



**Mitokondriális lokalizációjú fehérjék
funkciójának vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae*-ben**

PhD dolgozat

Bedekovics Tibor

Témavezető:

Dr. Sümegi Balázs

(Dr. Kispál Gyula)

Dr. Grazia Isaya

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvosi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs, 2007.

Tartalom

Rövidítések	3
1. Bevezetés	5
1.1. A Leu5p és a hGP	6
1.2. A frataxin, az Yfh1p és a CyaY	9
2. Célkitűzések	18
3. Anyagok és módszerek	18
4. Eredmények	24
4.1. Leu5p és a hGP funkciója	24
4.1.1. A Leu5p a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el	24
4.1.2. A LEU5 eltávolításának következményei	26
4.1.3. A CoA mitokondriális felhalmozásához Leu5p szükséges	31
4.1.4. A Leu5p és a Cit2p kapcsolata	35
4.1.5. A humán Graves fehérje képes a Leu5p funkciójának átvételére	36
4.2. A CyaY vizsgálata	38
4.2.1 A cyaY eltávolítása és következményei	38
4.2.2 Az E. coli CyaY részben képes az élesztő Yfh1p funkciójának helyettesítésére	41
4.2.2.1 A cyaY expressziója <i>S. cerevisiae</i> -ben	41
4.2.2.2 A cyaY képes a frataxin depletált élesztő komplementálására	45
4.2.2.2 A CyaY képes a hem bioszintézis helyreállítására	50
5. Megbeszélés	52
6. Idézett Irodalom	59
Köszönetnyilvánítás	70
Publikációs lista	71

Rövidítések

ADP	adenozin difoszfát
<i>AFT1/AFT2</i>	vas érzékeny transzkripciós faktorok
ATP	adenozin trifoszfát
CCCP	karbonil cianid 3-klorofenilhidrazon
<i>CIT1, CIT2</i>	mitokondriális illetve peroxiszómális citrát szintáz kódoló gének
CoA	koenzim A
<i>cyaY, CyaY</i>	<i>E. coli</i> frataxin homológ gén, ill. fehérje
DNS	dezoxiribonukleinsav
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	flavin adenin dinukleotid
FRDA	Friedreich ataxia
GalP	galaktóz promóter
hGP	humán Graves fehérje
IPMS	α -izopropil malát szintáz
α -IPM	α -izopropil-malát
β -IPM	β -izopropil-malát
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
α -KIC	α -ketoizokapronsav
α -KIV	α -ketoizovaleriánsav

<i>lacZ</i>	β -galaktozidáz operon Z génje
<i>LEU4, LEU5</i>	α -izopropilmalát szintáz kódoló gén és feltételezet analógja
MDH	malát dehidrogenáz
MPP	mátrix, vagy mitokondriális processzing peptidáz
mtDNA	mitokondriális DNS
PCR	polimeráz láncreakció
PMS	mitokondrium preparálás során az a sejtfrakció, amelyből a mitokondriumot eltávolítottuk (Post Mitochondrial Supernatant)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (proteáz inhibitor)
pSu9-DHFR	F1/Fo ATP-áz 9-es alegységének targeting szekvenciája a dehidrofolát reduktázhoz fúzionálva (modell fehérje mitokondrium importhoz)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD, SG	élesztő minimál médium, D: glükóz, G: galaktóz szénforrásokkal
SDH	szukcinát dehidrogenáz
Tim22p	mitokondrium belsőmembrán transzlokáz
<i>YFH1, Yfh1p</i>	élesztő frataxin homológ gén, ill. fehérje
YPD, YPg, YPE	gazdag élesztő táptalaj D: glükóz, g: glicerin, E: etanol szénforrásokkal

1. Bevezetés

A molekuláris biológia területén elterjedt módszer különböző organizmusokból származó fehérje analógok funkciójának vizsgálata egyszerű modell sejtek felhasználásával. A modellsejt alkalmazásának két előnyét használhatjuk fel, az egyik, amikor az eredeti organizmus, bonyolult felépítése nem teszi lehetővé gén manipuláció alkalmazását, a másik, amikor egyszerűbb organizmusnál tapasztalt jelenségek felhasználása segíthet a funkció magyarázatában. Az ilyen jellegű vizsgálatokhoz az egyik leggyakrabban használt modell szervezet az egyszerű péklesztő (*Saccharomyces cerevisiae*). Ez a modell sejt magában hordozza mindazokat az előnyöket, amelyeket egy egyszerű organizmus a kutatók számára nyújthat: gyors replikáció, egyszerű kezelhetőség és viszonylag könnyű génmanipuláció. Szintén alkalmas azonban bonyolultabb folyamatok vizsgálatára is, hiszen itt már számos olyan szubcelluláris szervecske is megtalálható, mint az emlős sejtekben, így pl. a sejtmag vagy a mitokondrium.

A dolgozat két fehérje homológ pár, a humán eredetű Graves (hGP) fehérje, homológja az élesztő Leu5p, valamint az *Escherichia Coli* eredetű CyaY és élesztő homológja az Yfh1p funkciójának vizsgálatára épül.

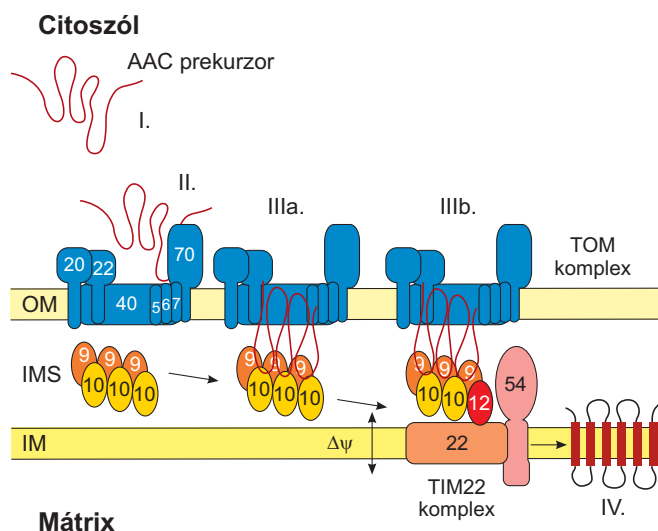
1.1. A Leu5p és a hGP

A mitokondrium számos létfontosságú folyamat lezajlásának színtere, mint pl. az oxidatív foszforiláció, a citrátkör, a β -oxidáció továbbá részben itt zajlik az urea ciklus, a hem és néhány aminosav szintézise is (Tzagoloff, 1982; de Winde & Grivell, 1993; Dickinson, 1999). A mitokondrium metabolikus aktivitása bizonyos molekulák gyors és specifikus szállítását teszi szükségessé a mátrix és a citoszól között, mivel a mitokondrium membránjai, elsősorban a belső membrán ezen komponensek számára átjárhatatlan. Erre a célra viszonylag nagy számú transzport fehérje áll rendelkezésre, amiknek egy speciális csoportja az ún. mitokondriális hordozók amelyek a mitokondrium belső membránján keresztül szállítanak (Walker & Runswick, 1993; Klingenberg & Nelson, 1994; el Moulaj *et al.*, 1997; Fiore *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 2000). Ehhez a csoporthoz tartoznak az olyan fehérjék, amiknek feladata az ADP és ATP kicserélése valamint az olyan anyagok szállítása, mint pl. a foszfát, citrát, karnitin, dikarbonsavak, aminosavak, FAD és proton. Ezek a hordozófehérjék sokban különböznek más mitokondriális fehérjéktől, így pl. nem tartalmaznak mitokondriális targeting szekvenciát, hanem speciális úton kerülnek át a mitokondrium külső membránján, a membrán közötti téren és a belső membránba, különböző import fehérjék segítségével épülnek be (Koehler *et al.*, 1999; Truscott & Pfanner, 1999; Bauer *et al.*, 2000). Transzportra alkalmas formájukban, dimereket alkotnak (Schroers *et al.*, 1998). A monomerek három homológ szakaszból épülnek fel, amelyek mindegyike két-két transzmembrán szegmenst tartalmaz. A fehérje

mindkét vége (az N és a C terminális) a membránközi tér felé fordul. A hordozó fehérjék aminosav szekvenciája 20-40%-ban megegyezik, beleértve egy sajátos egyedi darabkát, amely mindegyik, a mátrix felé forduló hurkon megtalálható. Ez a speciális darab mind a hordozó megfelelő működéséhez, mind pedig a belső membránhoz történő rögzítéséhez szükséges. Az 1. Ábrán a mitokondriális hordozók importja, beépülése a mitokondrium belső membránjába és a beágyazódott fehérje vázlatos szerkezete látható az ADP/ATP (AAC) hordozó példáján (Bauer *et al.*, 2000).

Élesztőben eddig összesen 35 hordozófehérjét találtak az elsődleges szerkezet jellemzői alapján (el Moualij *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 2000), mindezekből azonban csupán 13 fehérje szubsztrátját azonosították, amelyek az ADP/ATP, foszfát, különféle citrátköri intermedierek, karnitin, aminosavak és a FAD. A *S. cerevisiae* YHR002w génje egy olyan fehérjét (P38702) kódol, ami szintén tartalmazza a hordozófehérjék az előbbieken felsorolt sajátosságait (Nelson *et al.*, 1998). Ennek a fehérjének a legnagyobb aminosav szekvencia azonosságot mutató homológjai, a hGP, (35 % azonos aminosav összetétel (Zarrilli *et al.*, 1989)), egy marha homológja (37%, (Fiermonte *et al.*, 1992)) és egy *Saccharomyces pombe* fehérje az O13805 (46%). A *S. cerevisiae* YHR002w génjét korábban már klónozták (Drain & Schimmel, 1986) azzal a céllal, hogy egy második α -izopropilmalát szintázt izoláljonak a már jól jellemzett Leu4p mellé (Chang *et al.*, 1984), ekkor ez a gén a LEU5 elnevezést kapta. Ez a kísérlet azon a megfigyelésen alapult, hogy a Δ leu4 mutáns önmagában nem, de a Δ leu4 Δ leu5 kettős mutáns már leucin hozzáadását

igényelte a növekedéshez, ezért feltételezték, hogy a *LEU5* egy Leu4p analógot kódol. A *LEU5* szekvencia analízise kapcsán felmerült az a lehetőség is, hogy a fe-



1. Ábra. Az ADP/ATP hordozó (AAC) ájtuttatása a mitokondrium membránközi térén (IMS) és beépülése a belső membránba (Bauer *et al.*, 2000).

Az AAC prekuzort a citoszólban (I. fázis) először a Tom70 ismeri fel (II. fázis), majd az import csatornához továbbítja, ahol részlegesen áthatol a külső membránon (OM). A teljes áthatolást az AAC és a TOM komplex közötti kölcsönhatás gátolja meg. A következő fázisban (IIIa.) a már ájtutott modulokat a Tim9-10 komplex ragadja meg és tartja a membránközi térben (IMS), majd ezt követően az AAC a Tim9-10 komplexről a belső membrán (IM) Tim9-10-12 komplexére kerül (IIIb. fázis). Ekkor a hordozót még mindig tartja a TOM komplex, amely azt csak akkor engedi el, és a hordozó csak akkor tud a belső membránba ágyazódni, ha megfelelő membránpotenciál ($\Delta\psi$) van jelen és azt egy működőképes TIM22 komplex segíti elő.

hérje a belső membránba ágyazódott is lehet és esetleg nincs közvetlen szerepe a leucin szintézisében (Drain & Schimmel, 1986; Drain & Schimmel, 1988).

1.2. A frataxin, az Yfh1p és a CyaY

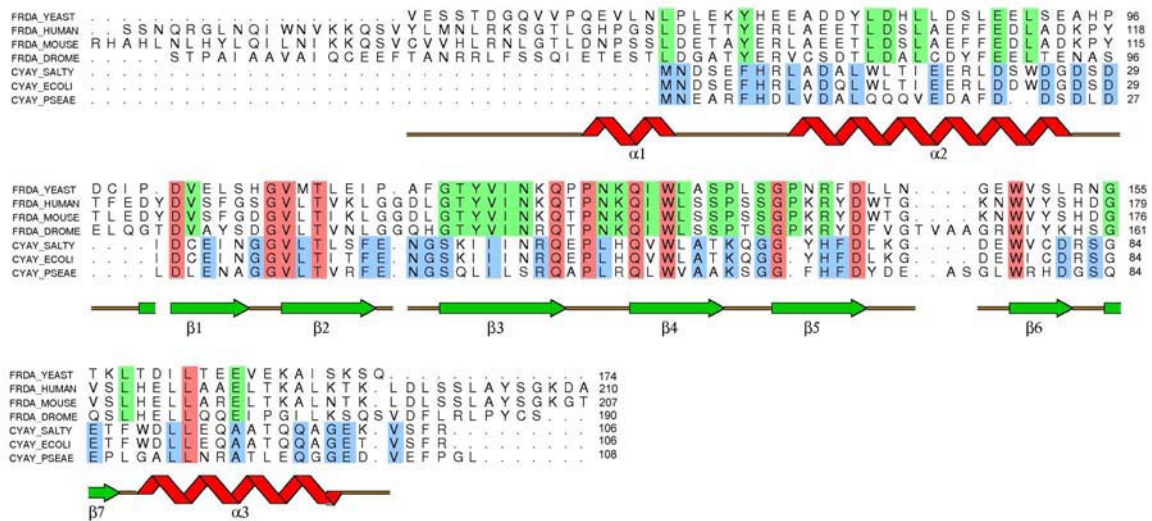
A Friedreich ataxia (FRDA) egy autoszómális recesszív betegség amely a leggyakrabban előforduló örökletes ataxiák egyike, előfordulási gyakorisága 1-2 eset 50.000 egyénenként (Koenig & Mandel, 1997; Puccio & Koenig, 2000; Pandolfo, 2001; Patel & Isaya, 2001). Jellemzői többek között a rossz testtartás, a végtagok ataxiája, reflex hiánya, érzékek elvesztése, izomgyengeség, csontozat deformálódása, kardiomiopátia és diabétesz előfordulási gyakoriságának megnövekedése. Az FRDA okozója a frataxin nevű fehérje mennyiségének nagy mértékű csökkenése. A legtöbb beteg esetében (>95 %) a jelenségért egy nagy kiterjedésű, homozigóta GAA bázishármas ismétlődés (hossza 66-1800) felelős, amely a fehérjét kódoló X25 gén első intronjában található (Campuzano *et al.*, 1996). A betegség súlyossága arányos a bázishármas ismétlődésének hosszával. A mutáció miatt a transzkripció erősen gátolt amelynek elsődleges következménye egy nagyon alacsony érett RNS (mRNA) szint, amelyet pedig igen kis mennyiségű fehérje szintézise követ. Az FRDA betegek másik részénél a DNS fehérjét kódoló részén találhatóak különböző pontmutációk, amelyek következménye olyan fehérjék képződése amelyek vagy rövidebbek mint a vad típus (truncated), vagy pedig felcserélt aminosavakat tartalmaznak (missence mutáció). Ezek a mutáns fehérjék funkciójukat csak rendkívül alacsony határfokkal képesek ellátni (Campuzano *et al.*, 1996; Bidichandani *et al.*, 1997; Forrest *et al.*, 1998; Cossee *et al.*, 1999).

A frataxin egy 210 aminosavból álló fehérje, amely a mitokondrium mátrixában található. Habár nem tartalmaz olyan domént, amelynek ismeretéből a funkciójára következtetni lehetne, a fehérje fontos szerepét mutatja, hogy ha a gént teljesen eltávolították egerekben, az korai embrionális pusztuláshoz vezetett (Cossee *et al.*, 2000). FRDA betegek szövetein végzett vizsgálatoknál azt találták, hogy a lecsökkent frataxin szint a mitokondriumban olyan nagymértékű vas felhalmozódást eredményez, hogy a vas kicsapódik (Lamarche *et al.*, 1980; Puccio *et al.*, 2001). Többek között ezért is tulajdonítanak a frataxinnak, felfedezése óta valamilyen, a vas háztartással kapcsolatos szerepet.

Ugyan a frataxin pontos funkciója még ma is vitatott, fontosságát az is tükrözi, hogy erősen konzerválódott az evolúció során (2. Ábra). A legtöbb eukariótában megtalálhatóak a frataxin különböző homológjai, egészen a pékésztőtől emberig, sőt homológok szintén megtalálhatók számos baktériumban is, így például *E. coli*-ban is (Babcock *et al.*, 1997; Foury & Cazzalini, 1997; Wilson & Roof, 1997; Li *et al.*, 1999; Huynen *et al.*, 2001).

A különböző eredetű frataxin homológok közül az élesztőben található Yfh1p (Yeast frataxin homolog 1) az egyik legtöbbet vizsgált változat. A fehérjét kódoló gén, *YFHI* eltávolítása ($\Delta yfh1$) a sejtek növekedési zavarához vezet, főleg nem fermentálható szénforrás esetében. Emellett a mutáns sejtekben megnő a hajlam a mitokondriális DNS (mtDNS) elvesztésére, továbbá érzékenyebbé válnak oxidatív behatásokkal szemben, valamint a mitokondriumban nagy mennyiségű vas halmozódik fel (Babcock *et al.*, 1997; Foury & Cazzalini, 1997; Wilson & Roof,

1997). Attól függően, hogy milyen a vizsgált élesztőtörzs genetikai háttere, ezek a fenotípusok elég különbözőek, így ebből nehéz a frataxin funkciójára messzemenő következtetést levonni.

