

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Két mitokondriális funkció vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae*-ben

Fekete Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Kispál Gyula, Dr. Sipos Katalin



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs, 2010

Bevezetés

A mitokondrium egy esszenciális sejtalkotó

A legelső és a mai napig ismert egyetlen nélkülözhetetlen mitokondriális funkció a vas-kén fehérjék aktivációjához szükséges vas-kén komplex bioszintézise. Arra a kérdésre azonban nem tudtuk a választ, hogy miért teszi ez a funkciója a mitokondriumot az eukarióta sejtek elengedhetetlen alkotórészévé. Munkacsoportunk egy németországi munkacsoporttal együttműködve ennek a kérdésnek a megválaszolását tűzte ki céljává.

Munkahipotézisünk kiindulópontja az volt, hogy a mitokondrium egy vagy több pótolhatatlan funkciót betöltő extramitokondriális vas-kén fehérje aktivációjával válik létfontosságú sejtalkotóvá. Munkánk kezdetekor azonban kizárólag olyan esszenciális vas-kén fehérjék voltak ismertek, amelyek saját vas-kén komplexük bioszintézisében játszanak szerepet.

Kutatásainkhoz tehát egy olyan élesztő célfehérjét kerestünk, amely valószínűleg vas-kén fehérje, élesztőben bizonyítottan esszenciális, de alapvető szerepe még nem tisztázott. A fehérje adatbankok átvizsgálása után az eddig ismeretlen funkciójú Rli1p-re esett a választásunk. Ez a fehérje egyike az evolúció során legerősebben konzerválódott fehérjéknek, látszólag minden archeában és eukariótában megtalálható. Munkánk kezdetekor német kollaborációs partnerünk segítségével bebizonyítottuk, hogy az Rli1p proszketikus csoportként vas-kén komplexet köt, viszont ellentétben a többi ismert esszenciális vas-kén fehérjével, nincs szerepe a vas-kén komplex bioszintézisében. Így ez a fehérje, funkciójának feltárásán keresztül megfelelő jelölt lett annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy miért nélkülözhetetlen a mitokondrium az eukarióta sejtek számára.

A mitokondriális génexpresszió szabályozása

Saccharomyces cerevisiae-ben a legtöbb mitokondriális RNS legalább 13 különálló promoterről átíródva policisztronos előalakokból képződik, vagyis két vagy több kódoló szekvenciát, rRNS-ek, tRNS-ek és mRNS-ek különböző kombinációit tartalmazza. Az eredetileg egy operonon kódolt érett, stabil RNS-ek mennyisége azonban nagymértékben különbözhet. Mindez azt bizonyítja, hogy a mitokondriumban a posztranszkripció mechanizmusoknak kiemelkedően fontos szerepe van az RNS-ek stabilitásának meghatározásában. Fontosságuk ellenére azonban viszonylag keveset tudunk ezekről a szabályozó mechanizmusokról.

Az apocitokrom *b* fehérjét kódoló COB mRNS a mitokondriális genom tRNS^{lu}-COB operonja által kódolt COB génről íródik át. Az érett mRNS a -955.

és/vagy -954. nukleotiddal kezdődik, és stabilitásának szabályozását a Cbp1 fehérje segíti, amely közvetlenül kapcsolódik a COB mRNS 5' végi AU-gazdag nem transzlálódó régiójához, azon belül is a -942. - 944. pozícióban található egyetlen CCG trinukleotidhoz. Ebben az egyedi trinukleotidban már egyetlen báziscsere (CCG → ACG) a $\Delta cbp1$ mutánszhoz hasonló fenotípust eredményez: a sejtekben kimutathatatlan érett és ötödére csökkent mennyiségű COB pre-mRNS található.

Mivel az egyedi CCG trinukleotid közel helyezkedik el az érett mRNS végső hasítási helyéhez, ez felveti annak a lehetőségét, hogy az érés és a lebontás egy közös mechanizmus által szabályozott folyamat: a Cbp1 fehérje az mRNS-hez kötődve védheti meg annak 5' végét a nukleázok általi hasítástól. Mindeztidáig nem sikerült a COB mRNS érésében fontos szerepet játszó nukleázot azonosítani, így ez a folyamat kétféleképpen képzelhető el: a Cbp1p mintegy úttorlaszként működve akadályozhat meg egy 5'-3' exonukleáz általi további hasítást, vagy egy endonukleáz hasítóhelyet lefedve védheti meg a COB mRNS-t a lebontástól.

