SufCB *Blastocystis* pravděpodobně získal horizontálním genovým přenosem z archeí řádu Methanomicrobiales, což

mohlo být výhodou při přechodu k parazitismu. *Blastocystis* je sice anaerobní, ale během životního cyklu přichází do kontaktu s kyslíkem. Podobně jako u bakterií je i zde míra exprese genu pro SufCB zvýšena při odpovědi na oxidativní stres (Tsaousis et al., 2012). Utilizace SUF některými parazity představuje možnost cílené léčby, jelikož se právě tímto odlišují od živočišných buněk hostitele.

Další výjimku striktní lokalizace SUF dráhy do plastidů představují oxymonády. To je skupina protist, která pravděpodobně během evoluce sekundárně ztratila jakoukoliv formu mitochondrie a s ní i celou ISC dráhu. Maturace jejich Fe-S proteinů je zajištěna částečně redukovanou drahou CIA a SUF, která nejspíše nahrazuje funkce ISC – zejména může zajišťovat síru pro stavbu klastrů. Komponenty obou drah lokalizují do cytosolu. Oxymonády mohli získat dráhu SUF pomocí horizontálního genového přenosu (HGT) z bakterií (Karnkowska et al., 2016).

Podobně jako u ostatních mechanismů biogeneze Fe-S klastrů je obecný mechanismus dráhy SUF rozdělen do dvou fází: (1) stavba Fe-S klastru na scaffold komplexu a (2) přesun klastru a maturace specifických cílových apoproteinů.

3.3.1 De novo syntéza klastrů

Stejně jako při *de novo* syntéze klastrů v mitochondriích je nutné importovat železo a získat síru i pro *de novo* stavbu klastrů v plastidech.

Import železa do stroma plastidu, kde je SUF dráha lokalizována, není dosud dobře prozkoumán a v tomto směru je potřeba dalšího výzkumu. Jedním z pravděpodobných transportérů železa přes vnitřní membránu plastidu je MFL1, jehož exprese u *A. thaliana* pozitivně koreluje s dostupností železa (Tarantino et al., 2011). Dalším pravděpodobným transportérem je PIC1, jehož absence vede až ke ztrátě thylakoidů, poruše fotosyntézy a ke chloróze, což značí celkové narušení na železe závislých procesů. Mutace *pic1* se projevuje také sníženou mírou biogeneze plastidových Fe-S klastrů (Duy et al., 2007). Třetím možným transportérem je NAP14, homolog bakteriálního FutC. *A. thaliana* mutantní v *nap14*. Vykazuje podobný fenotyp jako v případě výše popsané nefunkčnosti PIC1. V bakteriálním systému je FutC součástí komplexu FutABC přenašeče a vykazuje ATPázovou aktivitu. FutA váže železo, FutB vytváří transmembránový kanál. Homology proteinů FutA ani FutB nebyly u *A. thaliana* nalezeny a není tedy jasné, jakou roli hraje osamocený NAP14 (Shimoni-Shor et al., 2010).

Síru pro vznik klastru zprostředkovává PLP dependentní L-cystein desulfuráza NFS2 (dříve také SufS nebo NifS, dle bakteriální SUF dráhy) patřící do stejné skupiny jako NFS1, která figuruje v ISC (viz 3.1.1). Reakce je také stejná – přeměna L-cysteinu na L-alanin za vzniku persulfidu.

NFS2 tvoří homodimer, nicméně obě podjednotky mají své aktivní místo, ve kterém vzniká persulfid (Roret et al., 2014).

Pro aktivitu NFS2 je zásadní vazba SUFE1. Dohromady tak vzniká desulfurázový komplex NFS2₂-SUFE1₂. Vazba SUFE1 zásadně zvyšuje jak rychlost reakce, tak afinitu k substrátu. Sufe1 nese konzervovaný Cys zbytek, na který se přenáší persulfid z NFS2. Vzhledem k uzavřené konformaci NFS2 je třeba, aby byl akceptorový Cys zbytek SUFE1 mobilní a dostal se blízko aktivnímu místu NFS2, což jeden ze strukturálních modelů potvrzuje (Ye et al., 2006; Roret et al., 2014). Byly identifikovány ještě dva další aktivátory NFS2 – SUFE2 a SUFE3. Mutace vyřazující funkci SUFE1 a SUFE3 jsou embryonálně letální. SUFE3 se mimo jiné účastní biosyntézy NAD. Pro tuto funkci vyžaduje [4Fe-4S] klastr, který může být sestaven přímo na SUFE3 jen za přítomnosti substrátů a NFS2 (Murthy et al., 2007).

K vlastnímu sestavení klastru slouží scaffold komplex SUFBC₂D. Stejný scaffold komplex funguje i v bakteriální SUF dráze. Zvláště důležitý je SUFB, protože míra exprese ostatních podjednotek je závislá právě na expresi *SUFB*. Metodou RNA interference (RNAi) bylo stanoveno, že každá podjednotka je pro maturaci plastidových Fe-S proteinů esenciální. Narušením scaffold komplexu RNAi vzniká podobný fenotyp jako v případě nefunkčnosti desulfurázového komplexu (Hu et al., 2017).

Přesný mechanismus vzniku klastru není v současnosti dobře charakterizován. Informace chybí především u eukaryot. Detailněji byl studován u bakterií, a proto se následující část textu obrací právě tam. SufB i SufC mají ATPázovou aktivitu. SufB přebírá od SufE síru. Dle modelu mechanismu se SufD váže jen volně. Tato vazba je podstatná pouze pro předání železa na SufB. Pro tento proces je klíčová i ATPázová aktivita SufC. Dosud ovšem není jasné, jaký typ klastru na scaffold komplexu vzniká. Byl detekován jak [4Fe-4S], tak [3Fe-4S] klastr, nikoliv však [2Fe-2S]. *In vitro* byl pozorován vznik alternativních komplexů SufB₂C₂. Není tedy jasné, zda [2Fe-2S] centra nevznikají *in vivo* na takovémto komplexu (Saini et al., 2010).