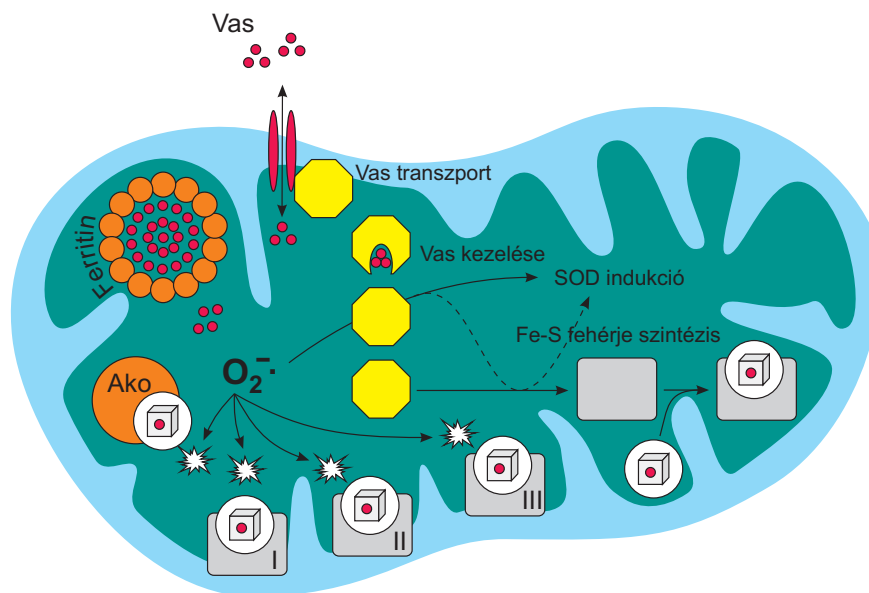


2. Ábra. Néhány frataxin homológ aminosav szekvenciájának összehasonlítása (élesztő, humán, *Drosophila*, *S. typhimurium*, *E. coli* és *P. aeruginosa*) (Karlberg *et al.*, 2006).

Az eukarióta fehérjék esetében a homológia a mitokondriális targeting szekvenciát követően kezdődik. A zölddel árnyékolt aminosavak az eukariótáknál, a késsel a prokariótáknál, a pirossal eukariótáknál és prokariótáknál egyaránt konzerváltak. Az élesztő és a humán fehérjék között 40 %, az *E. coli* és az élesztő között 28 % az aminosav azonosság.

Arra a kérdésre, hogy a frataxin milyen szerepet tölt be, számos elmélet született, de közülük a legtöbb valamilyen formában a vas háztartással kapcsolatos. Néhány lehetséges funkciót a 3. Ábra mutat be (Rotig *et al.*, 2002).

Teljes körű génextpressziós vizsgálatok azt mutatták ki, hogy csökkent frataxin szint esetében megnövekedett azoknak a géneknek az expressziója, amelyeket vas érzékeny transzkripciós faktorok *AFT1/AFT2* szabályoznak. Szintén ebbe a körbe



3. Ábra. A frataxin lehetséges funkciói (Rotig *et al.*, 2002).

A frataxin lehet egy olyan fehérje amely részt vesz (a) vas transzportban, szerepet játszhat a (b) vas kezelésében, komponens lehet (c) vas-kén fehérjék szintézisében, (d) védelmet nyújthat szabad gyökökkel szemben. Ako: akonitáz; I, II, III.: komplex I, II, III; SOD: superoxid dizmutáz.

tartoznak azok a gének, amelyek a vas felvételében érintettek (Foury & Talibi, 2001), így ennek eredménye fokozott vasfelvétel lesz. Mivel az AFT szabályzó rendszert a citoszól alacsony vas koncentrációja indukálja (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1996; Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001), az indukció egyik oka az lehetne, hogy a frataxin hiányában a vas a citoszólból a mitokondriumba helyeződik át. Valójában a

pontos ok azonban az, hogy az Aft1p a citoszól vas tartalmát nem közvetlenül elemi vas formájában, hanem valamely - pontosan nem ismert - vas-kén komponens formájában érzékeli. Mivel azonban a vas-kén beépülés a frataxin hiányában sérül, az Aft1p csökkent vas szintet érzékel és vasfelvételt indukál, majd ez láncreakció szerűen a mitokondrium vasfelhalmozásához vezet (Chen *et al.*, 2004). Az, hogy a frataxin hiányában a vas citoszóából mitokondriumba szállítása miért nem áll le, még nem ismert. A frataxin egyik lehetséges funkciója a vas mitokondriumból citoszólba átáramlásért felelős szerep is lehetne, mivel egy olyan sejtben, ahol előzőleg az Yfh1p mennyiségét egy szabályozható promóter segítségével lecsökkentették, az *YFH1* újbóli indukciója megszüntette a mitokondriális vas felhalmozódást, vagyis feltehetőleg elősegítette a vas kiáramlását a mitokondriumból a citoszólba (Radisky *et al.*, 1999). Két másik tanulmány alapján szintén egy lehetséges funkció lehetne a vas tárolása is (Adamec *et al.*, 2000; Cavadini *et al.*, 2002). Más vastároló fehérjékkel szemben a frataxint kódoló mRNS azonban nem tartalmaz vas érzékelő egységeket (Klausner *et al.*, 1993). Rekombináns humán és élesztő fehérjék a citoszólos vastároló fehérjéhez, a ferritinhez hasonlóan oligomereket képeznek amelyek képesek vas megkötésére. Habár már számos frataxin homológ háromdimenziós szerkezetét feltérképezték (Cho *et al.*, 2000; Dhe-Paganon *et al.*, 2000; Musco *et al.*, 2000; Gakh *et al.*, 2002), konkrét vas specifikus kötőhelyet csak egy távoli bakteriális homológ, az *E. coli* CyaY esetében sikerült találni (Nair *et al.*, 2004). Ebben az esetben a vas kötődéséhez nem szükséges a fehérje oligomerizációja.

A frataxin szintén közreműködhet a vas-kén fehérjék összeállításában és fenntartásában, ami az alapján feltételezhető, hogy csökkent frataxin szint a mitokondriális vas-kén enzimek aktivitását csökkenti (Rotig *et al.*, 1997; Foury, 1999; Puccio *et al.*, 2001; Muhlenhoff *et al.*, 2002). Ez a tény azonban felveti azt a kérdést is, hogy a csökkent aktivitás valójában a megnőtt oxidatív behatás és ezt követően az érzékeny vas-kén fehérjék inaktiválása vagy a vas-kén fehérjék csökkent szintézisének a következménye (Babcock *et al.*, 1997; Foury & Cazzalini, 1997). Az utóbbit tűnik alátámasztani az a tény, hogy a frataxin képes vasat átadni ferrokeletáznak, (*in vitro*), amely a hem bioszintézis utolsó lépését katalizálja (Park *et al.*, 2003; Yoon & Cowan, 2004), IscU-nak, amely a vas-kén fehérjék központjának összeállítását indítja el (Yoon & Cowan, 2003; Layer *et al.*, 2006), valamint akonitáznak, mely reakció során az inaktív $[3\text{Fe-4S}]^+$ központ aktív $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ formát eredményez (Bulteau *et al.*, 2004).

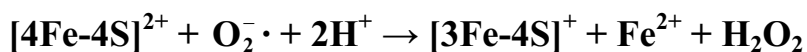
A frataxin további lehetséges funkciójaként jöhet még szóba, mint általános szabályozó a respirációban, szerep a mtDNS karbantartásában, a sejt antioxidáns védelmében és esetleg a fölösleges vas eltávolításában (Radisky *et al.*, 1999; Shoichet *et al.*, 2002; Gakh *et al.*, 2005).

In vitro kísérletekben azt is bemutatták, hogy a frataxin fehérje szintén bír un. ferroxidáz aktivitással (Park *et al.*, 2002; Nichol *et al.*, 2003; Bou-Abdallah *et al.*, 2004; Yoon & Cowan, 2004). Ebben a reakcióban a frataxin Fe(II)-t oxidál Fe(III)-má amit kötött formában tárol, amely során a fölöslegben lévő, a sejt számára nagyon veszélyes Fe^{2+} -t ártalmatlanítja. Ugyan a vas nélkülözhetetlen a legtöbb élő szervezet

számára, a főleg azonban nagy veszélyt jelent, mivel Fenton reakcióban nagyon reakcióképes hidroxil gyökök képződését indukálják (Halliwell & Gutteridge, 1999a):



Az ehhez a reakcióhoz szükséges hidrogén peroxid kis mennyiségben ugyan, de jelen van a sejtekben, elsősorban a mitokondriumban. A mitokondrium, mint a sejt erőműve, az ATP termelés fő színtere, de szintén itt termelődnek legnagyobb mennyiségben az ún. reaktív oxigén részecskék (ROS) (Sohal, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999b). Az elektrontranszport lánc mellékterméke a szuperoxid anion, amelyet normál körülmények között a szuperoxid dizmutáz semlegesít, hidrogén peroxid képződése mellett. Amennyiben a szuperoxid nagyobb mennyiségben van jelen, akkor képes a vas-kén enzimek, mint pl. akonitáz vas-kén központját megtámadni (Vasquez-Vivar *et al.*, 2000; Emerit *et al.*, 2001):



Ebben a reakcióban a vas-kén központ működésképtelenné válik. Az utóbbi időben egyre elfogadottabbnak tűnik az a nézet, hogy a frataxin elsődleges szerepe, mint vas shaperon egyrészt a rendelkezésre álló Fe^{2+} -t hem bioszintézishez juttatja, másrészt a főlegben lévő Fe^{2+} -t semlegesíti (Park *et al.*, 2003; Gakh *et al.*, 2005; Gakh *et al.*, 2006).

Mindezeket az adatokat összevetve nehéz megmondani, hogy a frataxin hiány estében kapott fenotípusok a közvetlen következmények, vagy pedig esetleg valamilyen másodlagos folyamatok eredményei. Így pl. a csökkent képesség nem

fermentálható szénforrások felhasználására következménye lehet a mtDNS elvesztésének vagy vas-kén centrumot tartalmazó enzimek hiányának is, ami viszont szintén bekövetkezhet a csökkent hem és/vagy vas-kén fehérje bioszintézis vagy a megnövekedett oxidációs hatás következtében fellépő aktivitáscsökkenés miatt is. A bonyolultabb másodlagos hatások elkerülése érdekében néhány élesztő modellben nem teljesen deletált törzseket használnak a frataxin vizsgálatára, hanem ún. kondicionális mutánsokat amelyekben a vizsgálni kívánt gént, esetünkben az *YFH1*-et egy szabályozható promóter, mint pl. GalP (galaktóz promóter), mögé helyezik el. Ebben az esetben az *Yfh1p* expressziója galaktóz vagy glükóz, mint szénforrás alkalmazásával, elősegíthető ill. gátolható (Muhlenhoff *et al.*, 2002; Karthikeyan *et al.*, 2003). Ebben az esetben elkerülhetőek az olyan megfordíthatatlan károsodások (mint pl. mtDNS elvesztése) is amelyek lehetetlenné tennék későbbiekben a frataxin hiányos állapot kompenzálását más gének expresszáásával.

A frataxin távoli bakteriális homológját, az *E. coli* CyaY fehérjét is több tanulmányban vizsgálták (Li *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Huynen *et al.*, 2001; Adinolfi *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2003; Adinolfi *et al.*, 2004; Bou-Abdallah *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 2004), azonban az eredmények nem vittek sokkal közelebb a frataxin pontos funkciójának a meghatározásához. A CyaY hiánya nem eredményezi azokat a jelenségeket, mint amiket az *Yfh1p* élesztőben, sőt mivel sem a sejt vastartalmában sem oxidatív behatással szembeni viselkedésében nem tapasztaltak változást az a lehetőség is felmerült, hogy ennek a fehérjének esetleg nincs semmilyen funkciója (Li *et al.*, 1999). Ugyanakkor azt már korábban

megállapították, hogy a fehérjét kódoló gén, a *cyaY* az expresszióhoz szükséges minden szükséges elemmel rendelkezik (-10, -35 régiók és riboszóma kötőhely), sőt *lacZ* fúziós kísérletekkel az expresszió meglétét is igazolták (Trotot *et al.*, 1996). Amellett, hogy az *E. coli* mutáns semmilyen, más organizmusokban tapasztalt frataxin hiányra jellemző jelenséget nem produkált, szintén nem sikerült metabolikus különbséget, hőérzékenységet, sőt még növekedésbeli eltérést sem találni (Li *et al.*, 1999). Mindez azonban felveti azt a kérdést, hogy egy olyan egyszerű szervezet, mint az *E. coli*, amelynek genomja csupán 4.300 génből áll (K12, laboratóriumi változat), miért tartana egy teljesen haszontalan gént, amit még expresszál is?

A frataxin homológok közül a CyaY a legrövidebb, összesen 106 aminosavból áll. Mivel az aminosav szekvencia jól konzerválódott az evolúció során történtek már sikeres kísérletek Yfh1p hiányos élesztőt magasabb organizmusból, mint pl. emberből származó frataxinnal komplementálni (Muhlenhoff *et al.*, 2002). Nem történtek azonban hasonló kísérletek *E.coli* esetében, hiszen nem sikerült jellemző fenotípust találni. Szintén nem jelent meg eddig közlemény, amiben CyaY-t próbáltak volna meg felhasználni magasabb rendű szervezetek, mint pl. *S. cerevisiae* komplementálására. Emellett az irodalomban rendelkezésre álló adatok szerint CyaY jellemzése csak *in vitro* történt de *in vivo* tulajdonságai nem ismertek.

2. Célkitűzések

1. - a Leu5p funkciójának megismerése
- a Leu5p homológjának a hGP-nek felhasználása Δ LEU5 élesztőtörzs komplementálására
2. - *E. coli cyaY* mutáns (Δ cyaY) létrehozása és karakterizálása
- Yfh1p hiányos élesztőtörzs kompenzálása CyaY felhasználásával

3. Anyagok és módszerek

Anyagok

A vizsgálatokhoz felhasznált anyagok Sigma, vagy ehhez hasonló minőségűek voltak. Néhány anyagot, mint pl. antitesteket, rekombináns fehérjéket magunk állítottunk elő, amelyek a későbbiekben kerülnek megemlítésre.

Baktérium és élesztő törzsek, mutánsok létrehozása, táptalajok

Bakteriális DNS plazmidok szaporítására és klónozáshoz DH5 α , rekombináns fehérjék termeléséhez BL21, XLBlue és DH5 α *E. coli* törzseket használtunk. A Δ cyaY törzs létrehozásához a genetikai háttér a CLT42 [F^- *car-94* Δ (*argF-lac*)U169 *rpsL150 thiA1 relA1 deoC1 ptsF25 flbB5301 rbsR*] (Roland *et al.*, 1985) szolgáltatta. A *cyaY* gén magszakításához Zeocine antibiotikum gént használtunk (PCR blunt plazmid, Invitrogene), lineáris formában (Datsenko & Wanner, 2000). A

Zeocin antibiotikum kazettát PCR reakcióban, *E. coli* (K12 DH5 α) kromoszómális DNS-ből felerősítettük olyan PCR primerek felhasználásával amelyek olyan 40-40 bázis szekvenciát tartalmaznak, amely a *cyaY* gént körülvevő régióval azonos. A terméket tisztítás után egy pKD20 segéd plazmidot tartalmazó CLT42 kompetens sejtbe transzformáltuk. A pKD20 egy λ bakteriofág géncsoportot tartalmaz (recBCD), amely lehetővé teszi, hogy az *E. coli* ne bontsa le a lineáris DNS-t. A transzformánsokat megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajon (Zeocin) szelektáltuk, majd a mutánsokat PCR reakció segítségével azonosítottuk. A helper plazmid egy hőérzékeny replikont tartalmaz, így azt a 37 °C-on történő növesztéssel eltávolítottuk (minden előző növesztés 30 °C-on történt). A plazmid elvesztését antibiotikummal szembeni érzékenység (ampicilin) alapján ellenőriztük.

Vad típusú élesztőként W303-1A vagy W303-1B [*MATa* vagy *MAT α* , *ade2-1 leu2-3,112 his311 his3-15 trp1-1 ura3-1*] törzseket, valamint a következő mutáns törzseket, Δ leu5 [W303-1A *leu5::HIS3*]; Δ cit2 [W303-1A *cit2::URA3*]; Δ leu5 Δ cit2 [W303-1A *leu5::HIS3 cit2::URA3*]; Δ cor1 [W303-1A *cor1::HIS3*] (Chelstowska & Butow, 1995); Δ cox6 [W303-1B *cox6::URA3*] (Koerner *et al.*, 1985); Δ flx1 [W303-1A *flx1::LEU2*] (Tzagoloff *et al.*, 1996); Δ mir1 [W303-1B *mir1::LEU2*] (Dietmeier *et al.*, 1993) és GK178 [*MATa ade5-1 leu2-3,112 trp1-2891 ura3-1*] (Karthikeyan *et al.*, 2003) használtuk. Az élesztő mutánsok létrehozásához a megfelelő géneket un. egy-lépéses génmegszakításos módszerrel távolítottuk el (Baudin *et al.*, 1993).

E. coli esetében a kultúrákat folyékony Luria (0.5% élesztő extraktum, 1% tripton, 0.5% NaCl) vagy minimál médiumban (Alper & Ames, 1978) (amely szintén

tartalmazott még 10 mM NH₄Cl-ot, 1 mM arginint, 0.015 mM thiamint és 1 mM uracilt) növesztettük 37°C-on (kivéve a pKD20 tartalmú törzs, 30°C), rázatás közben. Ugyanezeket a táptalajokat használtuk 2% agar hozzáadásával szilárd táptalajként. Mindkét esetben megfelelő antibiotikumot illetve 0.4% szénforrást alkalmaztunk. Élesztő kultúráknál YP (gazdag) (1% élesztő extraktum, 2% pepton), illetve minimál médiumot (S) (YNB mint nitrogén forrás, és szükséges aminosavak) használtunk a megfelelő szénforrások hozzáadásával (2% glükóz (D) vagy galaktóz (G), vagy 3% glicerín (g) vagy etanol (E)), folyékony, vagy szilárd (2% agar) állapotban. Valamennyi élesztőkultúrát 30°C-on növesztettünk. A GK178 élesztőtörzs esetében a YFH1 gén expresszióját egy nagyon szigorúan vezérelt mutáns *GALI* promóter (*gal1**) irányítja ami nagyon leszorítja az expressziót glükóz jelenlétében, de galaktóz esetében is jelentősen alacsony szinten tartja (Karthikeyan *et al.*, 2003). Ez a rendszer teszi lehetővé, hogy a szénforrás milyenségétől függően Yfh1p jelen legyen a sejtekben vagy sem. A *yfh1Δ* közeli állapot létrehozásához a GK178 törzset először galaktóz tartalmú minimál médiumon (SG) növesztettük egy éjszakán keresztül (kb. 16 óra), majd friss glükóz tartalmú minimál médiumba (SD) oltottuk vissza és tovább növesztettük legalább 5 generáción keresztül. Későbbiekben a kísérleteinkhez az ilyen módon Yfh1p depletált sejteket használtuk fel.