Célkitűzések

Munkánk első részében az élesztő Rli1 fehérje funkciójának feltárásával a mitokondrium esszenciális jellegét vizsgáltuk. Célul tűztük ki:

- az Rli1p sejtben belüli elhelyezkedésének meghatározását,
- a fehérjeszerkezet szerepének vizsgálatát a fehérje esszenciális voltának meghatározásában,
- az Rli1p potenciális kötőpartnereinek feltérképezését,
- az Rli1p-depléció hatására a sejtben bekövetkező változások vizsgálatát.

Munkánk második részében a mitokondriális COB-tRNS^{glu} operonon kódolt COB mRNS érését vizsgálva arra kerestük a választ, hogy a mitokondriális RNS-ek 5' végének kialakítása és 5' vég felől történő lebontása milyen mechanizmus által történik. Célunk volt:

- tandem elhelyezkedésű funkcionális és/vagy nem-funkcionális Cbp1 kötőhelyet tartalmazó élesztőtörzsek létrehozása,
- annak kimutatása, hogy exo- vagy endonukleáz hasítja a COB pre-mRNS 5' végét, valamint
- a Pet127 fehérje kulcsszerepének igazolása az érésben és a lebontásban.

Kísérleti anyagok és módszerek

Baktérium- és élesztőtörzsek

Az Rli1p-vel kapcsolatos kutatásaink során a *Saccharomyces cerevisiae* W303-as törzset (*MAT α /a,ura3-1, ade2-1, trp1-1, his3-11,15, leu2-3,112*) használtuk kontrollként mind diploid, mind haploid formában. A diploid RLI1/ Δ rli1 törzset PCR-alapú génkicserélés technikájával állítottuk elő. Az IRHA törzs létrehozása során az RLI1 gént PCR-al erősítettük ki, a terméket YIplac211/HA integrációs plazmidba klónoztuk, linearizáltuk, majd haploid W303 törzsbe transzformáltuk. Az Rli1-TAP törzs klónozása során a PCR-al kierősített RLI1 gént a pBS1479 plazmidba klónoztuk, linearizáltuk, majd W303 haploid élesztőtörzsbe transzformáltuk. A Tet-RLI1 törzset pCM225 plazmid felhasználásával, egylépéses promotér-kicserélés technikájával állítottuk elő.

A mitokondriális genomjukban tandem Cbp1-kötőhelyet hordozó élesztőtörzsek létrehozása az ún. high velocity microprojectile bombardment módszerrel történt. Ezen törzsekben a PET127 gén kiütése során a PCR-al létrehozott kanamicin kazettát hordozó *pet127::KanMX4* fragmentumot a mitokondriális mutáns élesztőtörzsekbe transzformáltuk.

Az *E. coli* kultúrákat LB médiumban növesztettük 37 °C-on. Az élesztőtörzseket komplex (YP) vagy minimál médiumban (MM) 2% glükóz illetve 3% glicerin hozzáadásával növesztettük. Ugyanezen táptalajokat használtuk 2% agar hozzáadásával szilárd táptalajokként.

Tetrádanalízis

A sporulációs táptalajon minimum 4-5 napja növekvő RLI1/ Δ rli1 sejteket 10%-os Glusulase oldatban előkezeltük. A szuszpenziót YPD táptalajra csepegtettük és az egyes tetrádokat alkotó négy-négy spórát mikromanipulátor segítségével szétválasztottuk. 5-6 napos 30 °C-on történő inkubáció után a spórából kifejlődő haploid sejtek jól láthatóak.

Differenciál centrifugálás

Az IRHA törzs egyéjszakás rázatott tenyészetét üvegyöngyökkel feltártuk, majd az egyes sejtalkotókat az egymást követő, egyre növekvő sebességű (3000 rpm 10 perc, 10000 rpm 10 perc, 100000 rpm 60 perc) centrifugálások lépéseivel választottuk el egymástól. A durva mitokondriális frakciót Nycodenz sűrűséggradiens centrifugálással tisztítva kaptuk meg a finom mitokondriális frakciót. Az egyes frakciókban a keresett fehérjéket Western blot segítségével azonosítottuk.

Cukorgradiens centrifugálás

Az RLI1-TAP egyéjszakás rázatott tenyészetet 0,8-as OD₆₀₀ értékig növesztettük, majd üvegyöngyökkel tártuk fel. A sejtörmelékét centrifugálással eltávolítottuk,

a felülúszót 10-50%-os lineáris cukorgradiens tetejére vittük fel, és Beckman SW41 rotorral 40000 rpm fordulatszámon 5 órán keresztül 4 °C-on centrifugáltuk. A mintákat frakciószedővel gyűjtöttük, majd Western blot segítségével vizsgáltuk.