Publikace Blanc et al. (2014) dokládá vznik [2Fe-2S] klastru na samotném SufB *in vitro*. Tento klastr na SufB lze redukčně fúzovat s druhým za vzniku [4Fe-4S] klastru. Na scaffold komplex se váže FADH₂, jehož role je také předmětem diskuse. Postulovaný model navrhuje využití FADH₂ pro redukci železa nebo persulfidu, případně pro fúzní reakci. Funkci FADH₂ může *in vitro* nahradit NADPH a je tedy otázkou, jak systém funguje *in vivo* (Saini et al., 2010). V úvahu připadá ferredoxin, který je v plastidech i apikoplastech lokalizován a je využíván v jiných klíčových biochemických drahách. Z tohoto důvodu není snadné prokázat jeho funkci v samotné dráze SUF, poukázat lze ale na jeho obdobné využití v ISC dráze mitochondrií (viz 3.1.1) (Akuh et al., 2022).

3.3.2 Přenos klastrů k cílovým apoproteinům

Stejně jako v cytosolu, jádře nebo mitochondrii vyžadují i plastidové apoproteiny pro svou maturaci specifické carrier proteiny. Většina z nich jsou funkčními homology carrier proteinů ISC dráhy. V chloroplastech *A. thaliana* jsou NFU1 (jde o jiný protein nežli NFU1 v ISC dráze, nicméně oba patří do stejné rodiny proteinů), NFU2 a NFU3. NFU2/3 doručují [4Fe-4S] klastry podjednotkám fotosystému I (PSI) a nejspíše i dalším Fe-S proteinům. Jejich mutace má negativní efekt také na fotosystém II (PSII), velikost rostliny a na syntézu chlorofylu. NFU1 je patrně schopen přenosu [2Fe-2S], [3Fe-4S] i [4Fe-4S] klastrů. Jeho mutace se nejvíce projevuje nižší aktivitou PSI, který využívá [4Fe-4S] klastry. Downstream od NFU2/3 působí HCF101, další carrier protein, který možná slouží jako adaptor pro určitou podmnožinu cílových apoproteinů specifických pro NFU2/3 (Touraine et al., 2019; Satyanarayan et al., 2021).

Mezi carrier proteiny se řadí také SUFA (Chahal et al., 2009), který však v *P. berghei* nezastává esenciální roli a jeho ztráta nepřináší změnu fenotypu. Jeho role v maturaci apoproteinů je tedy otázkou (Haussig et al., 2014).

V chloroplastech *A. thaliana* byl detekován IBA57.2, ortholog carrier proteinu IBA57 ISC dráhy (Waller et al., 2012). Další výzkum funkce IBA57.2 zatím chybí.

Funkci carrier proteinů zastávají také dva glutaredoxiny GRXS14 a GRXS16. Oba jsou schopné nést [2Fe-2S] klastr a při experimentální lokalizaci do mitochondrií jsou schopné nahradit funkci mitochondriálního GLRX5. Klastr koordinují jakožto homodimer za pomoci dvou molekul GSH. Každý monomer má jeden konzervovaný Cys zbytek. GRXS14 *in vitro* maturuje ferredoxin (Bandyopadhyay et al., 2008). Funkce obou glutaredoxinů se nejspíš vzájemně překrývá, jelikož vliv na růst *A. thaliana* má pouze současné vyřazení GRXS14 a knock-down GRXS16 (Rey et al., 2017).

Stejně jako v mitochondriích, tak i v plastidech interagují glutaredoxiny s proteiny BOLA. V chloroplastech *A. thaliana* jsou BOLA zastoupeny dvěma isoformami – BOLA1 a BOLA4. Obě komplementují funkci mitochondriálních BOLA1/3. Plastidové BOLA tvoří heterodimery s GRXS14/16 a mají konzervovaný His zbytek, což naznačuje koordinaci Rieskeho [2Fe-2S] klastru (Dhalleine et al., 2014; Uzarska et al., 2018).

3.4 NIF dráha

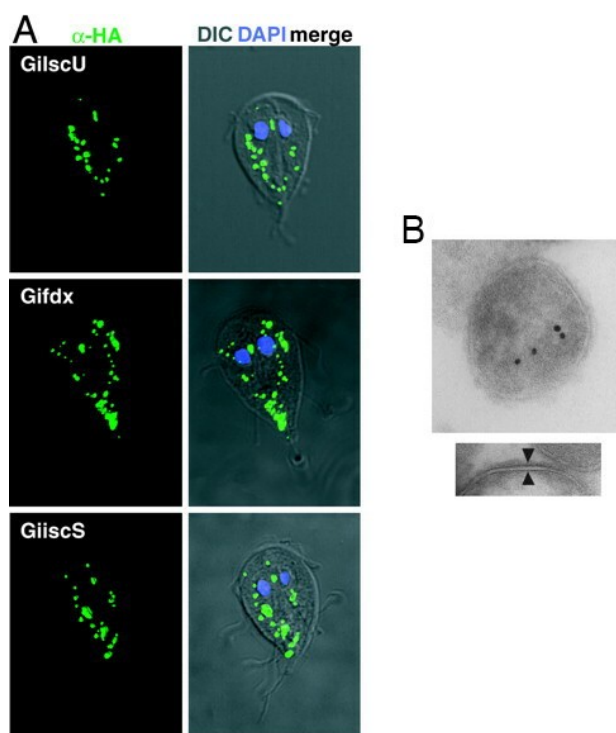
Prvním přímým důkazem existence dráhy NIF (nitrogen fixation), která primárně slouží k maturaci nitrogenázy v bakteriích fixujících dusík, byl popis funkce proteinu NifS. Jedná se o PLP dependentní L-cystein desulfurázu fungující obdobně jako desulfurázy v ISC nebo SUF. NifS funguje jako homodimer (Zheng et al., 1993). Funkci scaffold proteinu zastupuje v dráze NIF protein NifU (Ali et al., 2004). U eukaryot byla dráha NIF zatím objevena pouze u *Entamoeba histolytica* a *Mastigamoeba balamuthi*, anaerobních protist patřících do říše Amoebozoa. *M. balamuthi* využívá redukovanou CIA a NIF dráhu, která je lokalizována jak v hydrogenosomech, které jsou jedním z typů MRO, tak v cytosolu. Dráhu NIF zde zastupuje desulfuráza NifS a scaffold NifU (Nývtová et al., 2013). U *E. histolytica* byla identifikována jen dráha NIF, sestávající z NifS a NifU lokalizovaných v cytosolu. NifU v tomto organismu tvoří tetramer. V *E. coli* s vyřazenou ISC a SUF drahou byly tyto dva proteiny za anaerobních podmínek schopné maturovat Fe-S proteiny. Do eukaryot se geny *nif* dostaly nejspíše pomocí HGT z ϵ -proteobakterií (Ali et al., 2004).

