

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ (IMBB)**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**‘ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟ  
ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ  
ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ’**

**ΔΙΟΝΥΣΙΑ Π. ΣΙΔΕΡΗ**

Υπεύθυνος ερευνητής: Κ. ΤΟΚΑΤΛΙΔΗΣ

Υπεύθυνος καθηγητής: Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ

*ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2009*

*Αφιερωμένο στην μητέρα μου*

## Ευχαριστίες

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κώστα Τοκατλίδη που μου εμπιστεύτηκε ένα τόσο ενδιαφέρον και απαιτητικό ερευνητικό θέμα. Για την επιστημονική του καθοδήγηση στην διάρκεια των τελευταίων 6 χρόνων, για την υποστήριξη που μου έδειξε σε δύσκολες στιγμές, και για την εκτίμηση που έδειχνε συνεχώς για την δουλειά μου. Του χρωστάω απέραντη ευγνωμοσύνη γιατί ήταν πάντα δίπλα μου και πίστευε σε εμένα.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς επιτροπής και συγκεκριμένα τους Α. Οικονόμου και Δ. Τζαμαρία για την καθοδήγηση τους. Τον καθηγητή Lloyd Ruddock για τις επιστημονικές συμβουλές και κυρίως για την αμεσότητα που έχει στην επικοινωνία με τους φοιτητές του, καθώς επίσης και τα μέλη του εργαστηρίου Kirsi, Heli, Anna, Kaisa γιατί με έκαναν να αισθανθώ σαν πραγματικό μέλος του εργαστηρίου στην σύντομη επίσκεψή μου στην Φινλανδία. Τέλος τα μέλη του εργαστηρίου Ivano Bertini στην Φλωρεντία και συγκεκριμένα τους Chiara Cefaro και Simone Cioffi-Baffoni για την άριστη συνεργασία.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί τόσα χρόνια καθημερινά στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα τα πρώην μέλη και καλές μου φίλες Felicity Alcock και Carine deMarcos Lousa. Την Ειρήνη Λιονάκη, Αφροδίτη Χατζή και Παρή Κριτσιλίγκου για όλες τις αστείες στιγμές που πραγματικά βοήθησαν στο να ξεχνάς το άγχος της δουλειάς. Θα ήθελα να ξεχωρίσω τον ‘φαντάρο’ Νίκο Πετράκη γιατί εκτός από το ότι ανεχόταν όλα τα ‘κοριτσίστικα’ ξεσπάσματα του

εργαστηρίου και προσπαθούσε να ισορροπήσει τις καταστάσεις, επιπλέον τον τελευταίο χρόνο συνεργαστήκαμε άψογα και για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Ξεχωριστή θέση σε αυτή την εργασία ανήκει δικαιωματικά σε κάποια άτομα τα οποία δεν με στήριξαν απλά, υπήρξαν συνοδοιπόροι σε αυτό το μακρόχρονο ταξίδι. Την Νίτσα Κατρακίλη, για την καθημερινή υποστήριξη πειραματική και μη, για το κουράγιο, για τις ανεκτίμητες συμβουλές, για την φιλία της. Τον κολλητό μου φίλο Νίκο Βρεττό για τις νύχτες που με πίεζε να γράψω, για τα βράδια που μαθαίναμε στίχους από τραγούδια της Eurovision, για τις εκδρομές στα πιο όμορφα, απάτητα μέρη της Κρήτης, γιατί έκανε το ταξίδι ανώδυνο. Τον παντοτινό μου φίλο Κώστα Πουλιάκα που πάντα με στηρίζει και πιστεύει σε μένα ακόμα και από μακριά.

Τέλος πάνω από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου. Τον Γίαννη Ζαφειρόπουλο για την υπομονή που δείχνει τόσα χρόνια, για τις αμέτρητες νύχτες που με περίμενε στο εργαστήριο, για την αμέριστη συμπαράσταση, για την συντροφιά στο ταξίδι. Τους θείους μου Βένη και τον Νίκο που είναι για μένα δεύτεροι γονείς. Τα αδέρφια μου Βαλάντη και Κωνσταντίνα γιατί με κάνουν να θέλω να προσπαθώ περισσότερο, να ακολουθήσω το όνειρο. Τέλος, την μητέρα μου που από τότε που θυμάμαι μου έδειχνε απόλυτη εμπιστοσύνη και στήριζε όλες τις αποφάσεις μου όσο κανείς. Εσείς με κάνατε το άτομο που είμαι σήμερα και σε εσάς χρωστάω τα πάντα...

*Ευχαριστώ*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	III
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	V
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	VIII
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	X
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	XI
ABSTRACT .....	XII
<b>ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ .....</b>	<b>2</b>
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	2
1.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ .....	3
1.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ .....	5
<b>2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ .....</b>	<b>9</b>
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
2.2 ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΠΛΑΣΜΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ .....	10
2.2.1 Εισαγωγή δισουλφιδικών δεσμών στο περίπλασμα από την <i>DsbA</i> .....	11
2.2.2 Η ανακύκλωση της <i>DsbA</i> γίνεται από την <i>DsbB</i> .....	13
2.2.3 Ανακατανομή δισουλφιδικών δεσμών μέσω των <i>DsbC</i> , <i>DsbG</i> και <i>DsbD</i> .....	18
2.3 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ .....	23
2.3.1 Δομή και λειτουργία της <i>PDI</i> στο ενδοπλασματικό δίκτυο .....	23
2.3.2 Η <i>PDI</i> ανακυκλώνεται από την <i>FAD</i> εξαρτώμενη <i>Ero1</i> .....	28
<b>3. ΝΕΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΜΙΑ40 .....</b>	<b>32</b>
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ .....	32
3.2 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	34
3.2.1 Στόχευση στην εξωτερική μεμβράνη μέσω του συμπλόκου <i>SAM</i> .....	36
3.2.2 Στόχευση στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού <i>TIM22</i> .....	36
3.2.3 Στόχευση στην μιτοχονδριακή μήτρα μέσω του μονοπατιού <i>TIM23</i> .....	37
3.2.4 Στόχευση στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου .....	39
3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΥΣ ΔΕΣΜΟΥΣ ΣΤΟΝ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ .....	40
3.3.1 Πρωτεΐνες με διπλό <i>CX3C</i> μοτίβο-η οικογένεια των μικρών <i>Tim</i> .....	41
3.3.2 Πρωτεΐνες με διπλό <i>CX9C</i> μοτίβο .....	45
3.3.3 Άλλες πρωτεΐνες με δισουλφιδικούς δεσμούς .....	47
3.4 Η <i>FAD</i> ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΣΟΥΛΦΥΔΡΙΛΟΞΕΙΔΑΣΗ <i>ERV1</i> .....	48
3.5 Ο ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥ ΧΩΡΟΥ ΜΙΑ40 .....	52
3.6 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ .....	56
3.7 ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕ ΤΑ ΥΠΟΛΟΙΠΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΗΣ .....	59
<b>ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΟΠΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>61</b>
<b>ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>64</b>
4.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ .....	65
4.1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου <i>DNA</i> .....	65
4.1.2 Κλωνοποιήσεις .....	65
4.1.3 Μεταλλαξιγένεση .....	67
4.2 <i>IN ORGANELLO</i> ΤΕΧΝΙΚΕΣ .....	69
4.2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων .....	69
4.2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια .....	69
4.2.3 Παγίδευση μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων σε μιτοχόνδρια .....	70
4.2.4 Ανάλυση σχηματισμού συμπλόκων σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης .....	71
4.2.5 Ανοσοκατακρήμνιση μετά από πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια .....	71
4.2.6 Δημιουργία μιτοπλαστών .....	72

4.2.7 Έλεγχος οξειδωτικής κατάστασης ραδιοσημασμένου υποστρώματος σε μιτοχόνδρια.....	72
4.2.8 Διαλύματα.....	73
4.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	74
4.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) .....	74
4.3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE) .....	75
4.3.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης .....	76
4.3.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ανοσοαποτύπωση (Western) .....	77
4.3.5 Έκφραση πρωτεϊνών.....	77
4.3.6 Καθαρισμός πρωτεϊνών.....	78
4.3.7 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size exclusion chromatography).....	79
4.3.8 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών.....	79
4.3.9 Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών με το <i>in vitro</i> σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης.....	80
4.3.10 <i>In vitro</i> ανασύσταση της αλληλεπίδρασης Mia40 με ραδιενεργό υπόστρωμα .....	81
4.3.11 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry – ITC) .....	81
4.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ .....	82
4.4.1 Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη .....	82
4.4.2 Κατασκευή του στελέχους GalMia40.....	83
4.4.3 Πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας (Complementation test).....	83
<b>ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>84</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....</b>	<b>85</b>
<b>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΙΑ40.....</b>	<b>85</b>
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	85
5.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΜΙΑ40.....	85
5.3 <i>IN VITRO</i> ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΙΑ40 ΜΕ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	87
5.4 Η ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΚΥΣΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΜΟΤΙΒΟΥ CPC ΤΗΣ ΜΙΑ40. ....	89
5.5 Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΜΙΑ40 ΕΙΝΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΕ ΕΤΕΡΟΛΟΓΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΕΧΕΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΤΡΟΠΟ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΑΥΤΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ.....	94
5.6 ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΑ40. ....	98
5.7 Η ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΔΡΟΦΟΒΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΜΙΑ40. ...	101
5.8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	104
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....</b>	<b>110</b>
<b>Η ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ TIM ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΙΑ40 ΚΑΘΟΔΗΓΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΚΥΣΤΕΪΝΙΚΑ ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....</b>	<b>110</b>
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	110
6.2 Το Tim10 ΟΞΕΙΔΩΝΕΤΑΙ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΜΙΑ40. ....	110
6.3 Το Tim10 ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΙ ΠΑΡΟΔΙΚΑ ΜΙΚΤΑ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΑ ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΙΑ40 ΣΤΗΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ.....	113
6.4 Η ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΥ Tim10-ΜΙΑ40 ΔΕΝ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΔΙΣΘΕΝΗ ΚΑΤΙΟΝΤΑ .....	117
6.5 ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ Tim10 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	118
6.6 Η ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΗΝ ΜΙΑ40 ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚΟ ΚΥΣΤΕΪΝΙΚΟ ΚΑΤΑΛΟΙΠΟ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ Tim10.....	120
6.7 Η ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΙΑ40 ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΡΒΟΥΞΥΤΕΛΙΚΗ ΚΥΣΤΕΪΝΗ .....	123
6.8 Η ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚΗ ΚΥΣΤΕΪΝΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΕΙΝΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΗ ΣΤΑ ΜΙΚΡΑ TIM .....	126
6.9 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Cox17, ΕΝΑ CX9C ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΙΑ40. ....	127
6.10 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	132
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....</b>	<b>141</b>
<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΜΙΑ40. ....</b>	<b>141</b>
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	141
7.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ (ITS) ΓΙΑ ΤΟ Tim10. ....	142
7.3 ΤΟ ΣΙΝΙΑΛΟ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ITS ΕΙΝΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟ ΣΤΑ ΜΙΚΡΑ TIM .....	145
7.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΣΙΝΙΑΛΟ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ (ITS) ΤΟΥ Tim10. .	148

7.5 ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ITS ΜΕ ΤΗΝ ΜΙΑ40 .....	151
7.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ITS ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ COX17.....	155
7.7 Η ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΜΙΑ40 ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ITS ΔΕΝ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ. ....	157
7.8 ΤΟ ITS ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΜΙΑ40.....	158
7.9 ΤΟ ITS ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΜΗ-ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ. ....	159
7.10 Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΙΑ40 ΜΕΣΩ ΤΟΥ ITS ΚΑΘΟΔΗΓΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΥΔΡΟΒΟΦΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	161
7.11 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	165
<b>ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ .....</b>	<b>170</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>180</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....</b>	<b>197</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....</b>	<b>197</b>

## Πίνακας Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Στάδια οξειδοαναγωγής μεταξύ του υποστρώματος και της οξειδάσης. ....	6
<b>Εικόνα 2:</b> Περιγραφή των βασικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. ....	7
<b>Εικόνα 3:</b> Τα διαφορετικά οξειδοαναγωγικά μονοπάτια του κυττάρου. ....	9
<b>Εικόνα 4:</b> Το μονοπάτι οξείδωσης και ισομερίωσης στο περίπλασμα του βακτηρίου. ....	11
<b>Εικόνα 5:</b> Στάδια ανακύκλωσης της οξειδωτικής δράσης της DsbA. ....	15
<b>Εικόνα 6:</b> Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου DsbA-DsbB-UQ. ....	16
<b>Εικόνα 7:</b> Οξειδωτική δυναμικό του μονοπατιού οξείδωσης στο περίπλασμα. ....	17
<b>Εικόνα 8:</b> Μοντέλο δράσης ισομερίωσης υποστρωμάτων από την DsbC. ....	19
<b>Εικόνα 9:</b> Μονοπάτι ισομερίωσης στο περίπλασμα μέσω των πρωτεϊνών DsbC και DsbD. ....	20
<b>Εικόνα 10:</b> Οξειδωτικό δυναμικό του μονοπατιού ισομερίωσης στο περίπλασμα. ....	21
<b>Εικόνα 11:</b> Κρυσταλλική δομή της PDI. ....	25
<b>Εικόνα 12:</b> Σύγκριση κρυσταλλικών δομών της PDI, DsbC και DsbG. ....	26
<b>Εικόνα 13:</b> Οξειδοαναγωγικό μονοπάτι στο ενδοπλασματικό δίκτυο. ....	29
<b>Εικόνα 14:</b> Κρυσταλλική δομή της Ero1 από τον σακχαρομύκητα. ....	30
<b>Εικόνα 15:</b> Ρυθμιστικός έλεγχος της δράσης της Ero1. ....	31
<b>Εικόνα 16:</b> Μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο. ....	35
<b>Εικόνα 17:</b> Μονοπάτι εισόδου πρωτεϊνών που στοχεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο. ....	39
<b>Εικόνα 18:</b> Κρυσταλλική δομή του TIM10 συμπλόκου και των υπομονάδων Tim9, Tim10. ....	43
<b>Εικόνα 19:</b> Δομή της ανθρώπινης Cox17. ....	46
<b>Εικόνα 20:</b> Οργάνωση των κυστεϊνών στην Ern1, σύγκριση με την ομόλογη Ern2. ....	51
<b>Εικόνα 21:</b> Ευθυγράμμιση ομόλογων πρωτεϊνών της Mia40. ....	55
<b>Εικόνα 22:</b> Οξειδοαναγωγικό μονοπάτι στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. ....	57
<b>Εικόνα 23:</b> Ροή ηλεκτρονίων από την Ern1 στο οξυγόνο μέσω του κυτοχρώματος c. ....	58
<b>Εικόνα 24:</b> Θεωρητική σταθερά απόσβεσης $\epsilon$ για τις πρωτεΐνες Tim10 και Mia40. ....	80
<b>Εικόνα 25:</b> Στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης Mia40. ....	87
<b>Εικόνα 26:</b> Παγίδευση μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων μεταξύ Mia40 και υποστρώματος. ....	88
<b>Εικόνα 27:</b> <i>In vitro</i> ανασύσταση της αλληλεπίδρασης Mia40 με το Tim10 υπόστρωμα. ....	89
<b>Εικόνα 28:</b> Η δεύτερη κυστεΐνη του CPC μοτίβου είναι αναγκαία <i>in vitro</i> . ....	91
<b>Εικόνα 29:</b> Γενετική συμπληρωματικότητα μεταλλαγμάτων της Mia40 στο CPC μοτίβο. ....	92
<b>Εικόνα 31:</b> Η Mia40 SPC παγιδεύεται στην Ern1 στα μιτοχόνδρια. ....	94
<b>Εικόνα 32:</b> Ευθυγράμμιση ορθόλογων πρωτεϊνών της Mia40. ....	95
<b>Εικόνα 33:</b> Η MIA40 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Tim10. ....	97
<b>Εικόνα 34:</b> Η MIA40 σχηματίζει δισουλφιδικά ενδιάμεσα με COX17 και $\gamma$ Tim10 <i>in vitro</i> . ....	98
<b>Εικόνα 35:</b> Χαρακτηρισμός της δομής της MIA40 με NMR. ....	100
<b>Εικόνα 36:</b> Πίνακας μεταλλάξεων στην $\gamma$ Mia40 και αντιστοιχία αμινοξέων στην MIA40. ....	102
<b>Εικόνα 37:</b> <i>In vitro</i> έλεγχος αλληλεπίδρασης υδρόφοβων μεταλλαγμάτων με υποστρώματα. ....	103
<b>Εικόνα 38:</b> Γενετική συμπληρωματικότητα υδρόφοβων μεταλλαγμάτων της Mia40. ....	104
<b>Εικόνα 39:</b> Οξειδωτικό δυναμικό πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της Mia40. ....	106
<b>Εικόνα 40:</b> Μοντέλο οξείδωσης του υποστρώματος COX17 από την MIA40. ....	109
<b>Εικόνα 41:</b> Το υπόστρωμα Tim10 εισέρχεται στα μιτοχόνδρια μόνο σε ανηγμένη κατάσταση. ....	112
<b>Εικόνα 42:</b> Το υπόστρωμα Tim10 οξειδώνεται στα μιτοχόνδρια. ....	112
<b>Εικόνα 43:</b> Η είσοδος Tim10 στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την παρουσία Mia40. ....	113
<b>Εικόνα 44:</b> Το Tim10 υπόστρωμα σχηματίζει μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα στο μιτοχόνδριο. ....	115
<b>Εικόνα 45:</b> Η πρωτεΐνη Tim10 αλληλεπιδρά ομοιοπολικά με την Mia40 <i>in organello</i> . ....	116
<b>Εικόνα 46:</b> Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της Mia40 και του Tim10 σχηματίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. ....	117
<b>Εικόνα 47:</b> Ο σχηματισμός του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ Mia40 και Tim10 δεν επηρεάζεται από χηλικό παράγοντα. ....	118
<b>Εικόνα 48:</b> Στάδια εισόδου Tim10 στα μιτοχόνδρια. ....	119
<b>Εικόνα 49:</b> Σχηματική απεικόνιση της συνδεσιμότητας των κυστεϊνών της Tim10. ....	121
<b>Εικόνα 50:</b> Διαφορετικές απαιτήσεις κυστεϊνών του Tim10 για την πρόσδεση στην Mia40. ....	122
<b>Εικόνα 51:</b> Η αλληλεπίδραση του Tim10 με την Mia40 εξαρτάται από την πρώτη κυστεΐνη. ....	123
<b>Εικόνα 52:</b> Η απελευθέρωση του Tim10 από Mia40 εξαρτάται από την καρβοξυτελική κυστεΐνη. ....	124
<b>Εικόνα 53:</b> Ποσοτική μέτρηση του μονομερούς και δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ της Mia40 και νέο-εισερχόμενων μεταλλαγμάτων της Tim10. ....	124
<b>Εικόνα 54:</b> Τα κυστεϊνικά μεταλλάγματα του Tim10 παγιδεύονται σε 140 kDa σύμπλοκο. ....	125



<b>Εικόνα 55:</b> Η πρόσδεση του Tim9 στην Mia40 εξαρτάται από την αμινοτελική κυστεΐνη.....	126
<b>Εικόνα 56:</b> Η πρόσδεση του Tim12 στην Mia40 εξαρτάται από την αμινοτελική κυστεΐνη.....	127
<b>Εικόνα 57:</b> Σχηματική απεικόνιση της συνδεσιμότητας των κυστεϊνών στην πρωτεΐνη Cox17.....	128
<b>Εικόνα 58:</b> Η Cox17 σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο και οξειδώνεται <i>in organello</i> .....	129
<b>Εικόνα 59:</b> Η πρωτεΐνη Cox17 σχηματίζει δισουλφιδικά ενδιάμεσα με την Mia40 <i>in organello</i> .....	130
<b>Εικόνα 60:</b> Η εσωτερική κυστεΐνη 3 του Cox17 είναι κυστεΐνη πρόσδεσης στην Mia40.....	131
<b>Εικόνα 61:</b> Μοντέλο οξείδωσης των Tim υποστρώματων από την Mia40.....	138
<b>Εικόνα 62:</b> Κατασκευή ελλείψεων στην πρωτεΐνη Tim10.....	142
<b>Εικόνα 63:</b> Το υπόστρωμα ΔN39Tim10 δεν αλληλεπιδρά ομοιοπολικά με την Mia40 <i>in vitro</i> .....	143
<b>Εικόνα 64:</b> Το υπόστρωμα ΔN39Tim10 δεν αλληλεπιδρά με την Mia40 <i>in vivo</i> .....	144
<b>Εικόνα 65:</b> Κατασκευές ελλείψεων στα υποστρώματα Tim9 και Tim12.....	145
<b>Εικόνα 66:</b> Το Tim12 ITS είναι απαραίτητο για την ομοιοπολική πρόσδεση στην Mia40 <i>in vivo</i> .....	147
<b>Εικόνα 67:</b> Το ITS του Tim12 είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο.....	148
<b>Εικόνα 68:</b> Μετατροπή του ITS σε αλανίνες επηρεάζει την πρόσδεση στην Mia40 <i>in organello</i> .....	149
<b>Εικόνα 69:</b> Τα υδρόφοβα αμινοξέα στο ITS είναι σημαντικά για την πρόσδεση στην Mia40.....	150
<b>Εικόνα 70:</b> Ευθυγράμμιση μικρών Tim και προσδιορισμός του γενικότερου σινιάλου ITS.....	151
<b>Εικόνα 71:</b> Απεικόνιση α-έλικας του ITS στην Tim9, Tim10 και Tim12.....	152
<b>Εικόνα 72:</b> Θεωρητικό μοντέλο πρόσδεσης του ITS των Tim9 και Tim10 στην Mia40.....	153
<b>Εικόνα 73:</b> Το ITS πρέπει να βρίσκεται σε δομή α-έλικας για να προσδεθεί στην Mia40.....	154
<b>Εικόνα 74:</b> Ευθυγράμμιση των ομόλογων πρωτεϊνών στην Cox17 και προσδιορισμός του ITS.....	155
<b>Εικόνα 75:</b> Τα υδρόφοβα αμινοξέα στο ITS του Cox17 επηρεάζουν την πρόσδεση στην Mia40.....	156
<b>Εικόνα 76:</b> Τοποθέτηση του σινιάλου ITS στην καρβοξυτελική περιοχή του υποστρώματος δεν επηρεάζει την στόχευση στο μονοπάτι της Mia40.....	158
<b>Εικόνα 77:</b> Η πρωτεΐνη Sue μετατρέπεται σε υπόστρωμα της Mia40 με την προσθήκη του ITS.....	159
<b>Εικόνα 78:</b> Το μη-μιτοχονδριακό υπόστρωμα DHFR εισέρχεται στα μιτοχόνδρια παρουσία ITS.....	160
<b>Εικόνα 79:</b> Η πρωτεΐνη YFP εισέρχεται στα μιτοχόνδρια παρουσία ITS.....	161
<b>Εικόνα 80:</b> <i>In vitro</i> μη-ομοιοπολική πρόσδεση του Tim10 στην Mia40.....	163
<b>Εικόνα 81:</b> Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης μεταξύ Tim10 και Mia40 SPS.....	164

## Συντομογραφίες

<b>ΔG</b> .....	Gibbs free energy difference – Μεταβολή στη ελεύθερη ενέργεια Gibbs
<b>AAC</b> .....	ADT/ATP Carrier – Μεταφορέας του ADT και του ATP
<b>ADP</b> .....	Adenosine di phosphate - 5' Διφωσφορική αδενοσίνη
<b>ALR</b> .....	Augmenter of liver regeneration
<b>ATP</b> .....	Adenosine tri phosphate - 5' Τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>BB</b> .....	Breaking Buffer
<b>BSA</b> .....	Bovine Serum Albumin
<b>COX</b> .....	Cytochrome Oxidase – κυτοχρωμική οξειδάση
<b>DHFR</b> .....	Dihydrofolate Reductase
<b>DMSO</b> .....	Dimethyl sulfoxide – διμέθυλ σουλφοξείδιο
<b>DNA</b> .....	Deoxyribose Nucleic Acid - Δεοξυριβοζονουκελεϊκό οξύ
<b>DTT</b> .....	Dithiothreitol - διθειοθρεϊτόλη
<b>FAD</b> .....	Flavin Adenine Dinucleotide – φλάβινο αδένινο δινουκλεοτίδιο
<b>GST</b> .....	Glutathione S-Transferase
<b>HEPES</b> .....	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>IMS</b> .....	Intermembrane space – Διαμεμβρανικός χώρος
<b>ITC</b> .....	Isothermal Titration Calorimetry – Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης
<b>ITS</b> .....	Intermembrane space Targeting Signal – Σήμα στόχευσης στο IMS
<b>K<sub>d</sub></b> .....	Dissociation Constant – Σταθερά αποδιάταξης
<b>Mia40</b> .....	Mitochondrial Import and Assembly
<b>γMia40</b> .....	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mia40
<b>MIA40</b> .....	<i>Homo sapiens</i> Mia40
<b>MPP</b> .....	Matrix Presequence Peptidase
<b>NADH</b> .....	Nicotinamide Adenine Dinucleotide – νικοτινοαμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο
<b>NMR</b> .....	Nuclear Magnetic Resonance - πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
<b>PAGE</b> .....	Polyacrylamide Gel Electrophoresis – Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου
<b>PAM</b> .....	Presequence translocase Associated Motor complex
<b>PCR</b> .....	Polymerase Chain Reaction – αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PK</b> .....	Proteinase K – Πρωτεϊνάση K
<b>PMSF</b> .....	PhenylMethaneSulphonylFluoride
<b>SAM</b> .....	Sorting and Assembly Machinery
<b>SDS</b> .....	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>Su e</b> .....	Subunit e of the ATP synthase
<b>Su9</b> .....	Subunit 9 of the ATP synthase
<b>TCA</b> .....	TriChloroAcetic Acid – Τριχλωροοξικό οξύ
<b>TCEP</b> .....	tris(2-carboxyethyl)phosphine
<b>TIM</b> .....	Translocase of the Inner Membrane – Μεταθετάση της εσωτερικής μεμβράνης
<b>TOB</b> .....	Topogenesis of Outer membrane beta-Barrel
<b>TOM</b> .....	Translocase of the Outer Membrane – Μεταθετάση της εξωτερικής μεμβράνης
<b>Tris</b> .....	tris(hydroxymethyl)aminomethane
<b>WT</b> .....	Wild Type – αγρίου τύπου
<b>NEM</b> .....	N-ethyl maleimide
<b>DDM</b> .....	dodecyl maltoside (ήπιο απορρυπαντικό)

## Περίληψη

Στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων εντοπίζεται ένας πρόσφατα αναγνωρισμένος μηχανισμός που προάγει την οξειδωτική αναδίπλωση νέο-εισερχόμενων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Το οξειδωτικό μονοπάτι αποτελείται από τον οξειδοαναγωγικά ελεγχόμενο υποδοχέα Mia40 και την σουλφυδριλοξειδάση Ern1. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται στον διαμεμβρανικό χώρο παγιδεύονται σε αυτόν με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει κίνηση ηλεκτρονίων από το νέο-εισερχόμενο υπόστρωμα, στην Mia40, από εκεί στην Ern1 και τελικά στο οξυγόνο μέσω του κυτοχρώματος c. Η ανταλλαγή δισουλφιδικών δεσμών είναι ζωτικής σημασίας για την είσοδο και αναδίπλωση των πρωτεϊνών στον διαμεμβρανικό χώρο.

Σε αυτή την μελέτη στοχεύουμε στην διερεύνηση των μηχανιστικών παραμέτρων που ορίζουν την αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων με την οξειδάση του διαμεμβρανικού χώρου Mia40. Με βιοχημικά πειράματα δείχνουμε ότι η οξείδωση των υποστρωμάτων εξαρτάται από το αμινοτελικό CPC μοτίβο της Mia40. Παράλληλα χαρακτηρίζουμε δομικά την πρωτεΐνη και εντοπίζουμε μια υδρόφοβη κοιλότητα σε γειτνίαση με το καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης που δρα ως περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος. Επιπλέον με την δημιουργία σημειακών μεταλλαγών στα υποστρώματα αποκαλύπτουμε ότι ανάλογα με το υπόστρωμα υπάρχει μια κυστεΐνη που είναι υπεύθυνη για την δισουλφιδική πρόσδεση στην Mia40. Τέλος προσδιορίζουμε την αλληλουχία που καθοδηγεί το υπόστρωμα στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και συγκεκριμένα στο καταλυτικό κέντρο της Mia40 μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης στοιχειοθετούν ένα σημαντικό πλαίσιο για την περαιτέρω διερεύνηση του μοριακού οξειδωτικού μηχανισμού στα μιτοχόνδρια.

## Abstract

The intermembrane space of mitochondria (IMS) harbours a dedicated machinery that promotes the oxidative folding of substrate proteins. The newly identified oxidative pathway consists of the redox-regulated receptor Mia40 and the sulfhydryl oxidase Erv1. Precursors destined to the IMS are trapped by a disulfide relay mechanism which involves an electron cascade from the incoming substrate to Mia40, then on to Erv1 and finally to molecular oxygen via cytochrome c. This thiol-disulfide exchange mechanism is essential for the import and oxidative folding of the incoming cysteine-rich proteins.

In this work we aim to elucidate the mechanistic parameters that define the interaction between the substrate and the oxidase Mia40. Biochemical analysis reveals a general mechanism whereby Mia40 transfers oxidising equivalents to the substrates via an N-terminal CPC motif. Structural analysis uncovered a hydrophobic cleft in the vicinity of the active site of Mia40 that is used as a substrate binding domain. Furthermore, *in organello* import experiments have revealed a site-specific mechanism for the cysteine dependent interaction of Mia40 with the incoming substrate. A unique cysteine is responsible for docking the protein onto Mia40 that differs depending on the substrate. We further identify the signal responsible for targeting the precursors to the IMS. Finally we show that this signal directs the docking cysteine of the substrate in the vicinity of the catalytic center of Mia40 via hydrophobic interactions. The present results are an important step towards revealing the full molecular details underlying the oxidative protein folding pathway in mitochondria.

