

Vas-kén komplexet tartalmazó fehérjék szerepe igen szerteágazó valamennyi élőlényben. Legtöbbjük a mitokondriumban található, a citrátkörben és a terminális oxidációban vesz részt. A vas-kén komplex bioszintézise is a mitokondriumban zajlik, és egy több komponensű transzport rendszeren keresztül jut ki az extramitokondriális apoproteinekhez. Ez utóbbiak közül egyre többet ismerünk meg. A vas-kén komplex bioszintéziséért felelős gének többsége élesztő számára nélkülözhetetlen, amely arra utal, hogy a sejtek léteznek egy vagy több vas-kén fehérjéje, amelyek szintén nélkülözhetetlenek az élethez. Áttételesen ez lenne az egyik oka a mitokondriumok nélkülözhetetlen voltának, legalábbis élesztősejtekre vonatkoztatva. Egyik citoszolikus vas-kén fehérje az RNáz L inhibitor (Rli), amely élesztőben igazolhatóan esszenciális, vagyis hiányában az élesztősejtek elveszítik életképességüket. Emberben is ismert ez a fehérje. Az RNáz L az interferon által indukált fehérjék közé tartozik, kettős szálú RNS molekulák jelenlétében aktiválódik, így egyes vírusfertőzések elleni védekezésben is szerepe van. Ennek a válasznak a kioltásában, az RNáz L inaktiválásában van szerepe az Rli fehérjének. Érdekesség, hogy bár élesztőben az Rli esszenciális, az élesztő nem tartalmaz RNáz L enzimet, tehát nyilvánvalóan van más szerepe is ennek a fehérjének. Munkánk során ezt a más funkciót kutattuk, valamint arra kerestünk választ, hogy vajon a humán Rli fehérje is rendelkezik-e ezzel a másik funkcióval, illetve hogy milyen különbségeket találunk az élesztő és a humán Rli között.

Kutatásaink egy csoportja az unfolded protein response (UPR, az endoplazmatikus retikulumban (ER) nem megfelelően csomagolódott fehérjéket érzékelő rendszer) irányában zajlanak. Az UPR receptora ugyanis az Ire1p fehérje, amely strukturális és funkcionális hasonlóságot mutat az RNáz L-lel. Feltételezzük, hogy az Rli az Ire1p-hez kötődik, amely kötődésnek *in vitro* bizonyítékát találtuk is élesztőben, *in vivo* azonban még nincsenek bizonyítékaink. Érdekes módon humán sejtenyészeten az Rli expresszió változtatásával a Bip fehérje (ER chaperon) szintje is változott, ennél azonban többet kell tudnunk ahhoz, hogy bizonyítottan mondhatjuk az Rli szerepét az UPR-ban. Ezirányú vizsgálataink most is zajlanak, de közleményhez még nem vezettek.

Az igazolt, hogy ha van is az Rli-nek szerepe az unfolded protein response-ban, az nem esszenciális szerep. Az élesztő sejt mellett a humán Rli fehérjéről is bebizonyosodott, hogy nélkülözhetetlen az élethez. Két módszerrel csökkentettük az Rli expresszióját HeLa sejtekben. Egyrészt antiszensz Rli-t tartalmazó plazmid (pCDNA3) transzfektálásával, amely plazmid Catherine Bisbal ajándéka, másrészt siRNA technikával. Ez utóbbihoz az Rli specifikus, vas-kén komplexet kötő N-terminálisához terveztünk oligonukleotidákat, mert a C-terminális szakasz olyan doméneket tartalmaz, amelyek az ABC-transzportekhez analóg, és nem akartuk, hogy több fehérje expressziója is csökkenjen egyidejűleg. A PCR-rel felerősített N-terminális szakaszból *in vitro* transzkripcióval kettős szálú RNS-t szintetizáltunk, amelyet szintén *in vitro* dicer emésztésnek vetettünk alá. Ilyen módon 20-25 bázispár hosszúságú kettős szálú RNS molekulák keverékét kaptuk, amelyeket HeLa sejtekbe transzfektálva az Rli1p expresszióját csökkenteni tudtuk. Mindkét módon Rli depletált sejteknél azt figyeltük meg, hogy az Rli-szint nagyfokú csökkenése a sejt halálához vezetett.

Az Rli vas-kén fehérje, amit a radioaktív vasat kötő tulajdonsága, és jellegzetes szekvenciája, egymástól 2 illetve 3 aminosav távolságra lévő négy cisztein jelenléte is igazol. Sok vas-kén fehérjéről eddig már bebizonyosodott, hogy esszenciális voltokra az a magyarázat, hogy maguk is a vas-kén komplex szintézisében vesznek részt. Az Rli azonban olyan, citoszolikus elhelyezkedésű vas-kén fehérje, amely nem része sem a vas-kén komplex bioszintézisének, sem a komplex extramitokondriálisan történő apoproteinbe való beépítésének. Így esszenciális volta a vas-kén komplex szintézisben való részvétellel nem magyarázható.

