



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

PhD értekezés tézisei

Bedekovics Tibor

Témavezető:

Dr. Sümegi Balázs

(Dr. Kispál Gyula)

Dr. Grazia Isaya

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvosi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs, 2007.

## Rövidítések

ATP	adenozin trifoszfát
<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	deoxiribonukleinsav
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FRDA	Friedreich ataxia
GalP	galaktóz promóter
hGP	humán Graves fehérje
IPMS	$\alpha$ -izopropil malát szintáz
$\alpha$ -IPM	$\alpha$ -izopropil-malát
$\beta$ -IPM	$\beta$ -izopropil-malát
<i>LEU4, LEU5</i>	$\alpha$ -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 ( <b>P</b> ost <b>M</b> itochondrial <b>S</b> upernatant)
<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

## **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.

### **A Leu5p és a hGP**

A mitokondrium számos létfontosságú folyamat lezajlásának színtere, mint pl. az oxidatív foszforiláció, a citrátkör, a  $\beta$ -oxidáció, továbbá részben itt zajlik az urea ciklus, a hem és néhány aminosav szintézise is. 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, amelyeknek egy speciális csoportja az ún. mitokondriális hordozók. A hordozó fehérjék aminosav szekvenciája 20-40%-ban megegyezik. Élesztőben eddig összesen 35 hordozófehérjét találtak, mindezekből azonban csupán 13 fehérje szubsztrátja ismert. A *S. cerevisiae* *YHR002w* génje egy olyan fehérjét (P38702) kódol, ami tartalmazza a hordozófehérjék sajátosságait. Ezt a gént korábban már klónozták azzal a céllal, hogy egy második  $\alpha$ -izopropilmalát szintáz izoláljon a már jól jellemzett Leu4p mellé, ekkor ez a gén a *LEU5* elnevezést kapta. A  $\Delta$ leu4 mutáns önmagában nem, de a  $\Delta$ leu4  $\Delta$ 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 fehérje a belső membránba ágyazódott is lehet és esetleg nincs közvetlen szerepe a leucin szintézisében. A Leu5p humán homológja a hGP, amelynek aminosav összetétele 35%-ban azonos, a Graves betegségben érintett, funkciója ismeretlen.

### **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. 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 frataxin egy 210 aminosavból álló fehérje, amely a mitokondrium mátrixában található, felfedezése óta, a vas háztartással hozzák kapcsolatba. Ugyan a frataxin

pontos funkciója még ma is vitatott, fontosságát az is tükrözi, hogy erősen konzerválódott az evolúció során. Számos *in vitro* kísérletben bemutatták, hogy frataxin képes  $\text{Fe}^{2+}$  megkötésére valamint, mint vas shaperon, vas átadására ISC és hem szintézisére valamint akonitáz vas-kén központjának javítására. Egyre elfogadottabbnak tűnik az a nézet, hogy a frataxin fő funkciója a fölösleges vas ártalmatlanítása, valamint a biológiailag felhasználható vas átadása különböző szintézisekhez.

A különböző eredetű frataxin homológok közül az élesztőben található Yfh1p az egyik legtöbbet vizsgált változat. A fehérjét kódoló gén, *YFHI* eltávolítása ( $\Delta yfh1$ ) a sejtek növekedési zavarához vezet, nem fermentálható szénforrás esetében. Emellett a mutáns sejtekben megnő a hajlam a mitokondriális DNS (mtDNS) elvesztésére, továbbá érzékennyé válnak oxidatív behatásokkal szemben, valamint a mitokondriumban nagy mennyiségű vas halmozódik fel. Ezzel szemben a bakteriális homológ, az *E. coli* *cyaY* estében a sejtek semmilyen elváltozást nem mutatnak a gén eltávolítása után ( $\Delta cyaY$ ). *In vitro* kísérletekben azonban ez a fehérje is a többi homológhoz részben hasonlóan viselkedett. Mivel a *cyaY* az eredeti genetikai háttérben nem vizsgálható, hiszen a fehérje hiánya nem okoz a tanulmányozáshoz megfelelő elváltozást – valószínűleg annak következtében, hogy ez a fehérje ebben a háttérben fölöslegben van – a *cyaY* gént egy erős fenotípust produkáló genetikai háttérben, *yfh1Δ S. cerevisiae*-ben expresszáltuk.