## **ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1. Ο ρόλος των δισουλφιδικών δεσμών στην πρωτεϊνική αναδίπλωση

### 1.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες συντίθενται στο κύτταρο ως γραμμικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες στα ριβοσώματα. Στην συνέχεια αναδιπλώνονται σε τρισδιάστατες δομές που καθορίζονται από την αλληλουχία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι μηχανισμοί που συντονίζουν την σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση επιτρέπει στις πρωτεΐνες να εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες σε όλες τις βιολογικές διεργασίες. Η πληροφορία που καθορίζει την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη και εξαρτώμενη από την πρωτοταγή της δομή, από την αλληλουχία δηλαδή των αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα που είναι και μοναδική σε κάθε πρωτεΐνη.

Στο βασικό σύνολο των αμινοξέων περιλαμβάνεται και η κυστεΐνη η οποία υπόκειται σε ομοιοπολικές τροποποιήσεις. Οι κυστεΐνες είναι από τα πιο σπάνια αμινοξέα που απαντώνται στις πρωτεΐνες. Όταν είναι συντηρημένες συχνά είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην δομική σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Το τελευταίο είναι άμεσο αποτέλεσμα της πλευρικής θειολικής ομάδας που περιέχουν η οποία μπορεί να συμμετέχει στον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών ή στην πρόσδεση μετάλλων. Πολλές φορές η δραστηριότητα της θειολικής ομάδας καθιστά την κυστεΐνη ως το ενεργό οξειδοαναγωγικό κέντρο μιας πρωτεΐνης και έτσι σε πολλές περιπτώσεις η ενζυμική δράση μιας πρωτεΐνης ελέγχεται από την οξειδωτική κατάσταση των κυστεϊνών. Αυτού του είδους οι πρωτεΐνες μπορούν και προσαρμόζουν την λειτουργία τους ανάλογα με τις οξειδοαναγωγικές διακυμάνσεις του κυττάρου.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλυθεί ο κεντρικός ρόλος των δισουλφιδικών δεσμών στην πρωτεϊνική αναδίπλωση καθώς και οι βασικές αρχές οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων

ως βάση μελέτης των οξειδοαναγωγικών συστημάτων που έχουν αναπτυχθεί στο κύτταρο. Στην συνέχεια θα εστιάσουμε στο οξειδωτικό μονοπάτι αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων που αποτελεί και το βασικό αντικείμενο έρευνας αυτής της διδακτορικής διατριβής.

## 1.2 Ιδιότητες των δισουλφιδικών δεσμών

Ο δισουλφιδικός δεσμός αποτελεί την ομοιοπολική διασύνδεση ενός ζεύγους καταλοίπων κυστεΐνης. Απαντάται σε πολλές εκκρινόμενες πρωτεΐνες και σε συγκεκριμένα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, ενώ στο κυτταρόπλασμα συνήθως απουσιάζουν. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί αποτελούν μια μετα-μεταγραφική ομοιοπολική τροποποίηση που συμβαίνει στην διάρκεια της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών χρειάζεται όχι μόνο για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης αλλά επιπλέον και για την δομική σταθερότητα η οποία κατ'επέκταση επηρεάζει την λειτουργία της. Πρωτοπόρος στην μελέτη του ρόλου των δισουλφιδικών δεσμών στην αναδίπλωση πρωτεϊνών ήταν ο Anfinsen το 1961 (Anfinsen et al., 1961). Συγκεκριμένα ο Anfinsen έδειξε *in vitro* ότι η αποδιαταγμένη και ανηγμένη ριβονουκλεάση Α μπορεί να αναδιπλωθεί σε μια ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη μόνο παρουσία ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών. Κατέληξε στο ότι τα φυσικά δισουλφιδικά ζεύγη της ριβονουκλεάσης συμβάλλουν στην σταθεροποίηση της θερμοδυναμικά προτιμώμενης δομής .

Αντίστοιχα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και με άλλα υποστρώματα όπως η BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor) όπου και σε αυτή την περίπτωση φάνηκε ότι το στάδιο καθορισμού της ταχύτητας της αντίδρασης στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης αποτελεί ο σχηματισμός δύο ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών (Creighton, 1988; Creighton et al., 1993; Ma and Anderson, 1997; Weissman and Kim, 1991; Weissman

and Kim, 1995). Μετέπειτα μελέτες επιπλέον έδειξαν ότι η αδυναμία σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και σε αποικοδόμηση από κυτταρικές πρωτεάσες. Για παράδειγμα στην περίπτωση που δεν σχηματιστούν δυο ενδομοριακές δισουλφιδικές γέφυρες στην αλκαλική φωσφατάση, ένα από τα πρώτα υποστρώματα οξειδωσης που βρέθηκαν στο περίπλασμα του βακτηρίου, αυτή πρωτεολύεται (Bardwell et al., 1991).

Είναι λοιπόν αποδεκτό πλέον ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί σταθεροποιούν την δομή μιας πρωτεΐνης μειώνοντας την εντροπία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ευνοώντας έτσι την αναδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης (Wedemeyer et al., 2000);(Staley and Kim, 1990; Thornton, 1981). Σύμφωνα με θεωρητικές μελέτες η αύξηση στην δομική σταθερότητα λόγω κάποιου δισουλφιδικού δεσμού είναι ανάλογη με τον αριθμό των αμινοξέων μεταξύ των εμπλεκόμενων κυστεϊνών (Pace et al., 1988). Επιπλέον η ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών κοντά στον πυρήνα αναδίπλωσης μιας πρωτεΐνης επιταχύνει την αναδίπλωση, ενώ σε αντίθετη περίπτωση δύναται να επιβραδυνθεί η αναδίπλωση δυο και τρεις τάξεις μεγέθους (Abkevich and Shakhnovich, 2000).

Γενικά λοιπόν οι περισσότεροι δισουλφιδικοί δεσμοί σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες και επηρεάζουν τον ρυθμό της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Ωστόσο υπάρχει άλλη μια κατηγορία δισουλφιδικών δεσμών που έχει λειτουργικό ρόλο. Οι λειτουργικοί δισουλφιδικοί δεσμοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε καταλυτικά και αλλοστερικά δισουλφίδια (Hogg, 2003; Schmidt et al., 2006). Τα καταλυτικά δισουλφίδια αποτελούν το ενεργό κέντρο (active site) ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς διθειόλης-δισουλφιδίου (οξειδοαναγωγάσες) σε υποστρώματα έτσι ώστε να σχηματιστεί, αναχθεί ή ισομεριωθεί ένας δισουλφιδικός δεσμός. Τα αλλοστερικά δισουλφίδια ρυθμίζουν την λειτουργία μιας πρωτεΐνης με μη-ενζυματικό τρόπο προκαλώντας αλλαγές στην δομή της πρωτεΐνης.

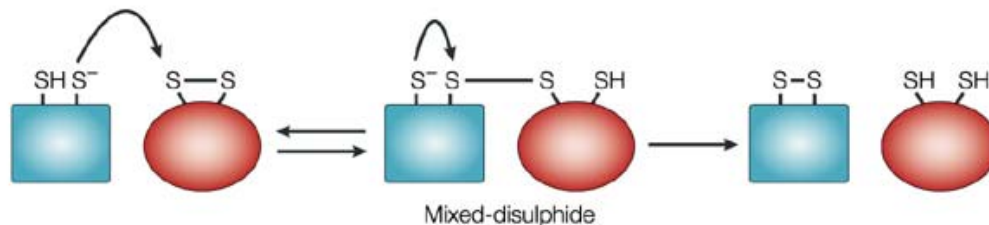


Ο σχηματισμός ενός δισουλφιδικού δεσμού από δύο σουλφυδριλομάδες οδηγεί στην απελευθέρωση δύο ηλεκτρονίων και έτσι για να ολοκληρωθεί η αντίδραση χρειάζεται ένας δέκτης ηλεκτρονίων. *In vitro* οι δισουλφιδικοί δεσμοί μπορούν να δημιουργηθούν αυθόρμητα μιας και τον ρόλο του δέκτη ηλεκτρονίων παίζει το οξυγόνο. Ωστόσο αυτού του είδους αυθόρμητες, τυχαίες οξειδώσεις έχουν πολύ αργή κινητική και ως εκ τούτου δεν μπορούν να υφίστανται στο κύτταρο όπου απαιτούνται ταχύτατες αντιδράσεις (Narayan et al., 2000; Weissman and Kim, 1993). Αυτή η διαπίστωση οδήγησε στην ανακάλυψη της PDI, (protein disulfide isomerase), της πρώτης κυτταρικής οξειδάσης από το εργαστήριο του Anfinsen (Anfinsen and Haber, 1961). Φαίνεται λοιπόν πως στο κύτταρο υπάρχουν πολύπλοκα και εξειδικευμένα συστήματα που είναι υπεύθυνα για την μεθοδική εισαγωγή αλλά και αφαίρεση δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες υποστρώματα. Όπως θα μελετήσουμε στην επόμενη ενότητα, υπάρχουν μυριάδες οξειδοαναγωγικά δίκτυα ‘καλωδιωμένα’ από συγκεκριμένες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Αρχικά όμως θα εξετάσουμε τον τρόπο με τον οποίο εισάγονται δισουλφιδικοί δεσμοί στα υποστρώματα και τους παράγοντες που επηρεάζουν την δημιουργία αυτών.

### 1.3 Δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών

Η οξείδωση και αναγωγή είναι θεμελιώδεις αντιδράσεις οι οποίες συμβαίνουν ταυτόχρονα για δύο μόρια. Αναλυτικότερα τα στάδια ολοκλήρωσης μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης μεταξύ του υποστρώματος και της οξειδάσης φαίνονται στην εικόνα 1. Η αντίδραση ξεκινάει όταν ένα θειολικό ανιόν ( $S^-$ ) του υποστρώματος, το οποίο προέκυψε από αποπρωτονίωση ελεύθερης σουλφυδριλομάδας (SH), προσβάλλει πυρηνόφιλα τον δισουλφιδικό δεσμό της οξειδάσης (εικόνα 1, στάδιο 1). Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα παροδικό

(transient) μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο (mixed disulfide intermediate) μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (εικόνα 1, στάδιο 2). Αυτό το μικτό ενδιάμεσο μπορεί να προσβληθεί από το δεύτερο θειολικό ανιόν του υποστρώματος απελευθερώνοντας έτσι το υπόστρωμα σε μια οξειδωμένη κατάσταση με την ταυτόχρονη αναγωγή της οξειδάσης (εικόνα 1, στάδιο 3). Αντίστοιχα δισουλφιδικοί δεσμοί μπορούν να δημιουργηθούν ενδομοριακά μιας πρωτεΐνης όπου το θειολικό ανιόν θα προσβάλλει έναν ήδη υφιστάμενο δισουλφιδικό δεσμό της ίδιας πρωτεΐνης. Αυτή η διαδικασία, που οδηγεί σε ενδομοριακή ανακατανομή των δισουλφιδικών δεσμών, ονομάζεται δισουλφιδικός ανασχηματισμός (disulfide reshuffling).

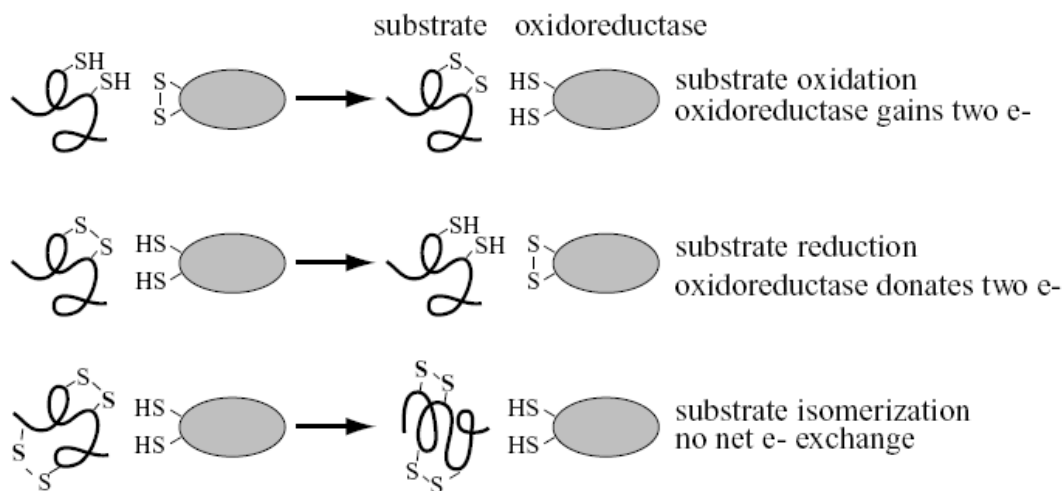


**Εικόνα 1: Στάδια οξειδοαναγωγής μεταξύ του υποστρώματος και της οξειδάσης.**

Περιγραφή μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης μεταξύ του υποστρώματος (μπλε) και της οξειδάσης (κόκκινο) που πραγματοποιείται σε τρία στάδια (Sevier and Kaiser, 2002).

Ένζυμα του κυττάρου που ονομάζονται οξειδοαναγωγάσες μπορούν να καταλύσουν την οξείδωση, αναγωγή ή ισομερίωση μιας πρωτεΐνης ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση στην οποία βρίσκεται το ενεργό τους κέντρο (εικόνα 2). Όταν το ενεργό κέντρο είναι οξειδωμένο (μορφή δισουλφιδίου) τότε καταλύει οξειδωτικές αντιδράσεις. Στην περίπτωση που είναι ανηγμένο (μορφή σουλφυδριλομάδας) τότε μπορεί να καταλύσει είτε την αναγωγή είτε την ισομερίωση λανθασμένων δισουλφιδικών συνδέσεων στο υπόστρωμα δρώντας ως αναγωγάση ή ισομεράση αντίστοιχα. Συγκεκριμένα για την διαδικασία της ισομερίωσης έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί, ο ενδομοριακός μηχανισμός ανακατανομής δισουλφιδίων και ο μηχανισμός αναγωγής-οξείδωσης. Στην πρώτη περίπτωση ανακατανέμονται

ενδομοριακά οι δισουλφιδικές γέφυρες μέσω ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου μεταξύ του υποστρώματος και της οξειδοαναγωγής. Στην δεύτερη περίπτωση οι λανθασμένες δισουλφιδικές συνδέσεις του υποστρώματος ανάγονται με την δράση μιας αναγωγής και το υπόστρωμα υπόκειται σε καινούριο κύκλο οξείδωσης από άλλο ένζυμο. Οι κύκλοι επαναλαμβάνονται μέχρι να σχηματιστούν οι σωστοί δισουλφιδικοί δεσμοί στο υπόστρωμα.



**Εικόνα 2: Περιγραφή των βασικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων.**

Πάνω: οξείδωση, μέση: αναγωγή, κάτω: ισομερίωση (Sevier and Kaiser, 2006a).

Η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών επηρεάζεται από τέσσερις παράγοντες. Από την συγκέντρωση του θειολικού ανιόντος, και από το πόσο ευπρόσιτες, εγγύς και δραστικές είναι οι θειολικές ομάδες και οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Όπως είπαμε και στην προηγούμενη παράγραφο κατά την διάρκεια μιας δισουλφιδικής ανταλλαγής ένα ιονισμένο θειολικό ανιόν ( $S^-$ ) προσβάλλει πυρηνόφιλα ένα άτομο θείου ενός δισουλφιδικού δεσμού. Η πρωτονιομένη SH σουλφυδριλομάδα είναι ανενεργή ενώ μόνο το θειολικό ανιόν μπορεί να ξεκινήσει την αντίδραση. Η συγκέντρωση του θειολικού ανιόντος έναντι της σουλφυδριλομάδας καθορίζει την οξειδοαναγωγική αντίδραση, ενώ οι πληθυσμοί των δύο επηρεάζονται από το pH του διαλύματος (Scheraga et al., 2001; Wedemeyer et al., 2002).

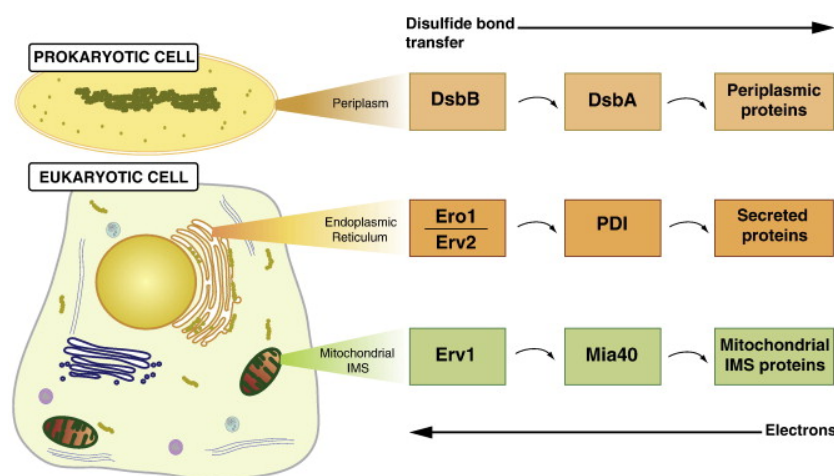
Για κάθε μονάδα που πέφτει το pH έναντι της pKa, μειώνεται 10 φορές η δραστηριότητα του θειολικού ανιόντος. Για τις κυστεΐνες pKa ορίζουμε ως το pH στο οποίο 50% αυτών είναι ιονισμένες. Η συνήθης τιμή της pKa των κυστεϊνών σε αποδιαταγμένες πρωτεΐνες είναι περίπου 8.7. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την γρήγορη οξειδωτική αντίδραση σε διαλύματα όπου το pH είναι μεγαλύτερο του 9 και αντίστοιχα αργότερες αντιδράσεις σε χαμηλότερες τιμές. Αυτή η πληροφορία αξιοποιείται συχνά σε *in vitro* πειράματα όπου χρειάζεται να παγιδευτούν μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα μεταξύ οξειδάσης και υποστρώματος. *In vivo* όμως το περιβάλλον του κυττάρου δεν επιτρέπει μεγάλες διακυμάνσεις στο pH γεγονός που επηρεάζει την ταχύτητα των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Μειώνοντας την pKa των κυστεϊνών οι οργανισμοί ξεπερνούν αυτόν τον περιορισμό, έτσι ώστε οι θειολικές ομάδες να παραμένουν ιονισμένες και δραστικές σε φυσιολογικές τιμές pH και να μην επηρεάζεται το ηλεκτροστατικό περιβάλλον της ενεργής ομάδας (Arolas et al., 2006; Wedemeyer et al., 2000).

Η ανταλλαγή δισουλφιδικών δεσμών μπορεί να προκύψει μόνο όταν το θειολικό ανιόν έρθει σε εγγύτητα με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Έτσι λοιπόν για να πραγματοποιηθεί μια οξειδοαναγωγική αντίδραση θα πρέπει οι ενεργές ομάδες να είναι εκτεθειμένες στην τεταρτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης. Τέλος η ταχύτητα σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών αντικατοπτρίζεται και στην εγγύτητα των ενεργών ομάδων. Συμπερασματικά φαίνεται ότι η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών σε μια πρωτεΐνη επηρεάζεται από πολλαπλούς παράγοντες και δεν είναι μια απλή χημική αντίδραση.

## 2. Οξειδωτικοί μηχανισμοί στο κύτταρο

### 2.1 Εισαγωγή

Η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών ευνοείται όταν πραγματοποιείται σε οξειδωτικό περιβάλλον. Στο κύτταρο έχουν αναπτυχθεί ειδικευμένα συστήματα που εκτελούν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις σε συγκεκριμένα ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Συγκεκριμένα οξειδοαναγωγικά μονοπάτια έχουν βρεθεί στο περίπλασμα των βακτηρίων, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και πρόσφατα στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά φαίνεται να έχουν αρκετές μηχανιστικές ομοιότητες και εμπλέκονται στην οξείδωση, αναγωγή και ισομερίωση των υποστρωμάτων (εικόνα 3). Σε αυτή την ενότητα θα περιγράψουμε τις θεμελιώδεις αρχές που διέπουν τα οξειδοαναγωγικά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί στο περίπλασμα των βακτηρίων και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων ως βάση ανάλυσης των μηχανισμών οξείδωσης στο μιτοχόνδριο. Η μηχανιστική μελέτη του τρόπου οξείδωσης των υποστρωμάτων στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.



**Εικόνα 3: Τα διαφορετικά οξειδοαναγωγικά μονοπάτια του κυττάρου.**

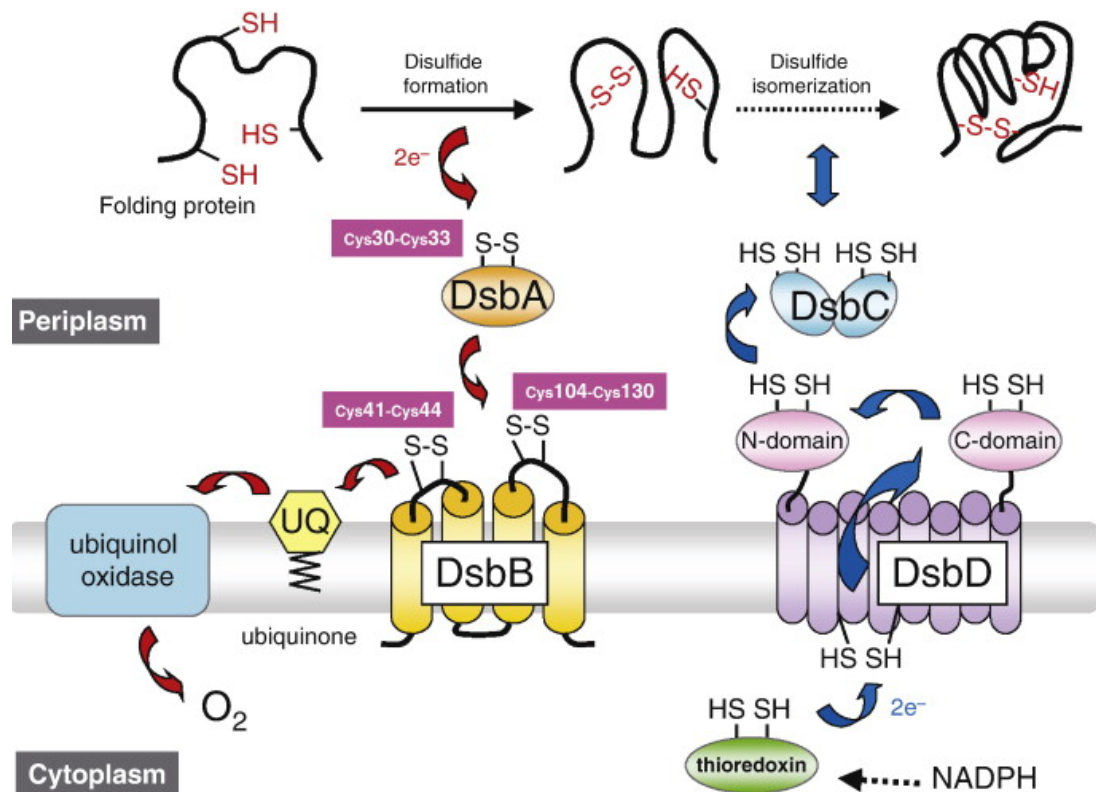
Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι οξείδωσης του περιπλάσματος, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και στα μιτοχόνδρια (Stojanovski et al., 2008b).

## 2.2 Κατάλυση δισουλφιδικών δεσμών στο περίπλασμα βακτηρίων

Στα αρχικά *in vitro* πειράματα του Anfinsen το 1961 βρέθηκε ότι η τυχαία οξείδωση πρωτεϊνών μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία μόνο οξυγόνου. Παράλληλα χαρακτήρισε για πρώτη φορά το ένζυμο PDI και έδειξε ότι επιταχύνει την οξείδωση και ισομερίωση των υποστρωμάτων (Goldberger et al., 1963). Περίπου τρεις δεκαετίες μετά βρέθηκαν αδιάσειστα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών πρέπει να καταλύεται *in vivo*. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *dsbA* οδηγούν σε συσσώρευση ανηγμένων πρωτεϊνών στο περίπλασμα του βακτηρίου *E.coli* (Bardwell et al., 1991). Στο περίπλασμα του βακτηρίου *E.coli* έχει υπολογιστεί ότι τουλάχιστον 300 διαφορετικές πρωτεΐνες περιέχουν δύο ή περισσότερες κυστεΐνες (McCarthy et al., 2000). Δεν αποτελεί λοιπόν έκπληξη το γεγονός ότι απουσία του γονιδίου *dsbA* οδηγεί σε πλειοτροπικές επιπτώσεις. Ειδικότερα στο *dsbA*<sup>-</sup> στέλεχος παρατηρείται υπερευαισθησία στο DTT και στα μέταλλα και επιπλέον συσσωρεύονται αποδιαταγμένες πρωτεΐνες όπως η OmpA (πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης), η αλκαλική φωσφατάση (περιπλασματική πρωτεΐνη), και η Flg1 (πρωτεΐνη μαστιγίου) (Dailey and Berg, 1993; Kamitani et al., 1992; Missiakas et al., 1993; Stafford et al., 1999).

Στο βακτήριο *E.coli* η εισαγωγή δισουλφιδικών δεσμών πραγματοποιείται από τις Dsb πρωτεΐνες (disulfide bond). Το βακτηριακό οξειδοαναγωγικό σύστημα απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες DsbA και DsbB που εμπλέκονται στον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στα υποστρώματα και επιπλέον από τις DsbC και DsbD που εμπλέκονται στην ισομερίωση των υποστρωμάτων (εικόνα 4). Μετά την ανακάλυψη της DsbA το 1991 (Bardwell et al., 1991; Kamitani et al., 1992), ο μηχανισμός εισαγωγής δισουλφιδικών δεσμών και ισομερίωσης στο περίπλασμα έχει γίνει ένα

από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα πειραματικά συστήματα. Στις επόμενες υποενότητες θα αναλυθεί ο μηχανιστικό τρόπος δράσης των Dsb πρωτεϊνών καθώς και η συντονισμένη λειτουργία όλων των υπομονάδων για την οξείδωση των υποστρωμάτων.



**Εικόνα 4: Το μονοπάτι οξείδωσης και ισομερίωσης στο περίπλασμα του βακτηρίου.**

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στα υποστρώματα εισάγονται από την DsbA και ισομεριώνονται από την DsbC. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν την ροή των ηλεκτρονίων στο μονοπάτι DsbB–DsbA και τα μπλε βέλη δείχνουν την ροή των ηλεκτρονίων στο μονοπάτι ισομερίωσης DsbD–DsbC (Inaba and Ito, 2008).

### 2.2.1 Εισαγωγή δισουλφιδικών δεσμών στο περίπλασμα από την DsbA

Πλέον είναι καθιερωμένο ότι η DsbA είναι ο άμεσος δότης δισουλφιδικών δεσμών στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες του περιπλάσματος στα βακτήρια. Είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη 21 kDa και αποτελείται από το τυπικό μοτίβο αναδίπλωσης θειορεδοξίνης στο οποίο είναι τοποθετημένο το ενεργό CXXC καταλυτικό της κέντρο

αποτελούμενο από τις κυστεΐνες 30 και 33 αντίστοιχα (εικόνα 4) (Martin et al., 1993). Οι κυστεΐνες του καταλυτικού κέντρου της DsbA βρίσκονται οξειδωμένες *in vivo* (Kishigami et al., 1995a). Γενικότερα οι δισουλφιδικοί δεσμοί σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες. Παραδόξως η οξειδωμένη DsbA είναι δομικά λιγότερο σταθερή σε σχέση με την ανηγμένη (Guddat et al., 1998; Zapun et al., 1993). Η έλλειψη σταθερότητας της οξειδωμένης μορφής αλλά και του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με το υπόστρωμα, αποτελεί θερμοδυναμικά μια οδηγήτρια δύναμη για την μεταφορά του δισουλφιδικού δεσμού από την DsbA στο υπόστρωμα.