NifU se skládá ze tří domén. N-koncová doména je podobná ISCU a může vázat [2Fe-2S] klastr. C-koncová doména je podobná NFU a váže [4Fe-4S] klastr. Mezi nimi je doména podobná feredoxinu vázající [2Fe-2S] klastr. Redukovaný klastr na N-koncové doméně lze fúzovat s druhým za vzniku [4Fe-4S] klastru. Elektrony potřebné pro redukci zřejmě dodává feredoxinová doména (Braymer et al., 2021).

4 Odlišnosti biogeneze Fe-S klastrů u *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis je parazitický protist patřící do diplomonád. Mezi hostitele se řadí i člověk. Stádium trofozoita žije v tenkém střevě hostitele za anaerobních podmínek a způsobuje onemocnění giardiózu. Infekčním stadiem jsou cysty, které odchází z těla hostitele se stolicí a mohou tak kontaminovat zdroje potravy nebo vody (Ali and Hill, 2003).

První studie řadili *G. intestinalis* k amitochondriálním organismům, ale později byly pozorovány mitosomy, které představují nejjednodušší typ MRO. Stejně jako mitochondrie mají dvojitou membránu, ovšem jejich biochemická funkce je značně omezena. Je zde lokalizována pouze redukovaná, nicméně funkční ISC dráha (**Obr. 4**). Biogeneze Fe-S klastrů tak může tvořit zásadní a často jediný selekční tlak na zachování nějaké formy mitochondriální organely (Tovar et al., 2003).



Obrázek 4: (A) Lokalizace *LscU*, feredoxinu (*fdx*) a *LscS* do mitosomů *G. intestinalis*. Specifické značení těchto proteinů pomocí myší protilátky α -HA má zelenou barvu, modře jsou obarveny jádra pomocí DAPI. (B) Elektronová mikroskopie mitosomu se značeným *LscU* zlatem. Šipky ukazují na dvojitou membránu mitosomu. Adaptováno podle Dolezal et al., (2005).

Funkční redukce mitosomální ISC dráhy spočívá v absenci proteinů IND1, IBA57, frataxinu a ISCA1 (přítomna je isoforma ISCA2). Ztráta IND1, IBA57 a ISCA1 koreluje se ztrátou Fe-S proteinů, jejichž maturace se tyto carrier proteiny účastní. Proteomická data neukazují ani na přítomnost feredoxin reduktázy, která ve standardní ISC dráze redukuje feredoxin za využití NADPH (viz 3.1). Samotný feredoxin je v mitosomech přítomen a není tedy jasné, jakým

způsobem je po poskytnutí elektronů redukován. ABC transportéry podobné Atm1, jenž je klíčový pro export molekuly X-S do cytosolu, byly sice v genomu *G. intestinalis* popsány, ale nemají důležitý strukturální motiv typický pro tento transportér všech ostatních zkoumaných organismů. Erv1, který zastupuje funkci v intermembránovém prostoru mitochondrie pravděpodobně v návaznosti na Atm1 také není v mitosomech *G. intestinalis* lokalizován (Jedelský et al., 2011).

G. intestinalis využívá také CIA dráhu, která ale postrádá proteiny Tah18, Dre2, MMS19 a CFD1. U eukaryot využívajících ISC a CIA dráhu zprostředkovává veškerou síru pro stavbu klastrů mitochondriální desulfuráza. Ani u *G. intestinalis* nebyla detekována cytosolická desulfuráza a je tedy zřejmé, že propojení mezi ISC a CIA musí fungovat i zde. Možnost představuje protein Cia2 (homolog CIAO2A/B), který lokalizuje v *G. intestinalis* jak do cytosolu, tak do intermembránového prostoru mitosomu (Pyrih et al., 2016). Další možností je existence dosud neznámé interakce mezi pozdní ISC a CIA dráhou. Jelikož mitosomy *G. intestinalis* nenesou žádné známé proteiny využívající [4Fe-4S] klastry, nabízí se otázka, proč je pozdní ISC dráha zachována. Při experimentální delecí BOLA, jež je součástí pozdní ISC dráhy, došlo ke snížení aktivity cytosolického [4Fe-4S] enzymu PFOR (Motyčková et al., 2022). V tomto směru je ale zapotřebí dalšího výzkumu. Abnormalitou je také existence tří genů pro NBP35 a interakce produktů dvou z nich s vnější mitosomální membránou (Pyrih et al., 2016).

5 Závěr

Mechanismy biogeneze Fe-S klastrů představují u eukaryot komplexní biochemické dráhy. Jejich výsledkem je nejen produkce různých typů Fe-S klastrů, ale i specifická maturace proteinů, jež tyto klastry vyžadují pro svou často esenciální roli v buněčném metabolismu. Je patrné, že tyto mechanismy jsou evolučně konzervovány od bakterií až po člověka. Regulace mechanismů biogeneze Fe-S klastrů v kontextu s ostatními biochemickými drahami eukaryotické buňky představuje další stupeň komplexity, což tato práce pouze nastiňuje například u dráhy SUF, která může být součástí buněčných odpovědí na stresové faktory.