TAP-tag affinitás izolálás

Az RLI1-TAP egyéjszakás rázatott tenyészetet 0,8-as OD₆₀₀ értékig növesztettük és a sejteket üvegyöngyökkel feltártuk. A felülúszót IgG Sepharose gyöngyökkel 1,5 órán keresztül 4 °C-on lassan ráztuk, majd lecentrifugáltuk. Az üledéket TEV proteáz enzimmal kezeltük, majd centrifugálással választottuk el a gyöngyöket a felülúszóban lévő, gyöngyökről lehasított fehérjétől. A felülúszóhoz kalmodulin-kötő puffert és Calmodulin gyöngyöket adtunk és 1 órán keresztül 4 °C-on ráztuk. A gyöngyöket először kalmodulin-kötő pufferrel mostuk, végül a kötött fehérjéket kalmodulin elúciós pufferrel eluáltuk a gyöngyökről.

Fehérjeszintézis vizsgálata pulse-chase módszerrel

A vad típusú és Tet-RLI1 törzseket YPD médiumban, doxiciklin jelenlétében illetve hiányában növesztettük. Az összegyűjtött és átmosott sejteket metionin- és cisztein-mentes minimál tápoldatba helyeztük. 10 µCi ³⁵S izotóppal jelölt metionin és cisztein keverékét adva a sejtekhez 10 percig inkubáltuk őket, 6 mM jelöletlen metionint és ciszteint adva a sejtekhez hígítottuk ki az izotópot, majd további 10 percig növesztettük a sejteket. Az összegyűjtött és feltárt sejteket 12%-os SDS poliakrilamid gélen szétválasztottuk, a fehérjékbe beépült izotópot PhosphoImager készülékkel tettük láthatóvá.

Sejtlégzés képességének vizsgálata

A törzseket YPD médiumban 0,8-as OD₆₀₀ értékig növesztettük. Sejtszámlálást követően mindegyik mintát 10⁴, 10³, 10² és 10 sejt/6 µl koncentrációkra hígítottuk. A sorozathígításból 6-6 µl-t glükóz- illetve glicerintartalmú táptalajra csöppentettünk, és 12 napig 30 °C-on növesztettünk. A növekedés ütemét a 2., 4., és 12. napon fényképen rögzítettük.

Primer extenziós analízis

A kísérletekhez használt oligonukleotidokat T4 polinukleotid kináz és [γ-³²P]ATP felhasználásával jelöltük meg. A reakcióelegy 8 µg teljes RNS-t és 10 pmol 5' vég-jelölt oligonukleotidot tartalmazott. A mintát 5 perc 85 °C-on történő melegítést követően 90 percen át 45 °C-on inkubáltuk. A reverz transzkripció dCTP, dGTP, dATP, dTTP és reverz transzkriptáz hozzáadásával 15 percig 42 °C-on zajlott. A reakciósorozat végén mintáinkat 7 M karbamidot tartalmazó 6%-os poliakrilamid szekvenáló gélen futtattuk meg. Eredményeinket PhosphoImager készülékkel tettük láthatóvá.

Eredmények és következtetések

*Az Rli1p szerepének vizsgálata,
avagy miért esszenciális a mitokondrium?*

Az Rli1p sejten belüli elhelyezkedése

Az egyéjszakás IRHA törzs rázatott tenyészet feltárását követően a sejtalkotókat differenciál centrifugálással szétválasztottuk, majd az egyes frakciókban az Rli1p jelenlétét Western blot segítségével határoztuk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy az Rli1p egy része a citoplazmában oldott formában fordul elő, másik része viszont valamilyen módon az ER-hez kötődve van jelen.

Az Rli1p citoszólikus elhelyezkedését német kollaborációs partnerünk *in situ* immuncitokémiai módszer segítségével erősítette meg, amivel azt is sikerült kimutatniuk, hogy a fehérje egy kisebb mennyisége a sejtmagban található. Kimutatták továbbá, hogy a nukleáris export leállítását követően az Rli1p mennyisége a sejtmagban megnőtt.

Mindez arra enged következtetni, hogy bár az Rli1p legnagyobb mennyiségben a citoszólban található, egy kisebb része a citoszól és a sejtmag között ingázik.

Az Rli1p vas-kén komplexe nélkülözhetetlen *Saccharomyces cerevisiae*-ben

Az Rli1p esszenciális voltának a megerősítésére, illetve a vas-kén komplex fontosságának vizsgálatához az egyetlen allélra nézve heterozigóta diploid RLI1/ Δ rli1 élesztőtörzs tetrádanalízist alkalmaztunk. Az egy tetrádot alkotó négy spóra szegregációját követően minden esetben csak két haploid élesztőkolónia kifejlődését figyeltük meg, mellyel megerősítettük azt a megfigyelést, hogy az Rli1p egy nélkülözhetetlen fehérje élesztőben.