Az Rli esszenciális funkcióját kereső kísérletek közül az elsők two-hybrid kísérletek voltak, amelyekkel *in vivo* fehérje-fehérje interakciók mutathatók ki. A kísérletek alapjául az az irodalmi adat szolgált, amely szerint az Rli fehérje kapcsolódik a Hcr1p-vel, amely fehérje részt vesz a riboszomális RNS érésében és a transláció iniciációjában. Two-hybrid esszével igazolni tudtuk a két fehérje kötődését, és különböző Rli mutánsok alkalmazásával azt is, hogy bár a vas-kén komplex jelenléte a fehérje számára esszenciális, ebben a kötődésben nem szerepel. Viszont az ABC-transzporter domén mutációjának a Hcr1p kötés megszűnése volt a következménye.

Annak vizsgálatát, hogy az Rli1p milyen egyéb fehérjéket köt *in vivo* a Hcr1p mellett, egy olyan élesztő törzssel végeztük, amelyben az Rli egy ún. TAP-taggal expresszáldott. A rövidítés a tandem affinity purification szóból származik, amely azt jelenti, hogy a sejten belül *in vivo* képződött fehérje komplexeket egy kettős affinitás tisztításnak vetjük alá olyan fiziológiás körülmények között, amely a sejten belül létrejött fehérje-fehérje interakciókat érintetlenül hagyja. Az így kapott fehérjekomplexek tagjai SDS gélelektroforézissel szétválaszthatók, és az egyes fehérjekomponensek a gélből kivágva MALDI-TOF rendszerrel (Janáky Tamás, Szeged) azonosíthatók. A módszer egyik nehézsége abban rejlik, hogy nagy mennyiségű sejtől kell kiindulnunk, hogy a gélen látható, használható anyagmennyiségeket nyerjünk. Ezekkel a vizsgálatokkal kiderült, hogy az Rli1p számos riboszomális fehérjével alkot komplexet, amelyek között mind a nagy alegység, mind a kis riboszomális alegység alkotója megtalálható.

A riboszomális kötődését az Rli fehérjének más módszerrel is igazolni tudtuk. Ezekhez a kísérletekhez szintén a TAP-taget hordozó törzset használtuk. A sejteket gazdag tápoldatban növelve a sejtlyázatot szukróz gradiens centrifugálásnak vetettük alá. Az egyes frakciókat 260 nm-en történő méréssel azonosítottuk (40S, 60S, 80S és poliszóma frakciók), és az adott frakciók fehérjetartalmát Western-blottal vizsgáltuk. Ennek alapján bebizonyosodott, hogy az Rli fehérje mind a kis, mind a nagy riboszóma alegységet tartalmazó frakciókban megtalálható, de legnagyobb mértékben a 40S kis alegységhez kapcsolódik.

Az Rli más fehérjékhez való kötődésének bebizonyítása valószínűsítette az Rli translációban betöltött szerepét. Ennek igazolására létrehoztunk egy olyan törzset, amelyben az Rli saját promóterét egy tetraciklin-származékkal (Doxycyclin) elnyomható promóterre cseréltük. Az esszenciális fehérjéket kódoló génszakaszokat ugyanis nem deletálhatjuk az élesztőben, hiszen az a sejt halálát okozza, hanem valamilyen módon a fehérje expresszióját kell olyan szintre szorítanunk, amikor a sejt még életképes, de a fehérje funkciójának kiesése már jelentkezik. Az általunk Tet-Rli-nek nevezett törzs tápoldatához ha doxycyclint adtunk, az Rli expressziója visszaszorítható volt. Nagy antibiotikum koncentráció, illetve túl hosszú kezelés azonban az élesztő sejtek halálát okozta. Ha az ilyen módon Rli-depletált törzs tápoldatához radioaktív metionint adtunk, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követő autoradiográfiát végeztünk, azt találtuk, hogy az Rli depletált sejtekben a kontrol sejtekkel összehasonlítva a transláció nagyfokú csökkenését láttuk, azaz a legtöbb fehérjében csökkent a beépült radioaktivitás. Ez a csökkenés a riboszomális fehérjék mennyiségére csak kis mértékben vonatkozik, tehát a transláció csökkenésének más oka is kell legyen, mint a riboszómák mennyiségi változása. Saját és más laboratóriumok kísérletei alapján bebizonyosodott, hogy az Rli depletált sejtekben károsodott mind a riboszomális alegységek transzportja, mind a rRNS-ek érése. Ezeknek egy része ugyanis az érési folyamatot a citoszolban fejezi be. A riboszomális RNS-ek érésében és a riboszomális alegységek transzportjában betöltött szerepéhez az Rli-nek szüksége van a vas-kén komplexre. Ha az élesztő sejtekben a vas-kén komplex bioszintézist meggátoltuk valamelyik, a szintézisben nélkülözhetetlen komponens expressziójának lecsökkentésével, akkor az Rli nem tudta a translációban betöltött feladatát végrehajtani.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy valószínűleg rátaláltunk arra a molekulára, amelynek szintézise miatt a vas-kén komplex előállításáért felelős komponensek nélkülözhetetlenek a sejt számára, és amely miatt az élesztőben a mitokondrium esszenciális sejtalkotónak tekinthető. Az élesztőben ugyanis relatíve nincs sok esszenciális fehérje, és ezen molekulák jelentős hányadát vas-kén fehérjék alkotják. A legtöbb vas-kén fehérje maga is részt vesz a vas-kén komplex bioszintézisében. Most úgy tűnik, sikerült megtalálni azt az esszenciális citoszolikus vas-kén fehérjét, amelyet a sejtek nem tudnak nélkülözni a transzlációban, a riboszomális RNS-ek érésében és a riboszomális alegységek transzportjában betöltött funkciója miatt.