Dráha SUF je u eukaryot v současné době poměrně málo prozkoumaná a další studium by umožnilo lepší pochopení nejen její role v plastidech a ve fyziologii rostlin, ale také by mohlo najít další cesty cíleného boje proti parazitům z řad apikomplex.

Naopak nejvíce studované jsou tzv. housekeeping dráhy ISC a CIA, které jsou pro eukaryota naprosto esenciální. Během evoluce eukaryot došlo k funkčnímu napojení CIA dráhy na mitochondriální ISC dráhu, čímž se zprostředkovala distribuce Fe-S klastrů do dalších kompartmentů buňky. Funkční propojení obou drah je pro životaschopnost buněk naprosto zásadní. Hlavním důvodem propojení je zřejmě metabolismus síry, jelikož CIA dráha nevyužívá enzymu desulfurasy, který uvolňuje elementární síru přeměnou L-cysteinu na L-alanin. Výsledky některých publikací ukazují v tomto ohledu na silný selekční tlak, který udržuje u organismů na cestě ke ztrátě mitochondrie alespoň její redukovanou formu. Definitivní potvrzení této teorie nicméně vyžaduje další výzkum. Studium dalších organismů jako je *G. intestinalis*, využívajících často redukované či minimální biochemické dráhy, může být obzvláště výhodné pro stanovení významu a funkce klíčových komponentů systémů jako je právě biogeneze Fe-S klastrů.

Závislost na těchto drahách lze patrně obejít pomocí dráhy NIF, která byla ale zatím objevena pouze u dvou eukaryotických organismů. Z tohoto důvodu se funkční charakterizace této dráhy opírá zejména o bakteriální systém, kde primárně slouží při tvorbě komplikovaného klastru nitrogenázy.

Žádný z mechanismů biogeneze Fe-S klastrů tedy stále není zcela pochopen a tato problematika je předmětem probíhajícího výzkumu. Zásadní otázkou společnou pro všechny dráhy je způsob, jakým je pro stavbu klastrů dodáváno železo. Současně s rozvojem poznání těchto mechanismů se pozornost upírá na funkce samotných Fe-S center v maturovaných proteinech, například v metabolismu DNA. Tímto směrem se tak zřejmě bude ubírat další vědecký výzkum včetně naší laboratoře.

Seznam použitých zkratek

4'-PP	4'-fosfopantetein
c-ISC	cytosolické dráha ISC
CIA	Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly
CTC	CIA targeting complex
DNA Pol	DNA polymeráza
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
ETC	elektron-transportní řetězec
GSH	glutathion
HGT	horizontální genový přenos
IREs	iron response elements
ISC	Iron-Sulfur Cluster assembly
Kryo-EM	kryo-elektronová mikroskopie
LECA	poslední společný předek všech eukaryotických organismů
LIAS	syntetáza kyseliny lipoové
MRO	od mitochondrie odvozené organely
NIF	nitrogen fixation
PCD	programovaná buněčná smrt
PLP	pyridoxal 5'-fosfát
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
RNAi	RNA interference
ROS	volné kyslíkové radikály
SUF	Sulfur mobilization pathway

Seznam použité literatury

- Adam, A.C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W., Hell, K., 2006.** The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.* 25, 174–183. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600905>
- *Akuh, O.-A., Elahi, R., Prigge, S.T., Seeber, F., 2022.** The ferredoxin redox system – an essential electron distributing hub in the apicoplast of Apicomplexa. *Trends Parasitol.* 38, 868–881. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.08.002>
- *Ali, S.A., Hill, D.R., 2003.** *Giardia intestinalis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 453.
- Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., Nozaki, T., 2004.** An Intestinal Parasitic Protist, *Entamoeba histolytica*, Possesses a Non-redundant Nitrogen Fixation-like System for Iron-Sulfur Cluster Assembly under Anaerobic Conditions*. *J. Biol. Chem.* 279, 16863–16874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313314200>
- Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Del Conte, R., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., Winkelmann, J., 2014.** [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6203–6208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400102111>
- 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., Rouhier, N., 2008.** Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* 27, 1122–1133. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.50>
- Beinert, H., Lee, W., 1961.** Evidence for a new type of iron containing electron carrier in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5, 40–45. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(61\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(61)90077-8)
- Bernard, D.G., Netz, D.J.A., Lagny, T.J., Pierik, A.J., Balk, J., 2013.** Requirements of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway in *Arabidopsis*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368, 20120259. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0259>
- Biederbick, A., Stehling, O., Rösser, R., Niggemeyer, B., Nakai, Y., Elsässer, H.-P., Lill, R., 2006.** Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5675–5687. <https://doi.org/10.1128/MCB.00112-06>
- Blahut, M., Wise, C.E., Bruno, M.R., Dong, G., Makris, T.M., Frantom, P.A., Dunkle, J.A., Outten, F.W., 2019.** Direct observation of intermediates in the SufS cysteine desulfurase reaction reveals functional roles of conserved active-site residues. *J. Biol. Chem.* 294, 12444–12458. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009471>
- Blanc, B., Clémancey, M., Latour, J.-M., Fontecave, M., Ollagnier de Choudens, S., 2014.** Molecular Investigation of Iron-Sulfur Cluster Assembly Scaffolds under Stress. *Biochemistry* 53, 7867–7869. <https://doi.org/10.1021/bi5012496>
- Boniecki, M.T., Freibert, S.A., Mühlhoff, U., Lill, R., Cygler, M., 2017.** Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01497-1>

- Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., Vickery, L.E., 2011.** Facilitated Transfer of IscU–[2Fe2S] Clusters by Chaperone-Mediated Ligand Exchange. *Biochemistry* 50, 9641–9650. <https://doi.org/10.1021/bi201123z>
- *Braymer, J.J., Freibert, S.A., Rakwalska-Bange, M., Lill, R., 2021.** Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1868, 118863. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118863>
- Bych, K., Kerscher, S., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Zwicker, K., Huynen, M.A., Lill, R., Brandt, U., Balk, J., 2008a.** The iron–sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J.* 27, 1736–1746. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.98>
- Bych, K., Netz, D.J.A., Vigani, G., Bill, E., Lill, R., Pierik, A.J., Balk, J., 2008b.** The Essential Cytosolic Iron-Sulfur Protein Nbp35 Acts without Cfd1 Partner in the Green Lineage*. *J. Biol. Chem.* 283, 35797–35804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807303200>
- Camponeschi, F., Prusty, N.R., Heider, S.A.E., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2020.** GLRX3 Acts as a [2Fe–2S] Cluster Chaperone in the Cytosolic Iron–Sulfur Assembly Machinery Transferring [2Fe–2S] Clusters to NUBP1. *J. Am. Chem. Soc.* 142, 10794–10805. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c02266>
- Chahal, H.K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., Outten, F.W., 2009.** The SufBCD Fe–S Scaffold Complex Interacts with SufA for Fe–S Cluster Transfer. *Biochemistry* 48, 10644–10653. <https://doi.org/10.1021/bi901518y>
- Chanet, R., Baille, D., Golinelli-Cohen, M.-P., Riquier, S., Guittet, O., Lepoivre, M., Huang, M.-E., Vernis, L., 2021.** Fe-S coordination defects in the replicative DNA polymerase delta cause deleterious DNA replication in vivo and subsequent DNA damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 Bethesda Md* 11, jkab124. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab124>
- Cory, S.A., Van Vranken, J.G., Brignole, E.J., Patra, S., Winge, D.R., Drennan, C.L., Rutter, J., Barondeau, D.P., 2017.** Structure of human Fe–S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP–ISD11 interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E5325–E5334. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702849114>
- Dhalleine, T., Rouhier, N., Couturier, J., 2014.** Putative roles of glutaredoxin-BolA holo-heterodimers in plants. *Plant Signal. Behav.* 9, e28564. <https://doi.org/10.4161/psb.28564>
- Dolezal, P., Smíd, O., Rada, P., Zubáková, Z., Bursac, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T., Tachezy, J., 2005.** Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10924–10929. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500349102>
- Drapier, J. c., Hirling, H., Wietzerbin, J., Kaldy, P., Kühn, L. c., 1993.** Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J.* 12, 3643–3649. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06038.x>
- Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E.A., Marszalek, J., 2004.** Sequence-specific Interaction between Mitochondrial Fe-S Scaffold Protein Isu and Hsp70 Ssq1 Is Essential for Their in Vivo Function*. *J. Biol. Chem.* 279, 29167–29174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402947200>

- Duy, D., Wanner, G., Meda, A.R., von Wirén, N., Soll, J., Philippar, K., 2007.** PIC1, an ancient permease in Arabidopsis chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell* 19, 986–1006. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047407>
- Fast, N.M., Kissinger, J.C., Roos, D.S., Keeling, P.J., 2001.** Nuclear-Encoded, Plastid-Targeted Genes Suggest a Single Common Origin for Apicomplexan and Dinoflagellate Plastids. *Mol. Biol. Evol.* 18, 418–426. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003818>
- Flint, D.H., Tuminello, J.F., Emptage, M.H., 1993.** The inactivation of Fe-S cluster containing hydrolyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268, 22369–22376. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41538-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41538-4)
- Fox, N.G., Yu, X., Feng, X., Bailey, H.J., Martelli, A., Nabhan, J.F., Strain-Damerell, C., Bulawa, C., Yue, W.W., Han, S., 2019.** Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09989-y>
- Freibert, S.-A., Boniecki, M.T., Stümpfig, C., Schulz, V., Krapoth, N., Winge, D.R., Mühlhoff, U., Stehling, O., Cygler, M., Lill, R., 2021.** N-terminal tyrosine of ISCU2 triggers [2Fe-2S] cluster synthesis by ISCU2 dimerization. *Nat. Commun.* 12, 6902. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27122-w>
- Freibert, S.-A., Goldberg, A.V., Hacker, C., Molik, S., Dean, P., Williams, T.A., Nakjang, S., Long, S., Sendra, K., Bill, E., Heinz, E., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., Embley, T.M., Lill, R., 2017.** Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron-sulfur cluster biosynthesis. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms13932>
- Frey, A.G., Palenchar, D.J., Wildemann, J.D., Philpott, C.C., 2016.** A Glutaredoxin-BolA Complex Serves as an Iron-Sulfur Cluster Chaperone for the Cytosolic Cluster Assembly Machinery *♦. *J. Biol. Chem.* 291, 22344–22356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744946>
- Garland, S.A., Hoff, K., Vickery, L.E., Culotta, V.C., 1999.** *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. Edited by S. Reed. *J. Mol. Biol.* 294, 897–907. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3294>
- Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A.B., Botzanowski, T., Müller, C.S., Pecqueur, L., Le Pavec, G., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., Grandas, A., Fontecave, M., Schünemann, V., Cianféroni, S., Sizun, C., Tolédano, M.B., D’Autréaux, B., 2019.** Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11470-9>
- Haile, D.J., Rouault, T.A., Harford, J.B., Kennedy, M.C., Blondin, G.A., Beinert, H., Klausner, R.D., 1992.** Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11735–11739. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11735>
- Haindrich, A.C., Boudová, M., Vancová, M., Diaz, P.P., Horáková, E., Lukeš, J., 2017.** The intermembrane space protein Erv1 of *Trypanosoma brucei* is essential for mitochondrial Fe-S cluster assembly and operates alone. *Mol. Biochem. Parasitol.* 214, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.03.009>