## Célkitűzések

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

## Módszerek

### ***Baktérium és élesztő törzsek, mutánsok létrehozása, táptalajok***

Bakteriális DNS plazmidok szaporítására és klónozáshoz DH5 $\alpha$ , rekombináns fehérjék termeléséhez BL21, XLBlue és DH5 $\alpha$  *E. coli* törzseket használtunk. A  $\Delta$ *cyaY* törzs létrehozásához a genetikai hátteret a CLT42 szolgáltatta. A *cyaY* gén megszakítása Zeocine antibiotikum gén segítségével történt. Vad típusú élesztőként W303-1A vagy W303-1B törzseket, valamint a következő mutáns törzseket,  $\Delta$ leu5;  $\Delta$ cit2;  $\Delta$ leu5 $\Delta$ cit2;  $\Delta$ cor1;  $\Delta$ cox6;  $\Delta$ flx1;  $\Delta$ mir1 és GK178 használtuk. Az élesztő mutánsok létrehozásához a megfelelő géneket un. egy-lépéses génmegszakításos módszerrel távolítottuk el. *E. coli* esetében a kultúrákat folyékony Luria vagy minimál médiumban növesztettük 37°C-on, rázatás közben. Ugyanezeket a táptalajokat használtuk 2% agar hozzáadásával szilárd táptalajként. Mindkét esetben megfelelő antibiotikumot illetve 0.4% szénforrást alkalmaztunk. Élesztő kultúráknál YP gazdag, illetve minimál médiumot (S) használtunk, glükóz, galaktóz, glicerin vagy etanol szénforrásokkal, folyékony, vagy szilárd állapotban. Valamennyi élesztőkultúrát 30°C-on növesztettünk. A GK178 élesztőtörzs esetében a *YFHI* gén repressziója glükóz jelenlétében történt,

mivel az expressziót egy nagyon szigorúan vezérelt mutáns *GAL1* promóter (*gal1\**) irányítja.

### ***Rekombináns fehérjék expressziója és tisztítása***

A hGP expressziójához a kódoló gént Jurkat limfóma sejtvonalból izolált cDNS-ből PCR segítségével erősítettük fel, majd pYes2, élesztő expressziós vektorba klónoztuk. Rekombináns, His-tag jelölt CyaY előállításához a strukturális gént kódoló régiót, vad típusú *E. coli* törzsből izolált kromozómális DNS-ből, PCR segítségével többszöröztük majd pQE9 *E. coli* expressziós vektorba illesztettük. A fehérje izolálása Ni-agaróz gyöngyök felhasználásával történt. Vad típusú CyaY tisztítása a Yfh1p-hez hasonlóan történt kromatográfiás eljárással, a fehérjék hasonló tulajdonságainak köszönhetően. A *CyaY* expressziójához élesztőben p426GPD élesztő expressziós vektort használtunk. Mivel a frataxin eukarióta sejtekben mitokondriális lokalizációjú, ezért a CyaY mitokondriumba juttatásához az élesztő frataxin homológ targeting szekvenciáját használtuk. Pozitív kontrollként *YFHI*-et tartalmazó, negatív kontrollként üres vektort használtunk. Az élesztő MMP-t *E. coliban* expresszáltuk és korábban közölt módszer szerint tisztítottuk. A ferrokeletáz reakcióban felhasznált élesztő ferrokeletáz fehérjét Dr. Gloria C. Ferreira-tól (University of Florida, Tampa, FL, USA) kaptuk.

### ***Enzim aktivitás és különböző metabolitok koncentrációjának mérése***

A mérésekhez felhasznált mintákat a sejtek üveggyöngyös törésével, vagy Yeast Buster reagens felhasználásával, vagy mitokondrium izolálásnál végzett frakcionálással nyertük. Az IPMS aktivitás mérése fluorimetrikus módszerrel történt. A citrát szintáz, malát dehidrogenáz (MDH), akonitáz, szukcinát dehidrogenáz (SDH) enzimek

aktivitása már korábban közölt módszer alapján spektrofotometrikusán történt. A CoA koncentrációjának meghatározása perklórsavval fehérjementesített mintákból, fluorimetriásan, a citrát koncentrációjának meghatározása pedig enzimatikusan történt. Citokrómok koncentrációjának megközelítő meghatározása spektrofotometriásan történt izolált mitokondriumok felhasználásával.