Το ενεργό κέντρο της DsbA έχει τη μεγαλύτερη οξειδωτική ικανότητα  $-120$  mV που έχει περιγραφεί ανάμεσα στις ως τώρα γνωστές οξειδοαναγωγάσες (Zapun et al., 1993). Αντίθετα η θειορεδοξίνη που δρα ως αναγωγάση έχει ισχυρή αναγωγική ικανότητα που αντικατοπτρίζεται στα  $-270$  mV. Η ισχυρή οξειδωτική δράση της DsbA αντικατοπτρίζεται και στην πολύ χαμηλή pKa που έχει η ενεργή κυστεΐνη C30 του καταλυτικού CXXC κέντρου. Συγκεκριμένα η C30 έχει τιμή pKa  $\sim 3$  σε αντιδιαστολή με την συνήθη τιμή που απαντάται στις κυστεΐνες που είναι περίπου 9 (Grauschopf et al., 1995). Με αυτόν τον τρόπο η C30 σε φυσιολογικό pH διατηρείται σχεδόν εξολοκλήρου στην μορφή θειολικού ανιόντος. Πράγματι λόγω της ισχυρής οξειδωτικής ικανότητας της DsbA ακόμα δεν έχουν παγιδευτεί υποστρώματα κατά την διάρκεια οξείδωσης τους *in vivo*. Σε μια μελέτη κατάφεραν να απομονώσουν μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα με την DsbA αλλά και να ταυτοποιήσουν τα υποστρώματα της πραγματοποιώντας μεταλλαξιγένεση στην προλίνη P151 (Kadokura et al., 2004). Το συγκεκριμένο κατάλοιπο που είναι συντηρημένο στις υπερ-οικογένεια της θειορεδοξίνης φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην καταλυτική δράση της DsbA, γεγονός που υποστηρίζεται και από την δομική τοποθέτηση του συγκεκριμένου αμινοξέος σε γειτνίαση με το ενεργό CXXC κέντρο (Kadokura et al.,



2004; Martin et al., 1993). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει πως το θειολικό ανιόν της C30 σταθεροποιείται από υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η κυριότερη εκ των οποίων είναι με την ιστιδίνη 32 (Guddat et al., 1997a). Η σταθεροποίηση του θειολικού ανιόντος είναι σημαντική μιας και μετακινεί την ισορροπία της δισουλφιδικής αντίδρασης προς την οξείδωση του υποστρώματος. Παράλληλα από την κρυσταλλική δομή της DsbA φαίνεται πως υπάρχει ένα υδρόφοβο τμήμα που καλύπτει το ενεργό της κέντρο. Το τμήμα αυτό φαίνεται να αλληλεπιδρά μέσω υδρόφοβων δεσμών με τα υποστρώματα (Guddat et al., 1997b). Δεν είναι απίθανο να υφίστανται μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της οξειδάσης και ενός αποδιαταγμένου υποστρώματος κατά την διάρκεια ή αμέσως μετά την μετατόπιση από την μεμβράνη μιας και η DsbA θα πρέπει να έχει πρόσβαση στις κυστεΐνες του υποστρώματος για να οδηγήσει την μεταφορά δισουλφιδικού δεσμού. Τελευταίες μελέτες ισχυροποιούν την πεποίθηση ότι η αλληλεπίδραση της DsbA με το υπόστρωμα γίνεται κατά την διάρκεια εισόδου στο περίπλασμα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας την αλκαλική φωσφατάση με μεταλλαγμένη την αμινοτελική κυστεΐνη σε σερίνη έδειξαν ότι παύει η μετατόπιση (Dartigalongue et al., 2000; Guigueno et al., 1997; Schierle et al., 2003).

### 2.2.2 Η ανακύκλωση της DsbA γίνεται από την DsbB.

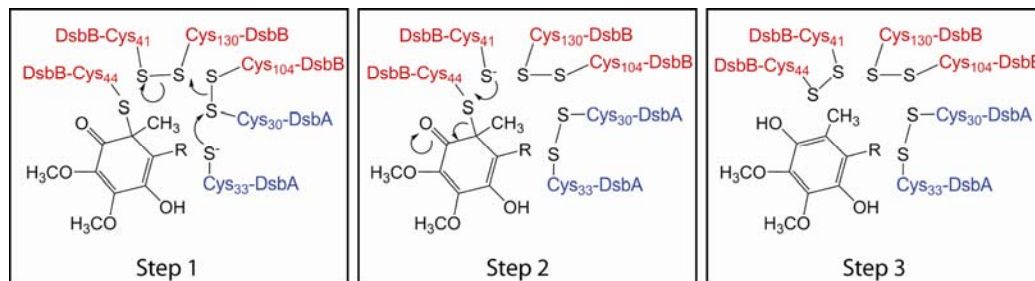
Προκειμένου να δράσει η DsbA ως οξειδάση του περιπλάσματος πρέπει να οξειδώνεται το ενεργό της κέντρο μετά από κάθε κύκλο οξείδωσης των υποστρωμάτων. Γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι τον ρόλο ανακύκλωσης του καταλυτικού κέντρου της DsbA έχει η πρωτεΐνη DsbB (Bardwell et al., 1993; Missiakas et al., 1993). Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι σε *dsbB*<sup>-</sup> στέλεχος παρατηρείται συσσώρευση ανηγμένης DsbA. Παράλληλα παρόμοιες επιπτώσεις στην

δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών του συγκεκριμένου στελέχους με αυτό της *dsbA* υποδεικνύει ότι και οι δυο πρωτεΐνες συμμετέχουν σε κοινό μονοπάτι οξειδωσης. Μετέπειτα βιοχημικές μελέτες έδειξαν άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών μέσω συγκεκριμένων κυστεϊνικών καταλοίπων (Guilhot et al., 1995; Kishigami et al., 1995b).

Η DsbB είναι μία πρωτεΐνη 20 kDa με τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες και δύο περιπλασματικές θηλιές. Κάθε υδρόφιλη εκτεθειμένη θηλιά περιέχει ένα ζεύγος συντηρημένων κυστεϊνών ένα εκ των οποίων είναι οργανωμένο σε CXXC μοτίβο (εικόνα 4). Συγκεκριμένα στην αμινοτελική θηλιά υπάρχουν οι κυστεΐνες C41 και C44 ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο οι C104 και C130. Τα ζεύγη κυστεϊνών υπόκεινται σε συνεχή κύκλους οξειδοαναγωγής και είναι ζωτικής σημασίας για την δράση της πρωτεΐνης (Jander et al., 1994). Η δράση της DsbB ανακυκλώνεται από την αναπνευστική αλυσίδα (Bader et al., 1999; Kobayashi et al., 1997). Σε αερόβιες συνθήκες τα ηλεκτρόνια κινούνται από την DsbB στην κινόνη (quinone) και από εκεί στις κυτοχρωμικές οξειδάσες *bd* και *bo* ενώ ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο (Bader et al., 1998; Inaba et al., 2004). Σε αναερόβιες συνθήκες η DsbB χρησιμοποιεί την μενακινόνη (menaquinone) ως άμεσο δέκτη ηλεκτρονίων. Αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν βάση για το ότι ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών οδηγείται από την αναπνευστική αλυσίδα και επιπλέον δείχνει πως οι κυτταρικές λειτουργίες προσαρμόζονται στις μεταβολές επιπέδων οξυγόνου.

Ο μηχανισμός δράσης της DsbB και η ροή ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στο οξυγόνο απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα και βασίζεται σε βιοχημικά πειράματα καθώς και στην πρόσφατη και ταυτόχρονη λύση της δομής του συμπλόκου DsbA-DsbB-Quinone από δύο διαφορετικά εργαστήρια με NMR και σκέδαση ακτίνων X

αντίστοιχα (Malojcic et al., 2008; Zhou et al., 2008). Προηγούμενη κρυστάλλωση του συμπλόκου DsbB-DsbA από το εργαστήριο του K.Ito είχε επιτυγχανθεί χρησιμοποιώντας μετάλλαξη στην C33A της DsbA και στην C130S της DsbB έτσι ώστε να παγιδευτεί το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ των δύο (Inaba et al., 2006a). Σε εκείνη την μελέτη είχεδειχθεί ότι το ενεργό κέντρο της DsbA επανοξειδώνεται από το δισουλφιδικό δεσμό C104-C130 στην καρβοξυτελική θηλιά της DsbB. Δεν είχεδειχθεί όμως τι συμβαίνει στο αμινοτελικό κυστεϊνικό ζεύγος και αυτό είναι που εξετάζουν μέσω των κρυσταλλικών δομών παρουσία κίνησης.

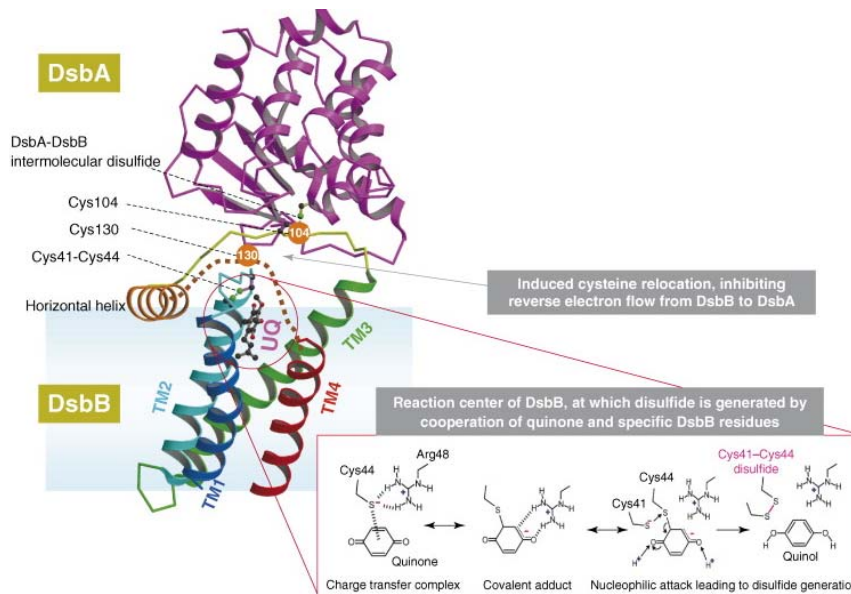


**Εικόνα 5: Στάδια ανακύκλωσης της οξειδωτικής δράσης της DsbA.**

Με κόκκινο η DsbB και οι κυστεΐνες της, με μπλε η DsbA και οι κυστεΐνες και με μαύρο η κίνηση. (Malojcic et al., 2008)

Προτείνεται λοιπόν ότι η τελική οξείδωση της DsbA πραγματοποιείται σε τρία στάδια (εικόνα 5). Εφόσον η DsbA έχει πραγματοποιήσει ένα κύκλο οξείδωσης κάποιου υποστρώματος βρίσκεται σε ανηγμένη κατάσταση. Το θειολικό ανιόν της κυστεΐνης C30 της DsbA προσβάλλει πυρηνόφιλα το δισουλφιδικό ζεύγος C104-C130 της DsbB και σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την κυστεΐνη 104. Ταυτόχρονα η κυστεΐνη C130 που απελευθερώνεται προσβάλλει τον δισουλφιδικό δεσμό 41-44 και σχηματίζεται δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την κυστεΐνη 41. Το ελεύθερο θειολικό ανιόν της κυστεΐνης 44 προσβάλλει πυρηνόφιλα την κίνηση. Σε αυτό στο στάδιο ξεκινάει η πυρηνόφιλη προσβολή της κυστεΐνης 33 στο δισουλφιδικό ενδιάμεσο 30-104 γεγονός που δίνει το έναυσμα για την ακόλουθη προσβολή της κυστεΐνης 104 στο δισουλφιδικό ενδιάμεσο 130-41 (**στάδιο 1**). Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην ανακατανομή των δεσμών έτσι ώστε να σχηματιστούν οι γέφυρες C30-C33 στην

DsbA και ο δεσμός C104-130 στην DsbB. Στη συνέχεια η ελεύθερη κυστεΐνη 41 προσβάλλει την κυστεΐνη 44 έτσι ώστε να σχηματιστεί ο ενδομοριακός δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των δύο (**στάδιο 2**). Τελικά έχουμε ένα πλήρως οξειδωμένο μόριο DsbB και DsbA έτσι ώστε να ακολουθήσει καινούριος κύκλος οξείδωσης νέο-εισερχόμενου υποστρώματος (**στάδιο 3**).



**Εικόνα 6: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου DsbA-DsbB-UQ.** Οι κυστεΐνες που φαίνονται στην εικόνα είναι της DsbB. Η κυστεΐνη Cys104 σχηματίζει διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό με την Cys130 της DsbA. Με UQ φαίνεται η κίνηση που προσδέεται στην DsbB και η αλληλεπίδραση των δύο φαίνεται σε κύκλο. Στο παραλληλόγραμο φαίνεται πως αλληλεπίδραση της κυστεΐνης 44 με την κίνηση σταθεροποιείται από ηλεκτροστατικούς δεσμούς με το συντηρημένο κατάλοιπο της αργινίνης 48 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο μεταφοράς (Ito and Inaba, 2008).

Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση της κυστεΐνης 44 με την κίνηση σταθεροποιείται και από ηλεκτροστατικούς δεσμούς με το συντηρημένο κατάλοιπο της αργινίνης 48 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου (charge-transfer complex) (εικόνα 6) (Inaba et al., 2006b; Kadokura et al., 2000). Μεταλλαγές της συγκεκριμένης αργινίνης προκαλούν αδυναμία της DsbB να καταλύσει δισουλφιδικούς δεσμούς. Από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου διαφαίνεται επίσης ότι η υδρόφοβη περιοχή της DsbA προσδέει τα αμινοξέα Pro100-Cys104-Phe106 της DsbB, έτσι ώστε να σχηματιστεί ο διαμοριακός δισουλφιδικός δεσμός

μεταξύ της C30 και C104. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνεται η κυστεΐνη 130 έτσι ώστε να μην επιτρέπεται η προσβολή αυτής στο C30-C104 δισουλφίδιο και να επιτραπεί η ολοκλήρωση της οξειδωσης της DsbA από την κυστεΐνη ζεύγος C33 (Ito and Inaba, 2008).

Ωστόσο αξιοπερίεργο ακόμα παραμένει το γεγονός ότι η DsbB μπορεί να οξειδώσει την DsbA τόσο αποδοτικά δεδομένου ότι η DsbA έχει πολύ ισχυρή οξειδωτική ικανότητα (Grauschopf et al., 1995; Inaba and Ito, 2002). Το οξειδωτικό δυναμικό του ζεύγους C104-C130 της DsbB που αλληλεπιδρά με την DsbA έχει μετρηθεί στα -220 mV ενώ του ζεύγους C41-C44 στα -200 mV (εικόνα 7) γεγονός που δεν εξηγεί θερμοδυναμικά την μεταφορά ηλεκτρονίων από την DsbA στην DsbB. Φαίνεται όμως πως η DsbB έχει σχεδιαστεί ώστε να αποκτά την ικανότητα οξειδωσης της DsbA εφόσον αλληλεπιδράσει με την κινόνη μιας και η ισχυρή οξειδωτική ικανότητα της κινόνης (οξειδωτικό δυναμικό +110 mV) μπορεί να οδηγήσει την ροή ηλεκτρονίων στο οξυγόνο.

<u>Component</u>	<u>Active-site cysteine pair</u>	<u>Redox potential (mV)</u>
DsbA	30/33	-122
DsbB	104/130	-224
	41/44	-207
	41/44/UQ	-69
	41/130	-224
UQ	na	+110
O <sub>2</sub>	na	+820

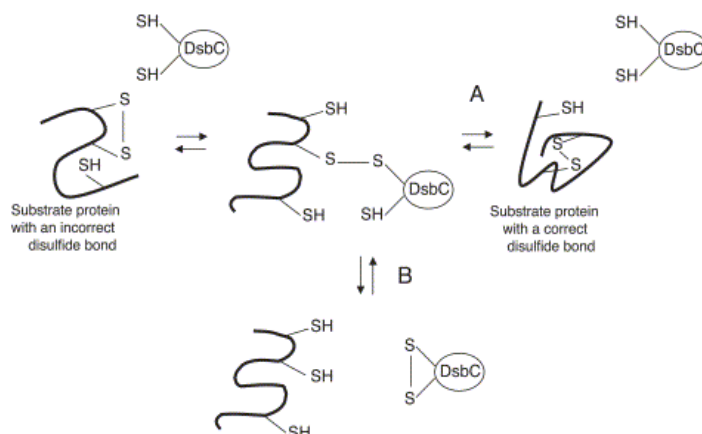
**Εικόνα 7:** Οξειδωτική δυναμικό του μονοπατιού οξειδωσης στο περίπλασμα (Inaba and Ito, 2008).

### 2.2.3 Ανακατανομή δισουλφιδικών δεσμών μέσω των DsbC, DsbG και DsbD.

Σε πρωτεΐνες που περιέχουν περισσότερες από δυο κυστεΐνες υπάρχει πάντα πιθανότητα δημιουργίας λανθασμένων συνδέσεων που προκύπτει από τυχαία οξείδωση. Προκειμένου να σχηματιστούν οι σωστοί δισουλφιδικοί δεσμοί που θα οδηγήσουν και στην σωστή αναδίπλωση του μορίου σε ορισμένες περιπτώσεις πρέπει να ανακατανεμηθούν οι λανθασμένες διασυνδέσεις. Δεδομένου ότι η DsbA έχει ισχυρό οξειδωτικό δυναμικό και οξειδώνει ταχύτατα και μη-ειδικά υποστρώματα, στο περίπλασμα έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα που διορθώνει τις λανθασμένες οξειδωτικές διασυνδέσεις. Στο περίπλασμα η ισομερίωση καταλύεται από τις πρωτεΐνες DsbC και πιθανότατα και από την DsbG (Bessette et al., 1999; Missiakas et al., 1994; Rietsch et al., 1997). Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την δράση της DsbG ως ισομεράση αλλά δεν είναι ολοκληρωμένες. Οι πειραματικές ενδείξεις που υποστηρίζουν την δράση της ως ισομεράση έχουν να κάνουν με τον έλεγχο της οξειδωτικής της κατάστασης *in vivo* και με *in vitro* αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι η DsbG δεν είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και απουσία αυτής δεν συσσωρεύονται στο κύτταρο κακώς-αναδιπλωμένα υποστρώματα που υπόκεινται σε οξειδωτική αναδίπλωση. Αντίθετα σε σταθερές συνθήκες ανάπτυξης του κυττάρου η DsbG βρίσκεται σε ανηγμένη κατάσταση όπως η DsbC, ενώ υπερέκφραση αυτής σε *dsbC* στέλεχος αποκαθιστά την έκφραση της ετερόλογης πρωτεΐνης BPTI (Heras et al., 2004). Ωστόσο *in vitro* δεν μπορεί να καταλύσει την αναγωγή μοντέλων υποστρωμάτων όπως της ινσουλίνης και της ριβονουκλεάσης (Shao et al., 2000).

Αντίθετα τα πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν την δράση της DsbC ως ισομεράση είναι λιγότερο αμφιλεγόμενα. Προσθήκη από καταλυτικές ποσότητες DsbC σε πλήρως ανηγμένη και αποδιαταγμένη BPTI οδηγεί στον σχηματισμό

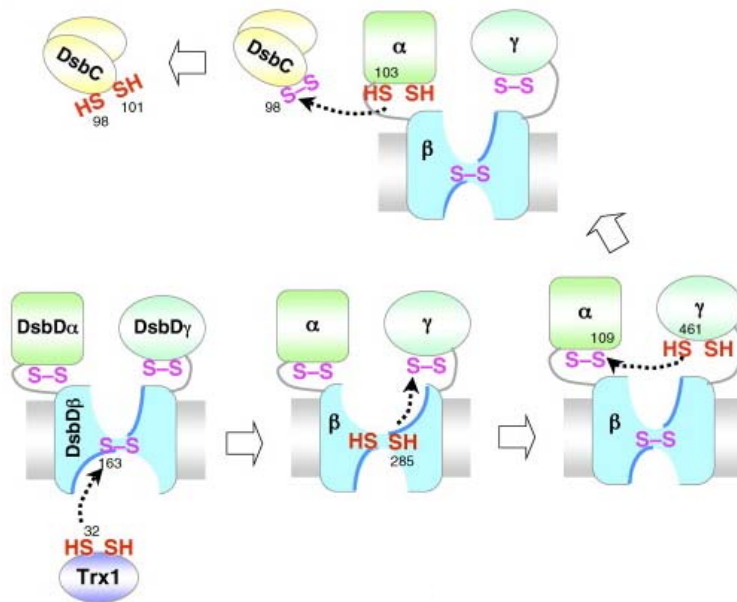
σωστών δισουλφιδικών δεσμών και ενεργής πρωτεΐνης *in vitro* (Zarun et al., 1995). Επιπλέον η ερευνητική ομάδα του Bardwell πραγματοποίησε *in vitro* μελέτη ανασύστασης του οξειδοαναγωγικού συστήματος και έδειξε ότι η DsbA μπορεί να οξειδώσει πλήρως την ριβονουκλεάση, αλλά μόνο παρουσία DsbC επανέρχεται η ενζυμική δράση του υποστρώματος (Bader et al., 1998). Ωστόσο δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ακόμα για το πώς ακριβώς δρα η DsbC στα υποστρώματα. Οι δύο πιθανοί τρόποι δράσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. Υπάρχει μια μελέτη από την ερευνητική ομάδα του Beckwith που φαίνεται να υποστηρίζει το μοντέλο αναγωγής-οξείδωσης (Rietsch et al., 1997). Συγκεκριμένα δείξαν ότι σε διπλό DsbA DsbD μετάλλαγμα οι κυστεΐνες του ενεργού κέντρου της DsbC παρέμειναν ανηγμένες, αντίθετα στο DsbD μετάλλαγμα ήταν σε οξειδωμένη κατάσταση. Αυτή η παρατήρηση φαίνεται να υποδεικνύει ότι η οξείδωση του ενεργού κέντρου της εξαρτάται από την DsbA. Εφόσον οι δύο πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν άμεσα η οξείδωση της DsbC μάλλον υφίσταται λόγω των οξειδωμένων από την DsbA υποστρωμάτων τα οποία στην συνέχεια ανάγονται από την DsbC (Gleiter and Bardwell, 2008).



**Εικόνα 8: Μοντέλο δράσης ισομερίωσης υποστρωμάτων από την DsbC.**

Ανηγμένη DsbC προσβάλλει έναν λάθος δισουλφιδικό δεσμό στο υπόστρωμα σχηματίζοντας διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό. Στην συνέχεια είτε θα ισομεριωθούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο υπόστρωμα και η DsbC θα παραμείνει ανηγμένη (A), είτε θα αναχθεί το υπόστρωμα με την ταυτόχρονη οξείδωση της DsbC (Nakamoto and Bardwell, 2004).

Η κρυσταλλική δομή της οξειδωμένης DsbC αποκαλύπτει δύο μονομερή 23 kDa έκαστο που σχηματίζουν ένα διμερές σε σχήμα ‘V’ (McCarthy et al., 2000). Κάθε μονομερές απαρτίζεται από δύο περιοχές: μια καρβοξυτελική περιοχή με μοτίβο θειορεδοξίνης που περιέχει το ενεργό CXXC μοτίβο και το αμινοτελικό άκρο υπεύθυνο για τον διμερισμό. Οι δύο περιοχές συνδέονται με μια  $\alpha$ -έλικα. Ο τρόπος που διμερίζεται η DsbC σχηματίζει μια μεγάλη κοιλότητα σε σχήμα ‘V’ που περιβάλλεται από υδρόφοβα αμινοξέα και έχει προταθεί ότι αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης των υποστρωμάτων. Οι ενεργές κυστεΐνες του κάθε μονομερούς είναι τοποθετημένες απέναντι η μια από την άλλη και σε συνδυασμό με τη μεγάλη κοιλότητα που σχηματίζει το διμερές έχει προταθεί ότι προστατεύει τα μερικώς αναδιπλωμένα υποστρώματα όσο ανασχηματίζονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί μέχρι να αποκτήσουν την σωστή αναδίπλωση. Ο διμερισμός της DsbC είναι απαραίτητος για την ισομερίωση υποστρωμάτων και για την αναγωγή από την DsbD.



**Εικόνα 9: Μονοπάτι ισομερίωσης στο περιβάλλον μέσω των πρωτεϊνών DsbC και DsbD.** Η DsbD επιτρέπει την ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου διαμέσου των υπομονάδων  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$ . Κάθε υπομονάδα περιέχει ένα ζεύγος ενεργών κυστεϊνών που φαίνονται με μωβ (οξειδωμένες) ή κόκκινο χρώμα (ανηγμένες). Η αλληλοδιάδοχη αναγωγή των δισουλφιδίων οδηγεί στην αναγωγή της DsbC. Οι διακοπτόμενες γραμμές δείχνουν τις πυρηνόφιλες προσβολές. Οι έντονες μπλε γραμμές στην υπομονάδα  $\beta$  δείχνουν το μονοπάτι αναγωγής από το κυτταρόπλασμα (Ito and Inaba, 2008).



Το μονοπάτι ισομερίωσης (εικόνα 9) στο περίπλασμα ολοκληρώνεται με την μεμβρανική πρωτεΐνη DsbD (Cho et al., 2007; Porat et al., 2004). Η DsbD είναι 59 kDa και αποτελείται από τρεις υπομονάδες  $\alpha$ ,  $\beta$ , και  $\gamma$ . Η  $\alpha$  και η  $\gamma$  υπομονάδες αποτελούν το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αντίστοιχα που εντοπίζονται στο περίπλασμα ενώ η υπομονάδα  $\beta$  αποτελεί το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης που περιέχει οκτώ διαμεμβρανικές περιοχές και τοποθετείται στην μεμβράνη. Και οι τρεις υπομονάδες περιέχει ένα συντηρημένο ζεύγος κυστεϊνών που είναι απαραίτητα για την λειτουργία της πρωτεΐνης (Chung et al., 2000; Stewart et al., 1999). Η υπομονάδα  $\beta$  είναι η μόνη που δεν έχει κρυσταλλωθεί ακόμα και για αυτό τον λόγο αποτελεί το ‘μαύρο κουτί’ όσον αφορά στον ακριβή τρόπο που συμμετέχει στην αναγωγή της DsbC. Το μονοπάτι ισομερίωσης ολοκληρώνει το NADPH στο κυτταρόπλασμα που αποτελεί τον δότη ηλεκτρονίων ανάγοντας την θειορεδοξίνη. Στη συνέχεια μέσω αναγωγής ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών στην DsbD τελικά ανάγεται το καταλυτικό κέντρο της DsbC προκειμένου να ισομεριώσει τα υποστρώματα. Και σε αυτό το μονοπάτι το αναγωγικό δυναμικό για κάθε ένα από τα εμπλεκόμενα ένζυμα συμφωνεί θερμοδυναμικά με την ροή της αντίδρασης (εικόνα 10) (Collet et al., 2002; Rozhkova et al., 2004).

<u>Component</u>	<u>Active-site cysteine pair</u>	<u>Redox potential (mV)</u>
DsbC	98/101	-140
DsbD		
$\alpha$	103/109	-232
$\gamma$	461/464	-235
$\beta$	163/285	nd
TRX-1	32/35	-270
NADPH	na	-320

**Εικόνα 10:** Οξειδωτικό δυναμικό του μονοπατιού ισομερίωσης στο περίπλασμα (Ito and Inaba, 2008).

Ενδιαφέρον αποτελεί το πώς επιτυγχάνεται μόνωση των δύο μονοπατιών οξειδωσης και ισομερίωσης παρόλο που βρίσκονται στο ίδιο ενδοκυττάριο διαμέρισμα, μιας και η DsbA εντοπίζεται σε οξειδωμένη κατάσταση ενώ η DsbC σε ανηγμένη (Joly and Swartz, 1997). Θα μπορούσε κανείς να αναρωτηθεί γιατί η DsbA με τόσο υψηλό οξειδωτικό δυναμικό δεν οξειδώνει την DsbC ή την DsbB μιας και θερμοδυναμικά τουλάχιστον οι αντιδράσεις αυτές θα ήταν εφικτές. Μελέτες κινητικής των αντιδράσεων *in vitro* έχουν δείξει ότι μόνο σε ‘φυσιολογικούς’ συνδυασμούς των ενζύμων DsbA, DsbB, DsbC και DsbD πραγματοποιούνται γρήγορες αντιδράσεις. Στην αντίθετη περίπτωση οι αντιδράσεις είναι  $10^3$  με  $10^7$  φορές πιο αργές (Rozhkova et al., 2004). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η κάθε αλληλεπίδραση είναι εξαιρετικά συγκεκριμένη και ειδική για κάθε ένζυμο. Επιπλέον σε δομική βάση φαίνεται ότι η περιοχή θειορεδοξίνης που περιέχει το διμερές μόριο της DsbC δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την DsbB διότι υπάρχει στερική ασυμβατότητα. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση είναι η μελέτη που έδειξε ότι μόνο η μονομερής DsbC μπορεί να οξειδωθεί από την DsbB (Bader et al., 2001); (Segatori et al., 2006). Επομένως τα δύο μονοπάτια μπορεί να έχουν εξελιχθεί ταυτόχρονα έτσι ώστε να μην υπάρχει επικοινωνία και με αυτό τον τρόπο να αποφεύγεται η άσκοπη κατανάλωση ηλεκτρονίων και ενέργειας (Kimball et al., 2003).

Το μονοπάτι οξειδωσης στο περίπλασμα δεν προκύπτει ως αποτέλεσμα αυθόρμητων μη ειδικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Καταλύεται από ένα καλά οργανωμένο δίκτυο που περιλαμβάνει συγκεκριμένα ένζυμα με ξεχωριστούς ρόλους. Αν και αρκετά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα για την δράση των Dsb πρωτεϊνών, το μονοπάτι οξειδωσης και ισομερίωσης στο περίπλασμα αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο πειραματικό σύστημα. Ένα λειτουργικά αντίστοιχο μονοπάτι

οξειδωσης απαντάται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων και θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα.

### 2.3 Οξείδωση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Πάνω από το ένα τρίτο των πρωτεϊνών στον άνθρωπο αναδιπλώνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο στο οποίο εδρεύουν αρκετές πρωτεΐνες που επιφέρουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες (Chen et al., 2005). Σε αυτές περιλαμβάνεται η διαδικασία της N-γλυκοσυλίωσης (Helenius and Aebi, 2004), της δημιουργίας γ-καρβοξυγλουταμικό σε παράγοντες πήξης του αίματος (Vermeer, 1990), και της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών (Sevier and Kaiser, 2002). Η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών είναι σημαντική για την ωρίμανση και λειτουργία των πρωτεϊνών μιας και συμβάλλει στην δομική σταθερότητα των μορίων. Η οξείδωση υποστρωμάτων στο ενδοπλασματικό δίκτυο καταλύεται από αρκετά ένζυμα. Ο ακριβής ρόλος όλων των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στο συγκεκριμένο οργανίδιο δεν είναι ακόμα γνωστός ενώ πολλές πτυχές του συστήματος παραμένουν ανεξερευνήτες.