Az Rli1p két [4Fe-4S] komplexe a fehérjerészhez annak két ferredoxin típusú motívumában megtalálható négy-négy erősen konzervált ciszteinjén keresztül kötődik. Ezért a vas-kén komplex fontosságának vizsgálatára PCR alapú irányított mutagenézissel három új mutáns RLI1 gént hoztunk létre, amelyekben az első, a második, vagy mindkét ferredoxin típusú motívumban az egyik konzervált cisztein helyett lizint kódoló bázishármas volt jelen. A vad típusú, valamint a mutáns géneket expressziós vektorba klónoztuk, majd a diploid RLI1/ Δ rli1 törzsbe transzformáltuk. A tetrádanalízis során a plazmidon vad típusú RLI1 gént tartalmazó diploid RLI1/ Δ rli1 törzs minden esetben négy életképes spórát hozott létre. Azok a spórák viszont, amelyek a mutáns kötőhelyet hordozó RLI1 gént tartalmazták nem voltak életképesek, hiszen mindegyik mutáns törzs 2:2 arányú szegregációval volt jellemezhető.

Mindez azt bizonyítja, hogy az Rli1p két konzervált ciszteinje létfontosságú a fehérje, és így a sejt számára is. Ez a megfigyelés egyben azt is jelzi, hogy mindkét vas-kén komplex a fehérje elengedhetetlen alkotórésze.

Az Rli1p ATP-kötő képessége nélkülözhetetlen *Saccharomyces cerevisiae*-ben

Ehhez a kísérlethez fejlesztettük ki a Tet-RLI1 törzset, amelyben az *RLI1* gén egy tetraciklin által represszálható promóter szabályozása alatt áll. Doxiciklin hozzáadásával ezekben a sejtekben az *RLI1* gén átírása gátlódik, így az Rli1 fehérje mennyisége lecsökken.

Doxiciklin jelenlétében a vad típusú, exogén *RLI1* gént tartalmazó Tet-RLI1 törzs a vad típusú sejtekkel megegyező mértékben növekedett, ami azt jelzi, hogy a plazmidon bevitt normál *RLI1* gén képes volt az endogén fehérje doxiciklin által kiváltott depléciójának ellensúlyozására. A PCR-alapú irányított mutagenézissel létrehozott, a fehérje első illetve második ATP-kötő régiójában megtalálható ATP-kötő lizin helyett leucint hordozó mutáns Rli1p-t expresszáló Tet-RLI1 törzs azonban képtelen volt a növekedésre doxiciklin jelenlétében.

A komplementáció hiánya azt jelzi, hogy az Rli1 fehérje ATP-kötő képessége esszenciális a fehérje, és így a sejt számára is.

Az Rli1p a Hcr1 fehérjéhez kapcsolódik *in vivo*

Korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy az Rli1p kapcsolódik a Hcr1 fehérjével, az rRNS-ek módosításában és a transláció iniciációjában is szerepet játszó fehérjével. Munkánk során ennek a kapcsolatnak a létét kívántuk igazolni élesztő két-hibrid módszerrel, illetve azt vizsgáltuk, hogy a vas-kén komplexnek illetve az ABC doménnek van-e szerepe a Hcr1p-vel való kapcsolat kialakításában.

A vad típusú *RLI1* és *HCR1* gént tartalmazó plazmidokat hordozó élesztősejtek esetén erős növekedést figyeltünk meg, amely igazolta a két fehérje szoros kapcsolatát *in vivo*. Az egyszeres mutáns ferredoxin motívummal rendelkező Rli1p fehérjék még képesek voltak a Hcr1p-vel kapcsolódni, a kétszeres mutáns ferredoxin motívummal rendelkező Rli1 fehérje azonban nem kötődött a Hcr1p-hez. A két ATP-kötő doménben mutáns fehérjéket, valamint kizárólag az eredeti, nem mutáns ATP-kötő lizint hordozó ABC domént önmagában expresszálva sem mutattuk ki a Hcr1p-hez történő kapcsolódást.