Rekombináns fehérjék készítése, expressziója élesztőben, ellenanyag termelése

A hGP expressziójához a kódoló gént Jurkat limfóma sejtvonalból izolált cDNS-

ből PCR segítségével erősítettük fel. Az 1300 bázisból álló DNS terméket pYes2 (Invitrogen), élesztőexpressziós vektorba klónoztuk, amelyben az expressziót *GAL10* galaktóz indukálható promóter szabályozza. Az így kapott plazmidot (pYES/hGP) használtuk élesztőtörzsek transzformálására. A hGP expressziójához a 0.2 % galaktózt használtunk a médiumban.

Rekombináns, His-tag jelölt CyaY előállításához a strukturális gént kódoló régiót (321 bázispár), vad típusú *E. coli* törzsből izolált kromozómális DNS-ből, PCR segítségével megtöbbszörítettük majd pQE9 (Qiagen) *E. coli* expressziós vektorba illesztettük (*Bam*HI-*Xho*I restrikciós helyre). Az így nyert plazmidot XLBlue *E. coli* törzsbe transzformáltuk. A fehérje expresszióját logaritmus növekedési fázisban IPTG-vel indukáltuk. A fehérje izolálása Ni-NTA agarose gyöngyök (Qiagen) felhasználásával történt. Mind a fehérje expressziója, mind pedig a tisztítása a gyártók útmutatása szerint történt.

Vad típusú CyaY tisztítása a Yfh1p-hez hasonlóan történt (Gakh *et al.*, 2002) a fehérjék hasonló tulajdonságainak köszönhetően. Erre a célra a *CyaY* kódoló szekvenciát az előzőekben leírtakhoz hasonló módon *E. coli* expressziós vektorba (pET24-a, Novagen, *Nde*I-*Hind*III restrikciós hely) illesztettük.

A *CyaY* expressziójához élesztőben p426GPD (Mumberg *et al.*, 1995) élesztő expressziós vektort használtunk. Ez a plazmid egy folyamatos, magas szintű expressziót nyújt a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GPD) promóternek köszönhetően. Mivel a frataxin eukarióta sejtekben mitokondriális lokalizációjú, ezért a CyaY mitokondriumba juttatásához egy mitokondriális targeting szekvenciát kellett

használni. Erre a célra az élesztő frataxin homológ targeting szekvenciáját használtuk. Az ilyen módon megszerkesztett plazmidot (p426GPD-*YFH1-cyaY*) GK178 törzsbe transzformáltuk, a kapott törzset CYAY-nak neveztük el. Hasonló módon készült a pozitív kontrollként használt törzs: YFH, ahol GK178 törzsbe vad típusú *YFH1* gént tartalmazó plazmidot (p426GPD-*YFH1*) transzformáltunk, valamint a negatív kontrol: P0, ahol a GK178 egy üres p426GPD vektort tartalmazott.

Élesztő MMP-t (Mitochondrial Processing Peptidase) *E. coliban* expresszáltuk és korábban közölt módszer szerint tisztítottuk (Gakh *et al.*, 2001; Gakh *et al.*, 2002).

A ferrokeletáz reakcióban felhasznált élesztő ferrokeletáz fehérjét Dr. Gloria C. Ferreira-tól (University of Florida, Tampa, FL, USA) kaptuk.

Ellenanyag termelése *CyaY* ellen nyúlban történt (Daum *et al.*, 1982), amelyhez His-tag *CyaY* rekombináns fehérjét használtunk. Az antitestet tartalmazó szérumot affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottuk, ahol a kromatográfiás oszlop előállításához a *CyaY*-t cianogén bromid aktivált Sepharose 4B (Pharmacia) gyöngyökhöz kötöttük. Az eljárás a gyártó által javasolt módon történt. A tisztított ellenanyagot immuno blott-al ellenőriztük.

Enzim aktivitás és különböző metabolitok koncentrációjának mérése

A mérésekhez felhasznált mintákat a sejtek üveggyöngyös törésével (Wootner & Jaehning, 1990), vagy Yeast Buster (Novagen) reagens felhasználásával, vagy mitokondrium izolálásnál (Daum *et al.*, 1982) végzett frakcionálással nyertük. A mitokondriumok preparálása vázlatosan az alábbiak szerint történt. Az élesztő

sejteket logaritmusos növekedési fázisban gyűjtöttük össze. A sejteket megfelelő pufferben többször mostuk, majd a sejt külső falát zymolyase enzimmel elbontottuk. A keletkezett szferoplasztokat üveg homegenizátorban óvatosan összetörtük, majd a törmelékből a mitokondriumokat több lépésben, differenciál-centrifugálással megtisztítottuk. A tisztítás során vettünk egy olyan sejtfrakciót is, amely a mitokondriumon és a nagyobb sejtörmeléken kívül a sejt valamennyi alkotóját tartalmazza (PMS: **P**ost **M**itochonrial **S**upernatant).

Az IPMS (**I**zo**P**ropil **M**alát **S**zintáz aktivitás mérése fluorimetrikus módszerrel történt (Calvo *et al.*, 1969). A citrát szintáz (Srere, 1967), malát dehidrogenáz (MDH) (Michael & Bergmeyer, 1974), akonitáz (Gardner *et al.*, 1994), szukcinát dehidrogenáz (SDH) (Schoppink *et al.*, 1988) enzimek aktivitása már korábban közölt módszer alapján spektrofotometriákkal történt. A CoA koncentrációjának meghatározása perklórsavval fehérjementesített mintákból, fluorimetrián (Michael & Bergmeyer, 1974), a citrát koncentrációjának meghatározása pedig, enzimatikusan történt (Moellering & Gruber, 1966).

Citokromok koncentrációjának megközelítő meghatározása spektrofotometrián történt (Tzagoloff, 1995), 500 µg fehérjét tartalmazó tisztított mitokondrium felhasználásával.

Általános módszerek

Az általános DNS munkák, mint plazmid izolálása, emésztés, ligálás és PCR már

jól ismert módszerek szerint történtek (Sambrook *et al.*, 1989). Az élesztő transzformálása Li-acetát felhasználásával (Gietz *et al.*, 1992) történt.

A minták fehérje tartalmát BCA (Pierce), Lowry (Lowry *et al.*, 1951) vagy Bradford (Bradford, 1976) módszerrel határoztuk meg.

A mitokondriális fehérjeimport kísérleteket közölt módszer szerint végeztük el (Steiner *et al.*, 1995; Diekert *et al.*, 1999; Diekert *et al.*, 2001).

4. Eredmények

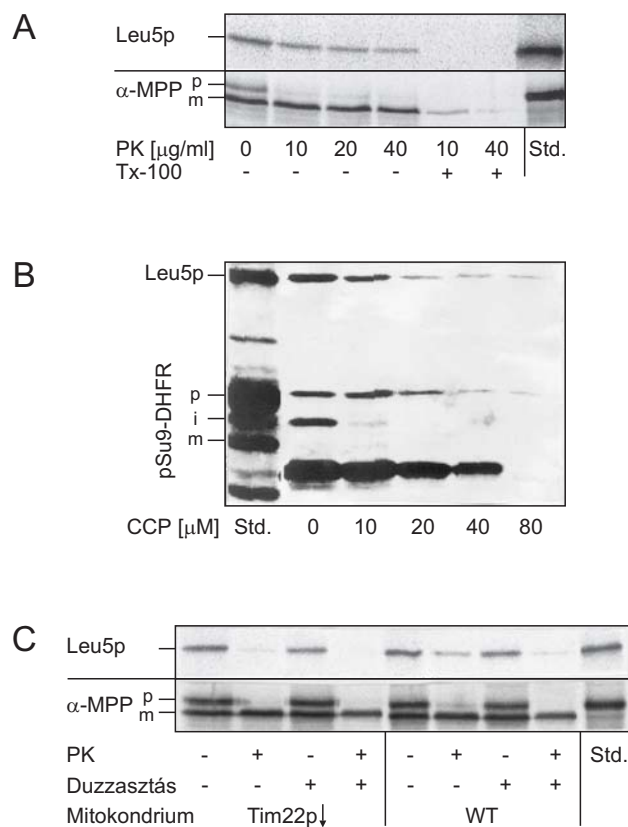
4.1. *Leu5p* és a *hGP* funkciója

4.1.1. *A Leu5p a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el*

Azért, hogy megtudjuk, hogy a *Leu5p* a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el, tanulmányoztuk az importját és pontos lokalizációját. A kísérlethez *in vitro* transzlációs reakcióban [³⁵S] metioninnal radioaktívan jelölt *Leu5p* fehérjét állítottunk elő. Ezt a fehérjét izolált mitokondriummal megfelelő membránpotenciál és ATP jelenlétében inkubáltuk, majd proteináz K enzimmel kezeltük. A kísérletben a *Leu5p* egy része védettséget mutatott (4A. Ábra) az enzimmel szemben, ami azt jelenti, hogy a mitokondrium felvette a fehérjét. Ha a mitokondriumot detergenssel megbontottuk a *Leu5p* elérhetővé vált a proteináz számára, amelyet az teljesen megemésztett. Ez azt jelenti, hogy az import során talált proteináz rezisztencia nem aggregáció következménye. Ha a membránpotenciált mitokondriális szétkapcsoló,

CCCP segítségével megszüntettük, a Leu5p importja nagy mértékben lecsökkent (4B. Ábra). Ehhez teljesen hasonló jelenséget tapasztaltunk a standardként használt pSu9-DHFR modell fehérje esetében is.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a Leu5p vajon a mitokondriális hordozókhoz hasonló módon importálódik-e, amelyhez egy olyan mutáns élesztőt használtunk, amelyben a Tim22p mennyisége csökkenthető. Az ebből a törzsből izolált mitokondriumot felhasználó import kísérletben a Leu5p importja megközelítőleg



4. Ábra. A Leu5p a mitokondrium belső membránjába importálódik.

A. Radioaktívan jelölt Leu5p és α -MPP fehérjéket izolált mitokondriummal (vad típus, 50µg) inkubáltunk 10 percig 25 °C-on import puffer jelenlétében (1 mM ATP és 2 mM

NADH). Ezután a mintákat jégen lehűtöttük, újra izoláltuk majd un. SoH pufferben (0.6 M sorbitol, 20 mM HEPES-KOH pH=7.4) felvettük, proteináz K enzimet (PK) adtunk a jelölt koncentrációban 0.1 % Triton X-100 jelenlétében. 15 perc emésztés után a reakciót 1 mM PMSF hozzáadásával megállítottuk. A fehérjéket triklórecetsavval kicsaptuk, majd SDS poliakrilamid gélen elválasztottuk. A radioaktív fehérjéket fluorográfia segítségével tettük láthatóvá.

B. A Leu5p importjához membrán potenciálra van szükség. Radioaktívan jelölt Leu5p és pSu9-DHFR fehérjéket CCCP jelenlétében (a jelölt koncentrációban), az előzőekben leírtakhoz hasonlóan importáltuk, proteináz K-val emésztettük és analizáltuk.

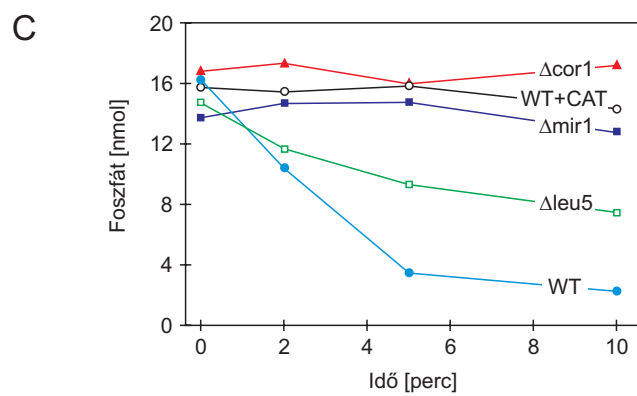
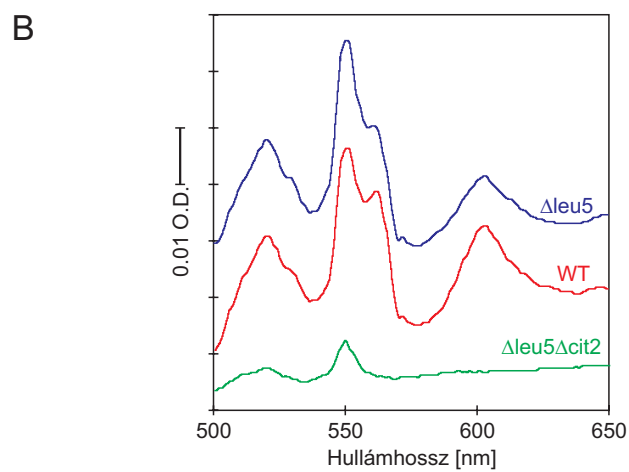
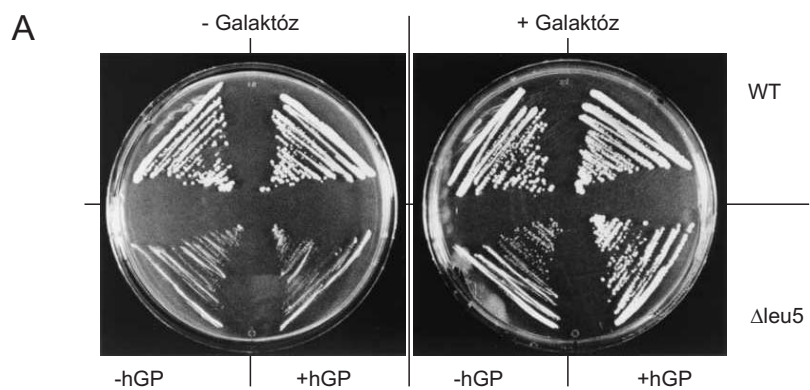
C. A Leu5p proteináz érzékenyvé válik a külső membrán nyitását követően és Tim22p szükséges az importjához. Radioaktív Leu5p és α -MPP-t az A pontban leírtak szerint importáltunk vad típusú illetve *tim22* mutáns törzsekből származó mitokondriumba. Import után a mitokondriumokat újra izoláltuk, majd duzzasztottuk (Diekert *et al.*, 2001) proteináz K hozzáadásával vagy a nélkül. Majd a mintákat az előzőekben leírtak szerint analizáltuk.

p, i és m: az importált fehérjék prekuzora, átmeneti ill. érett változata; St.: standard, a felhasznált prekuzor fehérje 50%-a, kezelés nélkül.

70%-al csökkent a vad típushoz képest. Ezt a jelenséget nem tapasztaltuk az α -MPP importja esetében, amely egy másik útvonalat, Tim17p/Tim23p-t használ. Az import Tim22p függősége a Leu5p mitokondriális hordozó jellegét támasztja alá.

4.1.2. A LEU5 eltávolításának következményei

A Leu5p funkciójának kereséséhez a LEU5 teljes kódoló szekvenciáját eltávolítottuk (Baudin *et al.*, 1993). A mutáns sejtek, Δ leu5 a vad típushoz viszonyítva gazdag médiumon, glükóz szénforrással nem mutatott számottevő növekedési különbséget, viszont a növekedése jelentős mértékben lelassult (*pet* fenotípus), ha szénforrásként glicerint alkalmaztunk (5A. Ábra). Minimál médiumon

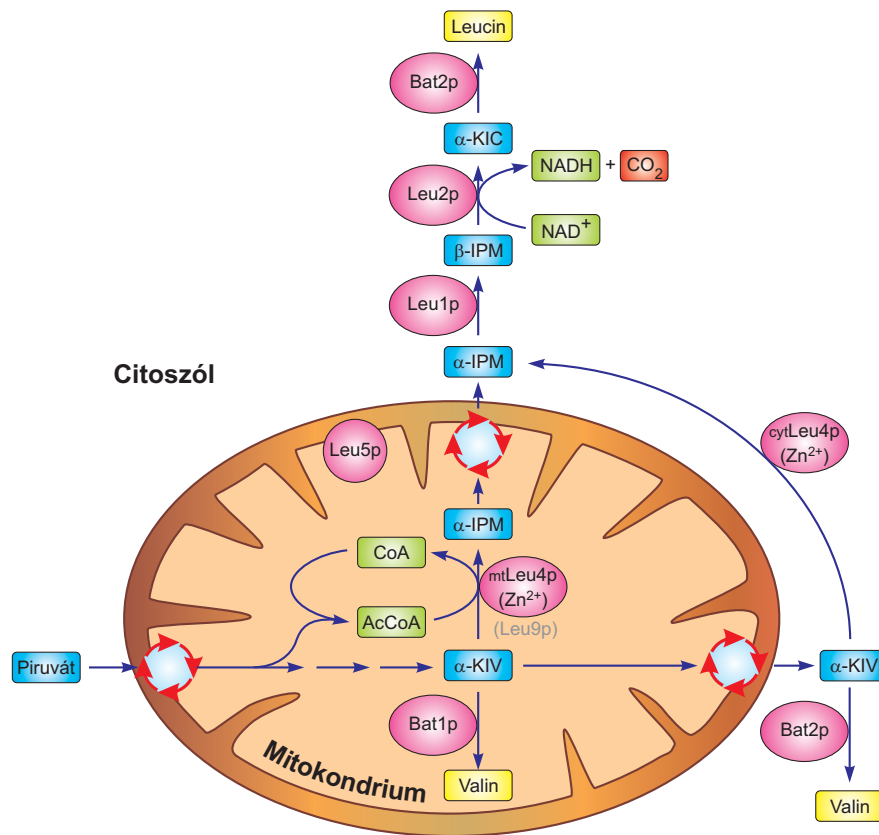


5. Ábra. A $\Delta leu5$ sejtekben működik az oxidatív foszforiláció.