- Haussig, J.M., Matuschewski, K., Kooij, T.W.A., 2014.** Identification of Vital and Dispensable Sulfur Utilization Factors in the Plasmodium Apicoplast. *PLOS ONE* 9, e89718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089718>
- Hu, X., Kato, Y., Sumida, A., Tanaka, A., Tanaka, R., 2017.** The SUFBC2D complex is required for the biogenesis of all major classes of plastid Fe-S proteins. *Plant J.* 90, 235–248. <https://doi.org/10.1111/tpj.13483>
- Iwata, S., Saynovits, M., Link, T.A., Michel, H., 1996.** Structure of a water soluble fragment of the ‘Rieske’ iron–sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure* 4, 567–579. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00062-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00062-7)
- Jedelský, P.L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Šmíd, O., Hrdý, I., Šedinová, M., Marcinčíková, M., Voleman, L., Perry, A.J., Beltrán, N.C., Lithgow, T., Tachezy, J., 2011.** The Minimal Proteome in the Reduced Mitochondrion of the Parasitic Protist *Giardia intestinalis*. *PLOS ONE* 6, e17285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017285>
- Jordan, S.F., Ioannou, I., Rammu, H., Halpern, A., Bogart, L.K., Ahn, M., Vasiliadou, R., Christodoulou, J., Maréchal, A., Lane, N., 2021.** Spontaneous assembly of redox-active iron-sulfur clusters at low concentrations of cysteine. *Nat. Commun.* 12, 5925. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26158-2>
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S.C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L.D., Herman, E.K., Soukal, P., Hroudová, M., Doležal, P., Stairs, C.W., Roger, A.J., Eliáš, M., Dacks, J.B., Vlček, Č., Hampl, V., 2016.** A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle. *Curr. Biol.* 26, 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.053>
- Kim, K.S., Maio, N., Singh, A., Rouault, T.A., 2018.** Cytosolic HSC20 integrates de novo iron–sulfur cluster biogenesis with the CIAO1-mediated transfer to recipients. *Hum. Mol. Genet.* 27, 837–852. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy004>
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., Lill, R., 1999.** The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 18, 3981–3989. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.3981>
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Mühlenhoff, U., Kispal, G., Lill, R., 2001.** An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* 2, 715–720. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve161>
- Lewis, B.E., Mason, Z., Rodrigues, A.V., Nuth, M., Dizin, E., Cowan, J.A., Stemmler, T.L., 2019.** Unique roles of iron and zinc binding to the yeast Fe–S cluster scaffold assembly protein “Tsu1”†. *Metallomics* 11, 1820–1835. <https://doi.org/10.1039/c9mt00172g>
- Li, P., Hendricks, A.L., Wang, Y., Villones, R.L.E., Lindkvist-Petersson, K., Meloni, G., Cowan, J.A., Wang, K., Gourdon, P., 2022.** Structures of Atm1 provide insight into [2Fe-2S] cluster export from mitochondria. *Nat. Commun.* 13, 4339. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32006-8>
- *Lill, R., Freibert, S.-A., 2020.** Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 89, 471–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111540>

- Maione, V., Grifagni, D., Torricella, F., Cantini, F., Banci, L., 2020.** CIAO3 protein forms a stable ternary complex with two key players of the human cytosolic iron–sulfur cluster assembly machinery. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 25, 501–508. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01778-z>
- Malkin, R., Rabinowitz, J.C., 1966.** The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 822–827. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(66\)90561-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(66)90561-4)
- Motyčková, A., Voleman, L., Najdová, V., Marková, L., Benda, M., Dohnálek, V., Janowicz, N., Malych, R., Štuřák, R., Ettema, T.J.G., Svärd, S., Stairs, C.W., Doležal, P., 2022.** The late ISC pathway interactome reveals mitochondrial–cytoplasmic crosstalk in *Giardia intestinalis*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.01.502261>
- *Moulis, J.-M., Davasse, V., Golinelli, M.-P., Meyer, J., Quinkal, I., 1996.** The coordination sphere of iron-sulfur clusters: lessons from site-directed mutagenesis experiments. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 1, 2–14. <https://doi.org/10.1007/s007750050017>
- Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., Lill, R., 2011.** Specialized Function of Yeast Isa1 and Isa2 Proteins in the Maturation of Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins*. *J. Biol. Chem.* 286, 41205–41216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.296152>
- Murthy, N.M.U., Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Abdel-Ghany, S.E., Rousset, C., Ye, H., Fontecave, M., Pilon-Smits, E.A.H., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701428200>
- Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stümpfig, M., Bill, E., Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Walden, W.E., Lill, R., 2012.** A Bridging [4Fe-4S] Cluster and Nucleotide Binding Are Essential for Function of the Cfd1-Nbp35 Complex as a Scaffold in Iron-Sulfur Protein Maturation*. *J. Biol. Chem.* 287, 12365–12378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328914>
- Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stümpfig, M., Mühlenhoff, U., Lill, R., 2007.** The Cfd1–Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat. Chem. Biol.* 3, 278–286. <https://doi.org/10.1038/nchembio872>
- Netz, D.J.A., Stüth, C.M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M.J., Pierik, A.J., 2011.** Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* 8, 125–132. <https://doi.org/10.1038/nchembio.721>
- Netz, D.J.A., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlenhoff, U., Pierik, A.J., Lill, R., 2010.** Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat. Chem. Biol.* 6, 758–765. <https://doi.org/10.1038/nchembio.432>
- Nývtlová, E., Štuřák, R., Harant, K., Šedinová, M., Hrdý, I., Pačes, J., Vlček, Č., Tachezy, J., 2013.** NIF-type iron-sulfur cluster assembly system is duplicated and distributed in the mitochondria and cytosol of *Mastigamoeba balamuthi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7371–7376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219590110>
- Odermatt, D.C., Gari, K., 2017.** The CIA Targeting Complex Is Highly Regulated and Provides Two Distinct Binding Sites for Client Iron-Sulfur Proteins. *Cell Rep.* 18, 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.037>