Eredményeink arra utalnak, hogy az egyes vas-kén komplexek hiánya csak kisebb mértékű konformációváltozást eredményez, amely még megengedi a Hcr1p-hez történő kötődést. Mindkét komplex elvesztését követően azonban az Rli1p szerkezete már oly mértékben eltér a natív konformációtól, ami lehetetlenné teszi a kapcsolat létrejöttét. Ezen kívül az ABC domén, pontosabban az ATP-kötő régió jelenléte (így feltételezhetően az ATP kötés) mindenképpen szükséges, bár önmagában nem elégséges feltétele a kapcsolat kialakításának.

Az Rli1p riboszómális alegységekhez kapcsolódik *in vivo*

Az Rli1p lehetséges kötőpartnereinek azonosítására a kofrakcionálás egy formáját, a TAP-tag (Tandem Affinity Purification) affinitás kromatográfiás módszert alkalmaztuk. A kísérlettel mind a kis, mind a nagy riboszómális alegység több fehérjéjének Rli1p-hez való kötődését igazoltuk. A kapott eredmények azt jelzik, hogy az

Rli1p képes a 80S riboszómához vagy pedig mind a kis, mind a nagy alegységhez kapcsolódni.

Eredményünk igazolására az előző kísérletben használt törzs sejtextraktumát cukorgradiens centrifugálással is elválasztottuk, és Western blotlalt vizsgáltuk a fehérjék jelenlétét az egyes frakciókban. Kísérletünk eredménye megerősítette eddigi megfigyeléseinket, mely szerint az Rli1p képes a riboszómális alegységekhez kapcsolódni.

Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy bár az Rli1p legnagyobb része a kis riboszómális alegységhez kötődik, a fehérje mindkét alegységgel, valamint a kész 80S riboszómával is képes kapcsolódni.

Az Rli1p szükséges a fehérjeszintézishez

Az Rli1p riboszómákhoz és a Hcr1p-hez való kötődése arra utal, hogy szerepe lehet a fehérjeszintézishez kötődő folyamatokban. Hogy megvizsgáljuk, az Rli1p-nek specifikusan egy vagy néhány fehérje szintézisében van-e szerepe, vagy általános fontossággal bír az összes fehérje translációjában, vad típusú (W303) és Tet-RLI1 sejteket 24 órán keresztül doxiciklinnel kezeltünk, hogy az Rli1p szintjét lecsökkentjük. A sejteket ³⁵S izotóppal jelölt metioninnal és ciszteinnel inkubáltuk, a fehérjékbe beépült izotópot pedig autoradiográfiával tettük láthatóvá.

Eredményünk azt mutatta, hogy az Rli1p depléciója a sejtek fehérjeszintézisének általános, nagymértékű csökkenését okozta.

Az Rli1p szükséges a riboszóma alegységek sejtmagból történő exportjához

Az Rli1p riboszómaérésben betöltött szerepének vizsgálatát a német munkacsoport végezte. Annak érdekében, hogy a kis, illetve a nagy riboszómális alegység érését nyomon kövessék, a két alegység egy-egy alkotófehérjéjének GFP-jelölt formáját expresszáltatták vad típusú és Tet-RLI1 törzsekben. A vad típusú sejtekben és doxiciklinnel nem kezelt Tet-RLI1 sejtekben a riboszómák normális eloszlását figyelték meg. Abban az esetben azonban, amikor az Rli1p mennyiségét a doxiciklin kezeléssel lecsökkentették, mindkét riboszómális alegység a sejtmagban halmozódott fel.

Mindez az Rli1p riboszómaérésben és/vagy a nukleocitoplazmatikus transzportban betöltött fontos szerepét jelzi.

Az Rli1p vas-kén komplexe nélkülözhetetlen a riboszómaérésben

Utolsó kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy a vas-kén komplex hiánya befolyásolja-e az Rli1p riboszómaérésben illetve -transzportban betöltött szerepét, vagy esetleg az apoprotein önmagában elégséges ennek a funkciónak az ellátásához.

Ennek a kérdésnek a megválaszolására egy olyan törzset használtunk, amelyben a citoplazmatikus vas-kén fehérjék, például az Rli1p aktiválása specifikusan gátolható. Ebben a törzsben a német munkacsoport a nagy riboszómális alegységet alkotó egyik, GFP-taggal ellátott fehérjéjének elhelyezkedését immuncitokémiai módszerrel vizsgálta. Az Rli1p aktivációjának gátlása esetén a nagy riboszómális alegység a

sejtmagban halmozódott fel, hasonlóan az Rli1p depléciónak során tapasztaltakhoz. Eredményeik alapján tehát elmondhatjuk, hogy az Rli1p riboszómaérésben játszott létfontosságú szerepéhez a vas-kén komplex jelenléte nélkülözhetetlen.