- A. Vad típusú és $\Delta leu5$ sejteket 4 napon keresztül növesztettük szilárd YPG táptalajon, 30 °C-on. A jobboldali táptalaj 0.2% galaktózt is tartalmazott. Ahol jelöltük, a sejtek pYes2/hGP plazmidot tartalmaznak.
- B. Vad típusú és $\Delta leu5$ sejtekből izolált mitokondriumok citokrómspektruma, az ábra bal oldalán lévő oszlop mutatja a 0.01-es abszorbancia (OD) különbséget.
- C. Membrán potenciál vezérelt ATP szintézis. A jelzett törzsekből izolált mitokondriumokat (10 μ g) P pufferben (20 mM morfolino-propán-szulfonsav-KOH, pH 7.2; 0.25 M szukróz; 0.3 mM K_3PO_4 ; 5 mM $MgCl_2$; 1 mg/ml zsírsavmentes BSA; 1 mM ADP) inkubáltuk 25 °C-on. A membrán potenciál létrehozása 2 mM NADH hozzáadásával történt. Az ATP képződését az inorganikus foszfát fogyásával detektáltuk (Lill *et al.*, 1990; Nargang *et al.*, 1995) módszer szerint. Az egyik mintánál az ADP és ATP mitokondrium és citoszól közti kicserélődését 50 mM carboxiatraktilozid (CAT) hozzáadásával gátoltuk.

a $\Delta leu5$ képes volt leucin hozzáadása nélkül is a növekedésre. A $Leu5p$ valószínűleg fontos, de nem nélkülözhetetlen funkcióval bír.

A $\Delta leu5$ csökkent növekedése nem respirációs defekt következménye. A mutáns és vad típusú törzsekből izolált mitokondriumokból felvett citokrómszorbációs spektrumokban nem találtunk jelentős különbséget (5B. Ábra), sőt a mutáns oxidatív foszforilációja is aktivitást mutatott, amit az inorganikus foszfát NADH függő ATP-be beépülésével mértünk (Nargang *et al.*, 1995) (5C. Ábra). Ugyan a vad típusúhoz képest egy gyenge csökkenést tapasztaltunk az ATP képződés sebességében a mutáns sejtek esetében, de ez a kis különbség valószínűleg nincs összefüggésben a nemfermentálható szénforráson tapasztalt súlyos növekedési zavarral. Mivel olyan törzsekből izolált mitokondriumok esetében, ahol a foszfát hordozó ($\Delta mir1$), vagy a komplex III ($\Delta cor1$) volt működésképtelen, vagy ha az ADP/ATP hordozót blokkol-

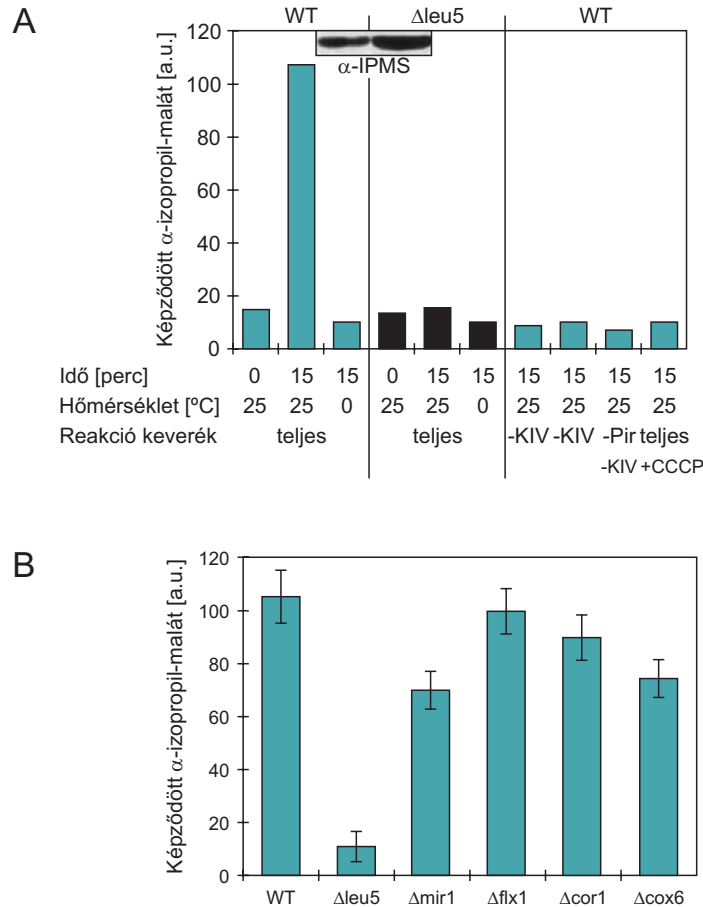


6. Ábra. A leucin bioszintézise.

A bioszintézis részben a citoszólban, részben a mitokondriumban zajlik, ennek megfelelően tüntettük fel az egyes enzimek lokalizációját. Pyr: piruvát, α -KIV: α -ketoizovaleriánsav, β -IPM: β -izopropil malát, α -KIC: α -ketoizokapronsav. A mtLeu4p és a cyLLeu4p az izopropil malát szintáz (Leu4p), a Bat 1p és Bat2p pedig, az elágazó szénlácú aminoszintáz mitokondriális ill. citoszólos formái.

tuk, vagy nem adtunk NADH-t, az ATP beépülés leállt, arra következtettünk, hogy a Δ leu5 estében nem az oxidatív foszforiláció gyengülése a növekedési probléma okozója. Ezek eredmények alapján arra az elhatározásra jutottunk, hogy a Leu5p nagy

valószínűséggel, mint mitokondriális hordozó, egy a mitokondriális bioszintetikus folyamatokhoz szükséges szubsztrát transzportját segítheti elő.



7. Ábra. A $\Delta leu5$ sejtek intakt mitokondriumában nem képződik α -IPM

A. YPGal médiumon növesztett $\Delta leu5$ sejtekből mitokondriumot izoláltunk, amelyeket 15 percig 0 vagy 25 °C-on SoH pufferben inkubáltunk 2 mM KIV és 2 mM piruvát jelenlétében (kivéve, ahol jelölve van az ábrán). Az egyik minta 20 μ M CCCP-t tartalmazott a membránpotenciál megszüntetésére. Az α -IPM szintézis vizsgálata a korábban leírtakkal azonos. Az IPMS immunoblot analízise vad típusú és $\Delta leu5$ sejtekből izolált mitokondriumokkal történt, IPMS ellen termelt antitest felhasználásával (Hampsey & Kohlhaw, 1981). Minkét minta azonos mennyiségű

fehérjét tartalmazott, amit a membrán Ponceau festésével ellenőriztünk az antitestek alkalmazása előtt.

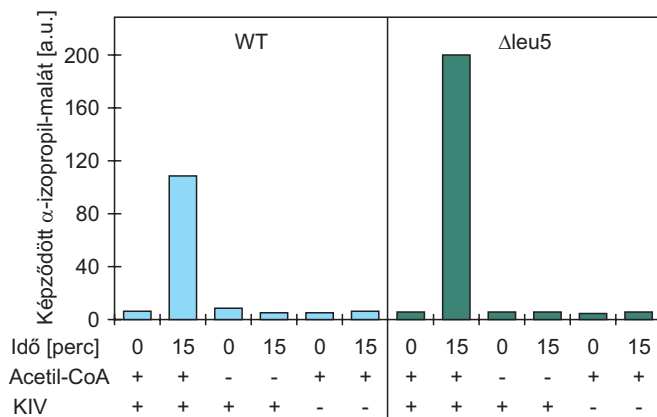
- B. Az ábrán feltüntetett törzsekből izolált mitokondriumokat 25 °C-on 2 mM KIV és 2 mM piruvát jelenlétében inkubáltuk, a A pontban leírtakkal azonos módon, majd meghatároztuk a minták α -IPM tartalmát. Az oszlopok három párhuzamos mérés átlagát, \pm a szórást mutatják.

4.1.3. A CoA mitokondriális felhalmozásához Leu5p szükséges

A Leu5p szubsztrátjának azonosításához felhasználtuk a *LEU4* (IPMS-t kódoló gén) és *LEU5* gének inaktiválásánál megfigyelt fenotípus változásokat. Csak a kettős mutáns esetében tapasztaltak leucin auxotrófiát (Chang *et al.*, 1984; Drain & Schimmel, 1986), amit az egyszeri mutánsok nem produkáltak. Δ leu4 sejtekben 25 %-ra csökkent az IPMS aktivitás, aminek alapján a szerzők egy másik, szintén IPMS aktivitással bíró fehérje létezését feltételezték, ezért régebben a Leu5p-t, mint másik IPMS enzimet említették. A maradék aktivitás azonban nem a leu5p-nek, hanem a Leu9p-nek tulajdonítható. Ez a fehérje kizárólagosan mitokondriális lokalizációjú, szemben a Leu4p-vel, amely a mitokondriumban és a citoszólban is megtalálható. Ebből következik, hogy a Δ leu4 sejtekben α -IPM csak a mitokondriumban szintetizálódik. Ebben az esetben vajon mi vezethet a leucin auxotrófiához, ha a *LEU5*-t is eltávolítjuk? Ezek alapján feltételezzük, hogy a Leu5p, mint mitokondriális hordozó, valami olyan szubsztrátot szállíthat, amely a mitokondriális IPMS által katalizált reakcióhoz szükséges (6. Ábra). Ebből a szempontból következő anyagok jöhetnek szóba: α -ketoizovaleriánsav, CoA, Zn^{2+} és α -IPM. Az α -ketoizovaleriánsav aligha lehet a Leu5p szubsztrátja, hiszen az a mitokondriumban szintetizálódik és a

Δ leu5 sejt pedig nem is valin auxotróf, pedig a α -ketoizovaleriánsav a valin szintézis közti terméke. Először az IPMS reakciót vizsgáltuk meg intakt izolált mitokondriumokon egy fluorometrikus módszerrel, ahol az umbelliferon és α -IPM vegyületét detektáltuk. Vad típusú mitokondriumok esetében az α -IPM szintézise az időtől és hőmérséklettől függött (7A. Ábra, bal oldali panel), valamint szintén függött a piruvát és az α -ketoizovaleriánsav hozzáadásától (7A. Ábra, jobb panel). A piruvát a piruvát dehidrogenáz segítségével acetyl-CoA-vá alakul át, amely nem képes a mitokondrium belső membránján átjutni (Haddock *et al.*, 1970). A mitokondrium szétkapcsoló, CCCP meggátolta az α -IPM keletkezését ami valószínűleg az α -ketoizovaleriánsav és/vagy a piruvát membránpotenciál-függő felvételével van kapcsolatban. Vad típusú mitokondriumban az α -IPM szintézise jól detektálható volt, de Δ leu5 sejtekből izolált mitokondriumban nem (7A. Ábra). Meglepő módon az IPMS fehérje mennyisége jóval magasabb volt a mutáns törzs mitokondriumban (7A. Ábra). Az α -IPM szintézis hiánya kizárólag Δ leu5 sejtekből izolált mitokondriumra jellemző összehasonlítva foszfát hordozó (Δ mir1), FAD hordozó (Δ flx1), komplex III (Δ cor1) vagy komplex IV (Δ cox6) mutánsokkal. Következésképpen az IPMS ugyan jelen van Δ leu5 mitokondriumokban, de nem képes α -IPM termelésére.

Teljesen más eredményt kaptunk, ha a mitokondriumokat detergens segítségével lizáltuk, amikor azt tapasztaltuk, hogy az IPMS aktivitás a mutáns sejtekben a vad típus közel kétszeresére nőtt (8. Ábra).

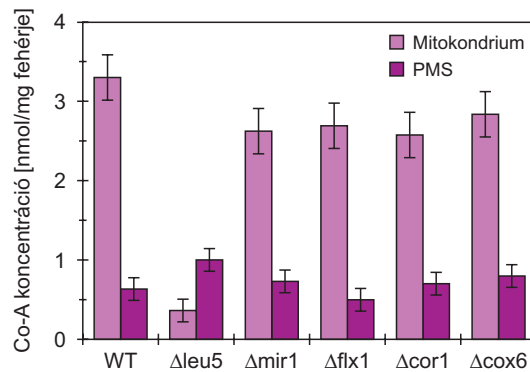


8. Ábra. A detergensen szétzúzott Δ leu5 mitokondriumok a vad típushoz hasonló IPMS aktivitással rendelkeznek.

YPGal táptalajon növesztett vad típusú és Δ leu5 sejtekből mitokondriumokat izoláltunk, amelyeket 0.05 % Triton X-100 tartalmú SoH pufferben lizáltunk, majd 10 percig 12.000 g-vel centrifugáltuk. A feltisztult mintát 0 vagy 15 percig 2 mM KIV és 1 mM acetil-CoA jelenlétében inkubáltuk (vagy nem, lásd jelölés), majd megmértük az α -IPM-t az előzőekben leírtak szerint.

Az α -IPM szintézise idő és hőmérsékletfüggő volt, valamint szükséges volt a megfelelő szubsztrátok az α -ketoizovaleriánsav és az acetil-CoA jelenléte. A reakció nem mutatott Zn^{2+} függőségét, ami kizárja, hogy az alacsony Zn^{2+} koncentráció lenne az IPMS reakció csökkent aktivitásának okozója a Δ leu5 mitokondriumokban. Szintén ezt bizonyítja, hogy nem találtunk különbséget a Zn^{2+} függő mitokondriális alkohol dehidrogenáz esetében. Összegezve, a Δ leu5 sejtek mitokondriuma tartalmaz aktív IPMS-t, de ez az aktivitás csak akkor mérhető, ha kinyitjuk a mitokondriumot. Ezek az eredmények mind kizárják, hogy az α -ketoizovaleriánsav, a Zn^{2+} , vagy az α -IPM lenne a Leu5p szubsztrátja, tehát a csökkent IPMS okozója csak a mátrix CoA

hiánya lehet. Ezért megvizsgáltuk különböző élesztősejtek mitokondriumának és PMS-ének a CoA tartalmát. Vad típus esetében a mitokondriumban 3.2 nmol, a PMS-ben 0.7 nmol CoA-t mértünk 1 mg fehérjére vonatkoztatva (9. Ábra). Meglepő módon a Δleu5 sejtek esetében a mitokondrium CoA tartalma körülbelül a 15-ére csökkent, míg a PMS-é enyhén megnőtt. A kontrollként felhasznált sejtek esetében (Δmir1 , Δflx1 , Δcor1 és Δcox6) nem tapasztaltunk számottevő változást. Így mindebből az következik, hogy a CoA mitokondriális felhalmozásához Leu5p szükséges.



9. Ábra. A Δleu5 sejtekből izolált mitokondriumok erősen csökkent mennyiségű CoA-t tartalmaznak.

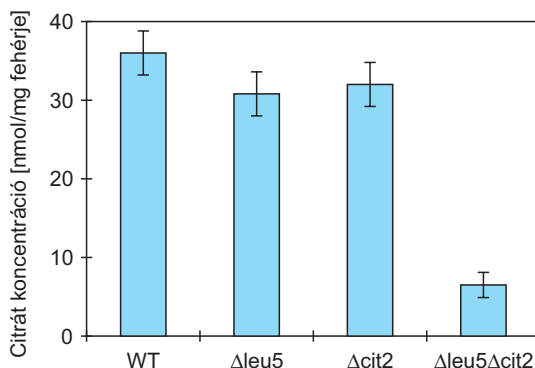
Az ábrán feltüntetett törzsekből izolált mitokondriumokból és PMS-ből határoztuk meg a CoA és acetyl-CoA mennyiségét. Az oszlopok három mérés átlagát, \pm a szórást mutatják, WT: vad típus.

4.1.4. A Leu5p és a Cit2p kapcsolata

Az előző eredményeket alátámasztandó, megpróbáltunk *in vivo* bizonyítékot szolgáltatni a $\Delta leu5$ sejtek alacsony mitokondriális CoA tartalmára. Először is a mitokondriális citrát szintáz (Cit1p) csökkent aktivitását feltételeztük. Az olyan mitokondrium, amelynek nincs Cit1p aktivitása, a számára szükséges citrátot a peroxisómális citrát szintáz (Cit2p) által előállított citrát importálásával fedezi (Lewin *et al.*, 1990). A $\Delta cit1\Delta cit2$ kettős mutáns az alacsony citrát szintnek köszönhetően nem képes nemfermentálható szénforrás felhasználására és glutamát auxotrófiát mutat (Kim *et al.*, 1986). Ezért azt feltételeztük, hogy a $\Delta leu5\Delta cit2$ kettős mutáns esetében hasonló fenotípust kellene tapasztalnunk. A *CIT2* kitörlése önmagában nem okoz különösebb változást. A $\Delta leu5\Delta cit2$ esetében viszont a sejt citrát szintje az ötödére csökkent, ha összehasonlítjuk a vad típussal vagy a $\Delta leu5$, vagy a $\Delta cit2$ mutánsokkal, amelyeknél ez az érték közel azonos (10. Ábra). Ezek a sejtek képtelenek glicerint használni szénforrásként, *pet* fenotípusúak, erős citokróom hiányt (5B. Ábra), valamint glutamát auxotrófiát mutatnak.