## **Eredmények**

### **Leu5p és a hGP funkciója**

#### *A Leu5p a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el*

Azért, hogy bemutassuk, hogy a Leu5p a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el, tanulmányoztuk az importját és pontos lokalizációját. A kísérletben [<sup>35</sup>S] metioninnal radioaktívan jelölt Leu5p fehérjét izolált mitokondriummal megfelelő membránpotenciál és ATP jelenlétében inkubáltuk, majd proteináz K enzimmel kezeltük. A kísérletben a Leu5p egy része védettséget mutatott az enzimmel szemben, ami azt jelenti, hogy a mitokondrium felvette a fehérjét. Továbbá, a fehérje nagyobb része elérhető volt proteináz számára ha a külső membránt hypotóniás sokkal kinyitottuk ami azt jelenti, hogy a fehérje a legalább részben a membrán közti térben helyezkedik el. Mivel a Leu5p lúgos extrakcióval szemben rezistensnek bizonyult, feltételeztük, hogy a fehérje a belső membránban helyezkedik el. Egy olyan törzsből származó mitokodrium esetében, ahol a mitokondriális hordozók importjában érintett Tim22p mennyiségét lecsökkentettük, a Leu5p importja nagy mértékben csökkent a vad típushoz képest, ami a Leu5p mitokondriális hordozó jellegét támasztja alá.



### ***A LEU5 eltávolításának következményei***

A Leu5p funkciójának kereséséhez a *LEU5* teljes kódoló szekvenciáját eltávolítottuk. A mutáns,  $\Delta$ leu5 sejtek növekedése glükóz szénforráson nem mutatott különbséget a vad típushoz képest, viszont növekedése jelentős mértékben lelassult ha szénforrásként glicerint alkalmaztunk. A  $\Delta$ leu5 nem mutatott leucin auxotrófiát. A mutáns és vad típusú törzsekből izolált mitokondriumokból felvett citokróm abszorpciós spektrumokban nem találtunk jelentős különbséget, sőt a mutáns oxidatív foszforilációja is aktivitást mutatott. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a Leu5p, mint mitokondriális hordozó, egy a mitokondriális bioszintetikus folyamatokhoz szükséges szubsztrát transzportját segítheti elő.

### ***A CoA mitokondriális felhalmozásához Leu5p szükséges***

A Leu5p szubsztrátjának azonosításához felhasználtuk a *LEU4* és a *LEU5* gének inaktiválásánál megfigyelt fenotípus változásokat. Csak a kettős mutáns esetében tapasztaltak leucin auxotrófiát, amit az egyszeri mutánsok nem produkáltak.  $\Delta$ leu4 sejtekben a mitokondriális Leu9p-nek köszönhetően, a következő lépéshez szükséges  $\alpha$ -IPM csak a mitokondriumban szintetizálódik. Ebből arra következtettünk, hogy a leucin auxotrófia okozója az lehet *leu5 $\Delta$*  esetében, hogy a Leu5p, mint mitokondriális hordozó, olyan szubsztrátot szállíthat, amely a mitokondriális  $\alpha$ -IPM szintéziséhez szükséges. Kísérleteinkben azonosítottuk, hogy a lehetséges szubsztrátok közül a CoA az amelyet a Leu5p szállíthat. Ennek ismeretében megvizsgáltuk a  $\Delta$ leu5 és vad típusú sejtek mitokondriumának CoA tartalmát, ahol alátámasztva korábbi eredményeinket, azt tapasztaltuk hogy a  $\Delta$ leu5 esetében a koncentráció jelentős mértékben lecsökkent.

### ***A Leu5p és a Cit2p kapcsolata***

A  $\Delta$ leu5 sejtek alacsony mitokondriális CoA tartalmának *in vivo* bizonyítására, ezt a genotípust a peroxiszómális citrát szintáz eltávolításával ( $\Delta$ cit2) kombináltuk ( $\Delta$ leu5 $\Delta$ cit2). Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy a  $\Delta$ leu5 $\Delta$ cit2 sejtek a  $\Delta$ cit1 $\Delta$ cit2-höz hasonlóan, képtelenek voltak glicerint használni szénforrásként, *pet* fenotípust, erős citokróm hiányt, valamint glutamát auxotrófiát mutattak. Ez azt jelenti, hogy a  $\Delta$ leu5 $\Delta$ cit2 sejtekben a mitokondriális citrát szintáz (*cit1p*) nem működik, nagy valószínűséggel az alacsony CoA szint következtében.

### ***A humán Graves fehérje képes a Leu5p funkciójának átvételére***

Mivel a Leu5p és a hGP között jelentős mértékű homológia van, ezért azt feltételeztük, hogy a két fehérjének hasonló funkciója van. Ennek bizonyítására  $\Delta$ leu5 sejteket hGP gént tartalmazó plazmiddal transzformáltuk. A kapott,  $\Delta$ leu5/hGP sejtek képesek voltak nemfermentálható szénforrás felhasználására, valamint a sejtekben az IMPS aktivitása, a citrát koncentrációja és a mitokondrium CoA koncentrációja a vad típushoz közeli szintre állt vissza. Adataink alapján kijelenthetjük, hogy a hGP nagy valószínűséggel szintén a CoA mitokondriumba juttatásban játszik szerepet.