Ezek az eredmények a mitokondrium esszenciális karaktere és a citoszólikus riboszómák működőképessége között fennálló meglepő, de szoros kapcsolatra mutatnak rá. A mitokondrium tehát – mint a vas-kén komplex bioszintézis központi organeluma – az Rli1 fehérje aktivációján keresztül meghatározó szerepet játszik a fehérjeszintetikus apparátus felépítésében.

A COB mRNS vizsgálata,

avagy hogyan működik az mRNS-ek 5' végi lebontása a mitokondriumban

Munkánkban a mitokondriális mRNS-ek 5' vég felől történő lebontásának vizsgálatát a COB mRNS életciklusának tanulmányozásán keresztül végeztük. A COB mRNS 5' végének kialakítása során az exo- vagy endonukleáz általi hasítás végterméke markánsan különbözhet egymástól. Exonukleáz általi hasítás esetén ugyanis a hasítás az 5' véghez legközelebb található szabályozó szekvencia helyzetétől függ, endonukleáz reakció esetén viszont a hasítás az első kódoló exonhoz legközelebb elhelyezkedő szabályozó szakasznál történik meg. Ez a különbség felhasználható arra, hogy a két enzimreakció-típust elkülönítsük egymástól és így kimutassuk, milyen típusú nukleáz hasítja a COB mRNS-ét.

A tandem Cbp1 kötőhelyek kialakítása

Kísérleteinkhez a COB mRNS 5' UTR szakaszának Cbp1 kötőhelyén a normál (CCG) trinukleotidot hordozó *C törzs* és a mutáns, működésképtelen (ACG) trinukleotidot hordozó *A törzs* mellé az alábbi tandem Cbp1 kötőhelyeket tartalmazó törzseket hoztuk létre:

- ◆ *AA törzs*: a COB mRNS 5' UTR szakaszán két mutáns, működésképtelen (ACG) trinukleotidot hordozó Cbp1 kötőhely található,
- ◆ *AC törzs*: az 5' véghez közelebb a mutáns (ACG), míg a kódoló szakaszhoz közelebb a vad típusú (CCG) trinukleotidot hordozó kötőhely található,
- ◆ *CA törzs*: az 5' véghez közelebb a vad típusú (CCG), míg a kódoló szakaszhoz közelebb a mutáns (ACG) trinukleotidot hordozó kötőhely található,
- ◆ *CC törzs*: a COB mRNS 5' UTR szakaszának mindkét Cbp1 kötőhelyén a működőképes CCG trinukleotidot hordozza.

A tandem Cbp1 kötőhely mindkét helye aktív

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az általunk létrehozott, egymás után kapcsolt két kötőhely mindegyike külön-külön teljes értékű kötőhelyként funkcionál-e, az egy normál (CCG) és egy mutáns (ACG) kötőhelyet tandem hordozó AC

és CA törzsek respirációs fenotípusát hasonlítottuk össze a vad típusú C törzs és a CC törzs fenotípusával. Azt tapasztaltuk, hogy mind a CC, mind a CA törzs a C törzssel megegyező mértékben növekedett. Az AC törzs szintén nőtt glicerintartalmú táptalajon, bár ennek mértéke kissé elmaradt a vad típusnál tapasztalttól.

Mindez azt bizonyítja, hogy a CCG kötőhely mindkét pozícióban működőképes.

Az érett COB mRNS 5' végét egy exonukleáz hasítás alakítja ki

A COB mRNS 5' végének helyzetét a különböző törzsekben primer extenziós analízis segítségével határoztuk meg. Ennek alapján a két vad típusú kötőhelyet tandem módon hordozó CC törzsben mind az érett, mind pedig a COB pre-mRNS 5' vége a CA törzsben kimutathatóval volt megegyező.

Ez az eredmény egyértelműen azt mutatja, hogy az 5' végét a hozzá legközelebb elhelyezkedő CCG hely határozza meg, ez pedig azt jelenti, hogy a COB mRNS 5' végét egy 5'-3' exonukleáz alakítja ki, lebontva az RNS 5' végét egészen addig, amíg a specifikus kötőhelyéhez kapcsolódó Cbp1p útját nem állja.