Mindezek a megfigyelések alátámasztják azt az elméletet, hogy a Leu5p fehérijének a CoA mitokondriumba jutásában van szerepe. Mitokondriális CoA és Cit2p hiányában a citrát szint lecsökken, aminek az lesz a következménye, hogy az α -ketoglutársav citrátköri intermedier sem szintetizálódik, ami a glutamát prekursora. Továbbá a hem bioszintézishez szükséges szukcinil-CoA hiány is bekövetkezik, ami

megmagyarázza a csökkent citokróm mennyiséget a $\Delta\text{leu5}\Delta\text{cit2}$ kettős mutáns esetében (5B. Ábra).



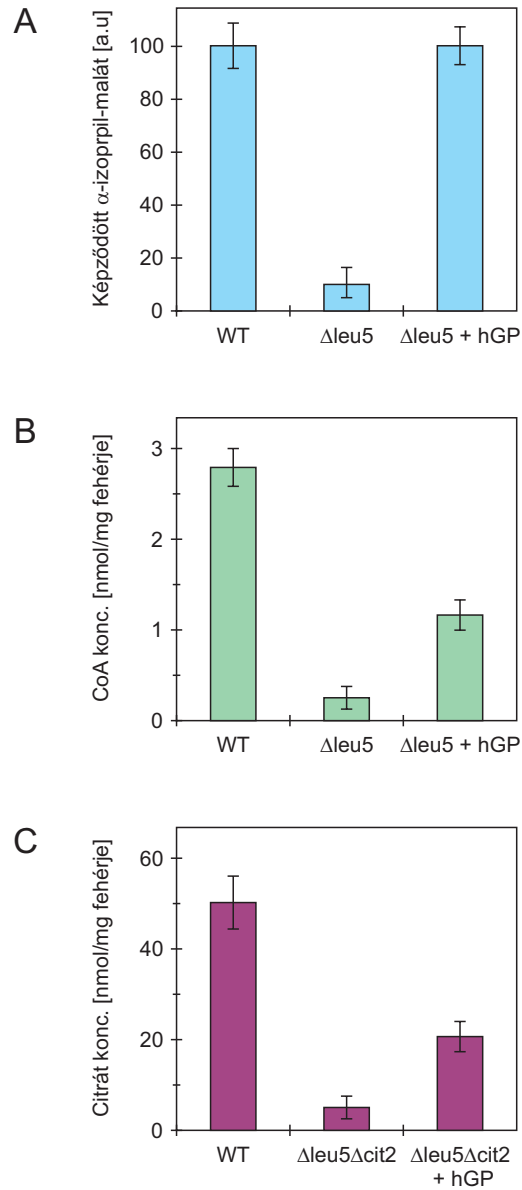
10. Ábra. A $\Delta\text{leu5}\Delta\text{cit2}$ sejtekben lecsökken a citrát mennyisége.

A citrát szintek meghatározása az ábrán feltüntetett sejtek extraktumából készült. Az oszlopok párhuzamos mérések átlagát \pm a szórást mutatják. WT: vad típus.

4.1.5. A humán Graves fehérje képes a Leu5p funkciójának átvételére

Mivel a Leu5p és a hGP között jelentős mértékű homológia van, feltételeztük, hogy a két fehérjének hasonló funkciója van. Ennek bizonyítására Δleu5 sejteket olyan plazmiddal transzformáltuk, amely a hGP gént galaktóz indukálható promóter szabályzása alatt tartalmazza. A kapott, $\Delta\text{leu5}/\text{hGP}$ sejtek növekedését nemfermentálható szénforráson vizsgáltuk. Ha a hGP expresszióját galaktózzal indukáltuk, a növekedés a vad típushoz hasonló volt (5A. Ábra), viszont a Δleu5 sokkal lassabban nőtt, ami azt jelenti, hogy a hGP átveheti a Leu5p funkcióját. Ezt az is bizonyítja,

hogy a mitokondriumban a CoA koncentrációja a vad típushoz közelire állt vissza (11B. Ábra), valamint helyreállt az IMPS aktivitása (11A. Ábra) és részlegesen a sej-



11. Ábra. A humán Graves fehérje képes funkciójában a Leu5p helyettesítésére.

Az α -IPM szintézise (A) a mitokondrium CoA tartalma (B) és a sejtek citrát tartalma (C) vad típusú (WT), Δ leu5 és Δ leu5 Δ cit2 sejtek esetében, hGP jelenlétében vagy anélkül. Az oszlopok három egymástól független meghatározás átlagát, \pm a szórást mutatják.

tek citrát tartalma is (11C. Ábra). Adataink alapján kijelenthetjük, hogy a hGP nagy valószínűséggel szintén a CoA mitokondriális felhalmozásában játszik szerepet.

4.2. A *CyaY* vizsgálata

4.2.1 A *cyaY* eltávolítása és következményei

A *cyaY* gén kitörlése Zeocin antibiotikum-rezisztencia gén (*zeo*) homológ rekombináns beillesztésével történt. A keletkezett törzs a Δ *cyaY* nevet kapta. Mivel a gén az igen fontos funkcióval bír, az adenilát ciklázt kódoló gén, a *cya* (Trotot *et al.*, 1996) környezetében található, a másodlagos hatásokat elkerülendő ún. „in frame” deléciót készítettünk. Ennek során a teljes kódoló szekvenciát kicseréltük az antibiotikum gén kódoló szekvenciájával, érintetlenül hagyva a gén környezetét, így ezzel a *cyaY* eredeti promóter szerkezetét is. Ilyen módon az antibiotikum gén a *cyaY* promóter vezérlése alá került. A mutánsok néhány kolóniáját átoltással, Zeocin tartalmú LB táptalajon többször megtisztítottuk, majd a mutáció jelenlétét PCR reakció és Western blott segítségével erősítettük meg. Valamennyi vizsgált törzs tartalmazta a kicserélt *zeo* gént, a kromoszóma megfelelő helyére integrálva. Az ilyen módon végzett génmegszakítás alátámasztotta azt a korábbi megfigyelést, hogy a *cyaY* gén promótere működő képes (Trotot *et al.*, 1996), hiszen ebben az esetben a

zeo expressziójához erre szükség van, nélküle a sejtek nem lennének képesek az antibiotikum rezisztenciához szükséges fehérje előállítására. Továbbá a gén-deléció Western blottal történő bizonyítása során CyaY könnyen detektálható volt anti CyaY antitest segítségével vad típusú sejtek esetében, ami szintén azt bizonyítja, hogy a *cyaY* gén expresszálódik.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *cyaY* eltávolításának milyen következményei vannak. Azt korábban már megállapították, hogy az élesztőtől eltérően, az *E. coli* esetében nem következik be vas felhalmozódás, vagy növekedett érzékenység oxidatív behatással szemben, ha annak frataxin homológját eltávolítják (Li *et al.*, 1999). Szintén nem tapasztaltak metabolikus defektet, amelynek során a sejtek képtelenek lettek volna valamilyen intermedier előállítására, vagy növekedésbeli különbséget figyeltek volna meg gazdag médiumon a mutáns és vad típusú sejtek között. Mivel a frataxin hiányos élesztő képtelen nemfermentálható szénforrás felvételére, ezért a $\Delta cyaY$ növekedését néhány nemfermentálható (glicerin, etanol és tejsav) és lassan fermentálható (galaktóz, arabinóz és raffinóz) szénforrást tartalmazható minimál médiumon teszteltük, de nem tapasztaltunk érzékelhető különbséget. Szintén nem tapasztaltunk mérhető különbséget, a mutáns és a vad törzsek között, ha a növekedést a szokásos 37 °C-tól eltérően alacsonyabb (30 °C), vagy magasabb (40 °C) hőmérsékleten ellenőriztük, szemben azzal, hogy a frataxin hiányos élesztő erős hőérzékenységet mutat (Knight *et al.*, 1998). Kísérletet tettünk továbbá különbséget kimutatni a vad és Δcya sejtek között vas-kén fehérjék szintézisében, két vas-kén központot tartalmazó enzim, az akonitáz és a szukcinát

dehidrogenáz aktivitásának mérésével. Annak ellenére, hogy ezek az enzimek erősen csökkent aktivitást mutatnak $\Delta yfh1$ élesztőben (Foury & Cazzalini, 1997), *E. coli* törzseink esetében azonban nem tapasztaltunk mérhető eltérést. Mivel egy genetikai analízis során, *S. cerevisiae*-ben (Chen *et al.*, 2002), megállapították, hogy a CIT2 (peroxiszómális citrátszintáz) hiányában a $\Delta yfh1$ törzs bizonyos funkciói részben helyreálltak, így pl. csökkent a *pet* fenotípus erőssége (respiráció helyreállása) valamint a vas okozta toxicitással szembeni érzékenysége. Ezért érdekesnek tartottuk megvizsgálni, hogy amennyiben a frataxin a citrát ciklussal valamilyen kapcsolatba hozható, citrátköri intermediereket alkalmazva, mint egyedüli szénforrást, vajon találunk-e növekedésbeli különbséget a Δcya és a vad típusú sejtek között. Erre a célra piruvátot, citrátot, α -ketoglutarátot, szukcinátot, és malátot használtunk folyékony minimál táptalajban. Ezen anyagok közül az α -ketoglutarát és a szukcinát kivételével nem találtunk számottevő változást (az adatokat nem mutatjuk be). Az α -ketoglutarát esetében a $\Delta cyaY$ törzs növekedésben enyhe lassulást mutatott (10 %), míg szukcinát szénforrás felhasználásával a mutáns törzs duplázódási ideje csaknem a kétszeresére nőtt. Annak bizonyítására, hogy a kapott különbséget nem csak a mutáció létrehozásának módja okozza, a *cyoY* gént egy alacsony kópiaszámú plazmidba (pBR322) klónoztuk, majd az így kapott vektort $\Delta cyoY$ és vad típusú sejtekbe transzformáltuk, majd ismét megvizsgáltuk növekedésüket szukcinát minimál médiumon. Sajnos ebben az esetben valószínűleg a nehéz szénforrás és az antibiotikum közös hatásának köszönhetően a sejtek nagy része elveszítette növekedési képességét, melynek eredményeképpen a duplázódási idő még a vad

típusú sejtek esetében is olyan nagyon megnőtt, hogy a kísérlet nem volt reprodukálható. Ezt követően feladtuk azt a törekvésünket, hogy *E. coli* esetében a CyaY hiány valamilyen hatását kimutassuk.

Mivel a *cyaY* deléciójának bizonyítása során megerősítettük, hogy a *cyaY* expresszálódik ezért elképzelhetetlennek tartjuk, hogy a CyaY nem bírna funkcióval, hanem inkább valószínűbbnek tűnik az a feltételezés, hogy *E. coli* esetében a CyaY funkciója a legtöbb körülmény között fölösleges, annak köszönhetően, hogy esetleg egy vagy több erős szupresszor képes ugyanazt a funkciót betölteni és a CyaY-ra csak nagyon speciális, esetleg laboratóriumban nem is előállítható körülmények között van szükség. Ezért fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy hogyan viselkedik a CyaY olyan genetikai háttérben ahol funkciójára szükség van. Ennek vizsgálatára a *S. cerevisiae*-t választottuk modellként.

4.2.2 Az E. coli CyaY részben képes az élesztő Yfh1p funkciójának helyettesítésére

4.2.2.1 A *cyaY* expressziója *S. cerevisiae*-ben

Mivel a frataxin eukarióta sejtekben mitokondriális lokalizációjú a CyaY mitokondriumba juttatásához egy mitokondriális targeting szekvenciára volt szükség. Erre a célra egy olyan hibrid fehérjét (Yfh1-CyaY) kódoló DNS-t alkottunk amelyben a Yfh1p targeting részét a CyaY N-terminálisához fuzionáltuk. A CyaY első metionin

aminosavát valinra cseréltük, azért, hogy elkerüljük olyan termékek transzlációját, amelyek nem tartalmaznak targeting szekvenciát (12. Ábra).



12. Ábra. A Yfh1-CyaY hibrid fehérje és az Yfh1p aminosav szekvenciák illesztése.

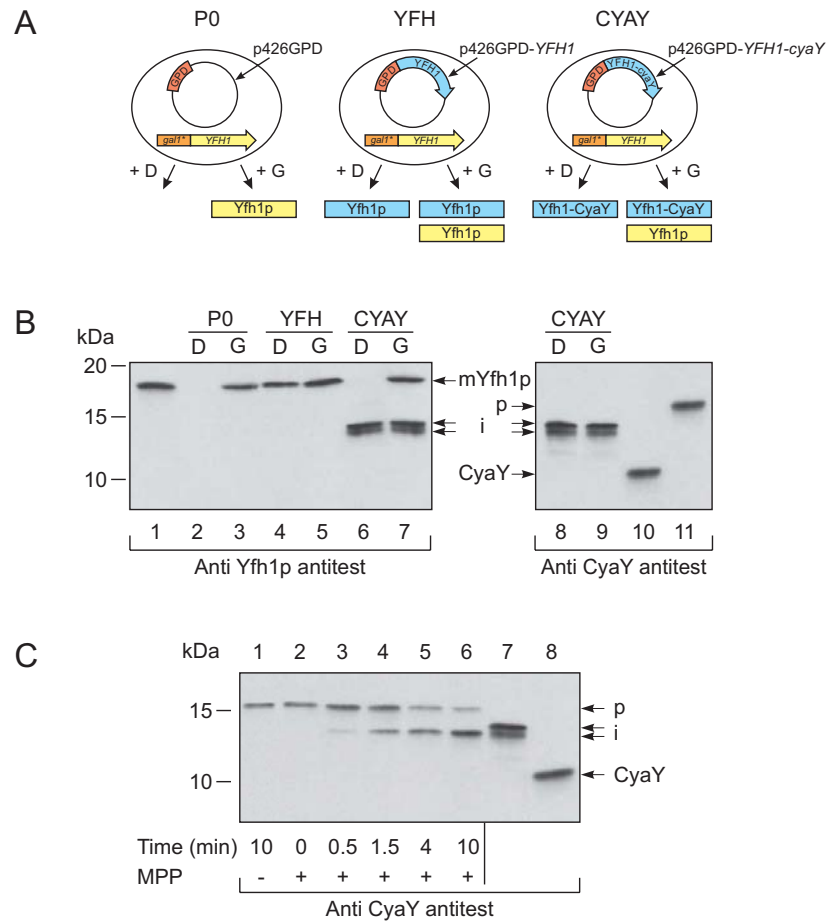
Az MPP I és MPP II jelölés a két MPP hasítási helyet mutatja. A Yfh1-CyaY kiméra expresszálása úgy történt, hogy Yfh1p mitokondriális targeting szekvenciát kódoló részét a CyaY-t kódoló DNS N-terminálisához fuzionáltuk, a *cyaY* rész ATG kodonja nélkül. Az illesztés Clustalw 1.8 program segítségével (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) készült.

Az ilyen módon kapott fehérje tartalmazza mindkét MPP hasító helyet (Branda *et al.*, 1999), amely szükséges a mitokondriális importot követő megfelelő processzáláshoz. Ezt a DNS-t egy állandó expressziót biztosító, élesztő glicerálaldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GPD) promótert tartalmazó vektorba, p426GPD-be klónoztuk, majd a kapott plazmidot, melyet p426GPD-*cyaY*-nek neveztünk el, GK178 *S. cerevisiae* törzsbe transzformáltuk (13A. Ábra, CYAY). A GK178 törzsbe szintén transzformáltunk egy üres p426GPD plazmidot, a kapott törzset (P0) a későbbiekben negatív kontrollként használtuk (kondicionális mutáns, 13B. Ábra). Pozitív kontrollként egy olyan törzset (YFH) hoztunk létre ahol a GK178 törzs egy olyan p426GPD plazmidot (p426GPD-YFH1) tartalmazott amelybe a teljes hosszúságú Yfh1p-t kódoló YFH1 szekvenciát klónoztuk (13A. Ábra).

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a kapott törzsek fehérje expresszióját, valamennyi törzset először SG táptalajban növesztettünk, majd SD táptalajra oltottuk át, azért, hogy lekapcsoljuk a *gal1*-YFH1* expresszióját, majd tovább növesztve a sejteket ezen a táptalajon, depletáljuk a sejtek kromoszómájáról expresszált Yfh1p fehérjéjét (Karthikeyan *et al.*, 2003). A CYAY törzsben mind az érett Yfh1p, mind pedig a részben processzált Yfh1-CyaY detektálható volt, ha a sejteket galaktóz jelenlétében növesztettük (13B. ábra, 7. sáv). Ha viszont a sejteket átoltottuk SD táptalajra öt generáción keresztül, már csak a Yfh1-CyaY volt jelen (13B. ábra, 6. sáv). Hasonló módon a Yfh1p detektálhatatlanná vált a P0 törzsben is, ha öt generáción át SD táptalajban nőtt (13B. ábra, 2. sáv). A YFH törzs esetében, a Yfh1p jelen volt mind SD, mind pedig SG táptalajon, valamivel nagyobb mennyiségben, ha a táptalaj galaktózt tartalmazott (13B. ábra, 4-5. sávok).

A Yfh1-CyaY processzálása két terméket eredményezett, amelyek rövidebbek voltak, mint a teljes hosszúságú Yfh1-CyaY, de hosszabbak, mint az *E. coli*-ban termelt vad típusú CyaY (13B. ábra, 8-11. sávok). Ezek a termékek egyaránt detektálhatóak voltak anti-CyaY és anti-Yfh1p antitestekkel (13B. ábra, 6-7. és 8-9. sávok), ami azt jelenti, hogy a Yfh1-CyaY mitokondriális targeting szekvenciája a processzálas során nem teljes egészében lett eltávolítva. Azért, hogy megvizsgáljuk, vajon az MPP képes a Yfh1-CyaY hibrid hasítására, megpróbáltunk rekombináns Yfh1-CyaY fehérjét élesztő MPP-vel *in vitro* elvágni. Az MPP hasítás egy olyan terméket eredményezett, amely az élesztőben *in vivo* kapott két termék közül a kisebbikkel mutatott azonos méretet (13B. ábra, 6. és 7. sáv). A másik, hosszabb

terméket, még rövid inkubációs idő esetében sem sikerült detektálni (13B. ábra, 3. sáv, 0.5 perc). Ezek alapján, amennyiben a Yfh1-CyaY-t élesztőben expresszáltunk, az a mitokondriumba importálnak és az MPP által legalább részlegesen processzálnak tekinthető.