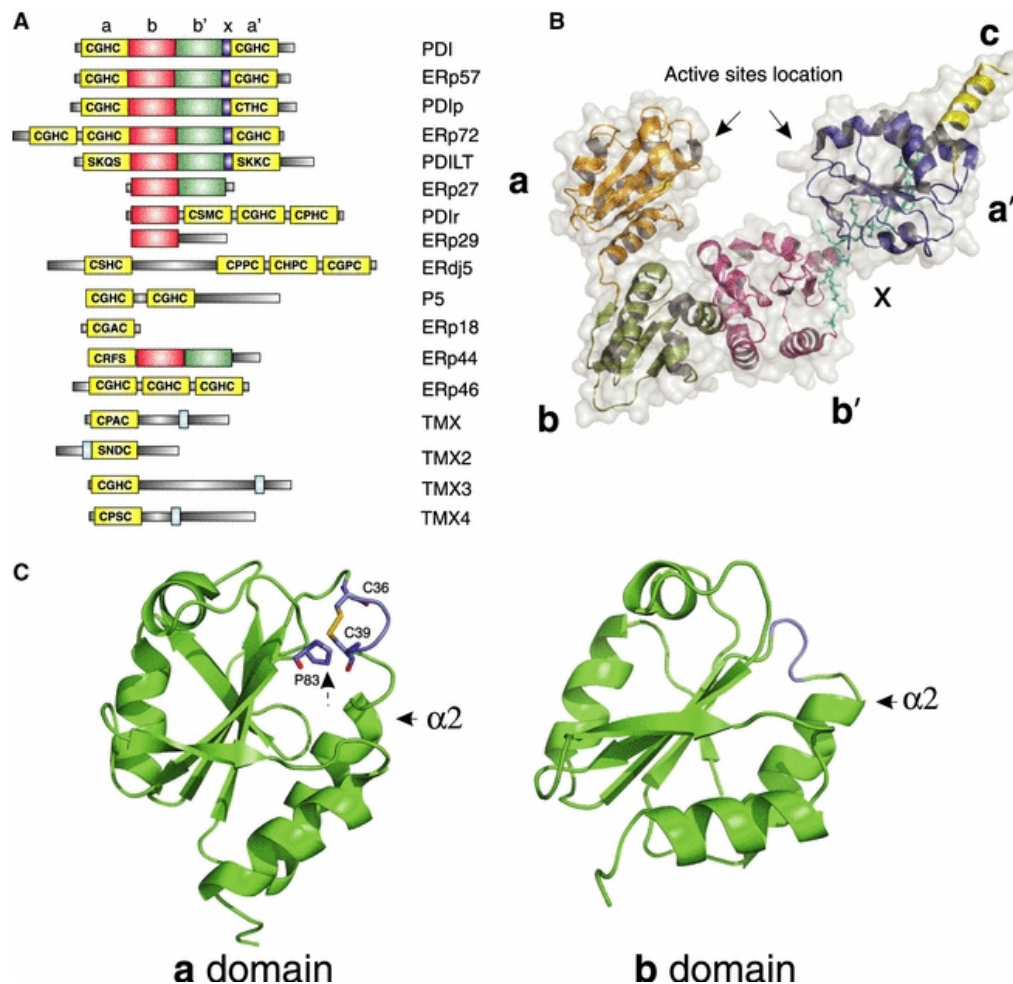
#### 2.3.1 Δομή και λειτουργία της PDI στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Περίπου 40 χρόνια μετά την ανακάλυψη της πρωτεΐνης δισουλφιδικής ισομεράσης PDI ως μια πρωτεΐνη που καταλύει την δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, αρκετά στοιχεία για τον ακριβή μηχανισμό δράσης της δεν είναι ακόμα γνωστά (Goldberger et al., 1963). Η πρωτεΐνη PDI είναι ζωτικής σημασίας και αποτελεί το 1% όλων των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Laboissiere et al., 1995). Περιέχει ένα διπλό CXXC καταλυτικό κέντρο που μπορεί να δράσει ως οξειδάση, αναγωγάση και ισομεράση. Μεταλλαγή του ενεργού CXXC κέντρου σε CXXS είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων σε αναγωγικό μέσο,

γεγονός που αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι η PDI εμπλέκεται σε οξειδοαναγωγικό μονοπάτι *in vivo* (Holst et al., 1997). Σε *in vitro* πειράματα το συγκεκριμένο μετάλλαγμα χάνει την ικανότητα οξείδωσης υποστρωμάτων, αλλά διατηρεί την λειτουργία ισομερίωσης (Freedman et al., 1998). Η προηγούμενη ένδειξη σε συνδυασμό με το *in vivo* αποτέλεσμα ευαισθησίας των κυττάρων σε αναγωγικό μέσο υποδεικνύει ότι η σημαντική λειτουργία της PDI είναι στην οξείδωση υποστρωμάτων. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η πρωτεΐνη ανάλογα με το οξειδωτικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος μπορεί να καταλύσει είτε σχηματισμό, είτε αναγωγή είτε την ισομερίωση δισουλφιδικών δεσμών (Sevier and Kaiser, 2002).

Πολύ πρόσφατα λύθηκε η δομή ολόκληρης της πρωτεΐνης του σακχαρομύκητα και δίνει για πρώτη φορά πληροφορία για το πώς είναι οργανωμένο όλο το μόριο (Tian et al., 2006). Η πρωτεΐνη PDI περιέχει δυο καταλυτικές περιοχές α και α' που περιέχουν το μοτίβο CXXC και διαχωρίζονται από δύο μη-καταλυτικές περιοχές β και β' (εικόνα 11). Και οι τέσσερις περιοχές οργανώνονται σε μοτίβο θειορεδοξίνης δηλαδή σε πέντε β-πτυχωτές περιτριγυρισμένες από τέσσερις α-έλικες. Στην περίπτωση των καταλυτικών περιοχών εντοπίζεται το ενεργό κέντρο CXXC στο αμινοτελικό άκρο της έλικας α2. Η συντηρημένη *cis*-προλίνη που είναι τοποθετημένη στην β4 πτυχωτή έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στην πρόσδεση του υποστρώματος (Molinari et al., 2002). Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται το σινιάλο τοποθέτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο K/HDEL. Επιτυχής προσπάθειες κρυστάλλωσης είχαν γίνει και στο παρελθόν αλλά με απομονωμένα τμήματα της πρωτεΐνης. Τώρα φαίνεται πως τα τμήματα της PDI οργανώνονται σε σχήμα 'U' όπου τα καταλυτικά κέντρα α και α' είναι απέναντι το ένα από το άλλο (εικόνα 11B). Οι περιοχές β και β' είναι πιο σταθερές σε σχέση με τις εύκαμπτες α

και  $\alpha'$ . Οι εσωτερικές πτυχές των περιοχών  $\beta$  και  $\beta'$  σχηματίζουν μια υδρόφοβη επιφάνεια όπου έχει προταθεί ότι προσδέεται το υπόστρωμα (Gruber et al., 2006).

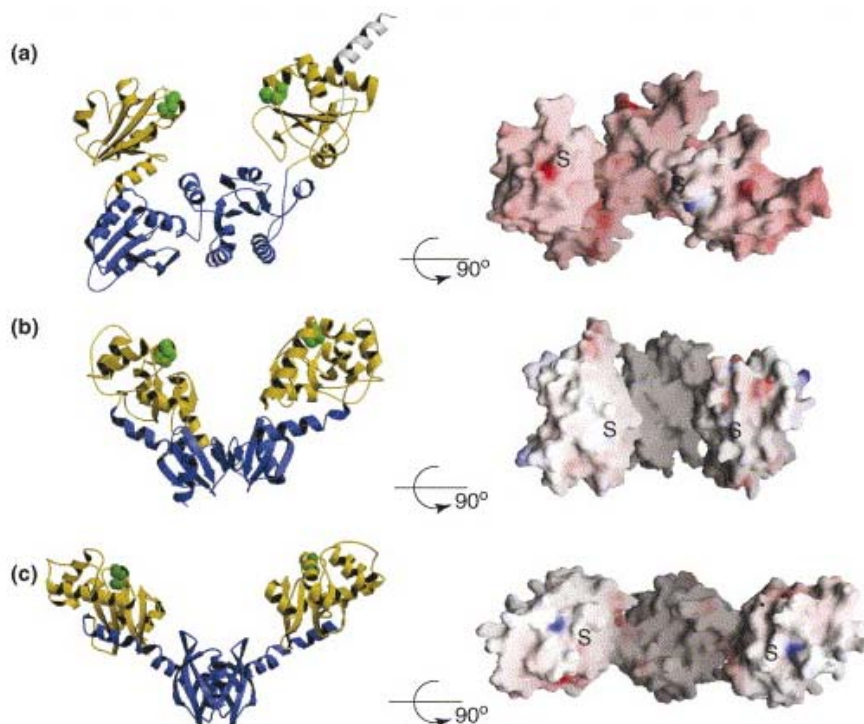


### Εικόνα 11: Κρυσταλλική δομή της PDI

A) Ομόλογες πρωτεΐνες της PDI B) Κρυσταλλική δομή της *S.cerevisiae* PDI (PDB 2B5E) Γ) Κρυσταλλικές δομές των περιοχών  $\alpha$  και  $\beta$  της ανθρώπινης PDI (Hatahet and Ruddock, 2007).

Ενδιαφέρον αποτελεί σε εξελικτική βάση η δομή της PDI. Η οργάνωση της πρωτεΐνης σε σχήμα 'U' θυμίζει την δομή σε σχήμα 'V' της βακτηριακής πρωτεΐνης DsbC και DsbG. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες είναι οργανωμένες σε διμερή όπου το κάθε μονομερές περιέχει ένα μοτίβο θειορεδοξίνης ενώ η PDI είναι μονομερής με ενσωματωμένα τέσσερα μοτίβα θειορεδοξίνης. Θα μπορούσε κανείς να εικάσει πως οι βακτηριακές πρωτεΐνες έχουν εξελιχθεί μέσω στρατολόγησης μίας περιοχής της θειορεδοξίνης, ενώ η PDI έχει εξελιχθεί μέσω διπλασιασμού της ίδιας περιοχής της

θειορεδοξίνης. Το εσωτερικό τμήμα και των δύο πρωτεϊνών περιβάλλεται από υδρόφοβα αμινοξέα που έχουν προταθεί να εμπλέκονται σε πρόσδεση υποστρωμάτων. Ωστόσο το γεγονός ότι οι βακτηριακές πρωτεΐνες DsbC και DsbG περιέχουν επιπλέον μια μακριά ελικωτή ένθεση σε γειτνίαση με το καταλυτικό CXXC ίσως να διαχωρίζει την ειδική λειτουργική τους δράση ως αναγωγάσες από την γενικότερη οξειδοαναγωγική δράση της PDI που έχει εκτεθειμένο το ενεργό της κέντρο (εικόνα 12) (Gruber et al., 2006).



**Εικόνα 12: Σύγκριση κρυσταλλικών δομών της PDI, DsbC και DsbG.**

A) *S. cerevisiae* PDI (PDB 2B5E), B) *E. coli* DsbC (PDB 1EEJ) και Γ) DsbG (PDB 1V57). Στα δεξιά είναι τα χωροπληρωτικά μοντέλα των πρωτεϊνών που δείχνουν το καταλυτικό κέντρο κάθε πρωτεΐνης (Gruber et al., 2006).

Στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το καταλυτικό CXXC μοτίβο είναι εκτεθειμένο στο διάλυμα και η πρώτη κυστεΐνη έχει pKa ~4.5 (Horibe et al., 2004; Wilkinson and Gilbert, 2004). Αντίθετα το καταλυτικό μοτίβο που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο στην περιοχή α' δεν είναι εκτεθειμένο στην δομή της πρωτεΐνης γεγονός που

εξηγεί την χαμηλή pKa ~12 (Xiao et al., 2004). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα απομονωμένα α και α' τμήματα μπορούν μόνο να ανάγουν και να οξειδώσουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Για να γίνει ισομερίωση του υποστρώματος είναι πάντα απαραίτητη η παρουσία της περιοχής β' (Darby and Creighton, 1995a; Darby and Creighton, 1995b). Ωστόσο ο ακριβής τρόπος δράσης της πρωτεΐνης δεν είναι ακόμα γνωστός όπως επίσης τι ρόλο έχει το κάθε καταλυτικό CXXC μοτίβο. Το οξειδωτικό δυναμικό της PDI στα -180 mV εξηγεί την οξειδωτική δράση της πρωτεΐνης (Hawkins et al., 1991; Lundstrom and Holmgren, 1993). Σε διαφορετική οξειδωτική κατάσταση εντοπίζεται η PDI στον σακχαρομύκητα από κύτταρα θηλαστικών σε σταθερές συνθήκες ανάπτυξης του κυττάρου. Η PDI σε θηλαστικά κύτταρα εντοπίζεται σε ανηγμένη κατάσταση γεγονός που υποδεικνύει ότι ο κύριος ρόλος της πρωτεΐνης είναι σε αντιδράσεις ισομερίωσης (Mezghrani et al., 2001), ενώ στον σακχαρομύκητα εντοπίζεται σε οξειδωμένη κατάσταση υποδεικνύοντας ότι ο κύριος ρόλος της πρωτεΐνης είναι η οξείδωση υποστρωμάτων (Frand and Kaiser, 1999). Ωστόσο έκφραση της ανθρώπινη PDI σε στέλεχος σακχαρομύκητα που απουσιάζει το ενδογενές γονίδιο δεν κρίνεται θνησιγόνα (Gunther et al., 1993). Αυτή η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο οργανισμών μπορεί να αντικατοπτρίζει την αργή κινητική ανακύκλωσης της οξειδωμένης μορφής της PDI ή/και την πιο γρήγορη οξείδωση των υποστρωμάτων. Παράλληλα πολλοί ερευνητές αντιτίθενται στην τιτλοδότηση της PDI ως οξειδάση μιας και σε πειράματα οξείδωσης υποστρωμάτων η ίδια ανάγεται γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν μπορεί να δημιουργήσει *de novo* δισουλφιδικούς δεσμούς ενδομοριακά.

Τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των πρωτεϊνών στην οικογένεια της PDI έχει αυξηθεί και πλέον αριθμούνται 17 διαφορετικές PDI στον άνθρωπο και τέσσερις στον σακχαρομύκητα. Η παρουσία τόσων ομόλογων πρωτεϊνών της PDI στο

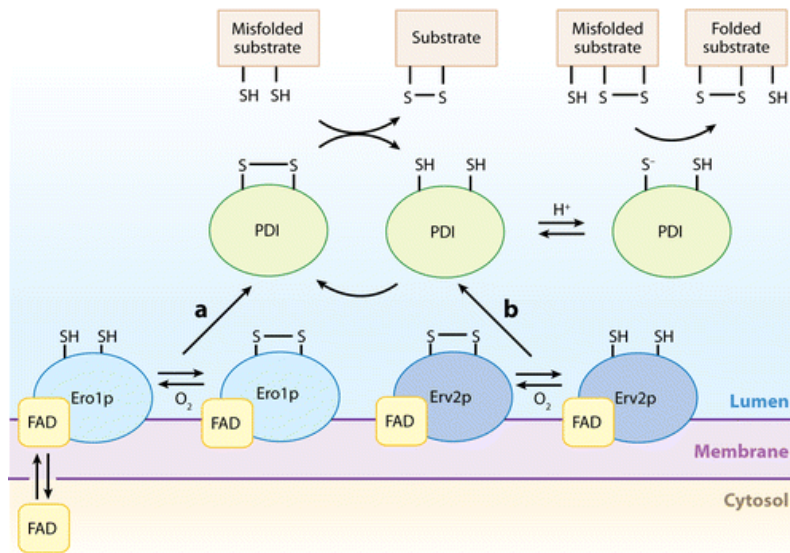
ενδοπλασματικό δίκτυο εγείρει ερωτηματικά γύρω από το αν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν πλεονάζων ή διαφορετικό ρόλο. Ωστόσο οι διαφορές που εντοπίζονται στα διαφορετικά μέλη της οικογένειας όπως είναι στο μέγεθος, στο καταλυτικό κέντρο, στην διαλυτότητα αλλά και στην ιστο-ειδική τοποθέτηση ισχυροποιούν την πεποίθηση ότι καθεμία από αυτές έχει διαφορετικό λειτουργικό ρόλο (Turano et al., 2002). Παράδειγμα αποτελεί η ομόλογη πρωτεΐνη της PDI, ERdj5, η οποία σε πρόσφατη μελέτη παρουσιάζεται να εμπλέκεται στην αναγωγή υποστρωμάτων με λανθασμένες δισουλφιδικές συνδέσεις. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι η ERdj5 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του μονοπατιού αποικοδόμησης του ενδοπλασματικού δικτύου (ERAD) όπως είναι οι πρωτεΐνες EDEM και BiP οπότε δύναται μέσω της αναγωγικής της δράσης να βοηθάει στην ξεδίπλωση υποστρωμάτων και στην αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ushioda et al., 2008).

### 2.3.2 Η PDI ανακυκλώνεται από την FAD εξαρτώμενη Ero1.

Η πρόσφατη ανακάλυψη της Ero1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο έλυσε το ερώτημα για το που μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια από την οξειδωση των υποστρωμάτων μέσω της PDI (Frandsen and Kaiser, 1999; Pollard et al., 1998). Η πρωτεΐνη Ero1 έχει προσδεμένο τον φλαβο-συμπαράγοντα FAD και μέσω αυτού μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο οξυγόνο. Εντοπίζεται στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και χαρακτηρίστηκε μέσω γενετικού ελέγχου (genetic screen) στον σακχαρομύκητα. Απουσία της Ero1 προκαλεί συσσώρευση ανηγμένων και κακώς-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι δύο πρωτεΐνες Ero1 και PDI έχουν παγιδευτεί σε μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο *in vivo* και συνθέτουν το μονοπάτι οξειδοαναγωγής στο ενδοπλασματικό δίκτυο με την PDI να μεταφέρει



δισουλφιδικούς δεσμούς στα υποστρώματα, την Ero1 να ανακυκλώνει την οξειδωμένη μορφή της PDI μέσω διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών και η ίδια μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια μέσω ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών στο FAD, τελικά να ανακυκλώνεται μέσω του οξυγόνου (εικόνα 13).

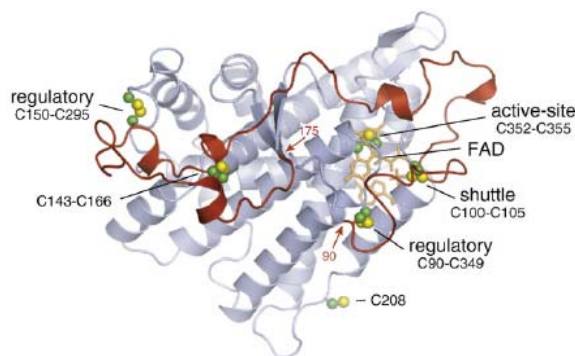


**Εικόνα 13: Οξειδοαναγωγικό μονοπάτι στο ενδοπλασματικό δίκτυο.**

Δύο μονοπάτια οξειδωσης υπάρχουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Α) Τα υποστρώματα οξειδώνονται μέσω της PDI που ανακυκλώνεται από την Ero1p-FAD. Στο δεύτερο μονοπάτι (β) η ανακύκλωση της PDI γίνεται μέσω της Erv2p-FAD. Οι λανθασμένες οξειδωμένες πρωτεΐνες ισομεριώνονται από την ανηγμένη PDI (*Mamathambika and Bardwell, 2008*).

Η λύση της κρυσταλλικής δομής της Ero1 έδειξε τον ακριβή τρόπο οργάνωσης των 11 κυστεϊνών στην πρωτεΐνη (Gross et al., 2004; Gross et al., 2006). Τέσσερις κυστεΐνες αποτελούν τα δύο καταλυτικά ζεύγη, εκ των οποίων το ένα οργάνωνεται σε CXXC μοτίβο και τοποθετείται σε γεινίαση με τον δακτύλιο του FAD ανάμεσα σε τέσσερις α-έλικες. Το άλλο ζευγάρι κυστεϊνών τιτλοδοτείται ως 'κινητό' ζευγάρι (shuttle pair) είναι τοποθετημένο σε μια εύκαμπτη πολυπεπτιδική θηλιά που τοποθετείται στην επιφάνεια στην πρωτεΐνης και δεν έχει συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή (εικόνα 14). Ο καταλυτικός κύκλος της Ero1 συμπεριλαμβάνει άμεση οξείδωση της PDI μέσω του 'κινητού' ζεύγους το οποίο επανοξειδώνεται μέσω ενδομοριακής αλληλεπίδρασης θειόλης-δισουλφιδίου με το ενεργό ζεύγος κυστεϊνών κοντά στο

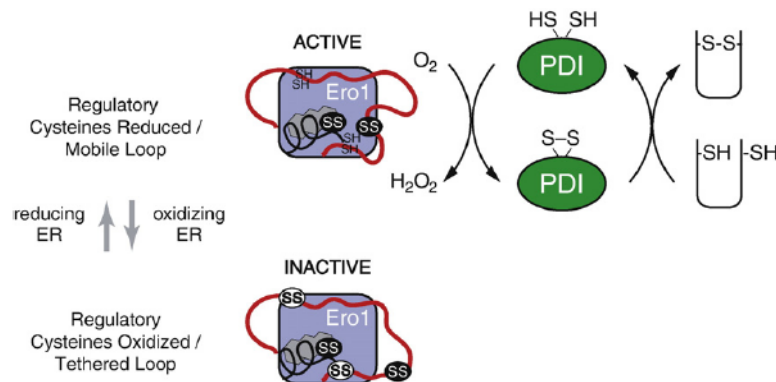
FAD (εικόνα 14). Η έλλειψη δευτεροταγής δομής στην περιοχή με το παλίνδρομο ζευγάρι κυστεϊνών πιθανότατα βοηθάει στην μετατόπιση του από την PDI στο λιγότερο προσβάσιμο ενεργό κέντρο και μιμείται τα αυθεντικά ξεδίπλωτα υποστρώματα της PDI. Επιπλέον το κινητό ζευγάρι μπορεί να λειτουργεί ως το κέντρο ελέγχου πρόσβασης στο ενεργό κέντρο έτσι ώστε να αποφεύγεται η αδιάκριτη οξείδωση υποστρωμάτων από το ισχυρά οξειδωτικό ενεργό κέντρο (Sevier and Kaiser, 2006b).



**Εικόνα 14: Κρυσταλλική δομή της Ego1 από τον σακχαρομύκητα.** Αμινοξέα 56-424 (Gross et al., 2004). Οι κυστεΐνες φαίνονται ως κίτρινες και πράσινες σφαίρες και το FAD ως πορτοκαλί δακτύλιος. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιέχει το κινητό ζευγάρι κυστεϊνών φαίνονται με κόκκινο (Sevier and Kaiser, 2008).

Η λειτουργική δράση της Ego1 ελέγχεται από την οξειδωτική κατάσταση που έχουν τα ρυθμιστικά ζεύγη κυστεϊνών. Η καίρια θέση που κατέχουν στην εύκαμπτη πολυπεπτιδική αλυσίδα κοντά στο ζεύγος ‘κίνησης’ έχει προταθεί ότι ελέγχει το εύρος κίνησης του ζεύγους και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζουν τη λειτουργία του ενζύμου. Κάτω από οξειδωτικές συνθήκες η δημιουργία του ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού στις ρυθμιστικές κυστεΐνες φαίνεται να τοποθετεί τις κυστεΐνες ‘κίνησης’ σε τέτοιο σημείο που να μην επιτρέπει την οξείδωση υποστρωμάτων (Sevier et al., 2007). Το μοντέλο δράσης της Ego1 προτάθηκε για πρώτη φορά ύστερα από γενετικές μελέτες στην πρωτεΐνη του σακχαρομύκητα. Πρόσφατα επιβεβαιώθηκε ο μηχανισμός και στην ανθρώπινη Ego1a (Appenzeller-Herzog et al., 2008; Baker et al., 2008). Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί το γεγονός ότι η

οξειδωτική κατάσταση των ρυθμιστικών κυστεϊνών στην Ero1 επηρεάζεται από τα επίπεδα γλουταθιόνης. Φαίνεται ότι η Ero1 δρα ως αισθητήριο κέντρο στο ενδοπλασματικό δίκτυο που ελέγχει την δράση της PDI ανάλογα με τις οξειδωτικές συνθήκες που επικρατούν στο κύτταρο.



**Εικόνα 15: Ρυθμιστικός έλεγχος της δράσης της Ero1.**

Οι καταλυτικές κυστεΐνες φαίνονται με μαύρους κύκλους ενώ οι ρυθμιστικές κυστεΐνες σε άσπρους κύκλους και σε SH όταν είναι ανηγμένες. Με κόκκινο φαίνεται η εύκαμπτη πεπτιδική αλυσίδα που περιέχει το κινητό ζεύγος κυστεϊνών. Στην περίπτωση που οι ρυθμιστικές κυστεΐνες είναι ανηγμένες τότε οι καταλυτικές κυστεΐνες οξειδώνονται μέσω οξυγόνου και ανακυκλώνουν την PDI. Στην περίπτωση που οι ρυθμιστικές κυστεΐνες είναι οξειδωμένες, μειώνεται η κινητικότητα της εύκαμπτης πολυπεπτιδικής αλυσίδας και κατ'επέκταση του κινητό ζεύγος κυστεϊνών γεγονός που οδηγεί σε μη ενεργή Ero1 (Sevier and Kaiser, 2008).

Ένα δεύτερο μονοπάτι οξείδωσης υποστρωμάτων έχει πρόσφατα δειχθεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο του σακχαρομύκητα και συμπεριλαμβάνει την πρωτεΐνη Ern2. Η Ern2 ανακαλύφθηκε ως γονίδιο που όταν υπερεκφραστεί επαναφέρει την βιωσιμότητα σε κύτταρα που απουσιάζει η Ero1. Η Ern2 είναι μια μη-ζωτικής σημασίας πρωτεΐνη 22 kDa που συνδέεται με την μεμβράνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο και έχει μη-ομοιοπολικά προσδεμένο τον συμπάραγοντα FAD (Gross et al., 2002). Μέσω του FAD μπορεί να οξειδώσει υποστρώματα χρησιμοποιώντας ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο. *In vivo* η Ern2 έχει παγιδευτεί σε μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την PDI (Sevier et al., 2001) γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη εμπλέκεται στο μονοπάτι οξείδωσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ανήκει στην οικογένεια σουλφυδριλοξειδασών Ern/ALR και ομόλογα της εντοπίζονται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ιούς (Fass, 2008).

### **3. Νέο μονοπάτι οξειδωσης πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο μιτοχονδρίων μέσω του μονοπατιού της Mia40**

#### **3.1 Εισαγωγή στο μιτοχόνδριο**

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και εμπλέκονται σε ποικίλες λειτουργίες μεταξύ των οποίων είναι η παραγωγή ενέργειας, παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) (Lesnefsky et al., 2001), μονοπάτι σηματοδότησης μέσω ασβεστίου (Gunter and Pfeiffer, 1990), βιογένεση συμπλόκων σιδήρου/θείου (Muhlenhoff and Lill, 2000), γήρανση (Trifunovic et al., 2004), και απόπτωση (Jiang and Wang, 2004). Λόγω του ρόλου του στην βιοσύνθεση ATP αποκαλείται το ενεργειακό εργοστάσιο του κυττάρου. Ωστόσο οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα δεν είναι ζωτικής σημασίας στην περίπτωση που τα κύτταρα μεγαλώνουν παρουσία ζυμώσιμης πηγής άνθρακα που μεταβολίζεται μέσω γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα. Από την άλλη πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου οι οποίες εμπλέκονται στις παρακάτω τρεις διαδικασίες: μετατόπιση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, αναδίπλωση και βιογένεση συμπλόκων σιδήρου/θείου, κρίνονται ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Φαίνεται λοιπόν ότι η σημασία ύπαρξης των μιτοχονδρίων ξεπερνά τον μέχρι τώρα ρόλο τους ως ενεργειακά εργοστάσια.

Τα μιτοχόνδρια πιθανότατα έχουν προέλθει από ένα α-πρωτεοβακτήριο που εισέβαλλε σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο περίπου πριν από ενάμιση δισεκατομμύριο χρόνια (Yang et al., 1985). Τα δύο κύτταρα ανέπτυξαν ενδοσυμβιωτική σχέση και με τον καιρό έχασαν την αυτονομία τους (Gray et al., 1999; Margulis, 1970). Το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος του βακτηρίου μεταφέρθηκε στο ευκαρυωτικό κύτταρο πιθανώς είτε λόγω της ανάγκης απομάκρυνσης του DNA από την περιοχή

δημιουργίας ROS που προκαλούν μεταλλαγές στο γονιδίωμα είτε οδηγήθηκε από το πιο εξελιγμένο ευκαρυωτικό σύστημα ελέγχου γονιδιακής έκφρασης. Από εκείνο το σημείο το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο εξελίχθηκε στο σημερινό μιτοχόνδριο το οποίο διατηρεί αρκετές μορφολογικές ομοιότητες με το βακτήριο όπως την διπλή μεμβράνη που περιέχεται στα gram<sup>-</sup> βακτήρια. Επιπλέον αρκετές από τις πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου που συμμετέχουν κυρίως σε βιογένεση πρωτεϊνών είναι ομόλογες τόσο στην δομή όσο και στην λειτουργία με βακτηριακές όπως για παράδειγμα η β-barrel πορίνη.