### **A CyaY vizsgálata**

#### ***A cyaY eltávolítása és következményei***

A *cyaY* gén kitörlése *E. coli*-ban Zeocin antibiotikum-rezisztencia gén (*zeo*) homológ rekombináns beillesztésével történt. A kapott törzset ( $\Delta$ CyaY) számos olyan körülmény között vizsgáltuk, ahol *S. cerevisiae* határozott fenotípust mutat, a  $\Delta$ CyaY esetében azonban nem sikerült kimutatni auxotrófiát, növekedési változást, különbséget

oxidatív behatással szemben vagy vas-kén központot tartalmazó enzimek aktivitásában. Valószínűnek tűnik, hogy az *E. coli* esetében a CyaY funkciója a legtöbb körülmény között fölösleges, annak következtében, 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. Erre a célra a *cyaY*-t Yfh1p depletált *S. cerevisiae*-ben expresszáltuk.

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

Mivel a frataxin eukarióta sejtekben mitokondriális lokalizációjú a CyaY mitokondriumba juttatásához egy olyan hibrid fehérjét (Yfh1-CyaY) kódoló DNS-t alkottunk amelyben a Yfh1p targeting részét a CyaY N-terminálisához fuzionáltuk. Ezt a DNS-t egy állandó expressziót biztosító, élesztő expressziós vektorba, p426GPD-be klónoztuk, majd a kapott plazmidot GK178 *S. cerevisiae* törzsbe transzformáltuk. A GK178 törzsben a *YFHI* gén expresszióját egy nagyon szigorúan vezérelt mutáns *GALI* promóter (*gal1\**) irányítja, amelynek segítségével glükóz jelenlétében *yfh1Δ* közeli állapot érhető el. Ilyen körülmények között csak a Yfh1-CyaY hibridfehérje volt detektálható, a Yfh1p nem. *In vivo* a Yfh1-CyaY processzálása két terméket eredményezett, amelyek közül az egyik terméket sikerült *in vitro* is előállítani, ami alapján feltételeztük, hogy hibrid fehérjénk a mitokondriumba importálódott és processzálódott.

### **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. Frataxin depleciót követően a CyaY-t tartalmazó törzs a vad típushoz hasonlóan nőtt nem fermentálható szénforrást tartalmazó táptalajon, szemben a nem komplementált törzssel, amely képtelen volt a növekedésre. Oxidatív stresszel szemben vizsgálva a CyaY a vad típusú Yfh1p-hez hasonló mértékben volt képes megvédeni a sejteket MMS vagy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléssel szemben. Ha a respirációs funkció megőrzését vizsgáltuk vas ionokkal történő kezelés során, akkor azt tapasztaltuk, hogy a CyaY a Yfh1p-hez képest egy kissé kevésbé tette képessé a sejteket ennek a hatásnak a tolerálására. A vas-kén központot tartalmazó enzimek aktivitása, mint az akonitáz és az SDH, a Yfh1-CyaY jelenlétében a Yfh1p-hez viszonyítva kb. 80-85%-ban helyreállt.

### **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. Míg a citokrómok mennyisége a detektálási határ alatt volt a Yfh1p depletált törzsben, addig a Yfh1-CyaY jelenlétében a vad típushoz hasonló szintet találtunk. Ez alapján feltételeztük, hogy a CyaY képes hem bioszintéziséhez vasat átadni ferrokeletáznak. Ezt a feltételezést *in vitro* igazoltuk rekombináns fehérje felhasználásával. A CyaY határozottan magasabb felvehető Fe<sup>2+</sup> szintet biztosított mint a puffer önmagában, azonban nem volt olyan hatékony, mint élesztő homológja a Yfh1p. A reakcióban a 75:1 vas-fehérje molarányt találtuk optimálisnak a hem szintéziséhez.

## **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** (Mayo Clinic, Department of Pediatric and Adolescent Medicine, Rochester, MN, Egyesült Államok) és **Dr. Roland Lill** (Institut für Zytobiologie der Philipps-Universität, Marburg, Németország) professzoroknak akik laboratóriumukban lehetővé tették kísérleti munkám egy részének kivitelezését.

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 türelmesen kitartottak mellettem még a nehéz időszakokban is.