13. Ábra. A YFH1-cyaY expressziója élesztőben.

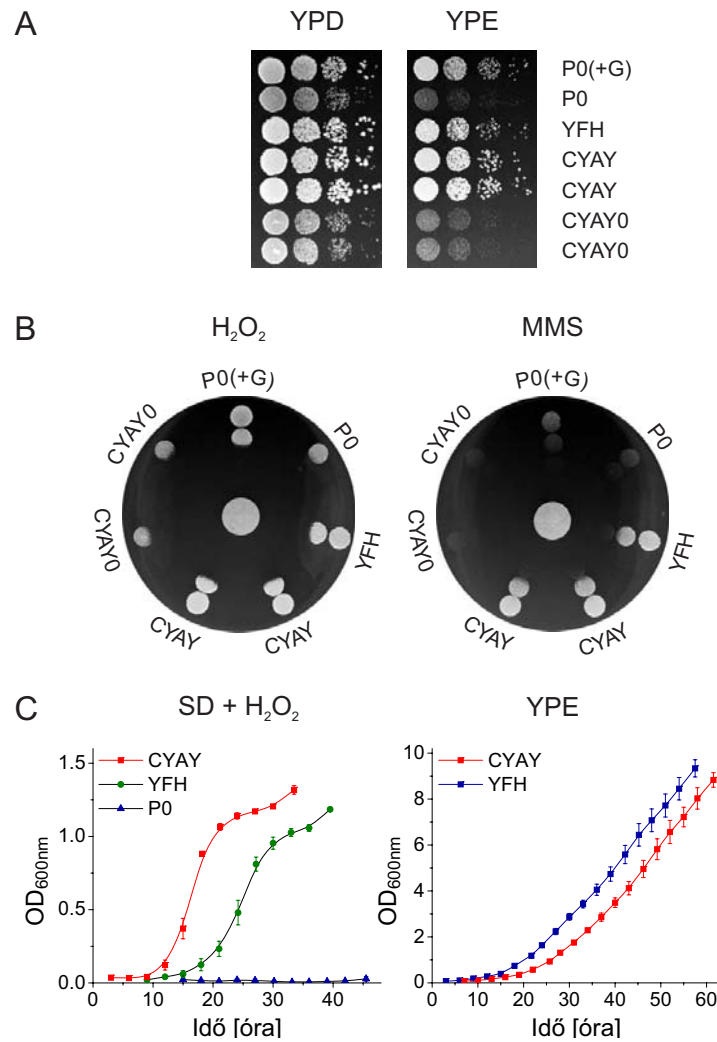
A. A p426GPD-YFH1 és a p426YFH1-cyaY vektorokat, amelyek a vad típusú Yfh1p-t és a Yfh1-CyaY hibrid fehérjét kódoló szekvenciákat tartalmaznak, valamint az üres p426GPD vektort, GK178 *S. cerevisiae* törzsbe transzformáltunk, amely a YFH, a CYAY és a P0 törzseket eredményezte. Mindhárom esetben az endogén YFH1 gén a

- szigorúan szabályozott, módosított galaktóz indukálható promóter, a *gal1** vezérlése alatt állt. A p426GPD-YFH1 és a p426GPD-YFH1-cyaY vektorok expressziója független a szénforrás milyenségétől.
- B. A P0, CYAY és YFH törzsekből, amelyek glükóz (D), vagy galaktóz (G) jelenlétében nőttek, fehérje preparátumot készítettünk. A 2-3. és a 6-7. sávokba 60 µg, a 4-5. sávokba 2 µg, a 8-9. sávokba pedig 1 µg fehérjét töltöttünk. A mintákat 14 %-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el, majd az egyes fehérje frakciókat Western blott segítségével, anti Yfh1p (bal oldali panel) vagy anti CyaY (jobb oldali panel) antitest felhasználásával jelenítettük meg. Viszonyítási standardként *E. coli*-ban termelt, érett Yfh1p-t (mYfh1p, 1. sáv), vad típusú CyaY-t (10. sáv) és teljes hosszúságú Yfh1-CyaY-t (11. sáv) használtunk. A p és i betűk a teljes illetve a átmeneti hosszúságú Yfh1p formákat jelölik.
- C. Yfh1-CyaY hasítása MPP-vel *in vitro*. Yfh1p-CyaY hibrid fehérjét expresszáló *E. coli* törzs lizátumát MPP jelenlétében inkubáltunk. A reakciókeverékből a jelzett időpontokban mintát vettünk, majd ezeket a mintákat SDS gélen elválasztottuk, majd Western blottal, anti CyaY antitest felhasználásával analizáltunk. Viszonyításképpen a CYAY törzsből készített fehérje mintát használtunk (7. sáv, ez a minta azonos a B rész 9. sávjában használttal). A p és i betűk a teljes illetve a átmeneti hosszúságú Yfh1p-CyaY formákat jelölik.

4.2.2.2 A *cyaY* képes a frataxin depletált élesztő komplementálására

A következőkben megvizsgáltuk, hogy vajon az Yfh1-CyaY képes-e helyre állítani azokat a zavarokat, amelyeket a frataxin hiánya okoz élesztőben. Miután a sejteket glükóz tartalmú táptalajra oltottuk át, és azt követően 5 generáción keresztül glükóz jelenlétében növesztettük, a P0 törzs nagyon nehezen nőtt nem fermentálható szénforráson, a CYAY viszont ugyanolyan jól nőtt mint a YFH1 (14A. Ábra, YPE). A CYAY estében tapasztalt komplementáció határozottan a Yfh1-CyaY fehérje jelenlétének tulajdonítható, hiszen a p426GPD-YFH1-cyaY vektor eltávolítása után, a

növekedés mértéke a P0 törzshez hasonlóra csökkent (14A. Ábra, CYAY0 törzs). Amikor a növekedést folyékony YPE táptalajban vizsgáltuk, a CYAY törzs egy kicsit lassabban nőtt mint a YFH (14C. Ábra, YPE). Szintén a Yfh1-CyaY fehérje

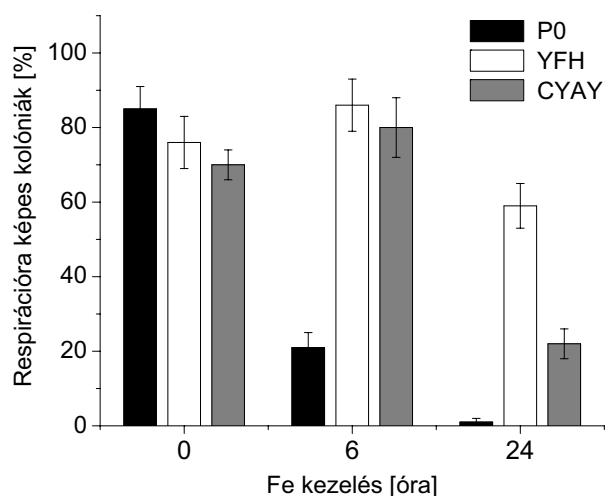


14. Ábra. Yfh1p depletált élesztő komplementálása CyaY-val.

A. Valamennyi törzset SD táptalajon növesztettünk a Yfh1p depletálására, kivéve a P0-t amelyet SG-n is növesztettünk (P0(+G)) és pozitív kontrollként használtunk. A kultúrákból hígítási sort készítettünk, majd egy kis térfogatát szilárd YPD vagy YPE

táptalajra cseppentettük. A CYAY esetében két egymástól függetlenül kiválasztott törzset használtunk. Annak a megerősítésére, hogy a komplementáció a Yfh1-CyaY jelenlétének köszönhető, a CYAY törzsből eltávolítottuk a p426GPD-YFH-cyaY plazmidot (CYAY0). A YPE mellett YPD táptalajt is használtunk, mint növekedési pozitív kontrol.

- B. Az előzőekben leírtak szerint Yfh1p-re depletált sejt kultúrákat YPD szilárd táptalajra csöpögtettünk, majd a táptalaj közepére helyezett szűrőpapír korongra 10 μ l H₂O₂-ot (bal oldali kép), vagy 5 μ l MMS-t (jobb oldali kép) cseppentettünk. A szilárd táptalajra helyezett kultúrákat 3 (YPD) vagy 5 (YPE) napig növesztettük 30 °C-on mielőtt a fényképeket készítettük.
- C. A CYAY és YFH törzsek három-három különböző kultúráját, melyeket az endogén Yfh1p-re depletáltunk, 500 μ M H₂O₂-ot tartalmazó folyékony SD (baloldal) vagy YPE médiumba (jobboldal) hígítottunk, majd a kultúrákat tovább növesztettük rázatás közben 30 °C-on, és a növekedést a kultúrák turbiditásának mérésével követtük (OD_{600nm}). A görbék a három kultúra átlagát mutatják, \pm a szórást.

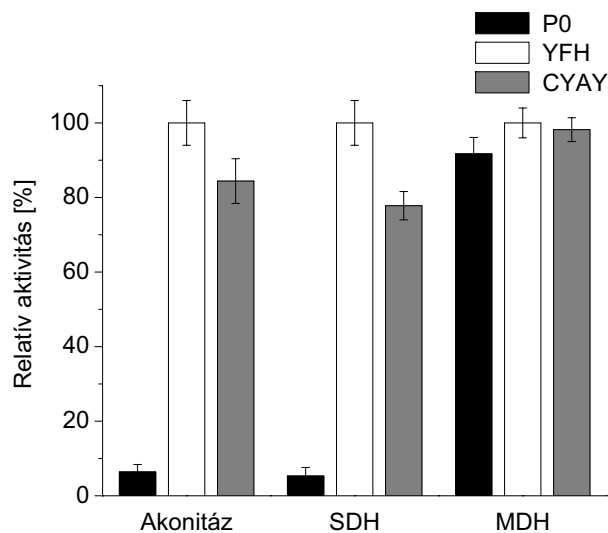


15. Ábra. A CyaY csak részlegesen képes az élesztősejteket megvédeni vassal szemben.

A P0, YFH és CYAY törzseket endogén Yfh1p-re depletáltuk, majd a kultúrákhoz 100 μ M FeCl₃-ot adtunk, majd a jelzett időpontokban mintát vettünk és azokat YPD vagy YPg szilárd táptalajra oltottuk. Az oszlopok azon kolóniák arányát mutatják, amelyek

respirációra képesek, vagyis nőttek a YPg táptalajon, az összes, YPD táptalajon nőtt kolóniák számához képest. Az itt bemutatott adatok három egymástól független kísérlet átlagát, \pm a szórást mutatják.

jelenlétének köszönhető a megnövekedett ellenálló képesség különböző stressz hatásokkal, mint H_2O_2 -al, vagy mint az alkilezőszer, metil-metánszulfonsavval (MMS) történő kezeléssel szemben (14b. Ábra). Az utóbbi anyag a mitokondriális és a nukleáris DNS sérülését idézi elő (Vongsamphanh *et al.*, 2001). Érdekes módon, amikor a sejtek H_2O_2 -al szembeni érzékenységét vizsgáltuk folyékony SD táptalajban, azt találtuk, hogy a CYAY törzs még a YFH-nél is jobban tolerálta ezt a hatást (14C. Ábra, SD + H_2O_2). Ha a respirációs funkció megőrzését vizsgáltuk vas ionokkal történő kezelés során, akkor a CYAY valamennyi vizsgált időpontban sokkal kedvezőbben reagált, mint P0, de a respiráció megtartása 24 óra után sokkal gyengébb volt a YFH-hez képest (15. Ábra). A vas-kén központot tartalmazó enzimek aktivitásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a Yfh1-CyaY jelenlétében az akonitáz és a SDH a YFH törzsben mérthez képest kb. 80-85%-ban helyreállt, ezzel szemben viszont a P0 esetében ezen enzimek aktivitása alig volt nagyobb a detektálhatóság alsó értékénél (16. Ábra). A MDH, mint olyan mitokondriális enzim, amelynek aktivitása független a vas-kén fehérje szintézistől, hasonló aktivitást mutatott valamennyi törzs esetében.



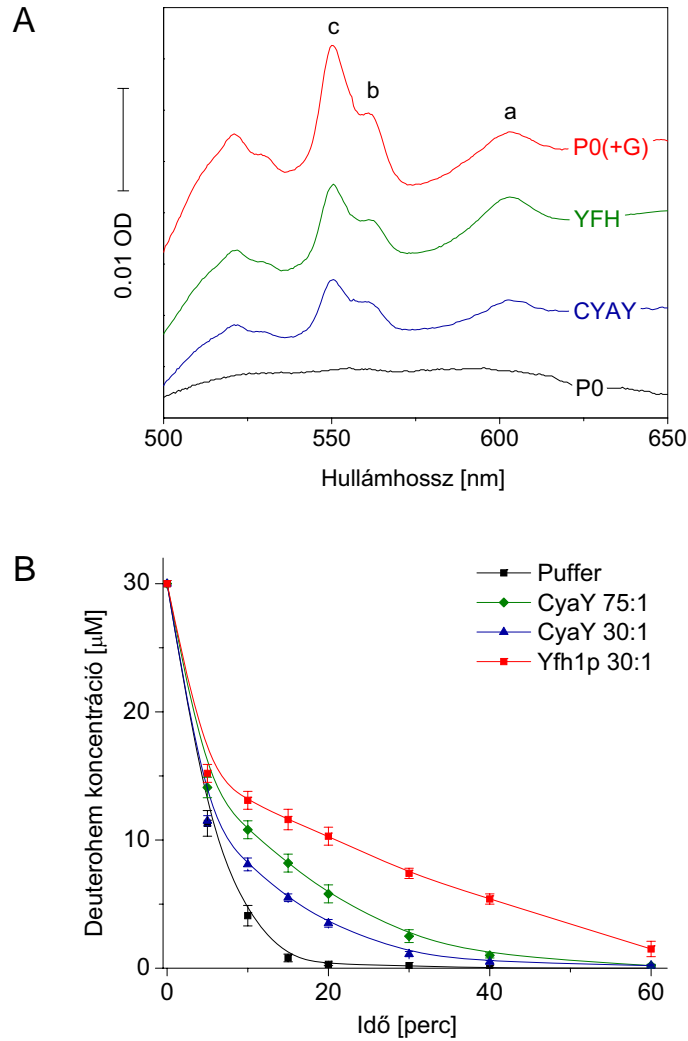
16. Ábra. A CyaY képes részlegesen helyreállítani a vas-kén központot tartalmazó enzimek aktivitását.

A P0, YFH és CYAY törzseket depletáltuk endogén Yfh1p-re, majd ezekből a sejtekből mitokondriumot izoláltunk, amelyeket az akonitáz, szukcinát dehidrogenáz (SDH) és malát dehidrogenáz (MDH) enzimek aktivitásának meghatározására használtunk. Valamennyi enzim esetében az aktivitást a YFH törzsben mért aktivitás %-ában fejeztük ki (% vad típus). A bemutatott értékek három párhuzamos meghatározás átlagát \pm a szórást mutatják. Az aktivitási értékek számszerűen a következők voltak (mU/mg):

	YFH	CYAY	P0
Akonitáz	58 \pm 3	50 \pm 4	4 \pm 1
SDH	15 \pm 1	12 \pm 1	1 \pm 0
MDH	600 \pm 24	589 \pm 19	550 \pm 26

4.2.2.2 A CyaY képes a hem bioszintézis helyreállítására

Végül arra a kérdésre próbáltunk választ kapni, hogy vajon a Yfh1-CyaY hibrid fehérjénk képes-e a hem bioszintézis helyreállítására frataxin hiányos élesztőben.



17. Ábra. A CyaY közreműködik a hem szintézisében.

A. A CyaY részlegesen helyreállítja a citokrómok mennyiségét.

A P0, YFH és CYAY törzseket SD táptalajon depletáltuk Yfh1p-re, kivéve a P0-t, amelyet galaktózon is növesztettünk, mint pozitív kontrol (P0(+G)). Valamennyi sejtet

később laktát médiumra oltottunk át és a növesztést 12 órán át folytattuk, majd a sejteket összegyűjtöttük és mitokondriumot preparáltunk. Mintánként 500 µg mitokondrium felhasználásával elkészítettük az oxidált és a redukált citokrómok differenciál-spektrumát (Tzagoloff, 1995). Az ábrán feltüntettük az a, b és c típusú citokrómok elnyelési maximumát.

B. A CyaY képes Fe^{2+} -t átadni élesztő ferrokeletáznak.

Az aerób hem szintézis reakciót már korábban közölt módszer szerint viteleztük ki (Park *et al.*, 2003). A vad típusú mYfh1p-t (1µM) és CyaY-t (1 vagy 0.4 µM) 30 µM Fe^{2+} -vel inkubáltunk megfelelő pufferben, aerób körülmények között, úgy, hogy a vas-fehérje arány 30:1 vagy 75:1 legyen. A feltüntetett időpontoknál mintát vettünk, melyhez élesztő ferrokeletázt (2 µM) és deuteroporfirint (120 µM) adtunk, majd az inkubálást 20 percig folytattuk. A deuterohem koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg. A görbék három független reakció átlagát tükrözik, \pm a szórás.

Erre a célra a különböző élesztőtörzseink citokróm abszorpciós spektrumát vizsgáltuk meg amely a sejtek citokróm tartalmát tükrözi. Míg a citokrómok mennyisége a detektálási határ alatt volt a Yfh1p depletált P0 törzsben, addig a Yfh1-CyaY jelenlétében a CYAY törzs a YFH törzséhez hasonló szintet mutatott (17A. Ábra).