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυττάρια δομές με διπλή μεμβράνη διαμέτρου 0.5-1μm και μήκους μέχρι 7μm. Το σχήμα και ο αριθμός τους ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εντοπίζονται. Μπορεί να έχουν σχήμα σφαίρας μέχρι ράβδου αλλά η γενική αρχιτεκτονική τους παραμένει ίδια. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο εξαρτάται από τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Για παράδειγμα οι ιστοί με υψηλές μεταβολικές ανάγκες όπως είναι ο σκελετικός μυς και οι νεφροί διαθέτουν αυξημένο αριθμό μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από διαφορετικά διαμερίσματα, την εξωτερική μεμβράνη, την εσωτερική μεμβράνη, τον διαμεμβρανικό χώρο και την μήτρα. Κάθε διαμέρισμα του μιτοχονδρίου έχει την δική του ξεχωριστή λειτουργία και ξεχωριστές πρωτεΐνες. Η εσωτερική μεμβράνη χωρίζει την μήτρα από τον διαμεμβρανικό χώρο, είναι πολλές φορές αναδιπλωμένη και σχηματίζει ένα μεγάλο αριθμό εγκοιλώσεων που ονομάζονται πτυχές (cristae) που εξυπηρετούν στην αύξηση της συνολικής μεμβρανικής επιφάνειας. Η παραγωγή ενέργειας μέσω του κύκλου του Krebs και την αναπνευστικής αλυσίδας πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη και την μήτρα. Η εξωτερική μεμβράνη επικοινωνεί με το κυτταρόπλασμα και μαζί με την εσωτερική μεμβράνη συμμετέχει σε διαδικασίες fusion, fission και απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής

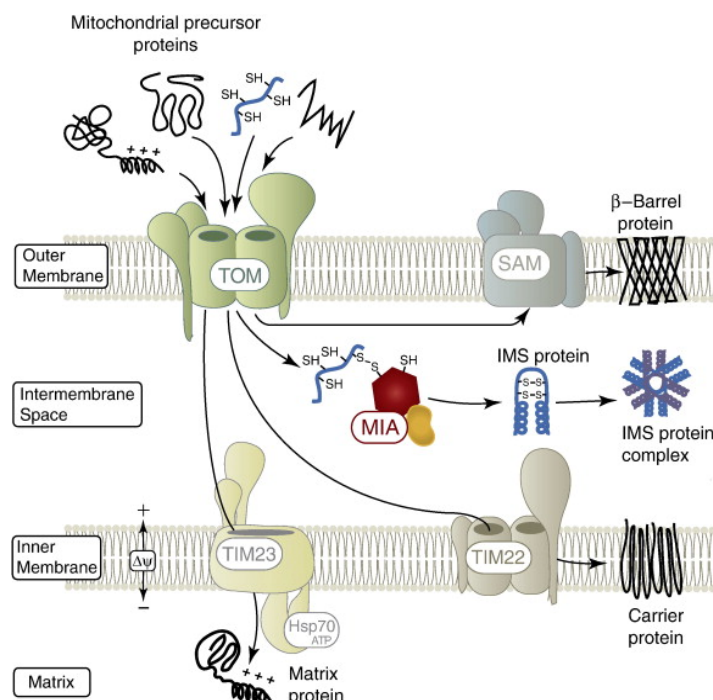
μεμβράνης εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διεργασίες γι' αυτό άλλωστε και το ποσοστό πρωτεϊνών στην μεμβράνη είναι περίπου 80%, το μεγαλύτερο ανάμεσα στα μεμβρανικά οργανίδια του κυττάρου.

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος του βακτηρίου μεταφέρθηκε στο ευκαρυωτικό κύτταρο κατά την διάρκεια την ενδοσυμβίωσης. Το μιτοχόνδριο σήμερα διατηρεί το δικό του γονιδίωμα αν και κωδικοποιεί για ένα μικρό μέρος μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα στον σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae* – baker's yeast), ο οργανισμός που χρησιμοποιείται ως μοντέλο σύστημα για την μελέτη βιογένεσης και στόχευσης πρωτεϊνών, σε μια προσπάθεια προσδιορισμού του μιτοχονδριακού πρωτεόματος βρέθηκαν περίπου 800 πρωτεΐνες από τις οποίες μόλις οκτώ κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA (Sickmann et al., 2003). Είναι εμφανές λοιπόν ότι εφόσον η σύνθεση της πλειονότητας των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών γίνεται στο κυτταρόπλασμα, έπρεπε να αναπτυχθούν μηχανισμοί στόχευσης και ταξινόμησης αυτών στα διαφορετικά διαμερίσματα του μιτοχονδρίου. Ως αποτέλεσμα έχει αναπτυχθεί ένα μεγάλο και πολύπλοκο εύρος μονοπατιών εισόδου για τα ξεχωριστά τμήματα του μιτοχονδρίου που θα αναλυθεί συνοπτικά στο επόμενο μέρος.

### **3.2 Βιογένεση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.**

Οι πρόδρομες μορφές των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών συνήθως μεταφέρονται στο μιτοχόνδριο με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών σαπερονών μετά την σύνθεση τους στο κυτταρόπλασμα. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών που στοχεύονται στο μιτοχόνδριο περιλαμβάνουν στο αμινοτελικό τους άκρο μία σηματοδοτική αλληλουχία που αποτελείται από μία αμφι-παθητική  $\alpha$ -έλικα που περιέχει πολλά θετικά φορτισμένα αμινοξέα από την μία πλευρά της έλικας και υδρόφοβα από την άλλη

(MTS/presequence). Αρχικά τα πρόδρομα μόρια πρέπει να εισέλθουν από την εξωτερική μεμβράνη η οποία λόγω των πολυάριθμων πορινών που σχηματίζουν κανάλια είναι ημιπερατή, πράγμα που σημαίνει ότι επιτρέπουν την μη-ειδική διάχυση μορίων μέχρι 5 kDa. Η εισαγωγή μεγαλύτερων από 5kDa μορίων επιτυγχάνεται μέσω του συμπλόκου μεταθετάσης TOM (translocase of the outer membrane). Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζει τον γενικό πόρο εισόδου (General Import Pore, GIP) που απαρτίζεται από τους υποδοχείς Tom5, Tom6, Tom7 και την πρωτεΐνη Tom40 η οποία σχηματίζει το πόρο στην εξωτερική μεμβράνη. Τα πρόδρομα μόρια μετά την μεταφορά τους διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης από το κανάλι TOM, ακολουθούν το δικό τους μονοπάτι στόχευσης ανάλογα με το μιτοχονδριακό διαμέρισμα στο οποίο προορίζονται. Τα επιμέρους μονοπάτια αναλύονται συνοπτικά στις επόμενες παραγράφους ενώ η εικόνα 16 απεικονίζει συνολικά όλα τα μονοπάτια εισόδου.



**Εικόνα 16: Μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο.**

Για την είσοδο μιτοχονδριακών πρωτεϊνών διακρίνονται τα μονοπάτια στόχευσης στην εξωτερική μεμβράνη SAM, στην εσωτερική μεμβράνη TIM22, στην μήτρα TIM23 και στον διαμεμβρανικό χώρο MIA40 και αναλύονται εκτενέστερα στο κείμενο (Stojanovski *et al.*, 2008b).

### 3.2.1 Στόχευση στην εξωτερική μεμβράνη μέσω του συμπλόκου SAM

Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για την εξωτερική μεμβράνη έχουν συνήθως δομή β-βαρελίου οι οποίες αφού δεσμευτούν από τους υποδοχείς του συμπλόκου TOM (Tom20, Tom22, Tom70) και περάσουν τον GIP παραλαμβάνονται από τα σύμπλοκα TIM10 (Tim9/Tim10) και Tim8/Tim13 που έχουν το ρόλο σαπερονών του διαμεμβρανικού χώρου και αποδίδονται στο σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης SAM/TOB (Sorting and Assembly Machinery/Topogenesis of outer membrane β-Barrel) (Becker et al., 2008; Bohnert et al., 2007; Kutik et al., 2007; Walther and Raparport, 2009) Το σύμπλοκο SAM απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες Sam35, Mas37, και την Sam50 που είναι ομόλογη της βακτηριακής Omp85 και σχηματίζει το κεντρικό μέρος του συμπλόκου (Stojanovski et al., 2007). Πρόσφατα βρέθηκε ότι τα πρόδρομα μόρια που στοχεύονται στην εξωτερική μεμβράνη περιέχουν μια συντηρημένη αλληλουχία στο καρβοξυτελικό τους άκρο που αποτελείται από ένα φορτισμένο αμινοξύ, μια γλυκίνη και δύο μεγάλα υδρόφοβα αμινοξέα (xxxRoxGxxHyxHyx) υπεύθυνο για την είσοδο και τοποθέτηση των πρόδρομων μορίων στην εξωτερική μεμβράνη (Kutik et al., 2008; Walther et al., 2009).

### 3.2.2 Στόχευση στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού TIM22

Οι πρωτεΐνες με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα που προορίζονται στην εσωτερική μεμβράνη συνήθως δεν φέρουν τυπικό σήμα στόχευσης. Η πληροφορία για τη στόχευση βρίσκεται σε διάφορα σημεία μέσα στην ώριμη μορφή της πρωτεΐνης (internal signals). Υποστρώματα αυτού του μονοπατιού αποτελούν οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μεταφορέων μεταβολιτών όπως η AAC (ADP/ATP Carrier) και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια στόχευσης πρωτεϊνών όπως είναι Tim17, Tim23, Tim22. Κατά την είσοδό τους περνούν ομοίως από το σύμπλοκο TOM,



αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα Tom70, και παραλαμβάνονται από τα σύμπλοκα TIM10 και Tim8/Tim13. Τα σύμπλοκα των μικρών Tim προστατεύουν τα υδρόφοβα τμήματα των μεμβρανικών υποστρωμάτων και στη συνέχεια παραδίδονται στο σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης TIM22 (Translocase of the Inner Membrane) που απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες Tim18, Tim12, Tim54 και Tim22 η οποία σχηματίζει το κανάλι του συμπλόκου (Milenkovic et al., 2007b). Το σύμπλοκο TIM22 είναι οργανωμένο σε δύο τμήματα. Το περιφερικό τμήμα που εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο αποτελείται από την πρωτεΐνη Tim12 μαζί με το TIM10 σύμπλοκο. Ενώ οι Tim9 και Tim10 μπορούν να αποσυνδεθούν από το TIM22, η Tim12 παραμένει άρρηκτα προσδεμένη και λειτουργεί σαν το σημείο πρόσδεσης του TIM10 (Adam et al., 1999; Koehler et al., 1998b). Το διαμεμβρανικό τμήμα του TIM22 αποτελείται από τις πρωτεΐνες Tim18, Tim22, και Tim54. Ο ρόλος των Tim18 Tim54 δεν είναι πλήρως κατανοητός ακόμα. Το σύμπλοκο με τη βοήθεια του δυναμικού της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης εισάγει τις πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη. Το μεμβρανικό δυναμικό ασκεί ηλεκτροφορετική δύναμη στο πρόδρομο μόριο που είναι αρκετή για την πλήρη είσοδο του μορίου στην μεμβράνη (Rehling et al., 2003).

### 3.2.3 Στόχευση στην μιτοχονδριακή μήτρα μέσω του μονοπατιού TIM23

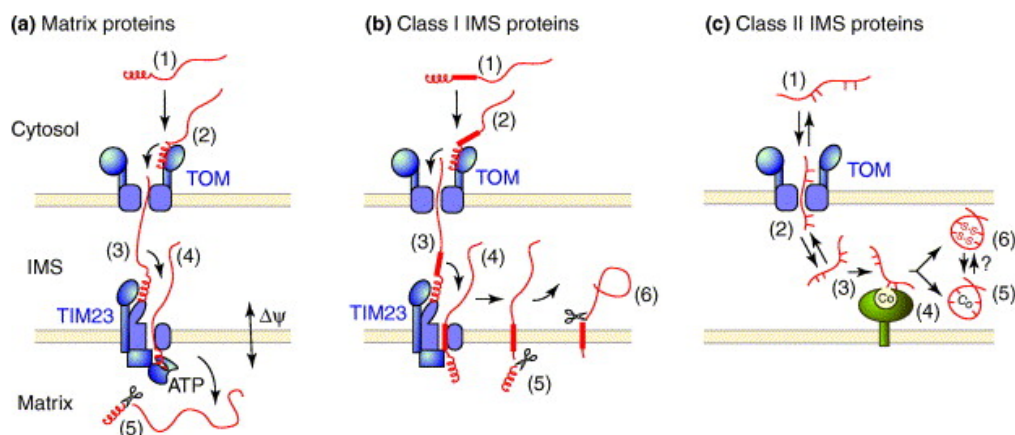
Οι πρωτεΐνες που στοχεύονται στην μιτοχονδριακή μήτρα φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο το τυπικό θετικά φορτισμένο σινιάλο στόχευσης (presequence). Τα πρόδρομα μόρια αρχικά δεσμεύονται στους υποδοχείς του συμπλόκου TOM. Μόλις το σινιάλο της πρωτεΐνης αφήσει το κανάλι Tom40 το υπόστρωμα παραδίδεται στο σύμπλοκο μεταθετάσης TIM23 (Neupert and Herrmann, 2007). Το σύμπλοκο TIM23 απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες Tim17, Tim21, Tim44, Tim50 και την πρωτεΐνη Tim23

η οποία σχηματίζει το κανάλι του συμπλόκου. Τα πρόδρομα μόρια αλληλεπιδρούν αρχικά με την Tim50 και μετά οδηγούνται στην Tim23. Η Tim50 βρέθηκε πρόσφατα και είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης. Η καρβοξυτελική της περιοχή προεξέχει στο IMS και είναι αυτή που αλληλεπιδρά με τις εισερχόμενες πρωτεΐνες (Geissler et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών Tim21 και Tim17 δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Το TIM23 κανάλι δεν είναι ένας παθητικός μεταφορέας μορίων και 'ανοίγει' μόνο στην παρουσία μεμβρανικού δυναμικού και εισερχόμενης πρωτεΐνης. Το μεμβρανικό δυναμικό  $\Delta\psi$  ρυθμίζει το κανάλι (Truscott et al., 2001) και λειτουργεί ως κινητήριος δύναμη για την μεταφορά της πρωτεΐνης.

Το μεμβρανικό τμήμα της Tim23 μπορεί να εισάγει μόνο το ακραίο τμήμα του αμινοτελικού άκρου του πρόδρομου μορίου στην μήτρα. Την ολοκλήρωση της μεταφοράς του πρόδρομου μορίου αναλαμβάνει το σύμπλοκο PAM (Presequence-translocase-Associated import-Motor) που βρίσκεται στην μήτρα. Αποτελείται από τις πρωτεΐνες mtHsp70, Tim44, Mge1, Pam18/Tim14, και Pam16. Το σύμπλοκο PAM και συγκεκριμένα η mtHsp70 χρησιμοποιεί την υδρόλυση του ATP σαν πηγή ενέργειας για να διευκολύνει την είσοδο πρωτεϊνών στη μήτρα. Η πρωτεΐνη Tim44 φέρει σε επαφή την mtHsp70 με το πρόδρομο μόριο (Liu et al., 2003; Schneider et al., 1994), ενώ η Pam18 (DnaJ-like protein) επάγει την ATPase δράση της mtHsp70 (D'Silva et al., 2003; Truscott et al., 2003). Η Pam16 συμμετέχει στην στρατολόγηση της Pam18 (Frazier et al., 2004). Παράλληλα η πρωτεΐνη Mge1 αποσπά το ADP από την mtHsp70 και βοηθά στην απελευθέρωση της πρωτεΐνης. Το μονοπάτι εισόδου ολοκληρώνεται με την μιτοχονδριακή μεταλλοπρωτεάση MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) η οποία αποσπά το σινιάλο στόχευσης από τις πρόδρομες πρωτεΐνες πριν την τελική τους αναδίπλωση.

### 3.2.4 Στόχευση στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου

Το μονοπάτι εισόδου στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων είναι αρκετά πολύπλοκο μιας και δεν υπάρχει ομοιογενής τρόπος στόχευσης για διαφορετικά είδη υποστρωμάτων (Herrmann and Kohl, 2007). Υπάρχουν πρωτεΐνες που περιέχουν μια αμφιμερή αλληλουχία στόχευσης (bipartite presequence) και εισάγονται μέσω του μονοπατιού διακοπής μεταφοράς (stop-transfer) (εικόνα 17 κατηγορία I) . Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιούν το μονοπάτι TIM23 και μετά υφίστανται δύο διαδοχικά πρωτεολυτικά στάδια ωρίμανσης. Ένα στην πλευρά της μήτρας, όπου απομακρύνεται η θετικά φορτισμένη σηματοδοτική αλληλουχία (presequence) μέσω της πεπτιδάσης της μήτρας MPP, και ένα στην πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου, απ' όπου απελευθερώνεται η ώριμη μορφή, διαλυτή μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο. Παραδείγματα πρωτεϊνών που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία αποτελούν οι πρωτεΐνες cytochrome b2, cytochrome c peroxidase, και Mgm1. Η τελευταία αποκόπτεται στον διαμεμβρανικό χώρο από την μιτοχονδριακή ρομβοειδή πρωτεάση Pcp1 ενώ οι άλλες δύο απελευθερώνονται από την πεπτιδάση Imp1 (Inner Membrane Peptidase).



**Εικόνα 17: Μονοπάτι εισόδου πρωτεϊνών που στοχεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο.**

α) Πρωτεΐνες που στοχεύονται στην μήτρα. β) πρωτεΐνες που στοχεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού διακοπής μεταφοράς. γ) πρωτεΐνες που στοχεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο και παγιδεύονται σε αυτόν μέσω οξειδωτικής αναδίπλωσης (Herrmann and Hell, 2005).

Εκτός από την κατηγορία πρωτεϊνών που χρησιμοποιεί την αμφιμερή αλληλουχία για στόχευση στο διαμεμβρανικό χώρο, υπάρχουν και πρωτεΐνες που δεν φέρουν κανένα καθορισμένο σινιάλο στόχευσης. Αυτή η κατηγορία πρωτεϊνών παγιδεύεται στο διαμεμβρανικό χώρο εξαιτίας της αναδίπλωσης τους (folding trap model). Η αναδίπλωση επιτυγχάνεται είτε με την πρόσδεση κάποιου μετάλλου, όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης Sod1, είτε μέσω δισουλφιδικών δεσμών, όπως στην περίπτωση των πρωτεϊνών της οικογένειας Tim, και αποτελεί την κατευθυντήρια δύναμη για την μονόδρομη μετατόπιση των πρωτεϊνών (Bihlmaier et al., 2008; Hell, 2008). Για την είσοδο αυτών των πρωτεϊνών δεν χρειάζεται μεμβρανικό δυναμικό που σημαίνει ότι η αναγκαιότητα για τις μεταθετάσες της εσωτερικής μεμβράνης έχει παρακαμφθεί. Σε αυτήν την κατηγορία πρωτεϊνών ανήκουν πρωτεΐνες με διπλό CX3C ή CX9C μοτίβο και είναι συνήθως χαμηλού μοριακού βάρους (< 22 kDa). Πρόσφατα απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ένας σημαντικός οξειδωτικός παράγοντας, γνωστός ως Mia40, ο οποίος συμμετέχει στην διαδικασία οξείδωσης και αναδίπλωσης των υποστρωμάτων στον διαμεμβρανικό χώρο. Το σύστημα οξείδωσης στον διαμεμβρανικό χώρο αποτελεί το αντικείμενο μελέτης αυτής της διατριβής και θα εξετασθεί λεπτομερώς στις επόμενες παραγράφους.

### **3.3 Πρωτεΐνες με δισουλφιδικούς δεσμούς στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων**

Ο διαμεμβρανικός χώρος των μιτοχονδρίων περιέχει ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό πρωτεϊνών που φαίνεται να περιέχουν δισουλφιδικές γέφυρες. Δεδομένης της επικοινωνίας του διαμεμβρανικού χώρου με το αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος μέσω των πορινών της εξωτερικής μεμβράνης, είναι αξιοπρόσεκτη η παρουσία ενός μηχανισμού εισόδου που βασίζεται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Ωστόσο στην φύση υπάρχουν παραδείγματα

διεξαγωγής οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων ακόμα και σε αναγωγικό περιβάλλον όπως συμβαίνει στο καψίδιο της οικογένειας ιών *rhoxviridae* (Senkevich et al., 2000; Senkevich et al., 2002). Επιπλέον η προέλευση των μιτοχονδρίων από προκαρυωτικούς οργανισμούς μαρτυρεί ότι ο διαμεμβρανικός χώρος θα μπορούσε να αποτελεί σημείο διεξαγωγής οξειδωτικών αντιδράσεων όπως συμβαίνει και στο βακτηριακό περίπλασμα. Σε μια πρόσφατη μελέτη υπολογίστηκε το οξειδωτικό δυναμικό του διαμεμβρανικού χώρου στα -255 mV, μικρότερο από το -290 mV του κυτταροπλάσματος (Hu et al., 2008), γεγονός που συνηγορεί στο ότι τα μιτοχόνδρια έχουν πιθανών διατηρήσει ένα οξειδοαναγωγικό δυναμικό για την είσοδο και συγκρότηση πρωτεϊνών στον διαμεμβρανικό χώρο. Τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς διακρίνονται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και θα αναλυθούν στις επόμενες παραγράφους.

### 3.3.1 Πρωτεΐνες με διπλό CX3C μοτίβο-η οικογένεια των μικρών Tim

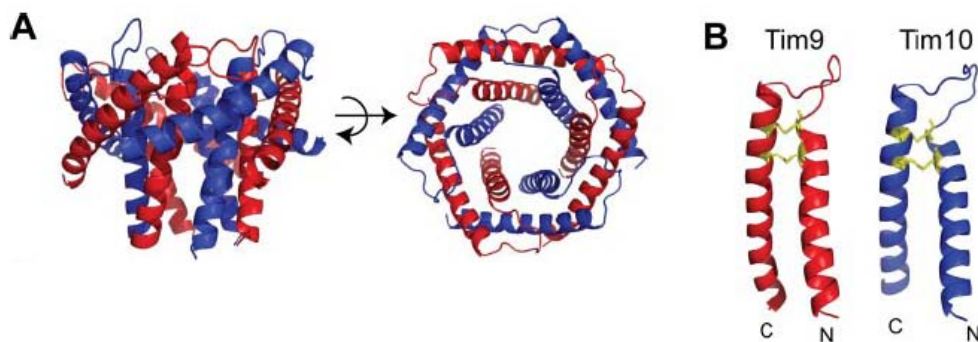
Οι μικρές Tim πρωτεΐνες ανήκουν σε μια οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών που τοποθετούνται στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. Μέλη αυτής της οικογένειας είναι οι πρωτεΐνες Tim8, Tim9, Tim10, Tim12, και Tim13 και είναι συντηρημένες σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά δεν εντοπίζονται σε προκαρυωτικούς (Bauer et al., 1999). Οι μικρές Tim πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα μεγέθους 70 kDa και λειτουργούν ως σαπερόνες του διαμεμβρανικού χώρου μεταφέροντας υδρόφοβες πρωτεΐνες στην εξωτερική ή εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου χωρίς την κατανάλωση ATP (Sirrenberg et al., 1998; Vasiljev et al., 2004). Συμμετέχουν στο μονοπάτι εισαγωγής πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη SAM (Wiedemann et al., 2004), αλλά και στο μονοπάτι TIM22 για εμπέδωση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη (Koehler et al., 1998a; Koehler et al., 1998b).

Δύο σύμπλοκα 70 kDa σχηματίζονται στον διαμεμβρανικό χώρο, το TIM10 και TIM8.13 (Murphy et al., 2001; Paschen et al., 2000). Το εξαμερές σύμπλοκο TIM10 σχηματίζεται μεταξύ τριών υπομονάδων Tim9 και τριών Tim10 και αντίστοιχα το TIM8.13 μεταξύ τριών υπομονάδων Tim8 και τριών Tim13. Το TIM10 σύμπλοκο στο μονοπάτι εισόδου TIM22 έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Tim12, Tim18, Tim22 και Tim54 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο 300 kDa στην εσωτερική μεμβράνη προκειμένου να υποβοηθήσει στην εμπέδωση υδρόφοβων υποστρωμάτων στην εσωτερική μεμβράνη (Leuenberger et al., 2003; Luciano et al., 2001; Wagner et al., 2008).

Στις πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών Tim απαντάται το διπλό CX3C μοτίβο, όπου οι κυστεΐνες περιέχουν τρία οποιαδήποτε αμινοξέα ανάμεσα τους. Το ένα μοτίβο από το άλλο μπορεί να απέχει 11-16 αμινοξέα. Το διπλό CX3C μοτίβο έχει προταθεί να αλληλεπιδρά με ιόντα ψευδαργύρου και πράγματι *in vitro* έχειδειχθεί ότι ανασυνδυασμένη Tim9 και Tim10 μπορούν να προσδέσουν ψευδάργυρο σε αναλογία 1:1 (Lu et al., 2004b). Επιπλέον έχει προταθεί ότι κατά την διάρκεια της σύνθεσης τους στο κυτταρόπλασμα δεσμεύουν ιόντα ψευδαργύρου με λειτουργικό σκοπό την παρεμπόδιση της αυθόρμητης οξειδωσης των κυστεϊνών (Morgan et al., 2009). Ωστόσο ο ρόλος του μετάλλου στην βιογένεση των μικρών Tim *in vivo* δεν έχει επιβεβαιωθεί. Αντίθετα, *in vitro* μελέτες θρυψινόλυσης έδειξαν ότι οι κυστεΐνες σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν την δομή της πρωτεΐνης (Allen et al., 2003). Η λύση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου TIM10 επιβεβαίωσε την ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών στην εκάστοτε μονομερής υπομονάδα. Πιο συγκεκριμένα οι κυστεΐνες του διπλού CX3C μοτίβου στα μικρά Tim οργανώνονται έτσι ώστε οι αντιπαράλληλες κυστεΐνες να σχηματίζουν δύο δισουλφιδικές γέφυρες (εικόνα 18) (Baker et al., 2009; Webb et al., 2006).

Χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη Tim10 ως μοντέλο αποδόθηκε διαφορετικός ρόλος στις δύο δισουλφιδικές γέφυρες. Με μεταλλαξιγένεση των εσωτερικών κυστεϊνών παρατηρήθηκε ότι η εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα που σχηματίζεται από τις κυστεΐνες 2 και 3 είναι σημαντική για την σταθεροποίηση της δομής της πρωτεΐνης και για την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το υπόστρωμα (Allen et al., 2003).

Η κρυσταλλική δομή για τα σύμπλοκα TIM10 του σακχαρομύκητα και του ανθρώπου όπως και το σύμπλοκο TIM13 του σακχαρομύκητα έχουν λυθεί (Baker et al., 2009; Webb et al., 2006). Η συνολική δομή και στις τρεις περιπτώσεις είναι πολύ όμοια. Οι υπομονάδες είναι αναδιπλωμένες σε μια διαμόρφωση έλικας-θηλιάς-έλικας (helix-coil-helix) που σταθεροποιείται από δύο δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των κυστεϊνών του διπλού CX3C μοτίβου όπως είχε αρχικά προβλεφθεί από μελέτες περιορισμένης πρωτεόλυσης με θρυψίνη. Οι κεντρικές θηλιές στο σύμπλοκο σχηματίζουν μια πεπλατυσμένη σχεδόν επίπεδη διαμόρφωση. Οι αντιπαράλληλες έλικες στην κάθε υπομονάδα είναι αρχικά σε επαφή σχηματίζοντας σπειρωμένες έλικες (coiled-coils) και στην συνέχεια αποκλίνουν. Συνολικά τα σύμπλοκα φαίνονται να διαμορφώνονται σε δομή α-προπέλας με έξι ελάσματα σε δευτεροταγή δομή α-έλικας (εικόνα 18).



**Εικόνα 18: Κρυσταλλική δομή του TIM10 συμπλόκου και των υπομονάδων Tim9, Tim10**

A) Το σύμπλοκο σε διάγραμμα κορδέλας όψη από το πλάι (αριστερά) και από πάνω (δεξιά). Η υπομονάδα Tim9 είναι με κόκκινο και η Tim10 με μπλε. B) Διάγραμμα κορδέλας των δύο υπομονάδων που σχηματίζουν δομή φουρκέτας με α-έλικες. Οι δισουλφιδικές γέφυρες που συγκρατούν τις α-έλικες φαίνονται με κίτρινο (Baker et al., 2009).

*In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένες περιοχές στις Tim πρωτεΐνες συμμετέχουν και επηρεάζουν την δημιουργία του συμπλόκου και την αλληλεπίδραση με το υδρόφοβο υπόστρωμα. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα φορτισμένα κατάλοιπα που βρίσκονται στις θηλιές του Tim10 και Tim9 είναι σημαντικά στην αλληλεπίδραση των δύο υπομονάδων υποδεικνύοντας ότι σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του συμπλόκου έχουν και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Baker et al., 2009; Vergnolle et al., 2007). Επιπλέον έχουν αποδοθεί διαφορετικοί ρόλοι στις υπομονάδες Tim9 και Tim10 όσον αφορά την συμμετοχή τους στον σχηματισμό του TIM10 συμπλόκου και την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη Tim10 αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα και μάλιστα μέσω της αμινοτελικής της περιοχής ενώ η πρωτεΐνη Tim9 προσδίδει δομική σταθερότητα στο TIM10 σύμπλοκο (Vergnolle et al., 2005).