Legfőbb köszönettel tartozom **Dr. Kispál Gyula** professzornak, akinek vezetésével az itt bemutatott eredmények többségét elértem, akitől a legtöbbet tanultam a molekuláris biológia és az élesztő genetika területén.

## 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 Isaya G.  
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 scapuloperoneal 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)

**IF: 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, Isaya G.  
Partial conservation of functions between eukaryotic frataxin and the *Escherichia coli* frataxin homolog CyaY.  
3<sup>rd</sup> International Friedreich's Ataxia Scientific Conference, Bethesda, MD, USA, **2006**.



**Functional Analyses of Mitochondrial  
Proteins in *Saccharomyces cerevisiae***

PhD Thesis

Tibor Bedekovics

Mentors:

Dr. Balázs Sümegi

(Dr. Gyula Kispál)

Dr. Grazia Isaya

University of Pécs

Medical Faculty

Institute of Biochemistry and Medical Chemistry

Pécs, 2007

## Abbreviations

ATP	adenosine triphosphate
<i>CIT1, CIT2</i>	mitochondrial and peroxisomal citrate synthase respectively
CoA	coenzyme A
<i>cyaY, CyaY</i>	the gene and the protein of the <i>E. coli</i> frataxin homologue
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FRDA	Friedreich ataxia
GalP	galactose promoter
hGP	human Graves protein
IPMS	$\alpha$ -isopropylmalate synthase
$\alpha$ -IPM	$\alpha$ -isopropylmalate
$\beta$ -IPM	$\beta$ -isopropylmalate
<i>LEU4, LEU5</i>	gene encoding IPMS and its hypothetical analogue
MDH	malate dehydrogenase
MPP	mitochondrial is processing peptidase
mtDNA	mitochondrial DNA
PCR	polymerase chain reaction
PMS	post mitochondrial supernatant
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDH	succinate dehydrogenase
Tim22p	trans inner membrane translocase
<i>YFH1, Yfh1p</i>	the gene and the protein of the yeast frataxin homologue



## **Introduction**

It is a well established technique in the field of molecular biology to use different organisms to study the function of protein homologs. There are two major advantages to use a simple organism as a model. One of them, when the originally found phenotype couldn't be studied in that organism because that is so complicated, it is not possible to use genetic engineering, or on the other hand when a phenotype found in a simple organism could be more easily explained in a more complex background. One of the most frequently used organisms as a model, is the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, often mentioned as the "work horse" of molecular biology. This simple organism has all the advantages that the scientists may wish: fast replication and easy genetic manipulation. However it is also suitable to study more complicated processes, since as an eukaryote this organism already carries subcellular compartments like nucleus and mitochondria.

The thesis is based on the functional analyses of the homolog protein pairs, the human Graves disease protein (hGP) and its homolog the yeast Leu5p, furthermore the bacterial and yeast frataxin homologs the CyaY and the Yfh1p.

### **The Leu5p and the hGP**

There are several vital processes taking place in the mitochondria, like oxidative phosphorylation, tricarboxylic acid cycle,  $\beta$ -oxidation, partially the urea cycle, the biosynthesis of heme and a few amino acids. There are a large number of substances necessary to be transported, specifically and fast enough between the matrix of the mitochondria and the cytosol, for the satisfying metabolic activity of mitochondria, since the inner membrane is not permeable for these components. There are a relatively

large number of transport proteins serving for these processes, of which there is a special group called mitochondrial carriers. The members of this group are sharing about 20-40 % of amino acid identity. There are 35 carriers known in yeast, however only 13 substrates of these proteins identified to date. The *YHR002w* gene of the *S. cerevisiae* encodes such a protein (P38702) having all the characteristic elements of mitochondrial carriers. This gene has been subcloned earlier to identify a second  $\alpha$ -izopropylmalate dehydrogenase, in addition to the already well characterized Leu4p. The gene named that time as *LEU5*. Since the single  $\Delta$ leu4 is not, but  $\Delta$ leu4  $\Delta$ leu5 double mutant is leucine auxotroph, it was suggested the encoded a Leu4p analog. The sequence analyses of *LEU5* revealed that, Leu5p could be integrated in the mitochondrial inner membrane, and may be not even involved in leucine synthesis. The Leu5p has a human homolog called hGP a protein involved in Graves disease, with unknown function. The amino acid composition of these two proteins are 35 % identical.