Azt már korábban bemutatták, hogy Yfh1p képes Fe^{2+} -t átadni más komponenseknek O_2 jelenlétében, semleges pH-nál, amely körülmények egyébként a Fe^{2+} oldhatatlan vas(III) oxidokká átalakulásának kedveznek (Park *et al.*, 2003; O'Neill *et al.*, 2005). Ezeket a korábban kifejlesztett módszereket használtuk megvizsgálni recombináns CyaY fehérje vas shaperon funkcióját. A *E. coli*-ban termelt fehérjét aerób puffer jelenlétében Fe^{2+} ionokkal inkubáltuk. A keverékhez tisztított, élesztő ferrokeletáz enzimet adtunk, amely katalizálja a Fe^{2+} , de nem a Fe^{3+} beillesztését protoporfirin IX-be, hanem eredményezve. A reakciót különböző ideig

kivitelezve meghatároztuk a biológiailag felhasználható Fe^{2+} mennyiségét. A reakcióban alkalmazott vas és CyaY molaránya 3 és 100 között változott, melyekből a 75:1 arányt találtuk optimálisnak a hem szintéziséhez. A 30:1 és 75:1 vas-fehérje arányoknál kapott eredményeket mutatjuk be a 17B. Ábrán. A CyaY határozottan magasabb felvehető Fe^{2+} szintet biztosított mint a puffer önmagában, azonban nem volt olyan hatékony, mint élesztő homológja a Yfh1p (17B. Ábra).

5. Megbeszélés

A tanulmány első felében egy élesztő és egy humán eredetű homológ pár a Leu5p és a Graves fehérje funkció analízisét mutattuk be. Biokémiai és genetika eszközök segítségével bebizonyítottuk, hogy mindkét fehérjének a mitokondriális mátrix CoA felhalmozódásában van szerepe. A Δleu5 sejtek mitokondriumában a CoA mennyisége a vad típus 1/15-ére csökkent, ugyanakkor nem tapasztaltunk számottevő különbséget ezen sejtek PMS-ében. A CoA depléció megszüntetésében a humán eredetű Graves fehérje képes volt a Leu5p részleges helyettesítésére. A CoA mennyisége a sejten belül széles eloszlást mutat, legnagyobb mennyiségben a mitokondriumban és a peroxiszómában található. Ugyan a CoA öt lépésből álló szintézisében résztvevő enzimek, az első kivételével még nem ismeretesek, azonban feltételezik, hogy a CoA a citoszólban szintetizálódik és ezekbe a szubcelluláris szervecskébe transzport útján kerül be (Tahiliani, 1991). Mivel ezen transzporterek azonosítása még nem történt meg, kísérletet tettünk Leu5p jelenlétében *in vitro* CoA

transzport kísérlet összeállítására izolált mitokondriumok felhasználásával, mivel eredményeink azt mutatják, hogy a Leu5p (és a hGP is) tökéletes jelöltnek mutatkozik mitokondriális CoA transzport funkció betöltésére. A kísérletben nem sikerült a CoA importját kimutatni, ami a CoA gyors bomlása miatt történhetett, egy a CoA hidroláz által katalizált reakcióban (Bucovaz *et al.*, 1997), de továbbra is feltételezzük a Leu5p ilyen szerepét. A CoA citoszólos szintézisét bizonyítja az is, hogy vizsgálataink befejezése után azonosították a CoA szintézis két utolsó lépését katalizáló CoA szintázt, amely citoszólos lokalizációjának bizonyult (Zhyvoloup *et al.*, 2002). Tudomásunk szerint olyan transzportert még nem sikerült azonosítani, amely a CoA peroxiszómába juttatásáért felelős.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a Δ leu5 sejtekben ugyan nagymértékben csökkent a CoA koncentráció, de még mindig jelentős mértékben jelen van, ami egy másik transzport mechanizmus meglétét is feltételezi. Mind a mai napig nem sikerült a Leu5p és hGP mellett másik ilyen funkciójú fehérjét találni.

A Leu5p CoA transzportban betöltött szerepe végre választ ad a Leu4p és Leu5p közötti kapcsolatra vonatkozó régóta megválaszolatlan kérdésre is (Chang *et al.*, 1984; Drain & Schimmel, 1986; Drain & Schimmel, 1988). Az egyszeres mutánsok nem, csak a kettős Δ leu4 Δ leu5 mutat leucin auxotrófiát. A Leu4p hiányában az α -IPMS-t a Leu9p szintetizálja, amely a Leu4p egy izoenzimje és mitokondriális lokalizációjú (6. Ábra). Mivel a Leu4p megtalálható a citoszólban is, így a Δ leu5 sejtekben az α -IPMS a citoszólban előállítható. A Δ leu4 Δ leu5 sejtek esetében viszont

a leucin szintézis ezen lépését csak a mitokondriális Leu9p tudja elvégezni, aktivitása viszont erősen limitált az alacsony CoA tartalomnak köszönhetően.

A Graves betegség egy autoimmun betegség, amelyben a pajzsmirigy túltengését a thyrotropin receptor és más thyroid fehérjék ellen termelt ellenanyagok okozzák (Brix *et al.*, 1998; McIver & Morris, 1998). A hGP cDNS-ét már régebben klónozták (Zarrilli *et al.*, 1989), majd a fehérje mitokondriális hordozó jellegét is megállapították, de eddig pontos funkcióhoz még nem kapcsolták. Eredményeink azt mutatják, hogy a hGP részlegesen képes helyettesíteni a Leu5p-t, így ennek a fehérjének is a CoA mitokondriumba juttatásában tulajdonítunk szerepet. Mivel az élesztőben expresszált, működőképes hGP és Graves betegségben szenvedő beteg véréruma között nem sikerült kimutatni immunreakciót, arra következtünk, hogy ebben a betegségben, nem a hGP az elsődleges antitest. Továbbá a hGP CoA transzportban betöltött szerepe alapján feltételezzük, hogy ennek a fehérjének nincs közvetlen szerepe a betegségben.

A tanulmány második felében egy *E. coli* eredetű frataxin homológot, a CyaY fehérjét vizsgáltuk, melynek során a CyaY-t *S. cerevisiae*-ben expresszáltuk. Korábban már bemutatták, hogy a CyaY képes *in vitro* vasat megkötni és átadni [2Fe-2S] szerkezetű vas-kén központoknak (Layer *et al.*, 2006). Viszont, amennyiben a *cyaY*-t eltávolították *E.coli*-ből, vagy *S. entericából*, nem tapasztaltak határozott fenotípust, szemben azokkal az erős változásokkal, amelyeket eukarióta sejteknél tapasztaltak részleges, vagy teljes frataxin vesztés esetén. Az olyan *E. coli* sejtek, amelyekből a *cyaY* gént kitörölték nem mutattak semmilyen auxotrófiát, különbséget

növekedésben, vas tartalomban, vagy érzékenységben H₂O₂-al szemben (Li *et al.*, 1999), amelyeket magunk is megerősítettünk (nem publikált megfigyelés). Hasonló jelenséget tapasztaltak *S. enterica* esetében is. Ha viszont a *cyaY* deléciót más gének, az *yggX* vagy az *apbC* (amelyek az antioxidáns védelemben ill. a vas-kén központok felépítésében érintettek) deléciójával kombinálták, az sejtek csökkent növekedést mutattak, csökkent az SDH aktivitásuk, megnőtt az érzékenységük az oxidálószer paraquat-tal szemben, viszont nem mutattak változást vas tartalomban (Vivas *et al.*, 2006). Mindezeket a megfigyeléseket összevetve feltételezhető az, hogy az *E. coli* sejtek esetében lehet, hogy a CyaY funkciója felesleges. Ezt a megközelítést alátámasztja az tény, hogy az *E. coli* esetében a vas-kén központok szintézisére három különböző, de funkciójában némileg fedésben lévő rendszer létezik az ISC (Krebs *et al.*, 2001), az SUF (Takahashi & Tokumoto, 2002) és a CSD (Loiseau *et al.*, 2005) rendszerek. Eukarióta sejtek esetében a frataxin részleges vagy teljes elvesztése a vas-kén központok (Duby *et al.*, 2002; Muhlenhoff *et al.*, 2002) és a hem (Lesuisse *et al.*, 2003; Schoenfeld *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005) bioszintézisének csaknem teljes elvesztését okozza, valamint a sejtek fokozott érzékenységét oxidatív behatással szemben emberben (Schultz, 2000), egérben (Thierbach *et al.*, 2005), *Caenorhabditis elegans*-ban (Vazquez-Manrique *et al.*, 2006) és élesztőben (Karthikeyan *et al.*, 2003). Ezért feltételeztük, hogy a CyaY funkciójának *in vivo* vizsgálatára a legjobb környezet egy olyan organizmus lenne ahol a frataxin funkciója nincs fölöslegben. Erre a célra egy olyan *S. cerevisiae* törzset használtunk, amely

depletálható az endogén Yfh1p-re, ahol, szemben a deletált ($\Delta yfh1$) mutánsokkal, a teljes frataxin hiányt követő megfordíthatatlan károsodások elkerülhetők.

Eredményeinkben bemutattuk, hogy az élesztőben expresszált CyaY képes a Yfh1p depletált élesztő növekedését a vad típushoz megközelítően fenntartani mind fermentálható, mind pedig nemfermentálható szénforráson (14A-B. Ábrák). Két vas-kén központot tartalmazó enzim, az akonitáz és a SDH, amelyek különösen érzékenyek a frataxin hiánnyal szemben (Rotig *et al.*, 1997; Foury, 1999), szintén a normál szint közelében voltak (16. Ábra), ami azt jelenti, hogy a CyaY hatékonyan képes az élesztő frataxin helyettesítésére a vas-kén fehérjék központjának kijavítására és/vagy *de novo* szintézisére. Hasonló módon a CYAY törzs citokróm tartalma is hasonló volt a YFH törzsben mérthez (17A. Ábra), amely alapján arra következtethetünk, hogy a CyaY alkalmas a hem szintézis helyreállítására, amelyet szintén megerősítettünk *in vitro*, ahol CyaY képes volt Fe^{2+} ionokat átadni élesztő ferroketáz számára (17B. Ábra). Ezek alapján a CyaY funkciójában, hasonlóan viselkedik mint a frataxin homológok eukarióta szervezetekből származó tagjai, mint vas shaperon, amely képes vasat szolgáltatni vas-kén fehérjék és hem szintéziséhez.

Annak a vizsgálatára, hogy a CyaY vajon képes-e a vas ártalmatlanítására a CYAY törzset különféle stressz hatásoknak tettük ki. H_2O_2 -os kezelés hidroxil gyökök képződését indukálja, a vas katalizálta Fenton reakcióban, amely a fehérjék, sejtmembránok oxidatív károsodásához, valamint igen változatos DNS sérüléshez vezet (Evans *et al.*, 2004). Ezért H_2O_2 -ot használtunk a CYAY törzs szabadgyökökkel szembeni érzékenységének vizsgálatára. A metilezőszer MMS,

képes mind a mitokondriális, mind pedig a nukleáris DNS-t károsítani (Vongsamphanh *et al.*, 2001). Ezt a vegyületet használtuk a Fenton reakcióban keletkező gyökök DNS károsító hatásának felerősítésére. H_2O_2 , vagy MMS hatásának kitéve a sejteket szilárd táptalajon, a CYAY és a YFH sejtek megközlítően hasonló túlélő képességet mutattak (14B. Ábra). Ezen túlmenően ha a H_2O_2 -ot adtunk SD táptalajban, növekedésben lévő kultúrákhoz, a CYAY még egy kissé jobban is nőtt mint a YFH (14C. Ábra). Ezzel szemben a CyaY csak részlegesen volt képes védelmet nyújtani a vas károsító hatásával szemben, ha a sejteket vas ionokkal kezeltük (15. Ábra). A kísérlet során, az idő előrehaladtával a CYAY törzs esetében lényegesen magasabb számú respirációra alkalmatlan kolóniát figyeltünk meg, mint a YFH törzs esetében. Ebből az eredményből arra következtethetünk, hogy a CyaY nem képes megfelelő képpen reagálni a megnövekedett mennyiségű mitokondriális labilis vassal szemben, amely a respirációban szereplő mitokondriális komponensek nagyobb arányú károsodásához vezet. Korábbi tanulmányokban bemutatták, hogy a CyaY képes Fe^{2+} -t oxidálni H_2O_2 jelenlétében (Bou-Abdallah *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2007), azonban az a ferroxidáz aktivitás megszűnik oxigén jelenlétében, az élesztő vagy a humán homológoktól eltérő módon (Bou-Abdallah *et al.*, 2004). Ez jelenség magyarázatot ad arra, hogy a CyaY miért képes védelmet nyújtani a H_2O_2 vagy az MMS által keltett fokozott oxidatív stresszel szemben, ugyanakkor a védő hatás vassal szemben már sokkal kevésbé érvényesült. Ez a jelenség következménye lehet annak a, hogy *E. coli*-ban bőségesen rendelkezésre állnak különböző a vas ártalmatlanítására képes, ferritin és ferritin szerű molekulák (Abdul-Tehrani *et al.*,

1999; Bou-Abdallah *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002). Az eukarióta sejtek mitokondriumában, ahol a frataxin található, csak néhány emlős (Drysdale *et al.*, 2002), vagy rovar (Missirlis *et al.*, 2006) szövet estében fordul elő ferritin, vagy ferritin szerű fehérje, amiből azt a következtetést lehet levonni, hogy az eukarióta frataxin ferroxidáz aktivitása az evolúció során alakulhatott ki, azért hogy a kompenzálja a mitokondrium azon hiányosságát, hogy nem képes vasat ártalmatlanítani.

6. Idézett Irodalom

- Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang YS, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harrison PM, Guest JR & Andrews SC (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**: 1415-1428.
- Adamec J, Rusnak F, Owen WG, Naylor S, Benson LM, Gacy AM & Isaya G (2000) Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* **67**: 549-562.
- Adinolfi S, Nair M, Politou A, Bayer E, Martin S, Temussi P & Pastore A (2004) The factors governing the thermal stability of frataxin orthologues: how to increase a protein's stability. *Biochemistry* **43**: 6511-6518.
- Adinolfi S, Trifuoggi M, Politou AS, Martin S & Pastore A (2002) A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet* **11**: 1865-1877.
- Alper MD & Ames BN (1978) Transport of antibiotics and metabolite analogs by systems under cyclic AMP control: positive selection of *Salmonella typhimurium* *cya* and *crp* mutants. *J Bacteriol* **133**: 149-157.
- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M & Kaplan J (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**: 1709-1712.
- Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F & Cullin C (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3329-3330.
- Bauer MF, Hofmann S, Neupert W & Brunner M (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol* **10**: 25-31.
- Bidichandani SI, Ashizawa T & Patel PI (1997) Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion [letter]. *Am J Hum Genet* **60**: 1251-1256.
- Blaiseau PL, Lesuisse E & Camadro JM (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* **276**: 34221-34226.

- Bou-Abdallah F, Adinolfi S, Pastore A, Laue TM & Dennis Chasteen N (2004) Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of Escherichia coli. *J Mol Biol* **341**: 605-615.
- Bou-Abdallah F, Lewin AC, Le Brun NE, Moore GR & Chasteen ND (2002) Iron detoxification properties of Escherichia coli bacterioferritin. Attenuation of oxyradical chemistry. *J Biol Chem* **277**: 37064-37069.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Branda SS, Cavadini P, Adamec J, Kalousek F, Taroni F & Isaya G (1999) Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* **274**: 22763-22769.
- Brix TH, Kyvik KO & Hegedus L (1998) What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review. *Thyroid* **8**: 727-734.
- Bucovaz ET, Macleod RM, Morrison JC & Whybrew WD (1997) The coenzyme A-synthesizing protein complex and its proposed role in CoA biosynthesis in bakers' yeast. *Biochimie* **79**: 787-798.
- Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G & Szweda LI (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**: 242-245.
- Calvo JM, Bartholomew JC & Stieglitz BI (1969) Fluorometric assay of enzymatic reactions involving acetyl Coenzyme A in aldol condensations. *Anal Biochem* **28**: 164-181.
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD *et al.* (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**: 1423-1427.
- Cavadini P, O'Neill HA, Benada O & Isaya G (2002) Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* **11**: 217-227.
- Chang LF, Cunningham TS, Gatzek PR, Chen WJ & Kohlhaw GB (1984) Cloning and characterization of yeast Leu4, one of two genes responsible for alpha-isopropylmalate synthesis. *Genetics* **108**: 91-106.
- Chelstowska A & Butow RA (1995) RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *J Biol Chem* **270**: 18141-18146.
- Chen OS, Crisp RJ, Valachovic M, Bard M, Winge DR & Kaplan J (2004) Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* **279**: 29513-29518.

- Chen OS, Hemenway S & Kaplan J (2002) Genetic analysis of iron citrate toxicity in yeast: implications for mammalian iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16922-16927.
- Cho SJ, Lee MG, Yang JK, Lee JY, Song HK & Suh SW (2000) Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8932-8937.
- Cossee M, Durr A, Schmitt M *et al.* (1999) Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol* **45**: 200-206.
- Cossee M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, Fischbeck K, Dolle P & Koenig M (2000) Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* **9**: 1219-1226.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Daum G, Bohni PC & Schatz G (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **257**: 13028-13033.
- de Winde JH & Grivell LA (1993) Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **46**: 51-91.
- Dhe-Paganon S, Shigeta R, Chi YI, Ristow M & Shoelson SE (2000) Crystal structure of human frataxin. *J Biol Chem* **275**: 30753-30756.
- Dickinson JR (1999) *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Taylor and Francis Ltd., London, United Kingdom.
- Diekert K, de Kroon AI, Kispal G & Lill R (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **65**: 37-51.
- Diekert K, Kispal G, Guiard B & Lill R (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11752-11757.
- Dietmeier K, Zara V, Palmisano A, Palmieri F, Voos W, Schlossmann J, Moczko M, Kispal G & Pfanner N (1993) Targeting and translocation of the phosphate carrier/p32 to the inner membrane of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **268**: 25958-25964.
- Ding H, Yang J, Coleman LC & Yeung S (2007) Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *J Biol Chem* **282**: 7997-8004.