Συνολικά τα *in vivo* και *in vitro* πειράματα στις μικρές Tim υπομονάδες υποδεικνύουν σε δύο κύριες προϋποθέσεις για την είσοδο και τοποθέτηση τους στον διαμεμβρανικό χώρο. Πρώτον είναι απαραίτητο τα υποστρώματα να βρίσκονται σε ανηγμένη κατάσταση για να εισέλθουν στο μιτοχόνδριο (Lu et al., 2004a) και δεύτερον χρειάζεται η οξείδωση των κυστεϊνών του διπλού CX3C μοτίβου για την παγίδευση τους στον διαμεμβρανικό χώρο και τον σχηματισμό του συμπλόκου σαπερόνης (Lu et al., 2004b). Ο ρόλος των κυστεϊνών στην αναδίπλωση της κάθε υπομονάδας είναι πολύ σημαντικός. Σε μεταλλαγή της τέταρτης κυστεϊνης στο ανθρώπινο ορθόλογο της πρωτεΐνης Tim8 αποδίδεται η εκδήλωση του συνδρόμου κώφωσης-δυστονίας (Hofmann et al., 2002; Roesch et al., 2002).

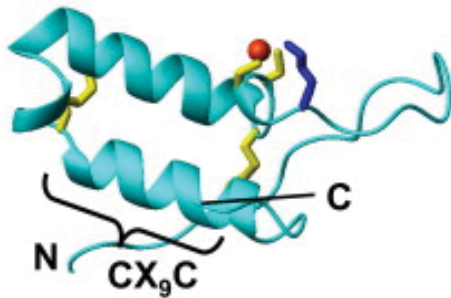


### 3.3.2 Πρωτεΐνες με διπλό CX9C μοτίβο

Στον διαμεμβρανικό χώρο εντοπίζονται και πρωτεΐνες που αναδιπλώνονται μέσω του διπλού CX9C μοτίβου όπου η μία κυστεΐνη από την άλλη απέχει 9 αμινοξέα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πολλές πρωτεΐνες της οικογένειας Cox που συμμετέχουν στον σχηματισμό του συμπλόκου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (CcO). Επιπλέον έχουν βρεθεί με υπολογιστικές μεθόδους πρωτεΐνες που περιέχουν το διπλό μοτίβο αλλά η δράση τους δεν είναι ακόμα γνωστή. Σε κάποιες από αυτές όπως στην Mic14 και Mic17 έχει επιβεβαιωθεί με *in organello* πειράματα ότι είναι πράγματι υποστρώματα του μονοπατιού της Mia40 (Gabriel et al., 2007). Στην κατηγορία των κυστεϊνών με διπλό μοτίβο CX9C ανήκει και η πρωτεΐνη Mia40 όμως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη θα αναλυθεί εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο.

Πάνω από 30 πρωτεΐνες χρειάζονται για το σχηματισμό του συμπλόκου CcO και συμμετέχουν στην σύνθεση και πρόσδεση της αίμης, μεταφορά και σύνδεση μετάλλου, και στην τελική ωρίμανση του συμπλόκου (Carr and Winge, 2003). Κάποιες από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου περιέχουν διπλό CX9C μοτίβο (Cox11, Cox12, Cox17, Cox19 και Cox23) ενώ η πιο καλά χαρακτηρισμένη είναι η Cox17. Η πρωτεΐνη Cox17 δρα ως σαπερόνη χαλκού στον διαμεμβρανικό χώρο και άμεσοι αποδέκτες είναι οι πρωτεΐνες Cox11 και Sco1 (Banci et al., 2008a; Horng et al., 2004). Η Cox17 περιέχει συνολικά έξι κυστεΐνες, οι τέσσερις εκ των οποίων αποτελούν το διπλό CX9C μοτίβο, ενώ οι υπόλοιπες δύο είναι συνεχόμενες στο αμινοτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι κυστεΐνες του διπλού CX9C μοτίβου παραθέτονται η μία απέναντι από την άλλη και οργανώνονται σε δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο ρόλος αυτών των κυστεϊνών φαίνεται να είναι δομικός μιας και σταθεροποιεί την πρωτεΐνη σε αναδιπλωμένη κατάσταση (Banci et al.,

2008b). Οι άλλες δύο κυστεΐνες που βρίσκονται κοντά στο αμινοτελικό άκρο είτε είναι οξειδωμένες είτε έχουν προσδεμένο χαλκό (I) και αποτελούν το πρώτο παράδειγμα πρόσδεσης μετάλλου από δύο συνεχόμενες κυστεΐνες (Arnesano et al., 2005; Banci et al., 2005).



**Εικόνα 19: Δομή της ανθρώπινης Cox17.**

Οι κυστεΐνες και οι δισουλφιδικοί δεσμοί φαίνονται με κίτρινο. Με κόκκινο φαίνεται το ιόν χαλκού (Cu(I)). Με μπλε φαίνεται η πλευρική ομάδα της λυσίνης 25 (Banci et al., 2009b).

Η δομή της πρωτεΐνης λύθηκε με NMR και έδειξε ότι οργανώνεται σε δύο αντιπαράλληλες  $\alpha$ -έλικες που σταθεροποιούνται από δύο δισουλφιδικές γέφυρες ακριβώς όπως στην περίπτωση των μικρών Tim (εικόνα 19) (Banci et al., 2008b). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ του διπλού CX9C μοτίβου είναι αρκετά σταθεροί και σπάνε παρουσία 20 mM DTT με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να είναι μερικώς αναδιπλωμένη. Η συγκεκριμένη παρατήρηση πιθανότατα υποδηλώνει ότι στο αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος η πρωτεΐνη βρίσκεται ξεδίπλωτη, απαραίτητη προϋπόθεση για της είσοδο της στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα οι κυστεΐνες που συμμετέχουν στην πρόσδεση μετάλλου είναι πολύ ευαίσθητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναγωγικού μέσου και όταν είναι οξειδωμένες μεταξύ τους δεν μπορούν να προσδέσουν μέταλλο. Μεταλλαξιγένεση των κυστεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσδεση μετάλλου προκαλεί θνησιμότητα σε κύτταρα σακχαρομύκητα που έχουν μεγαλώσει με μη-ζυμώσιμη πηγή άνθρακα και επιπλέον παρουσιάζουν πολύ χαμηλή δράση της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Heaton et al.,

2000). Επιπρόσθετα έχει δειχθεί ότι μια συντηρημένη λυσίνη στην θέση 25 βρίσκεται κοντά στο ιόν χαλκού και βοηθάει στην σταθεροποίηση του συνολικού αρνητικού φορτίου που προκύπτει από την πρόσδεση του ιόντος χαλκού στις κυστεΐνες (Banci et al., 2008b). Αντίστοιχο χαρακτηριστικό έχει βρεθεί και στην κυτταροπλασματική σαπερόνη χαλκού Atx1 και στην μιτοχονδριακή σαπερόνη χαλκού Cox11 όπου μια λυσίνη βοηθάει στην πρόσδεση του μετάλλου. Φαίνεται λοιπόν ότι η πρόσδεση και απελευθέρωση του χαλκού ελέγχεται από την οξειδωτική κατάσταση της πρωτεΐνης (Arnesano et al., 2001; Banci et al., 2004).

### 3.3.3 Άλλες πρωτεΐνες με δισουλφιδικούς δεσμούς

Στον διαμεμβρανικό χώρο υπάρχουν πρωτεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς αλλά δεν περιέχουν κάποιο συγκεκριμένο κυστεϊνικό μοτίβο. Η πρωτεΐνη Sod1 εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο αλλά και στο κυτταρόπλασμα και προστατεύει το κύτταρο από τις βλαπτικές επιπτώσεις των ανιόντων υπεροξειδίου (Fridovich, 1995; Sturtz et al., 2001). Το ενεργό ένζυμο βρίσκεται σε ομοδιμερή μορφή και περιέχει μια ενδομοριακή δισουλφιδική γέφυρα και ένα μόριο χαλκού και ψευδαργύρου προσδεμένο ανά μονομερές (Lamb et al., 2000). Για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Sod1 απαιτείται η πρόσδεση της σαπερόνης χαλκού Ccs1 η οποία επίσης περιέχει δύο δισουλφιδικές διασυνδέσεις, μια εκ των οποίων σε ένα συντηρημένο CX2C μοτίβο (Lamb et al., 1999). Και οι δύο πρωτεΐνες έχουν βρεθεί να επηρεάζονται από την απουσία της Mia40 στο διαμεμβρανικό χώρο (Reddehase et al., 2009).

Επιπλέον στον διαμεμβρανικό χώρο εντοπίζεται και η πρωτεΐνη Sco1 που συμμετέχει στην ωρίμανση του συμπλόκου κυτοχρωμικής οξειδάσης η οποία περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ ενός CX3C μοτίβου και οργανώνεται σε δομή

θειορεδοξίνης (Abajian and Rosenzweig, 2006; Balatri et al., 2003; Williams et al., 2005). Άλλο παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη Rieske FeS η οποία περιέχει μια δισουλφιδική γέφυρα που έχει προταθεί ότι σταθεροποιεί τη συστάδα σιδήρου-θείου (Leggate and Hirst, 2005). Η πρωτεΐνη Erv1 επίσης εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο, περιέχει τρεις δισουλφιδικές γέφυρες και δύο CX<sub>2</sub>C μοτίβα. Έχει καταλυτικό ρόλο στο οξειδοαναγωγικό μονοπάτι του μιτοχονδρίου και θα αναλυθεί εκτενέστερα στην επόμενη παράγραφο.

### 3.4 Η FAD εξαρτώμενη σουλφυδριλοξειδάση Erv1

Η ζωτικής σημασίας πρωτεΐνη Erv1 (essential for respiration and vegetative growth) βρέθηκε πρώτη φορά στον σακχαρομύκητα είναι 22 kDa και εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Η Erv1 φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες μέσα στο κύτταρο χωρίς να είναι γνωστός ακόμα ο ακριβής τρόπος δράσης. Βρέθηκε να είναι απαραίτητη για την λειτουργία της κυτταρικής αναπνοής, και για την κυτταρική ανάπτυξη (Lisowsky, 1992). Επιπλέον απουσία της πρωτεΐνης τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν απώλεια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και ανωμαλίες στην μορφολογία του μιτοχονδρίου (Becher et al., 1999; Lisowsky, 1994). Μέθοδοι φθορισμού και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν πως σε Erv1 θερμοευαίσθητο μετάλλαγμα η ικανότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης να σχηματίζει πτυχώσεις (cristae) ήταν σοβαρά ελαττωμένη. Επίσης ένας ακόμα ρόλος της Erv1 εντοπίζεται στον εφοδιασμό κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με προσχηματισμένα στο μιτοχόνδριο συσσωματώματα σιδήρου-θείου (Lange et al., 2001). Έλλειψη της Erv1 διακόπτει την *in vivo* ωρίμανση των κυτταροπλασματικών Fe/S πρωτεϊνών Leu1p και Rli1p, καθώς και οι δύο αυτές πρωτεΐνες απουσία της Erv1 δεν μπορούν να ενσωματώσουν το σίδηρο. Ωστόσο έλλειψη της Erv1 δεν είχε

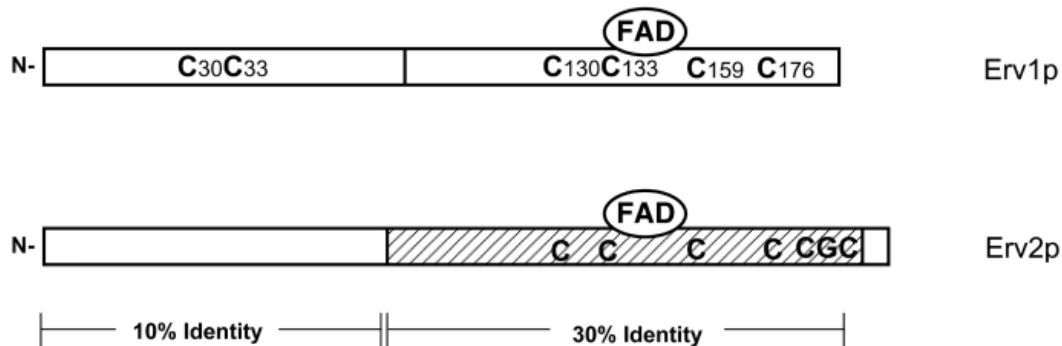
καμία επίδραση στις πρωτεΐνες Fe/S της μιτοχονδριακής μήτρας. Έχει προταθεί ότι η Erv1 αναλαμβάνει δράση στην ωρίμανση των Fe/S μετά την έξοδο τους από την μήτρα μέσω της πρωτεΐνης της εσωτερικής μεμβράνης Atm1 (Kispal et al., 1999). Επιπλέον σε κύτταρα όπου απουσιάζει η Erv1 υπάρχει πρόβλημα ωρίμανσης της αίμης, πιθανώς λόγω προβλήματος πρόσδεσης της αίμης στο κυτόχρωμα c και στη πρωτεΐνη Ccp1 (cytochrome c peroxidase) (Dabir et al., 2007). Παράλληλα τα επίπεδα πρωτεϊνών που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως των μικρών Tim, της Cox17 Sod1, Ccs1, είναι σημαντικά μειωμένα (Allen et al., 2005; Mesecke et al., 2005; Rissler et al., 2005). Τέλος το ορθόλογο της Erv1 στα θηλαστικά, ALR (augmenter of liver regeneration, έχει συσχετιστεί με την αναγέννηση συκωτιού με άγνωστο μηχανισμό (Giorda et al., 1996).

Η Erv1 ανήκει στην οικογένεια σουλφυδρυλοξειδασών Erv/ALR και ομόλογες του υπάρχουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, Erv2 (Gerber et al., 2001; Sevier et al., 2001; Stein and Lisowsky, 1998), στον εξωκυττάριο χώρο, Quiescin σουλφυδρυλοξειδάσες (Hoover et al., 1999; Hoover et al., 1996), και στην οικογένεια ιών rox, E10R (Senkevich et al., 2000; Senkevich et al., 2002). Το κοινό χαρακτηριστικό των σουλφυδρυλοξειδασών είναι ότι χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων, μέσω του προσδεμένου συμπαραγόντα FAD, για την οξείδωση υποστρωμάτων με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου ( $H_2O_2$ ) κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Coppock and Thorpe, 2006; Thorpe and Coppock, 2007). Κρυσταλλικές δομές σε ομόλογες πρωτεΐνες της Erv1, όπως της Erv2 στο σακχαρομύκητα και της Erv1 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας χαρακτηρίζονται από ένα καταλυτικό κέντρο περίπου 100 αμινοξέων το οποίο έχει μη-ομοιοπολικά προσδεμένο ένα φλαβινο αδενο δινουκλεοτίδιο (FAD) που σταθεροποιείται δομικά από τέσσερις συσσωρευμένες α-έλικες (Fass, 2008). Σε

γεινίαση με το ισοαλλοξαζινικό δακτύλιο του προσδεμένου FAD βρίσκεται το καταλυτικό ζευγάρι κυστεϊνών σε CX2C μοτίβο. Παράλληλα άλλο ένα ζεύγος κυστεϊνών είναι τοποθετημένα κοντά στο καταλυτικό κέντρο και ονομάζεται ζεύγος 'κίνησης' (shuttle pair). Το ζευγάρι αυτό μπορεί να βρίσκεται είτε σε αμινοτελικό ή σε καρβοξυτελικό άκρο ενώ η απόσταση από το καταλυτικό κέντρο αλλά και το μοτίβο στο οποίο είναι οργανωμένο το ζεύγος κυστεϊνών διαφοροποιείται στα μέλη της οικογένειας Ery/ALR. Στον σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* και στον άνθρωπο το ζεύγος κυστεϊνών κίνησης βρίσκεται σε CX2C μοτίβο στο αμινοτελικό άκρο ενώ στο φυτό *Arabidopsis thaliana* το ίδιο ζεύγος είναι σε μοτίβο CX4C στο καρβοξυτελικό άκρο (Levitani et al., 2004).

Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση αλλά και η λύση της δομής σε κάποια μέλη της οικογένειας Ery/ALR υποδεικνύουν σε ένα συγκεκριμένο τρόπο δράσης και οξειδωσης των υποστρωμάτων. Το ζεύγος 'κίνησης' φαίνεται να βρίσκεται σε περιοχή με μεγάλη ευελιξία και ως εκ τούτου έχει προταθεί ότι το ζεύγος μεταφέρει δισουλφιδικούς δεσμούς σε υποστρώματα. Επιπλέον έχει προταθεί ότι η περιοχή στην οποία βρίσκεται το ζεύγος κίνησης προσδίδει εξειδίκευση στα υποστρώματα στα διάφορα μέλη της οικογένειας Ery μιας και υπάρχουν διαφορές τόσο στα χαρακτηριστικά των υπόλοιπων αμινοξέων στην συγκεκριμένη περιοχή όσο και στον αριθμό των αμινοξέων που παρεμβάλλονται μεταξύ του ζεύγους των κυστεϊνών. Το ζεύγος κίνησης ανακυκλώνεται από το καταλυτικό δισουλφιδικό κέντρο το οποίο με την σειρά του μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο FAD και από εκεί στο οξυγόνο. Στην κρυσταλλική δομή της Ery2 το ζεύγος κίνησης CGC στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιγράφηκε ως τμήμα ενός ευλύγιστου χεριού και εντοπίστηκε σε δύο διαφορετικές καταστάσεις (Gross et al., 2002). Στη μία περίπτωση το CGC μοτίβο είναι τοποθετημένο πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο κυστεϊνών που βρίσκεται σε

γεινίαση με τον συμπαράγοντα FAD. Στην άλλη περίπτωση το CGC μοτίβο ήταν τοποθετημένο περίπου 10 Å μακριά από το καταλυτικό κέντρο. Φαίνεται λοιπόν πως το CGC μεσολαβεί και μεταφέρει δισουλφιδικούς δεσμούς από το ενδομοριακό καταλυτικό κέντρο στο υπόστρωμα (Collet and Bardwell, 2002).



**Εικόνα 20: Οργάνωση των κυστεϊνών στην Erv1, σύγκριση με την ομόλογη Erv2**

Το υψηλότερο ποσοστό ομολογίας των δύο πρωτεϊνών εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι κινητές κυστεϊνες στην Erv2 (CGC) εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο ενώ στην Erv1 οι C30C33 εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο. Το FAD και στις δύο πρωτεΐνες βρίσκεται κοντά στο ενεργό ζεύγος κυστεϊνών CXXC (Hofhaus et al., 2003).

Πρώιμες μελέτες ανέφεραν ότι η Erv1 συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικό μονοπάτι αλλά υποστρώματά της δεν είχαν ακόμα ταυτοποιηθεί (Hofhaus et al., 2003; Lee et al., 2000). Η πρωτεΐνη περιέχει 6 κυστεϊνες, τέσσερις εκ των οποίων είναι σε μοτίβο CX2C (εικόνα 20). Οι κυστεϊνες στο καρβοξυτελικό άκρο C159-C176 έχουν προταθεί ότι σταθεροποιούν το προσδεμένο FAD λόγω του ότι απομονωμένες εκδόσεις της Erv1 με σημειακές μεταλλάξεις στις καρβοξυτελικές κυστεϊνες αδυνατούν να δεσμεύσουν FAD (Hofhaus et al., 2003). Το ζεύγος κυστεϊνών C130-C133 είναι το καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης που μεταφέρει ηλεκτρόνια στο FAD ενώ το ζεύγος C30-C33 έχει προταθεί ότι αποτελεί τις κινητές κυστεϊνες σε αντιστοιχία με το ζεύγος CGC της Erv2 (Stein and Lisowsky, 1998). Ο υπολογισμός του οξειδωτικού δυναμικού για κάθε ένα από τα ζεύγη κυστεϊνών στην Erv1 συνηγορεί στην ενδομοριακή ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου με στόχο την ροή των ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στο FAD. Συγκεκριμένα για το προτεινόμενο κινητό

ζεύγος έχει βρεθεί τιμή -320 mV ενώ για το καταλυτικό κέντρο -150 mV (Dabir et al., 2007).

Το ζεύγος C30-C33 έχει προταθεί επίσης να συμμετέχει στον διμερισμό της πρωτεΐνης. Το συγκεκριμένο πόρισμα βασίζεται σε *in vitro* ανάλυση μεταλλαγμάτων απομονωμένης Ern1 σε μη αναγωγικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Η ομόλογη πρωτεΐνη Ern2 έχει κρυσταλλωθεί σε διμερής μορφή με το καρβοξυτελικό ζεύγος να συμμετέχει στο διμερισμό ενώ στην ομόλογη Ern1 των φυτών φαίνεται να είναι απαραίτητος ο διμερισμός για την λειτουργία της πρωτεΐνης (Levitan et al., 2004). Παρόλο που τα αποτελέσματα ομόλογων πρωτεϊνών συνηγορούν στην λειτουργική απαίτηση διμερούς Ern1, στα μιτοχόνδρια δεν έχει ανιχνευθεί διμερής μορφή.

Η λειτουργική δράση της Ern1 *in vitro* έχει μελετηθεί με τεχνητά υποστρώματα, όπως η λυσοζύμη και το DTT, κυρίως επειδή δεν έχουν βρεθεί αυθεντικά υποστρώματα (Hofhaus et al., 2003; Lee et al., 2000; Vitu et al., 2006). Το πρώτο αυθεντικό υπόστρωμα που βρέθηκε πρόσφατα είναι η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Mia40. Απουσία της Ern1 στα μιτοχόνδρια έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να είναι πιο ευαίσθητα σε DTT, αλλαγή της οξειδωτικής κατάστασης της Mia40 και σημαντική μείωση των επιπέδων πρωτεϊνών που εδρεύουν στον διαμεμβρανικό χώρο (Mesecke et al., 2005). Πώς όμως εμπλέκεται ακριβώς η Ern1 στην βιογένεση των πρωτεϊνών στον διαμεμβρανικό χώρο;

### **3.5 Ο οξειδοαναγωγικά ελεγχόμενος υποδοχέας του διαμεμβρανικού χώρου Mia40**

Η πρωτεΐνη Mia40 ήταν ανάμεσα στις μη-χαρακτηρισμένες ζωτικής σημασίας για το κύτταρο πρωτεΐνες που βρέθηκαν στο μιτοχονδριακό πρωτόμα με συστηματικό όνομα YKL195w. Η πρωτεΐνη του σακχαρομύκητα χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά

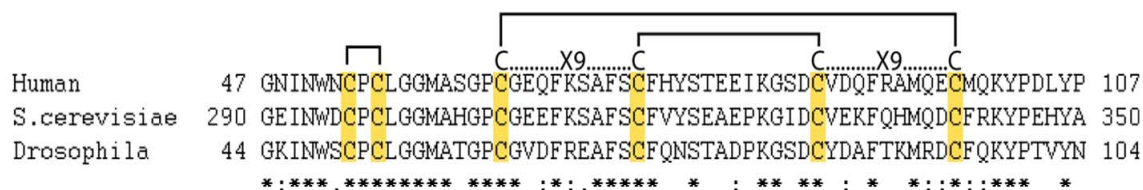


από το εργαστήριο του Pfanner και τους συνεργάτες του (Chacinska et al., 2004). Η Mia40 έχει μοριακό βάρος 44 kDa, με πολλά αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα γεγονός που την κάνει να μετατοπίζεται ως 64 kDa πρωτεΐνη σε SDS ηλεκτροφόρηση. Η ολιγομερής κατάσταση της ενδογενούς πρωτεΐνης δεν είναι ακόμα εξακριβωμένη. Πειράματα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης έχουν δείξει ότι το ανθρώπινο ομόλογο σχηματίζει διμερή και τετραμερή σύμπλοκα στα μιτοχόνδρια, ωστόσο η Mia40 στον σακχαρομύκητα μετατοπίζεται ιδιόμορφα σε πήκτωμα εγγενής ηλεκτροφόρησης σχηματίζοντας ζώνη 140 kDa που δεν άλλαζε ούτε παρουσία αναγωγικού μέσου ούτε με ισχυρά απορρυπαντικά (Chacinska et al., 2004; Hofmann et al., 2005; Naoe et al., 2004). Φαίνεται λοιπόν ότι οι συγκεκριμένες τεχνικές δεν είναι αξιόπιστες για την εξακρίβωση της ολιγομερής κατάστασης της ενδογενούς πρωτεΐνης.

Ομόλογες με την Mia40 πρωτεΐνες εντοπίζονται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από μύκητες σε φυτά και ζώα. Η πρωτεΐνη βρίσκεται είτε διαλυτή στον διαμεμβρανικό χώρο είτε αγκυροβολημένη στην εσωτερική μεμβράνη (Chacinska et al., 2004; Hofmann et al., 2005; Naoe et al., 2004; Terziyska et al., 2005). Η κύρια διαφορά στην πρωτοταγή δομή των ομόλογων πρωτεϊνών στην Mia40 εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο. Στο αμινοτελικό άκρο της Mia40 του σακχαρομύκητα υπάρχει μιτοχονδριακό αμφι-παθητικό σινιάλο που στοχεύει την πρωτεΐνη στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού της TIM23. Στην εσωτερική μεμβράνη διακόπτεται η μεταφορά της πρωτεΐνης (stop-transfer) και αποκόπτεται η αμφι-παθητική έλικα από την πρωτεάση MPP1 της μήτρας με αποτέλεσμα να εμπεδώνεται πλευρικά στην εσωτερική μεμβράνη. Ωστόσο η αγκυροβόληση της Mia40 στην εσωτερική μεμβράνη δεν είναι απαραίτητη για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Απαλοιφή του συγκεκριμένου τμήματος δεν είναι θνησιγόνα σε κύτταρα σακχαρομύκητα

(Chacinska et al., 2008; Naoe et al., 2004). Παράλληλα σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το σινιάλο στόχευσης της Mia40 απουσιάζει και η πρωτεΐνη εντοπίζεται διαλυτή στον διαμεμβρανικό χώρο γεγονός που υποδεικνύει ότι το λειτουργικό τμήμα της Mia40 εντοπίζεται στην συντηρημένη περιοχή μεταξύ των ομόλογων της Mia40.

Το συντηρημένο τμήμα που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο παρουσιάζει πάνω από 60% ομολογία και σε αυτό εντοπίζονται έξι συντηρημένες κυστεΐνες οργανωμένες σε διπλό CX9C μοτίβο και σε ένα CPC μοτίβο (εικόνα 21) των οποίων οι μεταλλάξεις κρίνονται θνησιγόνες για το κύτταρο (Naoe et al., 2004; Terziyska et al., 2009). Με περιορισμένη θρυψινόλυση και φασματομετρία μάζας έχειδειχθεί ότι οι κυστεΐνες του διπλού CX9C μοτίβου οργανώνονται αντι-παράλληλα, δηλαδή η πρώτη κυστεΐνη σχηματίζει μια εξωτερική δισουλφιδική γέφυρα με την τέταρτη κυστεΐνη ενώ οι εσωτερικές 2 και 3 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Grumbt et al., 2007). Αντίθετα οι κυστεΐνες του μοτίβου CPC σχηματίζουν έναν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ τους που σπάει εύκολα σε χαμηλές συγκεντρώσεις DTT. Οι δύο δισουλφιδικές γέφυρες του CX9C μοτίβου είναι αρκετά σταθερές μιας και επώαση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης σε υψηλή θερμοκρασία είναι προϋπόθεση για να αναχθεί πλήρως η πρωτεΐνη με 20 mM DTT (Banci et al., 2009a; Grumbt et al., 2007). Δεν μπορεί να αποκλειστεί και η περίπτωση να παίζει ρόλο στην αναδίπλωση ή την οργάνωση της Mia40 σε ανώτερα σύμπλοκα η πρόσδεση μετάλλων. Απομονωμένη ανασυνδυσμένη Mia40 σε ανηγμένη κατάσταση έχειδειχθεί ότι μπορεί να δεσμεύσει ιόντα ψευδαργύρου και χαλκού μέσω των ελεύθερων κυστεϊνών και μάλιστα παρουσία μετάλλου η πρωτεΐνη είναι λιγότερο ευαίσθητη σε πρωτεόλυση (Terziyska et al., 2005).



**Εικόνα 21: Ευθυγράμμιση ομόλογων πρωτεϊνών της Mia40.**

Με κίτρινο φαίνονται οι συντηρημένες κυστεΐνες, ενώ με γραμμές φαίνεται ο τρόπος διασύνδεσης των κυστεϊνών. Το διπλό μοτίβο CX9C αναγράφεται πάνω από τις αντίστοιχες κυστεΐνες. Η ευθυγράμμιση έγινε με το πρόγραμμα ClustalW.