### **The frataxin, Yfh1p and CyaY**

Friedreich's ataxia (FRDA) is the most common inherited ataxia transmitted in an autosomal fashion, with an occurrence of 1 or 2 in 50.000 individuals. Characteristic symptoms include ataxia of the limbs, areflexia, muscle weakness and skeletal deformities, cardiomyopathy, sensory loss, and increased incidence of diabetes mellitus. FRDA is caused by severely reduced levels of frataxin, a protein localized to the mitochondrial matrix. This 210 amino acid residues protein has been thought to be involved in iron homeostasis since its discovery. However the function of frataxin is still controversial, its importance is reflected by the conservation during the evolution.

It has been showed, that frataxin is able to bind  $\text{Fe}^{2+}$  in vitro, and as an iron chaperon also able to donate it for the biosynthesis of ISC and heme, and to repair the ISC of aconitase. It seems to be the mayor role of frataxin is to detoxify the excess iron of the mitochondria and to chaperon bioavailable iron for important processes.

The yeast frataxin homolog (Yfh1p) is one of the most studied form of the frataxin homologs. Deletion of the encoding gene, *YFHI* ( $\Delta yfh1$ ) causes a growth defect on non fermentable carbon source, leads to a tendency for loosing mitochondrial DNA (mtDNA), cells became sensitive against oxidative stress and iron accumulates in the mitochondria. However the lack its bacterial homolog, the *E. coli* CyaY ( $\Delta cyaY$ ) causing no obvious effect to the cells. In vitro this protein also behaves similarly to its homologs. Since CyaY can not be studied *in vivo* in its original background since deletion of *cyaY* doesn't result change in phenotype, most likely due to its redundancy in this environment, we expressed this gene in a frataxin depleted *S. cerevisiae*.

## Perspectives

1. - identify the function of Leu5p
  - complement a  $\Delta$ leu5 yeast strain with the human Leu5p homolog hGP
2. - delete the *cyaY* in *E. coli* ( $\Delta$ *cyaY*) and characterize the strain
  - complement a Yfh1p depleted yeast strain with CyaY

## Methods

### *Bacterial and yeast strains, producing mutant strains, medias*

To subclone and to produce DNA plasmids, DH5 $\alpha$ , to produce recombinant proteins, BL21, XLBlue and DH5 $\alpha$  *E. coli* strains were used. *CyaY* deletion was carried out in a CLT42 strain, using a Zeocine antibiotic resistance gene. W303-1A or W303-1B yeast strains were used as a wild type or the following mutant yeast strains were used:  $\Delta$ leu5;  $\Delta$ cit2;  $\Delta$ leu5 $\Delta$ cit2;  $\Delta$ cor1;  $\Delta$ cox6;  $\Delta$ flx1;  $\Delta$ mir1 and GK178. Gene deletion in yeast, were made by one step gene disruption. For *E. coli* Luria or minimal liquid media were used, the cultures were propagated at 37°C with shaking. Same media were used to prepare plates, containing 2% agar. In both liquid or solid media contained 0.4 % of different carbon sources.

For yeast YP rich, or synthetic media (S) were used, supplemented with glucose, galactose, glycerin or ethanol carbonsources, in liquid or solid form. All yeast strains were grown at 30°C. In the strain GK178 the expression of *YFHI* is controlled by a very tight controlled mutant *GAL1* promoter (*gal1\**), were the *YFHI* was repressed glucose.

### *Expression and purification of recombinant proteins*

The encoding gene of hGP were amplified by PCR from cDNA, isolated from Jurkat celline, and cubcloned into pYes yeast expression vector. For the production of

His-tagged recombinant CyaY, the encoding gene was subcloned into pQE9 *E. coli* expression vector, using a PCR amplified fragment from wild type *E. coli* chromosomal DNA. The protein was purified by Ni-agarose beads. Wild type CyaY was purified by chromatography in a similar way to that of Yfh1p, due to the similarity of the two proteins. For the expression of *CyaY* in yeast the p426GPD yeast expression vector was used. Since the frataxin is localized to mitochondria in eukaryotes, to target CyaY to the mitochondria the leader peptide of Yfh1p was fused to the N terminal of CyaY. The same vector including a wild type *YFHI*, and an empty vector served as a positive and a negative control respectively. Yeast MPP was expressed and purified by a method published earlier. The ferrochelatase protein used in ferrochelatase assay was a kind gift of Dr. Gloria C. Ferreira (University of Florida, Tampa, FL, USA).