- Ohki, Y., Imada, M., Murata, A., Sunada, Y., Ohta, S., Honda, M., Sasamori, T., Tokitoh, N., Katada, M., Tatsumi, K., 2009.** Synthesis, Structures, and Electronic Properties of [8Fe-7S] Cluster Complexes Modeling the Nitrogenase P-Cluster. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 13168–13178. <https://doi.org/10.1021/ja9055036>
- Outten, F.W., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04025.x>
- Ozer, H.K., Dlouhy, A.C., Thornton, J.D., Hu, J., Liu, Y., Barycki, J.J., Balk, J., Outten, C.E., 2015.** Cytosolic Fe-S Cluster Protein Maturation and Iron Regulation Are Independent of the Mitochondrial Erv1/Mia40 Import System *. *J. Biol. Chem.* 290, 27829–27840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.682179>
- Pandey, A., Golla, R., Yoon, H., Dancis, A., Pain, D., 2012.** Persulfide formation on mitochondrial cysteine desulfurase: enzyme activation by a eukaryote-specific interacting protein and Fe–S cluster synthesis. *Biochem. J.* 448, 171–187. <https://doi.org/10.1042/BJ20120951>
- Pandey, A., Pain, J., Dziuba, N., Pandey, A.K., Dancis, A., Lindahl, P.A., Pain, D., 2018.** Mitochondria Export Sulfur Species Required for Cytosolic tRNA Thiolation. *Cell Chem. Biol.* 25, 738–748.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.04.002>
- Pandey, A.K., Pain, J., J, B., Dancis, A., Pain, D., 2023.** Essential mitochondrial role in iron-sulfur cluster assembly of the cytoplasmic isopropylmalate isomerase Leu1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion* 69, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2023.02.006>
- Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Le Caer, J.-P., Grandas, A., Toledano, M.B., D’Autréaux, B., 2015.** Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat. Commun.* 6, 5686. <https://doi.org/10.1038/ncomms6686>
- Patel, S.J., Frey, A.G., Palenchar, D.J., Achar, S., Bullough, K.Z., Vashisht, A., Wohlschlegel, J.A., Philpott, C.C., 2019.** A PCBP1–Bola2 chaperone complex delivers iron for cytosolic [2Fe–2S] cluster assembly. *Nat. Chem. Biol.* 15, 872–881. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0330-6>
- Paul, V.D., Mühlenhoff, U., Stümpfig, M., Seebacher, J., Kugler, K.G., Renicke, C., Taxis, C., Gavin, A.-C., Pierik, A.J., Lill, R., 2015.** The deca-GX3 proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08231>
- Pyrih, J., Pyrihová, E., Kolísko, M., Stojanovová, D., Basu, S., Harant, K., Haindrich, A.C., Doležal, P., Lukeš, J., Roger, A., Tachezy, J., 2016.** Minimal cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery of *Giardia intestinalis* is partially associated with mitosomes. *Mol. Microbiol.* 102, 701–714. <https://doi.org/10.1111/mmi.13487>
- *Rees, D.C., 2002.** Great Metalloclusters in Enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 221–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135406>
- Rey, P., Becuwe, N., Tourrette, S., Rouhier, N., 2017.** Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of chlorophyll content. *Plant Cell Environ.* 40, 2319–2332. <https://doi.org/10.1111/pce.13036>

- Roret, T., Pégeot, H., Couturier, J., Mulliert, G., Rouhier, N., Didierjean, C., 2014.** X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 70, 1180–1185. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14017026>
- Saini, A., Mapolelo, D.T., Chahal, H.K., Johnson, M.K., Outten, F.W., 2010.** SufD and SufC ATPase Activity Are Required for Iron Acquisition during in Vivo Fe-S Cluster Formation on SufB. *Biochemistry* 49, 9402–9412. <https://doi.org/10.1021/bi1011546>
- Satyanarayan, M.B., Zhao, J., Zhang, J., Yu, F., Lu, Y., 2021.** Functional relationships of three NFU proteins in the biogenesis of chloroplastic iron-sulfur clusters. *Plant Direct* 5, e00303. <https://doi.org/10.1002/pld3.303>
- Saudino, G., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2022.** Protein-Interaction Affinity Gradient Drives [4Fe–4S] Cluster Insertion in Human Lipoyl Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 144, 5713–5717. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c13626>
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., Craig, E., 1999.** Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10206–10211. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10206>
- Seki, M., Takeda, Y., Iwai, K., Tanaka, K., 2013.** IOP1 Protein Is an External Component of the Human Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly (CIA) Machinery and Functions in the MMS19 Protein-dependent CIA Pathway *. *J. Biol. Chem.* 288, 16680–16689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416602>
- Shaw, G.C., Cope, J.J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G.E., Gwynn, B., Lambert, A.J., Wingert, R.A., Traver, D., Trede, N.S., Barut, B.A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M.J., Peters, L.L., Kaplan, J., Zon, L.I., Paw, B.H., 2006.** Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440, 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature04512>
- Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D.R., Rouault, T.A., 2012.** Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.002>
- Shimoni-Shor, E., Hassidim, M., Yuval-Naeh, N., Keren, N., 2010.** Disruption of Nap14, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in *Arabidopsis thaliana* results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures. *Plant Cell Environ.* 33, 1029–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02124.x>
- Srouf, B., Gervason, S., Hoock, M.H., Monfort, B., Want, K., Larkem, D., Trabelsi, N., Landrot, G., Zitolo, A., Fonda, E., Etienne, E., Gerbaud, G., Müller, C.S., Oltmanns, J., Gordon, J.B., Yadav, V., Kleczewska, M., Jelen, M., Toledano, M.B., Dutkiewicz, R., Goldberg, D.P., Schünemann, V., Guigliarelli, B., Burlat, B., Sizun, C., D’Autréaux, B., 2022.** Iron Insertion at the Assembly Site of the ISCU Scaffold Protein Is a Conserved Process Initiating Fe–S Cluster Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 144, 17496–17515. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06338>
- Stehling, O., Jeoung, J.-H., Freibert, S.A., Paul, V.D., Bänfer, S., Niggemeyer, B., Rösser, R., Dobbek, H., Lill, R., 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. U. S. A.* 115, E9085–E9094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807762115>