Fenti eredményeink az EMBO Journalben kerültek publikálásra, valamint a FEBS Journalben jelent meg egy kongresszusi előadás absztraktja. Az új eredmények összefoglalása az IUBMB Life egy rövid cikkében található.

Érdekes megfigyelésünk, hogy az élesztő és a humán Rli közötti nagyfokú homológia ellenére a tetránnal Rli-depletált Tet-Rli sejtekben a humán Rli overexpressziója nem kompenzálta az élesztő Rli hiányát, azaz a humán Rli élesztőben nem komplementál. Ennek okát szeretnénk kideríteni, amikor olyan humán-élesztő hibrid Rli fehérjéket expresszáltunk Tet-Rli élesztő törzsekben, amelyek az Rli molekula különböző szakaszait vagy az élesztőből vagy humán kódnak megfelelően kódolták. Azt tapasztaltuk, hogy ezen hibrid Rli molekulákat expresszáló törzsekben csak az a variáns komplementálta az élesztő Rli hiányát, amelynek az N-terminális rövid szakaszát cseréltük a humán fehérje N-terminálisára. Ez a szakasz viszont csaknem teljes egyezést mutat a két fehérje között. Mostani kísérleteinkkel arra keressük a választ, hogy melyik funkcióját veszíti el az Rli a humán fehérjében az élesztőhöz viszonyítva, illetve ez a funkció melyik fehérjeszakaszhoz köthető. Előzetes kísérleteink alapján mind a humán, mind a hibrid Rli fehérjék *in vitro* hasonló mértékben kötötték a Hcr fehérjét. Jelenleg *in vivo* funkcionális összehasonlításokat végzünk, de még nem rendelkezünk végleges eredménnyel.

Mivel humán sejtenyészetekben (HeLa) az Rli deplécióját a sejt életképességének elvesztése követte, keresni kezdtük, hogy vajon az interferon hatásmechanizmusán kívül van-e más szerepe az Rli fehérjének humán sejtekben is. Ehhez a már említett módokon (Rli antiszensz és siRNS dicer technikák alkalmazása) előidézttük a HeLa sejtekben az Rli deplécióját. Az így kezelt sejtekben ha a transzláció szintjét vizsgáltuk radioaktív metionin fehérjékbe épülése révén, azt tapasztaltuk, hogy az Rli-depletált sejtekben a transzláció mértéke az élesztő sejtekben megfigyelt módon csökkent. Ugyanígy megvizsgáltuk az egyes riboszomális RNS komponensek mennyiségét Northern-blottal a kezelt és Rli-depletált HeLa sejtekben, és azt tapasztaltuk, hogy a kezelt sejtekben az egyes riboszomális RNS-ek mennyisége csökkent a kontrol sejtekéhez viszonyítva. Hasonlóan RT-PCR technikával vizsgáltuk a kontrol és Rli-depletált sejtekben a riboszomális fehérjék mRNS szintjét, és itt is azt találtuk, hogy a riboszomális fehérjék mennyisége csökkent. Mindez arra utal, hogy humán sejtekben is az Rli fehérjének a transzlációt és/vagy riboszóma érést befolyásoló szerepe van, akárcsak azt a élesztő sejtek esetében megfigyelhettük. Ennek a szerepnek a mechanizmusát még nem tártuk fel részleteiben, de reményeink szerint hamarosan megismerjük, és így lehetőségünk lesz felismeréseinket publikálni.