Az exonukleáz reakció egy Pet127p-függő folyamat

Régóta ismert, hogy a Pet127 fehérjének szerepe van több mitokondriális mRNS, így a COB mRNS érésében is. Annak bizonyítására, hogy a Pet127 fehérje nemcsak az érésben, de a COB mRNS mennyiségének szabályozásában is fontos lehet, a nukleáris *PET127* gént kiütöttük mindegyik felhasznált törzsünkéből. A sejtlégzés vizsgálata során ezek a vad törzssel megegyező mértékben nőttek glicerinen. Mindez azt mutatja, hogy Pet127 hiányában a sejtekben elegendő mennyiségű stabil COB mRNS van abban az esetben is, ha a Cbp1p nem képes megfelelően kapcsolódni. Ezekben a törzsekben a COB mRNS-ek 5' végének vizsgálata során csak az éretlen formát tudtuk kimutatni, az érett forma szinte teljesen eltűnt.

Ezzel az eredménnyel megerősítettük azt az álláspontot, amely szerint a COB mRNS érése és lebontása kapcsoltan, egy közös mechanizmussal zajlik, amelyben a Pet127 fehérjének elsőrendű szerepe van.

Munkánk során tehát sikerült bebizonyítanunk, hogy *Saccharomyces cerevisiae*-ben, a mitokondriális apocitokrom *b* fehérjét kódoló COB mRNS érése és 5' vég felől történő lebontása két, egymással összekapcsolt reakció, amely a Pet127p által szabályozott 5'-3' exonukleáz reakcióval történik. A mitokondriumban az eddig ismert RNS bontó rendszerek közül az általunk azonosított az első, amely 5'-3' irányú, és 5'-3' exonukleáz aktivitással rendelkezik.

Összefoglalás

Munkánk első részében a mitokondrium esszenciális voltának háttérét, és ehhez kapcsolódóan egy eddig ismeretlen funkciójú esszenciális vas-kén fehérjét, az Rli1p-t vizsgáltuk:

- ◆ Kimutattuk, hogy a fehérje nagyobb része a citoszólban található, egy kisebb része pedig a citoszól és a sejtmag között ingázik.
- ◆ Igazoltuk, hogy a fehérje működőképességének kialakításában mind a fehérjében található két vas-kén komplexnek, mind ATP-kötő képességének kitüntetett jelentősége van.
- ◆ Eredményeink azt mutatták, hogy az Rli1p a Hcr1p-hez, az rRNS módosításban és a fehérjeszintézis iniciációjában is fontos szerepet játszó fehérjéhez, valamint mind a nagy, mind a kis riboszómális alegységhez kapcsolódik.
- ◆ Kimutattuk, hogy a fehérje mennyiségének csökkenése a sejtekben mindkét riboszóma alegység nukleáris exportjának defektusát, valamint a fehérjeszintézis általános csökkenését okozza.
- ◆ Bebizonyítottuk, hogy az Rli1p riboszómaérésben betöltött nélkülözhetetlen funkcióját csak akkor képes ellátni, ha két vas-kén komplexe az apoproteinhez kötött formában található.

Vizsgálataink során tehát bebizonyítottuk, hogy az élesztő Rli1 fehérje alapvető szerepet játszik a riboszómák érésében. Mindez a mitokondrium esszenciális jellegét is megmagyarázza, hiszen ez az organellum a vas-kén komplex szintézise által egy olyan vas-kén fehérjét aktivál, amely a riboszómák érésének elősegítésén keresztül elengedhetetlen a fehérjeszintézishez.

A mitokondriális génextpresszió szabályozásának vizsgálata során a COB mRNS 5' végi érésének és lebontásának mechanizmusát vizsgáltuk:

- ◆ Munkánk során sikeresen hoztunk létre olyan élesztőmutánsokat, amelyekben a COB mRNS 5' UTR szakaszán két Cbp1 kötőhely található, normál illetve mutáns formában.
- ◆ Ezen törzsek vizsgálatával sikerült kimutatnunk, hogy az mRNS 5' végének érése és az 5' vég felől történő lebontása kapcsolatos, egy közös mechanizmussal zajlik.
- ◆ Kimutattuk, hogy ez a két folyamat egy 5'-3' exonukleáz reakción keresztül megy végbe.
- ◆ Megerősítettük, hogy a nukleáris kódoltságú Pet127 fehérje irányító szerepe alapvetően fontos ezekben a folyamatokban.

A fenti, általunk azonosított mechanizmus a mitokondriumban az első olyan RNS-bontó rendszer, amely 5'-3' irányú és 5'-3' exonukleáz aktivitással rendelkezik.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Kispál Gyulának és Dr. Sipos Katalinnak munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatásukért, barátságukért. Hálás vagyok Prof. Carol Dieckmann-nak, Melissa Schonauer-nek és a University of Arizona-n dolgozó minden kollégámnak amiért befogadtak és mindenben segítettek a külföldön töltött idő során. Köszönöm a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet és az Orvosi Biológiai Intézet minden munkatársának hasznos tanácsait és segítségüket. Végül, de nem utolsósorban köszönöm férjemnek és szüleimnek türelmüket, megértésüket és támogató szeretetüket.