- Drain P & Schimmel P (1986) Yeast LEU5 is a PET-like gene that is not essential for leucine biosynthesis. *Mol Gen Genet* **204**: 397-403.
- Drain P & Schimmel P (1988) Multiple new genes that determine activity for the first step of leucine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **119**: 13-20.
- Drysdale J, Arosio P, Invernizzi R, Cazzola M, Volz A, Corsi B, Biasiotto G & Levi S (2002) Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis* **29**: 376-383.
- Duby G, Foury F, Ramazzotti A, Herrmann J & Lutz T (2002) A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* **11**: 2635-2643.
- el Moulaj B, Duyckaerts C, Lamotte-Brasseur J & Sluse FE (1997) Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 573-581.
- Emerit J, Beaumont C & Trivin F (2001) Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* **55**: 333-339.
- Evans MD, Dizdaroglu M & Cooke MS (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* **567**: 1-61.
- Fiermonte G, Runswick MJ, Walker JE & Palmieri F (1992) Sequence and pattern of expression of a bovine homologue of a human mitochondrial transport protein associated with Grave's disease. *DNA Seq* **3**: 71-78.
- Fiore C, Trezeguet V, Le Saux A, Roux P, Schwimmer C, Dianoux AC, Noel F, Lauquin GJ, Brandolin G & Vignais PV (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* **80**: 137-150.
- Forrest SM, Knight M, Delatycki MB, Paris D, Williamson R, King J, Yeung L, Nassif N & Nicholson GA (1998) The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene. *Neurogenetics* **1**: 253-257.
- Foury F (1999) Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* **456**: 281-284.
- Foury F & Cazzalini O (1997) Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett* **411**: 373-377.
- Foury F & Talibi D (2001) Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* **276**: 7762-7768.
- Gakh O, Adamec J, Gacy AM, Twesten RD, Owen WG & Isaya G (2002) Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **41**: 6798-6804.

- Gakh O, Obsil T, Adamec J, Spizek J, Amler E, Janata J & Kalousek F (2001) Substrate binding changes conformation of the alpha-, but not the beta-subunit of mitochondrial processing peptidase. *Arch Biochem Biophys* **385**: 392-396.
- Gakh O, Park S, Liu G, Macomber L, Imlay JA, Ferreira GC & Isaya G (2005) Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum Mol Genet*.
- Gakh O, Park S, Liu G, Macomber L, Imlay JA, Ferreira GC & Isaya G (2006) Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum Mol Genet* **15**: 467-479.
- Gardner PR, Nguyen DD & White CW (1994) Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12248-12252.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA & Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- Haddock BA, Yates DW & Garland PB (1970) The localization of some coenzyme A-dependent enzymes in rat liver mitochondria. *Biochem J* **119**: 565-573.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1999a) Chemistry of biologically important radicals. *Free radicals in biology and medicine* (eds). pp. 48-82. Oxford University Press,
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1999b) Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. *Free radicals in biology and medicine* (eds). pp. 1-34. Oxford University Press,
- Hampsey DM & Kohlhaw GB (1981) Inactivation of yeast alpha-isopropylmalate synthase by CoA. Antagonism between CoA and adenylates and the mechanism of CoA inactivation. *J Biol Chem* **256**: 3791-3796.
- Huynen MA, Snel B, Bork P & Gibson TJ (2001) The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum Mol Genet* **10**: 2463-2468.
- Karlberg T, Schagerlof U, Gakh O, Park S, Ryde U, Lindahl M, Leath K, Garman E, Isaya G & Al-Karadaghi S (2006) The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron. *Structure* **14**: 1535-1546.

- Karthikeyan G, Santos JH, Graziewicz MA, Copeland WC, Isaya G, Van Houten B & Resnick MA (2003) Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Hum Mol Genet* **12**: 3331-3342.
- Kim KS, Rosenkrantz MS & Guarente L (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Mol Cell Biol* **6**: 1936-1942.
- Klausner RD, Rouault TA & Harford JB (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* **72**: 19-28.
- Klingenberg M & Nelson DR (1994) Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. *Biochim Biophys Acta* **1187**: 241-244.
- Knight SA, Sepuri NB, Pain D & Dancis A (1998) Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 18389-18393.
- Koehler CM, Merchant S & Schatz G (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* **24**: 428-432.
- Koenig M & Mandel JL (1997) Deciphering the cause of Friedreich ataxia. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 689-694.
- Koerner TJ, Homison G & Tzagoloff A (1985) Nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with altered subunits 4, 5, and 6 of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **260**: 5871-5874.
- Krebs C, Agar JN, Smith AD, Frazzon J, Dean DR, Huynh BH & Johnson MK (2001) IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **40**: 14069-14080.
- Lamarche JB, Cote M & Lemieux B (1980) The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can J Neurol Sci* **7**: 389-396.
- Layer G, Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y & Fontecave M (2006) Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J Biol Chem* **281**: 16256-16263.
- Lee MG, Cho SJ, Yang JK, Song HK & Suh SW (2000) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Escherichia coli* CyaY, a structural homologue of human frataxin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 7)**: 920-921.
- Lesuisse E, Santos R, Matzanke BF, Knight SA, Camadro JM & Dancis A (2003) Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet* **12**: 879-889.

- Lewin AS, Hines V & Small GM (1990) Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal. *Mol Cell Biol* **10**: 1399-1405.
- Li DS, Ohshima K, Jiralerspong S, Bojanowski MW & Pandolfo M (1999) Knock-out of the *cyaY* gene in *Escherichia coli* does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Lett* **456**: 13-16.
- Lill R, Dowhan W & Wickner W (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60**: 271-280.
- Loiseau L, Ollagnier-de Choudens S, Lascoux D, Forest E, Fontecave M & Barras F (2005) Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 26760-26769.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Mclver B & Morris JC (1998) The pathogenesis of Graves' disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* **27**: 73-89.
- Michael G & Bergmeyer HU (1974) *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, N.Y.
- Missirlis F, Holmberg S, Georgieva T, Dunkov BC, Rouault TA & Law JH (2006) Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5893-5898.
- Moellering H & Gruber W (1966) Determination of citrate with citrate lyase. *Anal Biochem* **17**: 369-376.
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G & Lill R (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* **11**: 2025-2036.
- Mumberg D, Muller R & Funk M (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
- Musco G, Stier G, Kolmerer B, Adinolfi S, Martin S, Frenkiel T, Gibson T & Pastore A (2000) Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin. *Structure* **8**: 695-707.
- Nair M, Adinolfi S, Kelly G, Frenkiel TA & Pastore A (2003) NMR assignment of the ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonances of the *E. coli* frataxin orthologue, CyaY. *J Biomol NMR* **27**: 403-404.
- Nair M, Adinolfi S, Pastore C, Kelly G, Temussi P & Pastore A (2004) Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure (Camb)* **12**: 2037-2048.

- Nargang FE, Kunkele KP, Mayer A, Ritzel RG, Neupert W & Lill R (1995) 'Sheltered disruption' of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *Embo J* **14**: 1099-1108.
- Nelson DR, Felix CM & Swanson JM (1998) Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J Mol Biol* **277**: 285-308.
- Nichol H, Gakh O, O'Neill HA, Pickering IJ, Isaya G & George GN (2003) Structure of frataxin iron cores: an X-ray absorption spectroscopic study. *Biochemistry* **42**: 5971-5976.
- O'Neill HA, Gakh O, Park S, Cui J, Mooney SM, Sampson M, Ferreira GC & Isaya G (2005) Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* **44**: 537-545.
- Palmieri L, Runswick MJ, Fiermonte G, Walker JE & Palmieri F (2000) Yeast mitochondrial carriers: bacterial expression, biochemical identification and metabolic significance. *J Bioenerg Biomembr* **32**: 67-77.
- Pandolfo M (2001) Molecular basis of Friedreich ataxia. *Mov Disord* **16**: 815-821.
- Park S, Gakh O, Mooney SM & Isaya G (2002) The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J Biol Chem* **277**: 38589-38595.
- Park S, Gakh O, O'Neill HA, Mangravita A, Nichol H, Ferreira GC & Isaya G (2003) Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem* **278**: 31340-31351.
- Patel PI & Isaya G (2001) Friedreich ataxia: from GAA triplet-repeat expansion to frataxin deficiency. *Am J Hum Genet* **69**: 15-24.
- Puccio H & Koenig M (2000) Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* **9**: 887-892.
- Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P & Koenig M (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* **27**: 181-186.
- Radisky DC, Babcock MC & Kaplan J (1999) The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem* **274**: 4497-4499.
- Roland KL, Powell FE & Tumbough CL, Jr. (1985) Role of translation and attenuation in the control of *pyrBI* operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**: 991-999.

- Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A & Rustin P (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* **17**: 215-217.
- Rotig A, Sidi D, Munnich A & Rustin P (2002) Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends Mol Med* **8**: 221-224.
- Rutherford JC, Jaron S, Ray E, Brown PO & Winge DR (2001) A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14322-14327.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn*. Cold Springs Harbor Press, Cold Springs Harbor, NY.
- Schoenfeld RA, Napoli E, Wong A *et al.* (2005) Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Hum Mol Genet* **14**: 3787-3799.
- Schoppink PJ, Hemrika W, Reynen JM, Grivell LA & Berden JA (1988) Yeast ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase is still active after inactivation of the gene encoding the 17-kDa subunit VI. *Eur J Biochem* **173**: 115-122.
- Schroers A, Burkovski A, Wohlrab H & Kramer R (1998) The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J Biol Chem* **273**: 14269-14276.
- Schultz JB, Dehmer, T., Schols, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Burk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M.F., Bogdanov, M.B. (2000) Oxidative stress in patients with Friedreich's ataxia. *Neurology* **55**: 1719-1721.
- Shoichet SA, Baumer AT, Stamenkovic D, Sauer H, Pfeiffer AF, Kahn CR, Muller-Wieland D, Richter C & Ristow M (2002) Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Hum Mol Genet* **11**: 815-821.
- Sohal RS (1997) Mitochondria generate superoxide anion radicals and hydrogen peroxide. *Faseb J* **11**: 1269-1270.
- Srere PA (1967) Enzyme concentrations in tissues. *Science* **158**: 936-937.
- Steiner H, Zollner A, Haid A, Neupert W & Lill R (1995) Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem* **270**: 22842-22849.
- Tahiliani AG (1991) Evidence for net uptake and efflux of mitochondrial coenzyme A. *Biochim Biophys Acta* **1067**: 29-37.
- Takahashi Y & Tokumoto U (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**: 28380-28383.

- Thierbach R, Schulz TJ, Isken F *et al.* (2005) Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* **14**: 3857-3864.
- Trotot P, Sismeiro O, Vivares C, Glaser P, Bresson-Roy A & Danchin A (1996) Comparative analysis of the cya locus in enterobacteria and related gram-negative facultative anaerobes. *Biochimie* **78**: 277-287.
- Truscott KN & Pfanner N (1999) Import of carrier proteins into mitochondria. *Biol Chem* **380**: 1151-1156.
- Tzagoloff A (1982) *Mitochondria*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Tzagoloff A (1995) Ubiquinol-Cytochrome-c Oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **260**: 51-63.
- Tzagoloff A, Jang J, Glerum DM & Wu M (1996) FLX1 codes for a carrier protein involved in maintaining a proper balance of flavin nucleotides in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **271**: 7392-7397.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B & Kennedy MC (2000) Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J Biol Chem* **275**: 14064-14069.
- Vazquez-Manrique RP, Gonzalez-Cabo P, Ros S, Aziz H, Baylis HA & Palau F (2006) Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *Faseb J* **20**: 172-174.
- Vivas E, Skovran E & Downs DM (2006) *Salmonella enterica* strains lacking the frataxin homolog CyaY show defects in Fe-S cluster metabolism in vivo. *J Bacteriol* **188**: 1175-1179.
- Vongsamphanh R, Fortier PK & Ramotar D (2001) Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol Cell Biol* **21**: 1647-1655.
- Walker JE & Runswick MJ (1993) The mitochondrial transport protein superfamily. *J Bioenerg Biomembr* **25**: 435-446.
- Wilson RB & Roof DM (1997) Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet* **16**: 352-357.
- Wontner M & Jaehning JA (1990) Accurate initiation by RNA polymerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **265**: 8979-8982.
- Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A & Klausner RD (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *Embo J* **15**: 3377-3384.

- Yoon T & Cowan JA (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* **125**: 6078-6084.
- Yoon T & Cowan JA (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* **279**: 25943-25946.
- Zarrilli R, Oates EL, McBride OW, Lerman MI, Chan JY, Santisteban P, Ursini MV, Notkins AL & Kohn LD (1989) Sequence and chromosomal assignment of a novel cDNA identified by immunoscreening of a thyroid expression library: similarity to a family of mitochondrial solute carrier proteins. *Mol Endocrinol* **3**: 1498-1505.
- Zhang Y, Lyver ER, Knight SA, Lesuisse E & Dancis A (2005) Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis. *J Biol Chem* **280**: 19794-19807.
- Zhao G, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue TM, Chiancone E & Chasteen ND (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of Escherichia coli. *J Biol Chem* **277**: 27689-27696.
- Zhyvoloup A, Nemazanyy I, Babich A *et al.* (2002) Molecular cloning of CoA Synthase. The missing link in CoA biosynthesis. *J Biol Chem* **277**: 22107-22110.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek **Dr. Sümegi Balázs**, **Dr. Kispál Gyula** és **Dr. Grazia Isaya** professzoroknak akik lehetővé tették számomra az itt bemutatott eredmények elérését.

Köszönetet mondok **Dr. Sümegi Balázs** tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy munkámat lehetővé tette a POTE AOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben.

Köszönettel tartozom **Dr. Grazia Isaya** professzornak aki laboratóriumában lehetővé tette kísérleti munkám egy részének kivitelezését (Mayo Clinic, Department of Pediatric and Adolescent Medicine, Rochester, MN, Egyesült Államok), valamint nélkülözhetetlen segítséget nyújtott legutóbbi publikációm írása során tett kritikai észrevételeivel és hasznos tanácsaival.

Köszönettel tartozom **Dr. Roland Lill** professzor úrnak aki laboratóriumában lehetővé tette kísérleti munkám egy részének kivitelezését (Institut für Zytobiologie der Philipps-Universität, Marburg, Németország), valamint számtalanszor segítségemre volt hasznos tanácsaival.

Köszönöm **Dr. Sándor Attila** professzor úrnak a Biokémiai Intézetben eltöltött évek során tanúsított kitartó támogatást és biztatást.

Szeretnék köszönetet mondani a **Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet** valamennyi munkatársának akik munkám során segítségemre voltak.

Nagyon sok köszönettel tartozom családomnak, feleségemnek **Gabinak** és gyermekeimnek **Grétinek** és **Bálintnak** akik mindig türelemsen kitartottak mellettem még a nehéz időszakokban is.

Legfőbb köszönettel tartozom **Dr. Kispál Gyula** professzor úrnak, mint fő tanító mesteremnek aki megfertőzött a molekuláris biológia és az élesztő genetika iránti rajongással. Neki köszönhetem, hogy belesöpöntem ebbe a csodálatos világba és talán egy életre elköteleztem magam a kutatás mellett.

Publikációs lista

A dolgozattal kapcsolatban megjelent közlemények

1. Prohl C, Pelzer W, Diekert K, Kmita H, **Bedekovics T**, Kispal G, Lill R. The yeast mitochondrial carrier Leu5p and its human homologue Graves' disease protein are required for accumulation of coenzyme A in the matrix. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1089-1097 (IF: 9.8)
2. **Bedekovics T**, Gajdos G, Kispal G and IsayaG. Partial conservation of functions between eukaryotic frataxin and the *Escherichia coli* frataxin homolog CyaY. *FEMS Yeast Res.* 2007; In Press (IF: 2.27)

Egyéb közlemények

1. Melegh B, Seress L, **Bedekovics T**, Kispal G, Sumegi B, Trombitas K, Mehes K. Muscle carnitine acetyltransferase and carnitine deficiency in a case of mitochondrial encephalomyopathy. *J Inherit Metab Dis.* 1999;22:827-838 (IF: 1.7)
2. Pal E, **Bedekovics T**, Gati I. Familial scapulooperoneal myopathy and mitochondrial DNA defect. *Eur Neurol.* 1999;42:211-216 (IF: 1.1)
3. Kispal G, Sipos K, Lange H, Fekete Z, **Bedekovics T**, Janaky T, Bassler J, Aguilar Netz DJ, Balk J, Rotte C, Lill R. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *Embo J.* 2005;24:589-598 (IF: 10.4)
4. Kellermayer R, Szigeti R, Keeling KM, **Bedekovics T**, Bedwell DM. Aminoglycosides as potential pharmacogenetic agents in the treatment of Hailey-Hailey disease. *J Invest Dermatol.* 2006;126:229-231 (IF: 4.54)

Impakt Faktor Összesen: 29.8

Kongresszusi előadások, poszterek jegyzéke

Előadás:

1. **Bedekovics T**, Mustaev A and Turnbough CL
Tethering the nascent transcript to the *Escherichia coli* RNA polymerase active center during reiterative transcription
10th Biennial Meeting on Post-Initiation Activities of RNA Polymerase, Mountain Lake, VA, USA, **2000**.

Poszter:

1. **Bedekovics T**, Gajdos G, Gáti I, Sümegi B and Czopf J
Detection of mitochondrial DNA deletions in different types of mitochondrial myopathies via polymerase chain reaction
2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, **1995**.
2. **Bedekovics T** and. Turnbough CL
The *Escherichia coli* *pyG* Expression is Negatively regulated by intracellular CTP
35. Membrántranszport Konferencia, Sümeg, **2005**.
3. **Bedekovics T**, Gajdos G, Kispal G, IsayaG.
Partial conservation of functions between eukaryotic frataxin and the *Escherichia coli* frataxin homolog CyaY.
3rd International Friedreich's Ataxia Scientific Conference, Bethesda, MD, USA, **2006**.