- Stehling, O., Vashisht, A.A., Mascarenhas, J., Jonsson, Z.O., Sharma, T., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Wohlschlegel, J.A., Lill, R., 2012.** MMS19 Assembles Iron-Sulfur Proteins Required for DNA Metabolism and Genomic Integrity. *Science* 337, 195–199. <https://doi.org/10.1126/science.1219723>
- Suraci, D., Saudino, G., Nasta, V., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2021.** ISCA1 Orchestrates ISCA2 and NFU1 in the Maturation of Human Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins. *J. Mol. Biol.* 433, 166924. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166924>
- Takahashi, Y., Tokumoto, U., 2002.** A Third Bacterial System for the Assembly of Iron-Sulfur Clusters with Homologs in Archaea and Plastids*210. *J. Biol. Chem.* 277, 28380–28383. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200365200>
- Tarantino, D., Morandini, P., Ramirez, L., Soave, C., Murgia, I., 2011.** Identification of an Arabidopsis mitoferrinlike carrier protein involved in Fe metabolism. *Plant Physiol. Biochem., 15th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants* 49, 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.003>
- ter Beek, J., Parkash, V., Bylund, G.O., Osterman, P., Sauer-Eriksson, A.E., Johansson, E., 2019.** Structural evidence for an essential Fe–S cluster in the catalytic core domain of DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acids Res.* 47, 5712–5722. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz248>
- Touraine, B., Vignols, F., Przybyla-Toscano, J., Ischebeck, T., Dhalleine, T., Wu, H.-C., Magno, C., Berger, N., Couturier, J., Dubos, C., Feussner, I., Caffarri, S., Havaux, M., Rouhier, N., Gaymard, F., 2019.** Iron–sulfur protein NFU2 is required for branched-chain amino acid synthesis in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.* 70, 1875–1889. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz050>
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., Van Der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., Lucocq, J.M., 2003.** Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172–176. <https://doi.org/10.1038/nature01945>
- Tsaousis, A.D., Ollagnier de Choudens, S., Gentekaki, E., Long, S., Gaston, D., Stechmann, A., Vinella, D., Py, B., Fontcave, M., Barras, F., Lukeš, J., Roger, A.J., 2012.** Evolution of Fe/S cluster biogenesis in the anaerobic parasite Blastocystis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10426–10431. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116067109>
- Ugulava, N.B., Sacanell, C.J., Jarrett, J.T., 2001.** Spectroscopic changes during a single turnover of biotin synthase: destruction of a [2Fe-2S] cluster accompanies sulfur insertion. *Biochemistry* 40, 8352–8358. <https://doi.org/10.1021/bi010463x>
- Upadhyay, A.S., Stehling, O., Panayiotou, C., Rösser, R., Lill, R., Överby, A.K., 2017.** Cellular requirements for iron–sulfur cluster insertion into the antiviral radical SAM protein viperin. *J. Biol. Chem.* 292, 13879–13889. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780122>
- Urzica, E., Pierik, A.J., Mühlenhoff, U., Lill, R., 2009.** Crucial Role of Conserved Cysteine Residues in the Assembly of Two Iron–Sulfur Clusters on the CIA Protein Nar1. *Biochemistry* 48, 4946–4958. <https://doi.org/10.1021/bi900312x>
- Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R., Mühlenhoff, U., 2013.** The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol. Biol. Cell* 24, 1830–1841. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-09-0644>

- Uzarska, M.A., Nasta, V., Weiler, B.D., Spantgar, F., Ciofi-Baffoni, S., Saviello, M.R., Gonnelli, L., Mühlenhoff, U., Banci, L., Lill, R., 2016.** Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *eLife* 5, e16673. <https://doi.org/10.7554/eLife.16673>
- Uzarska, M.A., Przybyla-Toscano, J., Spantgar, F., Zannini, F., Lill, R., Mühlenhoff, U., Rouhier, N., 2018.** Conserved functions of Arabidopsis mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1865, 1250–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.003>
- Van Vranken, J.G., Jeong, M.-Y., Wei, P., Chen, Y.-C., Gygi, S.P., Winge, D.R., Rutter, J., 2016.** The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17828>
- Waller, J.C., Ellens, K.W., Alvarez, S., Loizeau, K., Ravanel, S., Hanson, A.D., 2012.** Mitochondrial and plastidial COG0354 proteins have folate-dependent functions in iron–sulphur cluster metabolism. *J. Exp. Bot.* 63, 403–411. <https://doi.org/10.1093/jxb/err286>
- Warui, D.M., Sil, D., Lee, K.-H., Neti, S.S., Esakova, O.A., Knox, H.L., Krebs, C., Booker, S.J., 2022.** In Vitro Demonstration of Human Lipoyl Synthase Catalytic Activity in the Presence of NFU1. *ACS Bio Med Chem Au* 2, 456–468. <https://doi.org/10.1021/acsbioimedchemau.2c00020>
- Weiler, B.D., Brück, M.-C., Kothe, I., Bill, E., Lill, R., Mühlenhoff, U., 2020.** Mitochondrial [4Fe-4S] protein assembly involves reductive [2Fe-2S] cluster fusion on ISCA1–ISCA2 by electron flow from ferredoxin FDX2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 20555–20565. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003982117>
- Wohlrab, H., 2005.** The human mitochondrial transport protein family: Identification and protein regions significant for transport function and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1709, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.07.003>
- Ye, H., Abdel-Ghany, S.E., Anderson, T.D., Pilon-Smits, E.A.H., Pilon, M., 2006.** CpSufE Activates the Cysteine Desulfurase CpNifS for Chloroplastic Fe-S Cluster Formation*. *J. Biol. Chem.* 281, 8958–8969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512737200>
- Yoon, H., Golla, R., Lesuisse, E., Pain, J., Donald, J.E., Lyver, E.R., Pain, D., Dancis, A., 2012.** Mutation in the Fe–S scaffold protein Isu bypasses frataxin deletion. *Biochem. J.* 441, 473–480. <https://doi.org/10.1042/BJ20111637>
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., Dean, D.R., 1998.** Assembly of Iron-Sulfur Clusters. *J. Biol. Chem.* 273, 13264–13272. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13264>
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., Dean, D.R., 1993.** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 2754–2758. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.2754>

Sekundární citace jsou značeny „*“