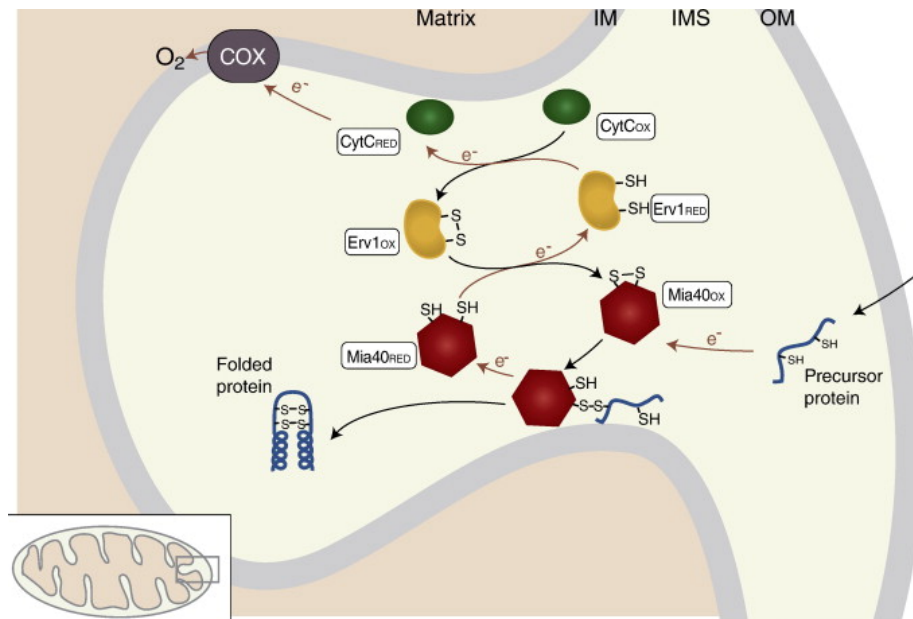
Η Mia40 αποτελεί κεντρικό παράγοντα ενός μονοπατιού υπεύθυνου για την είσοδο και οργάνωση μιας πλειάδας πρωτεϊνών στον διαμεμβρανικό χώρο μιτοχονδρίων. Το κοινό χαρακτηριστικό των υποστρώματα του μονοπατιού είναι ότι περιέχουν κυστεΐνες και παγιδεύονται στον διαμεμβρανικό χώρο μέσω οξειδωτικής αναδίπλωσης (βλέπε ενότητα 4.3 για πιο λεπτομερή ανάλυση των υποστρωμάτων). Απουσία της πρωτεΐνης Mia40 στα μιτοχόνδρια προκαλεί σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων σε πρωτεΐνες με CXnC μοτίβο (Chacinska et al., 2004; Mesecke et al., 2005). Επιπλέον τα υποστρώματα δεν εισέρχονται σε απομονωμένα μιτοχόνδρια όπου απουσιάζει η ενδογενής Mia40 γεγονός που υποδεικνύει ότι η Mia40 έχει ρόλο υποδοχέα στον διαμεμβρανικό χώρο. Παράλληλα η Mia40 έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά μέσω παροδικών δισουλφιδικών δεσμών με πρωτεΐνες που στοχεύονται στον διαμεμβρανικό χώρο και περιέχουν δισουλφιδικές διασυνδέσεις, όπως για παράδειγμα με τα μέλη της οικογένειας των μικρών Tim (Gabriel et al., 2007; Mesecke et al., 2005; Milenkovic et al., 2007a; Sideris and Tokatlidis, 2007; Terziyska et al., 2007). Τέλος τα υποστρώματα δεν μετατοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων παρουσία ισχυρών αναγωγικών μέσων που παρεμποδίζουν την δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συγκλίνουν σε ένα ρόλο της Mia40 ως υποδοχέα του διαμεμβρανικού χώρου που προάγει την οξειδωτική αναδίπλωση υποστρωμάτων μέσω μεταφοράς δισουλφιδικών δεσμών.

### 3.6 Μονοπάτι ανταλλαγής δισουλφιδίων στον διαμεμβρανικό χώρο

Αρκετά δεδομένα συνηγορούν στην ύπαρξη ενός καλά οργανωμένου μονοπατιού που εισάγει δισουλφιδικούς δεσμούς σε υποστρώματα. Το μεγαλύτερο μέρος της Mia40 βρίσκεται σε οξειδωμένη κατάσταση στα μιτοχόνδρια. Έχειδειχθεί ότι η Ern1 επηρεάζει την οξειδωτική κατάσταση της Mia40, συγκεκριμένα απουσία της Ern1 η Mia40 είναι μερικώς ανηγμένη (Mesecke et al., 2005). Επίσης απουσία Ern1 στα μιτοχόνδρια παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων υποστρωμάτων του μονοπατιού της Mia40. Επιπλέον απουσία της Ern1 στα μιτοχόνδρια επηρεάζει αρνητικά την δημιουργία μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων των υποστρωμάτων με την Mia40. Παράλληλα σε σταθερές κυτταρικές συνθήκες, η Mia40 σε ποσοστό 5% βρίσκεται σε ομοιοπολικό σύμπλοκο με την Ern1 (Mesecke et al., 2005). *In vitro* πειράματα ανασυγκρότησης της αλληλεπίδρασης έχουν δείξει ότι η Ern1 μπορεί να οξειδώσει το CPC μοτίβο της Mia40 (Terziyska et al., 2009). Φαίνεται λοιπόν πως ο ρόλος της Ern1 δεν είναι άμεσος όσον αφορά στην αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την Mia40 αλλά έμμεσος επηρεάζοντας την οξειδωτική κατάσταση της Mia40. Δύναται λοιπόν η Ern1 να αποτελεί τον παράγοντα οξείδωσης της Mia40 στον διαμεμβρανικό χώρο του κυττάρου.

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στην ύπαρξη ενός μονοπατιού οξειδοαναγωγής στον διαμεμβρανικό χώρο (εικόνα 22) που οδηγεί στην οξειδωτική αναδίπλωση των υποστρωμάτων. Τα υποστρώματα εισάγονται μέσω της εξωτερικής μεμβράνης στα μιτοχόνδρια σε ανηγμένη ξεδίπλωτη κατάσταση όπου αναγνωρίζονται από τον οξειδοαναγωγικά ελεγχόμενο (redox regulated) υποδοχέα Mia40. Στην συνέχεια σχηματίζεται μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ του υποστρώματος και της Mia40 γεγονός που οδηγεί στην οξείδωση και απελευθέρωση του υποστρώματος σε

αναδιπλωμένη μορφή. Το υπόστρωμα οξειδωμένο και αναδιπλωμένο πλέον παγιδεύεται στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και οργανώνεται σε λειτουργικό σύμπλοκο (πχ σύμπλοκο TIM10 στην περίπτωση των μικρών Tim, ή πρόσδεση μετάλλων όπως στην περίπτωση της Cox17).



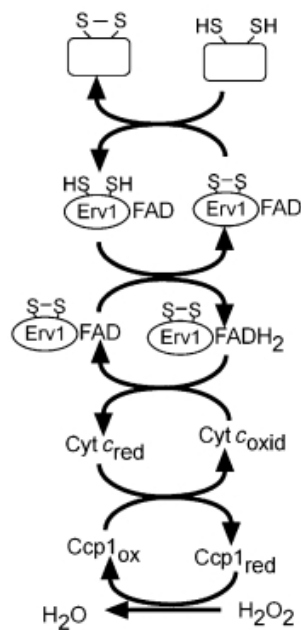
**Εικόνα 22: Οξειδοαναγωγικό μονοπάτι στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου.**

Το νέο-εισερχόμενο υπόστρωμα (μπλε) σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 (κόκκινο) και τελικά απελευθερώνεται σε οξειδωμένη αναδιπλωμένη μορφή. Η Mia40 επανοξειδώνεται από την Erv1 (κίτρινο) ενώ τα ηλεκτρόνια μέσω του κυτοχρώματος c τελικά καταλήγουν στο οξυγόνο (Stojanovski *et al.*, 2008b).

Επακόλουθο της παραπάνω αντίδρασης ανταλλαγής δισουλφιδικού δεσμού με διθειόλη, είναι η Mia40 να απελευθερώνεται σε ανηγμένη μορφή. Η οξειδωμένη μορφή της Mia40 ανακυκλώνεται από την Erv1 και καθίσταται έτσι, ικανή για έναν νέο κύκλο οξείδωσης μέσω ανταλλαγής δισουλφιδικών δεσμών. Το μοντέλο που παρουσιάζεται στην εικόνα είναι απλοποιημένο βάση των πειραματικών ενδείξεων που υπάρχουν ως τώρα. Στην πραγματικότητα μπορεί να είναι πιο σύνθετο από αυτό που περιγράφεται. Σε πειράματα ανασύστασης του μονοπατιού σε αερόβιες συνθήκες *in vitro*, έχει παρατηρηθεί ότι επώαση ανηγμένου υποστρώματος με καταλυτικές ποσότητες οξειδωμένης Mia40 και Erv1 οδηγεί στην πλήρη οξείδωση

του υποστρώματος και της Mia40 (Grumbt et al., 2007; Terziyska et al., 2009; Tienson et al., 2009). Φαίνεται λοιπόν ότι μόνο αυτά τα τρία στοιχεία είναι αρκετά για την ανασυγκρότηση του οξειδωαναγωγικού μονοπατιού στα μιτοχόνδρια.

Ποιος όμως είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στο μονοπάτι οξείδωσης των υποστρωμάτων; Είδαμε ότι η Erv1 λειτουργεί στην ανακύκλωση της οξειδωμένης μορφής της Mia40, πως όμως ανακυκλώνεται η ίδια; Η Erv1 ως σουλφυδριλοξειδάση έχειδειχθεί ότι μεταφέρει μέσω του FAD ηλεκτρόνια στο οξυγόνο με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (εικόνα 23) (Bihlmaier et al., 2007; Dabir et al., 2007; Lee et al., 2000).



**Εικόνα 23:** Ροή ηλεκτρονίων από την Erv1 στο οξυγόνο μέσω του κυτόχρωματος c (Dabir et al., 2007).

Ωστόσο για την ανθρώπινη ομόλογη πρωτεΐνη της Erv1, ALR, έχειδειχθεί ότι το κυτόχρωμα c είναι 100 φορές καλύτερος δέκτης ηλεκτρονίων σε σχέση με το οξυγόνο γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι και η Erv1 στα μιτοχόνδρια χρησιμοποιεί το κυτόχρωμα c και μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας να ανακυκλώνεται (Allen et al., 2005; Farrell and Thorpe, 2005). Πειραματικές μελέτες επιβεβαίωσαν την άμεση αλληλεπίδραση της Erv1 με το κυτόχρωμα c *in vivo* και *in vitro*. Επιπλέον

επηρεάζοντας την οξειδωτική κατάσταση του κυτοχρώματος χρησιμοποιώντας με εξωγενής παράγοντες αναστολής της αναπνευστικής αλυσίδα, επηρεάζεται και η οξειδωτική κατάσταση της Mia40 (Bihlmaier et al., 2007).

Φαίνεται λοιπόν πως το κυτόχρωμα c και η αναπνευστική αλυσίδα αποτελούν τον τελευταίο κρίκο στο μονοπάτι οξείδωσης των νέο-εισερχομένων υποστρωμάτων στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (εικόνα 23). Απαραίτητη προϋπόθεση βέβαια για την ολοκλήρωση του μονοπατιού είναι η παρουσία οξυγόνου. Απουσία οξυγόνου το μονοπάτι πιθανότατα να αξιοποιεί άλλα κυτοχρώματα, όπως το Cys7, που υπερεκφράζεται σε αναερόβιες συνθήκες για την μεταφορά ηλεκτρονίων. Έχει προταθεί ότι η σύνδεση του μονοπατιού της Mia40 με την αναπνευστική αλυσίδα να χρειάζεται για να είναι πιο αποδοτικό το σύστημα οξειδοαναγωγής και επιπλέον για να αποφεύγεται η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στον διαμεμβρανικό χώρο (Bihlmaier et al., 2007).

### 3.7 Ομοιότητες με τα υπόλοιπα κυτταρικά συστήματα οξειδοαναγωγής

Το οξειδοαναγωγικό σύστημα στα μιτοχόνδρια έχει αρκετές ομοιότητες με το σύστημα στο βακτηριακό περίπλασμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στο περίπλασμα, όπως περιγράψαμε στην ενότητα 2.2 η DsbA εισάγει δισουλφιδικούς δεσμούς στα υποστρώματα ενώ η ίδια ανακυκλώνεται από την DsbB και ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Σε αναλογία με αυτό το σύστημα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο η FAD-εξαρτώμενη Ero1, οξειδώνει την PDI που με την σειρά της εισάγει δισουλφιδικούς δεσμούς στα υποστρώματα. Παρόλο που η Mia40 δεν έχει καμία δομική ομοιότητα με τις αντίστοιχες DsbA και PDI που φέρουν μοτίβο αναδίπλωσης θειορεδοξίνης, φαίνεται να τελούν την ίδια λειτουργία σε διαφορετικά όμως οργανίδια. Φαίνεται λοιπόν πως

το μιτοχονδριακό οξειδοαναγωγικό σύστημα βασίζεται στις ίδιες θεμελιώδεις αρχές με τα συστήματα του ενδοπλασματικού δικτύου και περιπλάσματος.

Πρώτον και τα τρία συστήματα αποτελούνται από δύο πρωτεΐνες με σκοπό την μεταφορά δισουλφιδικών δεσμών στο υπόστρωμα. Δεύτερον, ενδομοριακές ανταλλαγές θειόλης-δισουλφιδίου χρησιμοποιούνται και από την Ern1, και από την Ero1 αλλά και από την DsbB προκειμένου να μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια σε δέκτες ηλεκτρονίων που δεν περιέχουν θειόλες. Επιπλέον η τετραπλή δεσμίδα από α-έλικες (four helix bundle) στο καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι ένα συντηρημένο δομικό μοτίβο που απαντάται και στην οικογένεια Ern/ALR και στην Ero1 αλλά και στην DsbB παρόλο που η συγκεκριμένη δεν έχει περιέχει τον συμπαραγόνα FAD στο ενεργό της κέντρο. Τέλος, σε όλα τα συστήματα ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο ενώ σε αναερόβιες συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιήσουν εναλλακτικούς τερματικούς δέκτες. Το μιτοχονδριακό και το περιπλασματικό σύστημα οξειδοαναγωγής συνδέονται με την αναπνευστική αλυσίδα ενώ η μόνη διαφορά τους έγκειται στο ότι οι κινόνες δέχονται 2 ηλεκτρόνια ενώ το κυτόχρωμα c στο μιτοχόνδριο προσδένει μόνο ένα. Μελλοντικά θα έχει ενδιαφέρον να εξετασθεί αν στο μιτοχόνδριο υπάρχει ξεχωριστό μονοπάτι ισομερίωσης όπως μέσω του DsbC/DsbD στο βακτηριακό περίπλασμα ή αν η Mia40 έχει και ρόλο ισομερίωσης όπως η PDI στο ενδοπλασματικό δίκτυο.



## **ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΟΠΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη των μηχανιστικών παραμέτρων που ορίζουν την αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων με την οξειδάση του διαμεμβρανικού χώρου Mia40. Συγκεκριμένα η διατριβή κινείται σε τρία πλαίσια: (1) μελέτη της τρόπου δράσης της Mia40 στα υποστρώματα και δομικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης, (2) εύρεση των στοιχείων στο υπόστρωμα που καθορίζουν την αλληλεπίδραση και οξείδωση τους από την Mia40, και (3) προσδιορισμός του σινιάλου στόχευσης των υποστρωμάτων στο μιτοχόνδριο μέσω του μονοπατιού της Mia40.

(1) Προκειμένου να μελετήσουμε τον τρόπο δράσης της Mia40, εστίασαμε στην πρωτεΐνη και στοχεύσαμε στην ανάλυση του ακριβή μηχανισμού με τον οποίο αλληλεπιδρά και αναγνωρίζει τα νέο-εισερχόμενα υποστρώματα. Αρχικά απομονώσαμε και χαρακτηρίσαμε την ανασυνδυασμένη Mia40 και αναπτύξαμε μια πειραματική τεχνική ελέγχου της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια με σκοπό τον προσδιορισμό του καταλυτικού κέντρου της οξειδάσης εξετάσαμε τον λειτουργικό ρόλο των συντηρημένων κυστεϊνών της Mia40 μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης τα οποία ελέγξαμε σε πειράματα αλληλεπίδρασης με διαφορετικά είδη υποστρωμάτων. Σε συνεργασία με το εργαστήριο του I.Bertini (Magnetic Resonance Center CERM, University of Florence, Italy) χαρακτηρίσαμε δομικά την απομονωμένη πρωτεΐνη με NMR και προσδιορίσαμε την περιοχή πρόσδεσης των υποστρωμάτων. Συνολικά τα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά αποτελέσματα στηρίζουν βιοχημικά την λειτουργική πληροφορία που αντλούμε από την δομή της Mia40, και αποσαφηνίζουν την διαδικασία οξειδωτικής αναδίπλωσης των υποστρωμάτων σε μοριακό επίπεδο.

(2) Στο δεύτερο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων ερευνήσαμε ποιά στοιχεία του υποστρώματος καθορίζουν την ομοιοπολική αλληλεπίδραση με την Mia40. Αρχικά αναπτύξαμε μια πειραματική διαδικασία που επιτρέπει την παρακολούθηση σχηματισμού διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού της Mia40 με το πρόδρομο υπόστρωμα *in organello*. Χρησιμοποιήσαμε ως μοντέλο υπόστρωμα το Tim10 και Με την δημιουργία σημειακών μεταλλαγών των κυστεϊνών σε σερίνες μελετήσαμε ποια κυστεϊνικά κατάλοιπα του υποστρώματος είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με την Mia40. Πραγματοποιώντας μεταλλαξιγένεση και σε άλλα υποστρώματα της Mia40 καταλήξαμε σε ένα γενικότερο μηχανισμό πρόσδεσης του υποστρώματος στην Mia40 που πραγματοποιείται σε ευδιάκριτα στάδια.

(3) Τέλος προσδιορίσαμε τα χαρακτηριστικά που καθοδηγούν το υπόστρωμα στο διαμεμβρανικό χώρο και τοποθετούν μη-ομοιοπολικά το ενεργό κέντρο της οξειδάσης Mia40 σε συγκεκριμένο κυστεϊνικό κατάλοιπο του υποστρώματος. Προσδιορίσαμε την αλληλουχία στόχευσης πραγματοποιώντας ελλείψεις σε υποστρώματα της Mia40 και ελέγχοντας την ικανότητα εισόδου και αλληλεπίδρασης με την Mia40 στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στο σινιάλο στόχευσης προσδιορίσαμε τα αμινοξέα που είναι κρίσιμα για την αναγνώριση του υποστρώματος από την Mia40. Τέλος πραγματοποιώντας θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης προσδιορίσαμε την συγγένεια των δύο πρωτεϊνών και ταυτοποιήσαμε την φύση της μη-ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης. Συνολικά από αυτή την μελέτη προκύπτει ότι στα υποστρώματα του μονοπατιού της Mia40 υπάρχει σινιάλο στόχευσης για τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και επιπλέον ότι αυτό το σινιάλο καθορίζει και οριοθετεί την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος στην Mia40 σε στάδιο που προηγείται του σχηματισμού του διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού.

## **ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 4.1 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

### 4.1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Οι μοριακές τεχνικές εκτελέστηκαν με βάση τα εργαστηριακά εγχειρίδια ‘Molecular Cloning’ (J.Sambrook, E.F. Fritsch, T.Maniatis) και ‘Current Protocols in Molecular Biology’ (F.Ausubel, R.Brent, R.Kingston, D.Moore, J.Seidman, J.Smith, K.Struhl). Στην παρούσα διατριβή για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5α και πλασμιδιακοί φορείς της Novagen (pET), Promega (pSP64-65, polyA), Amersham (pGEX4T-1). Όλες οι κατασκευές ελέγχθηκαν με περιοριστική ανάλυση και αλληλούχιση του DNA.

### 4.1.2 Κλωνοποιήσεις

Οι κατασκευές των πλασμιδιακών φορέων έγιναν με PCR και χρήση περιοριστικών ενζύμων (συνολικά τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν φαίνονται στον πίνακα 1). Γενικά για την κλωνοποίηση της Mía40 και των κατασκευών ελλείψεων χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές και τα ένζυμα BamHI/EcoRI για τους φορείς pSP64, pRS316-UP40 και pGEX4T-1. Ο ενδογενής υποκινητής της Mía40 (UP40) κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pRS316 χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα XbaI/BamHI. Για την κλωνοποίηση στον pET22 με επίτοπο 6 x His στο καρβοξυτελικό άκρο και στόχευση στο περίπλασμα κατασκευάστηκε reverse εκκινητής χωρίς το κωδικόνιο λήξης που φέρει την αλληλουχία για το περιοριστικό ένζυμο XhoI. Ο forward εκκινητής κατασκευάστηκε με μια επιπλέον βάση έτσι ώστε να αξιοποιηθεί η περιοριστική θέση BamHI και να διορθωθεί το αναγνωστικό πλαίσιο (reading frame).

Το γονίδιο Tim10 και οι κατασκευές ελλείψεων κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα (polyA-pSP64, Promega) που φέρει polyA άκρο έτσι ώστε να ενισχυθεί η σταθερότητα του mRNA κατά την διάρκεια του *in vitro* transcription/translation. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν περιοριστικές θέσεις BamHI/SacI. Για την συνένωση του σινιάλου στόχευσης cytochrome b2 στα γονίδια Tim10 και Tim12 χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που πολλαπλασιάζουν τα 85 πρώτα αμινοξέα του γονιδίου cyb2 από το πλασμίδιο pSM4 (δώρο από Ben Glick, Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, Chicago, IL, U.S.A.) χρησιμοποιώντας εκκινητές που φέρουν τις περιοριστικές αλληλουχίες BamHI/BamHI. Ο προσανατολισμός ένθεσης ελέγχθηκε με PCR και αλληλούχιση.

Τέλος οι κατασκευές που φέρουν το σινιάλο στόχευσης 32-40 ITS Tim10 κατασκευάστηκαν με ένθεση στο forward εκκινητή της περιοριστικής θέσης BamHI, της αλληλουχίας του ITS και 15 βάσεων ομόλογες του γονιδίου στο οποίο θέλαμε να κάνουμε την ένθεση του αμινοτελικού άκρου χωρίς το κωδικόνιο έναρξης ATG. Οι κατασκευές ITS-DHFR και ITS-YFP έγιναν με τον ίδιο τρόπο και πολλαπλασιάστηκαν με PCR από τους φορείς pQE16-DHFR και pRSET-YFP (δώρο από Τάσο Οικονόμου, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Crete, Greece) αντίστοιχα. Για την κατασκευή που φέρει το ITS Tim10 στο καρβοξυτελικό άκρο σχεδιάστηκε reverse εκκινητής που φέρει την περιοριστική αλληλουχία EcoRI, την ITS αλληλουχία σε 5'-3' προσανατολισμό, και 15 βάσεις συμπληρωματικότητα με το 3' άκρο του γονιδίου χωρίς το κωδικόνιο λήξης. Ως forward εκκινητής χρησιμοποιήθηκε αυτός που εισάγει την έλλειψη ΔN39Tim10 με περιοριστική θέση BamHI.

4.1.3 Μεταλλαξιγένεση

Για την δημιουργία σημειακών μεταλλαγών σε οποιοδήποτε γονίδιο χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο QuickChange site-directed mutagenesis και έγινε βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (Stratagene).

**Πίνακας 1: Πίνακας περιγραφής πλασμιδίων**

Gene Description	Vector	Reference
Mia40 wt	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 DN67	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 DN244	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 DN290	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 SPS	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 SPC	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 CPS	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 I292/W294A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 L299/M302A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 F311/F315A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 F334/M337A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40, pET22	this study
Mia40 I292/W294/F311/F315A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Mia40 L299/M302/F311/F315A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Mia40 F311/F315/F334/M337A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Mia40 I292/W294/L299/M302/F311/F315A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Mia40 I292/W294/F311/F315/F334/M337A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Mia40 L299/M302/F311/F315/F334/M337A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Mia40 I292/W294/L299/M302/F311/F315/F334/M337A	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Mia40 DN244 SPS	pET22	this study
Mia40 DN244 SPC	pET22	this study
Mia40 DN290 SPS	pET22	this study
Mia40 DN290 SPC	pET22	this study
Mia40 DN67 SPS	pGEX4T-1	this study
Mia40 DN67 SPC	pGEX4T-1	this study
Mia40 DN67 CPS	pGEX4T-1	this study
hMia40	pSP64, pGEX4T-1, pRS316/UP40	this study
Tim10 wt	pSP64, pGEX4T-1	Allen et al.
Tim10 C40S	pSP64	Allen et al.
Tim10 C44S	pSP64	Allen et al.
Tim10 C61S	pSP64	Allen et al.
Tim10 C65S	pSP64	Allen et al.
Tim10 C40/C61S	pSP64	this study
Tim10 C40/C65S	pSP64	this study
Tim10 C44/C61S	pSP64	this study
Tim10 C44/C65S	pSP64	this study
Tim10 C44/C61/C65S	pSP64, pGEX4T-1	this study
Tim10 C40/C44/C61/C65S	pSP64, pGEX4T-1	this study
Tim10 DN14	pSP64, pGEX4T-1	Vergnolle et al.
Tim10 DN31	polyA-pSP64, pGEX4T-1	this study
Tim10 DN39	polyA-pSP64, pGEX4T-1	this study
Tim10 DC21	pSP64, pGEX4T-1	Vergnolle et al.
Tim10 DC33	pSP64, pGEX4T-1	this study
Tim10 DC43	polyA-pSP64, pGEX4T-1	this study
cyb2(1-85)DN39Tim10	pSP64	this study
DN39Tim10-ITS	pSP64	this study
Tim10 M32/N34A (2Ala)	pSP64	this study
Tim10 M32/F33/N34/K35A (4Ala)	pSP64	this study

Tim10 M32/F33/N34/K35/L36/N38A (6A1a)	pSP64	this study
Tim10 M32/F33/N34/K35/L36/V37N38A (7A1a)	pSP64	this study
Tim10 F33A	pSP64	this study
Tim10 K35A	pSP64	this study
Tim10 L36A	pSP64	this study
Tim10 F33/L36A	pSP64	this study
Tim10 N38/N39A	pSP64	this study
Tim10 L36C/C40/C44/C61/C65S	pSP64	this study
Tim10 V37C/C40/C44/C61/C65S	pSP64	this study
Tim10 N38C/C40/C44/C61/C65S	pSP64	this study
Tim10 N39C/C40/C44/C61/C65S	pSP64	this study
Tim10 Y41C/C40/C44/C61/C65S	pSP64	this study
Tim10 K42C/C40/C44/C61/C65S	pSP64	this study
Tim10 K43C/C40/C44/C61/C65S	pSP64	this study
Tim10 C40/C61/C65S	pSP64	this study
Tim9 wt	pSP64	Allen et al.
Tim9 C35S	pSP64	this study
Tim9 C39S	pSP64	this study
Tim9 C55S	pSP64	this study
Tim9 C59S	pSP64	this study
Tim9 DN23	pSP64	this study
Tim9 DN34	pSP64	this study
Tim9 DC21	pSP64	Vergnolle et al.
Tim12 wt	pSP64	Vergnolle et al.
Tim12 C30S	pSP64	De Marcos
Tim12 C30/C61S	pSP64	De Marcos
Tim12 C40S	pSP64	this study
Tim12 DN28	pSP64	Lionaki et al.
Tim12 DN39	pSP64	this study
cytb2(1-85)DN28Tim12	pSP64, pRS316/UP12	Lionaki et al.
cytb2(1-85)DN39Tim12	pSP64, pRS316/UP12	this study
hCox17wt	pSP64	this study
hCox17 C26S	pSP64	this study
hCox17 C36S	pSP64	this study
hCox17 C45S	pSP64	this study
hCox17 C55S	pSP64	this study
hCox17 C36/C45S	pSP64	this study
hCox17 C26/C55S	pSP64	this study
hCox17 C26/C45/C55S	pSP64	this study
hCox17 C26/C36/C55S	pSP64	this study
hCox17 C36/C45/C55S	pSP64	this study
hCox17 L48/I49A	pSP64	this study
hCox17 L48/I49/H52A	pSP64	this study
Sue	pSP65	Petrakis et al.
DN23 Sue	pSP65	Petrakis et al.
ITS(31-40Tim10)-DN23-C28S-Sue	pSP64	this study
ITS(31-40Tim10)-DHFR	pSP64	this study
F33A ITS-DHFR	pSP64	this study
ITS(31-40Tim10)-YFP	pSP64, pcDNA3, pRS316/UP40	this study
ITS(23-40Tim10)-YFP	pSP64, pcDNA3, pRS316/UP40	this study
ITS(25-35Tim9)-YFP	pSP64, pcDNA3, pRS316/UP40	this study
YFP	pSP64, pcDNA3	this study
(1-30)AAC-DHFR	pSP64	Vergnolle et al.



## 4.2 *In organello* τεχνικές

### 4.2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων

Για τα πειράματα εισόδου πρόδρομης πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια από το αγρίου τύπου στέλεχος του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, D273-10B (MAT $\alpha$ ), το οποίο αναπτύχθηκε στους 30°C σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γαλακτικό οξύ (YPL). Η πηγή άνθρακα που περιέχει αυτό το μέσο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας στο κυτταρόπλασμα (μέσω γλυκόλυσης), κι έτσι αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα που διαθέτουν λειτουργικά μιτοχόνδρια, ενώ ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε αυτά είναι μεγάλος, αυξάνοντας την ποσότητα μιτοχονδρίων που θα απομονωθεί. Η διαδικασία απομόνωσης των μιτοχονδρίων γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των (Daum et al., 1982) και αποθηκεύονται στους -80°C. Το πρωτόκολλο κάνει χρήση του πολυσακχαρίτη Nycodenz το οποίο ξεχωρίζει τα μιτοχόνδρια από άλλα μεμβρανώδη οργανίδια (Glick, 1991; Glick and Pon, 1995). Στην περίπτωση απομόνωσης μιτοχονδρίων από τα στελέχη GalMia40 και GalErv1 στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε επιπλέον 0.2% (κ.ο) γλυκόζη, (για 22 ώρες στο στέλεχος GalMia40 και για 30 ώρες στο GalErv1), έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης καταστολή του ενδογενούς γονιδίου.