#### ***Enzymatic activity assays, determination of the concentration of metabolites***

The samples used for the assays were prepared by disrupting the cells with glass beads, using Yeast Buster, or collecting different fractions at mitochondria isolation. The activity of IPMS was assayed by a fluorimetric method. The activities of malate dehydrogenase (MDH), aconitase, and succinate dehydrogenase (SDH) were assayed by spectrophotometric methods. Concentration of CoA was measured from the deproteinated samples by a fluorimetric, citrate levels were determined enzymatically. The levels of cytochromes were estimated from isolated mitochondria by spectrophotometric method.

## Results

### The function of Leu5p and hGP

#### *Leu5p located in the inner membrane of the mitochondria*

In order to show Leu5p localized to the inner membrane of the mitochondria we studied the import and the exact localization of the protein. [35S] radioactive labeled Leu5p protein were incubated in the presence of isolated, energized mitochondria, then the mixture were treated with proteinase K. The Leu5p showed partial resistance against the enzyme, what means the protein was taken up by the mitochondria. Furthermore the most of the photolytic resistance lost when the outer membrane was broken up by hypotonic shock, showing that the Leu5p exposed to the inner membrane space. The imported protein was resistant to extraction by treatment with alkaline buffers, indicating integration into the membrane. Import of Leu5p into a Tim22p-depleted mitochondria was strongly reduced compared to wild-type organelles, and thus appears to follow the carrier-specific protein import pathway.

#### *Phenotypic consequences of the deletion of LEU5*

To initiate the functional investigation of Leu5p, the entire coding region of *LEU5* was deleted ( $\Delta$ leu5). In comparison to wild-type cells, mutant cells lacking *LEU5* showed similar growth on rich media containing glucose but displayed strongly retarded growth on rich media containing glycerol. However this strain didn't show auxotrophy for leucine. No significant differences in the cytochrome spectra or in oxidative phosphorylation of  $\Delta$ leu5 mitochondria were observed compared to wild-type organelles. From these data we reasoned that, the Leu5p, as a member of the carrier

family, mediates the transport of a substrate required for proper function of an intra mitochondrial biosynthetic process.

### ***Leu5p is required for accumulation of CoA inside mitochondria***

To identify the substrate of Leu5p, we took advantage of the phenotypical observations made for the inactivation of the *LEU4* and *LEU5* genes. The combined, but not the single, mutation of the two genes was reported to result in an auxotrophy for leucine. In  $\Delta leu4$  cells the  $\alpha$ -IPM, necessary for the following step in leucine synthesis is exclusively produced in the mitochondria by Leu9p localized to the mitochondrial matrix. From this piece of data we reasoned that Leu5p, as a mitochondrial carrier, may transport a compound necessary for the reaction in which  $\alpha$ -IPM formed. In our experiments it was identified that among the potential candidates, CoA is the substrate what could be transported by Leu5p. This finding has been proven by the strongly reduced CoA content of  $\Delta leu5$  strain compared to wild type.

### ***The relationship of Leu5p and Cit2p***

To show an *in vivo* evidence for the  $\Delta leu5$  cells reduced mitochondrial CoA content, this genotype was combined with the deletion of the peroxisomal citrate synthase ( $\Delta leu5\Delta cit2$ ). This strain behaved similarly to  $\Delta cit1\Delta cit2$ , showed *pet* phenotype, was unable to use glycerol as a carbon source, and showed auxotrophy for glutamate, from which we reasoned the citrate synthase located in the mitochondria (*cit1p*) was unable to perform at a satisfying level due to strongly reduced CoA level.

### ***The hGP functionally complements the defect of $\Delta$ leu5***

The significant homology between hGP and yeast Leu5p suggests a similar function of the two proteins. To test this idea,  $\Delta$ leu5 cells were transformed with a plasmid carrying the hGP gene. The resulting  $\Delta$ leu5/hGP cells were able for utilizing nonfermentable carbon sources and the activity of IMPS, the citrate and the CoA levels of mitochondria restored close to that of the wild type. Our data demonstrate that the human protein can at least partially replace Leu5p function and suggest a role of hGP in the accumulation of CoA in mitochondria.

### **Study of CyaY**

#### ***Phenotypic consequences of the deletion of *cyaY****

The *cyaY* gene of *E. coli* was deleted by the homologues recombination of the Zeocine antibiotic resistance gene (*zeo*) to the chromosome. The resulting strain ( $\Delta$ CyaY) was investigated in several conditions where other species, like *S. cerevisiae* are showing dramatic phenotypic changes. However  $\Delta$ CyaY didn't show any obvious phenotype, including auxotrophy for any nutrient, defect in growth rate, sensitivity against oxidative stress or alteration in activity of iron-sulfur cluster enzymes. Together, these observations suggest that the function of CyaY may be functionally redundant in *E. coli*, due to the possible presence of one or more suppressors. May be the biological function of CyaY only necessary in such a special condition, what not even reproducible artificially in laboratory. We therefore reasoned that yeast cells depleted of the endogenous Yfh1p would be suitable to interrogate the function of CyaY in iron delivery and iron detoxification in a non redundant setting.