Tudományos közlemények jegyzéke

A disszertáció alapját alkotó közlemények

1. Kispál 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 Feb 9; 24(3): 589-98.
IF: 10,053
(Science Magazine Editors' Choice: Science 307(5710):646)
2. Lill R, **Fekete Z**, Sipos K, Rotte C
Why are Mitochondria Essential for Life?
IUBMB Life. 2005 Oct; 57(10): 701-703
IF: 2,116
3. **Fekete Z**, Ellis TP, Schonauer MS, Dieckmann CL
Pet127 governs a 5'-3' exonuclease reaction important in the processing of COB mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*
J Biol Chem. 2008 febr 15; 283 (7): 3767-3772
IF: 5,520

Egyéb közlemények

1. Sipos K, Lange H, **Fekete Z**, Ullmann P, Lill R, Kispál G
Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione
J Biol Chem. 2002 Jul 26; 277(30): 26944-9.
IF: 6,696

Referált folyóiratban megjelent absztraktok

1. Kispál G, Sipos K, **Fekete Z**, Antus Z, Lill R
Iron-sulfur activation-a mitochondrial function in the unfolded protein response
28th FEBS Congress, Istanbul, Turkey, 20-25 October 2002
FEBS Journal 269 (s1), 220
2. **Fekete Z**, Sipos K, Lange H, Nagy J, Aguilar Netz DJ, Balk J, Rotte C, Lill R, Kispál G
The iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria play an essential role in the biogenesis of cytosolic ribosomes
30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary
July 2-7, 2005
FEBS Journal 272 (s1), N5-005

Előadások

1. **Fekete Z**, Sipos K, Kispál G
A GSH szerepe az extramitokondriális vas-kén fehérjék érésében
A Pécsi Akadémiai Bizottság Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma I, Pécs, 2002. december 11.
2. **Fekete Z**, Sipos K, Lange H, Nagy J, Aguilar Netz DJ, Balk J, Rotte C, Lill R, Kispál G
The iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria play an essential role in the biogenesis of cytosolic ribosomes
30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary,
July 2-7, 2005

Poszterek

1. Kispál G, Sipos K, **Fekete Z**, Lill R
Az RNáz L inhibitor, egy citoszolikus vas-kén fehérje aktiválása és funkciója
Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya
6. *Munkaértekezlete*. Sárospatak, 2001. május 14-17.
2. Kispál G, Sipos K, **Fekete Z**, Lill R
A vas-kén komplex bioszintézis zavara ataxiával térsult szideroblasztos anémiában
XXXI. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2001. május 22-25.

3. Sipos K, **Fekete Z**, Szigeti R
A pyrBI operon attenuátorának vizsgálata szisztematikus mutagenézis révén E. coliban
A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. munkaértekezlete, Keszthely, 2002. május 14-17.
4. **Fekete Z**, Sipos K, Kispál G
A glutation szerepe az extramitochondriális vas-kén fehérjék aktiválásában
Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 7. munkaértekezlete, Keszthely, 2002. május 14-17.
5. **Fekete Z**, Sipos K, Kispál G
A glutation szerepe az extramitochondriális vas-kén fehérjék aktiválásában
XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002. május 21-24.
6. Kispál G, Sipos K, **Fekete Z**
Iron-sulfur protein activation – an essential mitochondrial function
XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002. május 21-24.
7. Sipos K, **Fekete Z**, Szigeti R
A pyrBI operon attenuátorának vizsgálata szisztematikus mutagenézis révén E. coliban
XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002. május 21-24.
8. Kispál G, Sipos K, **Fekete Z**, Lill R
Iron-sulfur protein activation- a mitochondrial function in the unfolded protein response
28th FEBS Congress, Istanbul, October 20-25, 2002
9. Sipos K, **Fekete Z**, Szigeti R
A PyrBI operon attenuátorának vizsgálata szisztematikus mutagenézis révén E. coliban
XXXI. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2002. május 21-24.
10. **Fekete Z**, Sipos K, Antus Z, Nagy J, Mártonfalvi Z, Kispál G
A cisztein deszulfuráz szerepe a tio-tRNS modifikációban eukarióta sejtben
Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 8. munkaértekezlete, Tihany, 2003. május 12-15.
11. Antus Z, **Fekete Z**, Sipos K, Nagy J, Mártonfalvi Z, Kispál G
Az Rli1p szerepe az unfolded protein response-ban
XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2003. május 20-23.