### ***E. coli CyaY partially complements frataxin depleted yeast***

Since frataxin in eukaryotes is localized to mitochondria, we engineered a construct coding for a chimeric protein (Yfh1–CyaY) consisting of the mitochondrial matrix targeting signal of Yfh1p fused in frame with the N-terminus of CyaY. This construct was subcloned into a constitutively expressing yeast expression vector (p426GDP), and the resulting vector was used to transform the *S. cerevisiae* GK178 strain. In this strain, endogenous expression of *YFH1* is regulated by a tightly controlled mutant *GAL1* promoter (*gal1\**), that provides a close to *yfh1Δ* state in the presence of glucose. Growing the cells in the presence of glucose only Yfh1-CyaY hybrid protein was detectable, but not Yfh1p. *In vivo* processing of Yfh1–CyaY generated two products. One of them was also detectable after *in vitro* processing, thus we reasoned that the Yfh1–CyaY hybrid protein imported and processed by mitochondria.

### ***CyaY complements frataxin depleted yeast***

Next, we investigated whether Yfh1–CyaY was able to suppress the phenotypic changes associated with Yfh1p depletion. After frataxin depletion the strain containing CyaY was able to utilize nonfermentable carbon source comparable to the wild type, whereas the non complemented strain were growing very poorly. CyaY was able to protect cells similarly to the Yfh1p, when the cells were exposed to oxidative stress generated by MMS or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. When the maintenance of respiratory function was analyzed during treatment with iron, we found that CyaY could make the cells a bit less tolerant against this effect than the Yfh1p did. The activity of iron-sulfur cluster containing enzymes, like aconitase and SDH, in the presence of Yfh1-CyaY was restored to about 80-85% of wild type level.

### ***CyaY restores heme synthesis***

Lastly we investigated whether Yfh1–CyaY was also able to restore heme synthesis in frataxin depleted yeast strain. Whereas the cytochromes were under the detection limit in the Yfh1p depleted strain, the presence of Yfh1–CyaY was associated with cytochrome content close to that of wild type strain. Based on this observation we suspected that CyaY was able to donate iron to ferrochelatase for the biosynthesis of heme. This hypothesis was evidenced in an *in vitro* reaction using recombinant proteins. CyaY was able to provide a definitely higher bioavailable Fe<sup>2+</sup> level than the buffer itself, but was not as efficient as Yfh1p. In this reaction 75:1 iron to protein ratio has been found to be optimal for heme synthesis.

## **Acknowledgement**

I thank to my mentors **Dr. Balázs Sümegi**, **Dr. Gyula Kispál** and **Dr. Grazia Isaya** professors who helped me to complete the results presented here.

I thank **Dr. Balázs Sümegi** professor, chair of the Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, to make it possible to carry out my experiments in his institute.

I thank **Dr. Grazia Isaya** (Mayo Clinic, Department of Pediatric and Adolescent Medicine, Rochester, MN, USA) and **Dr. Roland Lill** (Institut für Zytobiologie der Philipps-Universität, Marburg, Germany) professors for letting me to conduct some of my experiments in their laboratories.

I thank **Dr. Attila Sándor** professor for my solid support and never ending encouragement during the years what I spent at the Institute of Biochemistry.

I thank many coworkers of the institute for helping me with my experiments.

I thank my family, my wife **Gabi** and my children **Gréti** and **Bálint**, for their patient, even in the tough periods of time.

I thank **Dr. Gyula Kispál** professor for leading my research in most of the time, who helped me to succeed with the results presented here, and established the base of my knowledge in molecular biology and yeast genetics.

## List of Publications

### Publications Served for the Thesis

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 Isaya G.  
Partial conservation of functions between eukaryotic frataxin and the *Escherichia coli* frataxin homolog CyaY. *FEMS Yeast Res*. 2007; In Press (IF: 2.27)

### Other Publications

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 scapuloperoneal 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)

**IF: 29.8**

### Oral and Poster Presentations

#### Oral Presentation:

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**.

#### Posters:

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.  
3<sup>rd</sup> International Friedreich's Ataxia Scientific Conference, Bethesda, MD, USA, **2006**.