### 4.2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύονται σε import buffer σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml και εξισορροπούνται στους 30°C. Στην συνέχεια προστίθεται το ραδιενεργό πρόδρομο υπόστρωμα (2-10% κ.ο. ανάλογα με το ποσοστό σήμανσης του υποστρώματος) και συνεχίζεται η επώαση στους 30°C. Ο χρόνος επώασης των μιτοχονδρίων με το υπόστρωμα διαφοροποιείται ανάλογα με το πείραμα. Σε περίπτωση πειράματος κινητικής τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για να

σταματήσει η αντίδραση στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Μετά την αντίδραση εισαγωγής τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 14000 στροφές στους 4°C. Το μη εισαγόμενο πρόδρομο μόριο απομακρύνεται με επαναδιάλυση του ιζήματος σε ισοτονικό διάλυμα παρουσία πρωτεΐνάσης K ( $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) στους 4°C για 20 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη PMSF (2 mM), για 10 λεπτά στους 4°C. Τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 15  $\mu\text{l}$  2x Laemmli sample buffer με  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη. Τα δείγματα βράζονται σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε 12% Tris-Tricine SDS-PAGE. Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 30 λεπτά στα 20 V με το σύστημα semi-dry transfer. Οι μεμβράνες στην συνέχεια εκτίθενται για 24 ώρες και το αποτέλεσμα της εισόδου αναλύεται στο phospho-imager με αυτοραδιογραφία (Molecular Dynamics).

#### *4.2.3 Παγίδευση μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων μετά από είσοδο ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια*

Στην περίπτωση που πραγματοποιείται πείραμα εισόδου ραδιενεργού υποστρώματος με σκοπό την παγίδευση μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου στην διάρκεια οξείδωσης του υποστρώματος το πείραμα πραγματοποιείται κανονικά (§. 4.2.2) με την διαφορά ότι σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη 10 mM NEM για 5 λεπτά στον πάγο. Επιπλέον τα δείγματα αναλύονται απουσία αναγωγικού μέσου σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

#### 4.2.4 Ανάλυση σχηματισμού συμπλόκων μετά από είσοδο υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης

Η εγγενής ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενδιάμεσων πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζονται κατά την διάρκεια εισόδου πρόδρομων μορίων σε μιτοχόνδρια. Η παρούσα διαδικασία ακολουθεί την αντίδραση εισόδου ραδιενεργού πρωτεϊνικού υποστρώματος στα μιτοχόνδρια (§4.2.2). Έτσι, τα μιτοχόνδρια, μετά την είσοδο της ραδιενεργής προ-πρωτεΐνης, φυγοκεντρούνται (14000rpm, 5min, 4°C) και επαναδιαλύονται στο ήπιο μη-ιοντικό απορρυπαντικό διάλυμα DDM για 30 λεπτά στον πάγο, έτσι ώστε να διατηρηθούν ανέπαφα τα ενδογενή πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στη συνέχεια το διαλυτό μέρος απομακρύνεται από τα μη διαλυτοποιημένα μιτοχόνδρια με φυγοκέντρηση στα 100.000g για 20 λεπτά και στο οποίο προστίθεται 10x BN sample buffer. Τα δείγματα μετατοπίζονται σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα με βαθμίδωση 6-16% πολυακρυλαμίδης και αναλύονται με αυτοραδιογραφία (§4.3.2 BN-PAGE).

Στην περίπτωση που απομακρύνουμε τα σύμπλοκα με αντίσωμα (antibody depletion) επωάζουμε το διαλυτοποιημένο δείγμα με το εκάστοτε αντίσωμα για 20 λεπτά στον πάγο και μετά για άλλα 20 λεπτά με σφαιρίδια Protein A (Amersham). Το προσδεμένο υλικό απομακρύνεται με φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 2500g ενώ το υπερκείμενο μετατοπίζεται σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης με εγγενή ηλεκτροφόρηση.

#### 4.2.5 Ανοσοκατακρήμνιση μετά από πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια

Η παρούσα διαδικασία ακολουθεί την αντίδραση εισόδου ραδιενεργού πρωτεϊνικού υποστρώματος στα μιτοχόνδρια. Έτσι τα μιτοχόνδρια τελικά επαναδιαλύονται σε lysis buffer και τα βράζουμε για 5 λεπτά στους 95°C. Μετά αραιώνονται 20 φορές με IP buffer και επωάζονται με τα εκάστοτε αντισώματα και Protein A σφαιρίδια (Amersham)

για 2 ώρες στους 4°C. Το προσδεμένο υλικό ξεπλένεται τρεις φορές με διάλυμα IP και τέλος επαναδιαλύεται σε Laemmli sample buffer. Το ανοσοκατακρημνισμένο υλικό αναλύεται σε αναγωγικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και μη, και ελέγχεται με αυτοραδιογραφία.

#### 4.2.6 Δημιουργία μιτοπλαστών

Για την δημιουργία μιτοχονδρίων απαλλαγμένα από την εξωτερική τους μεμβράνη (μιτοπλάστες) τα μιτοχόνδρια επώαστηκαν με υποτονικό διάλυμα. Συγκεκριμένα τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε συγκέντρωση 5 mg/ml με 1x import buffer και αμέσως μετά αραιώθηκαν σε 9 όγκους mitoplast buffer, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση μιτοχονδρίων να είναι 0.5mg/ml, παρουσία ή απουσία 0,1 mg/ml πρωτεΐνης K για 30' στον πάγο. Στην περίπτωση προσθήκης πρωτεΐνης K απενεργοποιήθηκε με 2 mM PMSF για 10' στον πάγο. Το υπερκείμενο (διαμεμβρανικός χώρος) διαχωρίζεται από την πελέτα (μιτοπλάστες και τμήματα της εξωτερικής μεμβράνης) με φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές στους 4°C για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή γίνεται είτε πριν είτε μετά την εισαγωγή της πρόδρομης πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο ανάλογα με το τι εξετάζουμε.

#### 4.2.7 Έλεγχος οξειδωτικής κατάστασης ραδιοσημασμένου υποστρώματος μετά από είσοδο σε μιτοχόνδρια

Προκειμένου να ελέγξουμε την οξειδωτική κατάσταση στην οποία βρίσκεται το υπόστρωμα μετά από πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια πραγματοποιείται η παρακάτω διαδικασία. Συγκεκριμένα γίνεται χρήση του αλκυλιωτικού παράγοντα AMS ο οποίος προσδένεται στις ελεύθερες σουλφυδριλομάδες και για κάθε μόριο που προσδένεται προσδίδει 0.5 kDa στην πρωτεΐνη. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να γνωρίζουμε τον ακριβή αριθμό κυστεϊνών που παραμένει ανηγμένος στην διάρκεια του χρόνου.

Αναλυτικότερα το πείραμα γίνεται όπως περιγράφεται και στην ενότητα 4.2.2 με τις παρακάτω τροποποιήσεις. Μετά την είσοδο του ραδιενεργού υποστρώματος στα μιτοχόνδρια το δείγμα φυγοκεντρείται αμέσως και ξεπλένεται η περίσσια υποστρώματος που δεν έχει εισέρθει στα μιτοχόνδρια με επαναδιάλυση των μιτοχονδρίων σε ισοτονικό διάλυμα. Στην συνέχεια τα δείγματα επαναδιαλύονται σε 2x Laemmli sample buffer παρουσία 10 mM AMS για μισή ώρα στους 30°C. Μετά την επώαση τα δείγματα βράζονται σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε 12% Tris-Tricine SDS-PAGE παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Το πηκτώμα πολυακρυλαμίδης μεταφέρεται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ηλεκτροαποτύπωση. Η μεμβράνη στην συνέχεια εκτίθεται για 24 ώρες και το αποτέλεσμα της εισόδου αναλύεται στο phospho-imager με αυτοραδιογραφία (Molecular Dynamics).

#### 4.2.8 Διαλύματα

##### **Import buffer**

100 mM Hepes, pH 7.1, 1.2 M sorbitol, 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM KCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM L-Methionine, 2 mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), 2 mM ATP, 2.5 mM NADH.

##### **Ισοτονικό διάλυμα επαναδιάλυσης μιτοχονδρίων**

0.6 M sorbitol, 20 mM K+MES pH 7.4

##### **Mitoplast buffer**

20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 1 mM DTT

##### **10 x Laemmli sample buffer**

0.5 M Tris, 8 mM EDTA, 0.4% SDS pH 6.8, 5 % glycerol, (200 mM DTT), 0.001% Bromophenol blue

##### **0.16% w/v DDM buffer**

50 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM Hepes/KOH pH 7.4, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM PMSF

**Lysis buffer**

150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 0.5% Triton X-100, 1% SDS

**IP buffer**

150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 0.5% Triton X-100

**4.3 Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών****4.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)**

Για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Τα πρωτεϊνικά δείγματα επεξεργάζονται με διάλυμα που περιέχει SDS, ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Στην περίπτωση που εξετάζεται ο σχηματισμός ομοιοπολικά συνδεδεμένων συμπλόκων στα δείγματα δεν προστίθενται αναγωγικοί παράγοντες όπως β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT οι οποίοι σπάνε δισουλφιδικούς δεσμούς. Για τον πολυμερισμό των πήκτωμάτων χρησιμοποιείται 0.01% TEMED και 0.1% APS. Το πήκτωμα επιστοιβάξής εναποθέτεται αμέσως μετά το πήκτωμα διαχωρισμού πριν αυτό πολυμεριστεί (Schagger and von Jagow, 1987).

**12% πήκτωμα διαχωρισμού (Separating)**

12 ml 30% acrylamide / 0.8% bis-acrylamide, 1 ml 2.2% bis-acrylamide, 10 ml 3 M Tris / 0.3% SDS pH 8.45, 4 ml dH<sub>2</sub>O, 3 ml 87% glycerol

**5% πήκτωμα επιστοιβάξης (Separating)**

1.5 ml 30% acrylamide / 0.8% bis-acrylamide, 0.06 ml 2.2% bis-acrylamide, 3.1 ml 3 M Tris / 0.3%, SDS pH 8.45, 7.9 ml dH<sub>2</sub>O

**Cathode buffer**

0.1 M Tris pH 8.25, 0.1 M Tris-Tricine, 10% SDS

**Anode buffer**

0.2 M Tris pH 8.9

#### 4.3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών απουσία SDS καλείται μη-αποδιατακτική ή εγγενής ηλεκτροφόρηση. Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την μελέτη μη-ομοιοπολικών συμπλόκων. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι η μετατόπιση των πρωτεϊνικών συμπλόκων εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος και όχι από το ενδογενές τους φορτίο. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με την προσθήκη της ανιονικής χρώσης Coomassie blue G250 η οποία προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές της διαλυτοποιημένης πρωτεΐνης και εξουδετερώνει το ενδογενές της φορτίο (Schagger and von Jagow, 1991). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για πήκτωμα πολυακρυλαμίδης βαθμίδωσης 6-16% φαίνονται παρακάτω. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.01% TEMED ΚΑΙ 0.1% APS Η μετατόπιση των πρωτεϊνών στην εγγενή ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 12 ώρες στα 100V, και συνεχίζεται για 3 ώρες στα 400V στους 4°C.

**6% Separating gel**

8.75 ml 48% acrylamide / 1.5% bis-acrylamide, 35 ml 100 mM BisTris-HCl pH7.0 / 1 M 6-aminocaproic acid, 26.25 ml dH<sub>2</sub>O.

**16% Separating gel**

20 ml 48% acrylamide / 1.5% bis-acrylamide, 30 ml 100 mM BisTris-HCl pH 7.0 / 1 M 6-aminocaproic acid, 10 ml Glycerol

**Stacking gel**

3 ml 48% acrylamide / 1.5% bis-acrylamide, 18.75 ml 100 mM BisTris-HCl pH 7.0 /  
1 M 6-aminocaproic acid, 15.5 ml dH<sub>2</sub>O

**Blue cathode buffer**

50 mM Tris-Tricine, 15 mM BisTris-HCl pH7.0, 0.02% Coomassie Blue G-250

**Colourless cathode buffer**

50 mM Tris-Tricine, 15 mM BisTris-HCl pH7.0

**Anode buffer**

50 mM BisTris-HCl pH7.0

*4.3.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης*

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης πραγματοποιείται με χρώση κυανού του Coomassie. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται η Coomassie brilliant blue (R-250) η οποία βάφει μπλε τις πρωτεϊνικές ζώνες και έχει ευαισθησία μέχρι 0.1μg. Στην περίπτωση που τα πρωτεϊνικά δείγματα είναι ραδιενεργά τότε οι σημάνσεις μπορούν να φανούν με αυτοραδιογραφία, δηλαδή με την τοποθέτηση ενός φιλμ ακτινογραφίας επάνω από την πηκτική. Πιο συγκεκριμένα το πήκτωμα βάφεται με διάλυμα χρώσης το οποίο περιέχει και οξικό οξύ για την μονιμοποίηση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια αποχρωματίζεται η περίσσια Coomassie σε διάλυμα αποχρωματισμού, το πήκτωμα στεγνώνεται σε συσκευή Biorad Gel Dryer και τέλος τοποθετείται σε κασέτα για έκθεση. Στην περίπτωση που χρειάζεται η ενίσχυση του ραδιενεργού σήματος το πήκτωμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων με 5% TCA για 5 λεπτά, στη συνέχεια εξουδετερώνεται το χαμηλό pH με 1M Tris-base για 2 λεπτά και τέλος επωάζεται για 20 λεπτά με 1M σαλικυλικό νάτριο (sodium salicylate) πριν το στέγνωμα και την έκθεση σε κασέτα.



#### 4.3.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ανοσοαποτύπωση (Western)

Η ανίχνευση μικρής ποσότητας πρωτεΐνης μέσα από ένα πλήθος πρωτεϊνών πραγματοποιείται με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίζονται σε πηκτή ακρυλαμίδης και μεταφέρονται με ηλεκτροαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στη συσκευή Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell Biorad σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το εκάστοτε αντίσωμα ανάλογα με το πείραμα σε 1% γάλα / TBST. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι πολυκλωνικά που παρήχθησαν σε κουνέλια. Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι α-rabbit (Sigma) συζευγμένο με HRP (horse raddish peroxidase). Το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσία υπεροξειδίου και λουμινόλης (συστατικά του ECL της Pierce) αλλάζει οξειδωτική κατάσταση και εκλύει φως (χημειοφωταύγεια), το φιλμ μαυρίζει και έτσι ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από τα διαφορετικά αντισώματα.

#### 4.3.5 Έκφραση πρωτεϊνών

Όλες οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εκφράστηκαν στο στέλεχος κυττάρων *E. coli* BL21(DE3). Αρχικά εμβολιάζονται σε μικρές καλλιέργειες LB με τα εκάστοτε αντιβιοτικά μοναδικές αποικίες. Ακολουθεί επώαση των καλλιιεργειών για 14 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια αραιώνονται 1:50 σε φρέσκο θρεπτικό υγρό με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζονται στους 37°C μέχρι την εκθετική φάση (O.D. 0.4 - 0.7). Σε αυτό το σημείο προστίθεται 0.4 mM IPTG και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 30°C στην περίπτωση των κυττάρων που είναι μετασχηματισμένα με φορέα pET22 ή pGEX4T-1 με οποιαδήποτε μορφή της Mia40. Στην περίπτωση που τα κύτταρα είναι μετασχηματισμένα με πλασμίδιο pGEX4T-1 που φέρουν

οποιαδήποτε μορφή του Tim10 τότε η επαγωγή πραγματοποιείται για 18 ώρες στους 18°C προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα της επαγόμενης πρωτεΐνης. Κατόπιν τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 5000g στους 4°C. Οι κυτταρικές πελέτες είτε χρησιμοποιούνται αμέσως για απομόνωση πρωτεΐνης είτε φυλάσσονται στους -20°C μέχρι την ημέρα του καθαρισμού.

#### 4.3.6 Καθαρισμός πρωτεϊνών

Η GST-Tim10, ΔN30 και ΔN39 απομονώθηκε από βακτήρια *E. coli* που έφερε το πλασμίδιο pGEX4T-1. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,4) και έπειτα έσπασαν με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο επωάστηκε με σφαιρίδια γλουταθιόνης (GST-agarose beads, Sigma) για 6 ώρες ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη. Κατόπιν, τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A και η προσδεμένη πρωτεΐνη εκλούστηκε με διάλυμα 10 mM γλουταθιόνη, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, και 5 U/ml θρομβίνη προστέθηκε. Η θρομβίνη παρέμεινε για να αποκόψει τον επίτοπο της GST από τη πρωτεΐνη για 6 ώρες. Μετά την αποκοπή, η θρομβίνη απενεργοποιήθηκε με PMSF 1 mM και η Tim10 απομονώθηκε από το μείγμα με χρωματογραφία πηκτής (Gel filtration), χρησιμοποιώντας στήλη S75 superdex (GE Healthcare).

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ΔN290Mia40, ΔN290Mia40SPS εκφράστηκαν στο στέλεχος του *E. coli* BL21 (DE3) από τον pET22. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.4) και έπειτα έσπασαν με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο προσδέθηκε σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads,

Qiagen) και έπειτα τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A στο οποίο προστέθηκαν 50 mM ιμιδαζόλιο. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια με διάλυμα A + 300 mM ιμιδαζόλιο. Οι εκλουσμένες πρωτεΐνες καθαρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία ανιόνανταλλαγής (anion exchange chromatography) με τη χρήση στήλης MonoQ HR 5/5 (Pharmacia Biotech).

#### 4.3.7 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size exclusion chromatography)

Οι εκλουσμένες πρωτεΐνες είτε από στήλες νικελίου είτε από σφαιρίδια γλουταθιόνης πέρασαν από δεύτερο στάδιο καθαρισμού με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Στην περίπτωση της ΔN67Mia40 χρησιμοποιήθηκε η στήλη Superdex200 (Amersham pharmacia) ενώ στην περίπτωση καθαρισμού των μικρών Tim ή των απαλειμμένων Mia40 χρησιμοποιήθηκε η στήλη Superdex75. Οι στήλες είχαν και στις δύο περιπτώσεις όγκο 25 ml και ήταν συνδεδεμένες με το σύστημα AKTA purifier FPLC (AmershamPharmacia). Οι παράμετροι για την περάτωση της χρωματογραφίας ορίστηκαν από το Unicorn software και ήταν οι εξής: 500  $\mu$ l injected volume, 0.5 ml  $\text{min}^{-1}$  flow rate, one column volume length of elution, 500  $\mu$ l fractions.

#### 4.3.8 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση πρωτεϊνών υπολογίστηκε με βάση την απορρόφηση τους στα 280nm και σύμφωνα με τον τύπο  $A_{280} = \epsilon c l$  όπου  $c$  = συγκέντρωση (M),  $l$  = μήκος φωτός σε cm και  $\epsilon$  είναι η θεωρητική σταθερά απόσβεσης που υπολογίζεται από την εξίσωση:  $\epsilon (280\text{nm}) = 5500 (\#W) + 1490 (\#Y) + 125 (\#C)$  όπου  $\#W$  = η περιεκτικότητα σε τρυπτοφάνες,  $\#Y$  = η περιεκτικότητα σε τυροσίνες και  $\#C$  = ο αριθμός των οξειδωμένων κυστεϊνών (Pace et al., 1995).

Πρωτεΐνες	Θεωρητική σταθερά απόσβεσης $\epsilon$
Mia40	13450
$\Delta N67$ Mia40	11835
$\Delta N244$ Mia40	11835
$\Delta N290$ Mia40 / SPS	10345 / 9970
Tim10	4720
$\Delta N30$ Tim10	4720
$\Delta N39$ Tim10	4720

**Εικόνα 24:** Θεωρητική σταθερά απόσβεσης  $\epsilon$  για τις πρωτεΐνες Tim10 και Mia40.

#### 4.3.9 Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης

Η ραδιοσήμανση πρωτεϊνών πραγματοποιείται από πλασμίδιο που φέρει το επιθυμητό κάθε φορά γονίδιο ανάλογα με το υπόστρωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είτε σε πειράματα εισόδου σε μιτοχόνδρια είτε σε *in vitro* πειράματα αλληλεπίδρασης με αενασυνδυσασμένες πρωτεΐνες. Η σήμανση γίνεται με  $^{35}\text{S}$  μεθιονίνη με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης σε κυτταρικό εκχύλισμα πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων από κουνέλι (rabbit reticulocyte lysate) χρησιμοποιώντας την SP6 πολυμεράση και με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Promega TNT). Για την επιτυχή ραδιοσήμανση πρωτεΐνης χρειάζεται πλασμίδιο υψηλής καθαρότητας απομονωμένο με κολώνα Qiagen. Η αντίδραση γίνεται για 90 λεπτά στους 30°C και η πρωτεΐνη απομακρύνεται από ριβοσώματα με φυγοκέντρηση στα 55000 g, για 15 λεπτά, στους 4°C.

#### 4.3.10 *In vitro* ανασύσταση της αλληλεπίδρασης Mia40 με ραδιενεργό υπόστρωμα

Η Mia40 χρησιμοποιείται σε περίσσια είτε προσδεμένη σε σφαιρίδια γλουταθιόνης μέσω GST επίτοπου είτε καθαρισμένη (1 µg ανά αντίδραση) και επωάζεται για 10 λεπτά με ραδιενεργό υπόστρωμα. Η αντίδραση σταματάει με 10 mM NEM προκειμένου να παγιδευτούν μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε Mia40 προσδεμένη σε σφαιρίδια απομακρύνουμε το υπόστρωμα που έχει προσδεθεί μη ειδικά στα σφαιρίδια ξεπλένοντας τρεις φορές με διάλυμα (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 0.1% BSA, 0.1% Triton X-100). Το προσδεμένο υλικό επαναδιαλύεται σε Laemmli sample buffer και αναλύονται σε μη-αναγωγικό πήκτωμα ακρυλαμίδης με ηλεκτροφόρηση SDS. Τα δείγματα εκτίθενται σε κασέτα και αναλύονται με αυτοραδιογραφία.

#### 4.3.11 *Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry – ITC)*

Για τη μέτρηση της διαφοράς ενθαλπίας ( $\Delta H$ ), της εντροπίας ( $\Delta S$ ) και της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) της πρόσδεσης των διάφορων μεταλλαγμάτων της Tim10 κατά τη πρόσδεσή της στη ΔN290Mia40 SPS χρησιμοποιήθηκε θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης. Τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25°C. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση μικροθερμιδόμετρου VP-ITC (Microcal). Τα πρωτεϊνικά δείγματα υπέστησαν εκτεταμένη διαπίδυση διαμέσω μεμβράνης (dialysis) σε διάλυμα 50 mM KPi pH 7,4 για 12 ώρες στους 4 °C. Για τη πλήρη αναγωγή τους οι πρωτεΐνες επώαστηκαν με 10 mM TCEP (αναγωγικός παράγοντας) για 1 ώρα στους 4°C και μετά υπέστησαν διαπίδυση διαμέσω μεμβράνης για μία ώρα σε διάλυμα 50 mM KPi pH 7,4, 1 mM TCEP στους 4 °C, για να εξισωθούν οι συνθήκες των διαλυμάτων κατά τις μετρήσεις. Οι πρωτεΐνες Tim10, ΔN30Tim10 και

ΔN39Tim10 χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0,025 mM, ενώ η ΔN290Mia40 SPS προστέθηκε με έγχυση σε συγκέντρωση 0,25 mM σε μεσοδιαστήματα των 15 δευτερολέπτων. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε μετρώντας την απορρόφηση στα 280 nm, με βάση τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές της σταθεράς απόσβεσης (§ 4.3.8).

#### 4.4 Μέθοδοι σακχαρομύκητα

##### 4.4.1 Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη

Τα στελέχη *S.cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα FT5 (Tzamarias and Struhl, 1994), D273-10B (MATα), GalMia40 (§ 4.4.2), GalTim12 (Lionaki et al., 2008). Τα κύτταρα μεγάλωσαν είτε σε πλούσιο θρεπτικό μέσο είτε σε φτωχό ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω. Όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν στους 30°C.

##### YPD/YPL/YPGal (πλούσια θρεπτικά)

2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη για YPD, γαλακτικό οξύ για YPL, και γαλακτόζη για YPGal), 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone.

##### SC/SG/SL (φτωχά θρεπτικά/επιλογή μέσω αυξοτροφίας)

2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη για SC, γαλακτικό οξύ για SL, και γαλακτόζη για SG), 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.6% (w/v) casamino amino acids. Στην περίπτωση των Gal στελεχών στο θρεπτικό διάλυμα SL προστίθεται και 0.2% γλυκόζη για διατήρηση καταστολής του ενδογενούς γονιδίου.

#### 4.4.2 Κατασκευή του στελέχους *GalMia40*

Το στέλεχος κατασκευάστηκε με πολλαπλασιασμό της κασέτας *kanMX4/Gal1-10* που περιέχει τον υποκινητή της γαλακτόζης από το πλασμιακό φορέα M4801 (δώρο από Αντώνη Μακρή - MAIX) με τους κάτωθι εκκινητές: (forward) 5'CCAAAATAACTTCTCTAGTGATACGTAAAGCTTCAGAAATGGAGCTCGT TTTCGACACTGG3' και 5'GTTTCTGCACGCATTCCTGACGACTAAGTTGCGAAGCATGGATCCGTTTTTCTCCTTGAC3' (reverse). Το προϊόν περιείχε άκρα του γονιδίου της *Mia40* και χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους σακχαρομύκητα FT5 (Tzamaras and Struhl, 1994) και οι αποικίες επιλέχθηκαν σε θρεπτικό YPGal με 0.2mg/ml geneticin. Η ένθεση του Gal υποκινητή μπροστά από το γονίδιο της *Mia40* επαληθεύτηκε με PCR σε απομονωμένο DNA του σακχαρομύκητα. Η μείωση της πρωτεϊνικής ποσότητας της *Mia40* επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση σε κύτταρα που είχαν μεγαλώσει σε γλυκόζη για τουλάχιστον 22 ώρες.

#### 4.4.3 Πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας (*Complementation test*)

Για τα πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας το *GALMia40* στέλεχος μετασχηματίστηκε με πλασμίδια pRS316 (προσδίδει αυξοτροφία στην ουρακίλη) που φέρουν μεταλλαγμένες ή όχι εκδόσεις του γονιδίου της *Mia40* κλωνοποιημένα υπό τον ενδογενή υποκινητή της *Mia40* (340 βάσεις από το 5' άκρο). Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι μεγάλωσαν σε ελάχιστο θρεπτικό υγρό παρουσία γαλακτόζης (SG) και μετά μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υγρό παρουσία γλυκόζης (SC) για 18 ώρες στους 30°C. Η ίδια αραιώση κυττάρων τοποθετήθηκε σε SC, SG και SL πιάτα και επωάστηκαν για 4-5 μέρες στους 30°C.

## **ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### Λειτουργική και δομική μελέτη της πρωτεΐνης Mia40

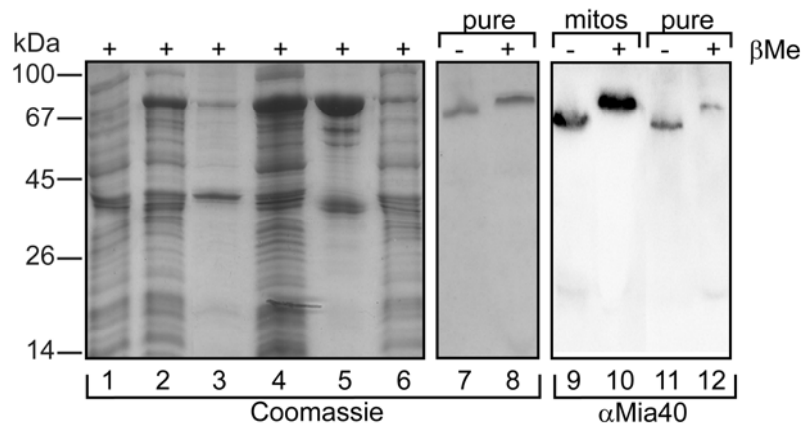
#### 5.1 Εισαγωγή

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι κρίσιμοι για την διατήρηση της δομικής σταθερότητας πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται σε σημαντικά κυτταρικά μονοπάτια. Εισάγονται μέσω καλά οργανωμένων και συντονισμένων ενεργειών από ένζυμα που είναι αυστηρά αφιερωμένα και ειδικευμένα στην κατάλυση οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Στο μιτοχόνδριο οι δισουλφιδικοί δεσμοί εισάγονται μέσω ενός πρόσφατα αναγνωρισμένου μονοπατιού στο οποίο λειτουργεί η Mia40. Προκαταρκτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η Mia40-εξαρτώμενη οξείδωση είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και επιτρέπει την σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε σημαντικές μιτοχονδριακές λειτουργίες όπως είναι η αναπνοή και η βιογένεση πρωτεϊνών. Σε αυτό το κεφάλαιο μελετάμε με πειράματα *in vitro*, *in organello* και *in vivo* τον μοριακό μηχανισμό οξείδωσης των υποστρωμάτων από την Mia40. Παράλληλα χαρακτηρίζουμε δομικά την Mia40 και προσδιορίζουμε το καταλυτικό κέντρο δράσης της.

#### 5.2 Καθαρισμός της ανασυνδυασμένης Mia40

Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης Mia40 αρχικά κλωνοποιήθηκε το γονίδιο σε κατάλληλο φορέα για έκφραση και απομόνωση από βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο της Mia40 πολλαπλασιάστηκε από το γονιδίωμα του σακχαρομύκητα χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους υποκινητές με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το απομονωμένο τμήμα DNA κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGEX4T-1 (Amersham) που φέρει GST (glutathione

S-transferase) επίτοπο με κατάλληλα περιοριστικά ενζυμα όπως έχει ήδη διευκρινιστεί στο δεύτερο μέρος υλικά και μέθοδοι. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης έγινε στο βακτηριακό *E.coli* στέλεχος BL21(DE3). Οι συνθήκες επαγωγής και έκφρασης περιγράφεται στα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Στην διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε ότι μετά τη λύση των κυττάρων με τη βοήθεια υπερήχων και την επακόλουθη φυγοκέντρηση η Mia40 εντοπίζεται στο διαλυτό υπερκείμενο (εικόνα 25, διαδρομή 4). Η καθαρή πρωτεΐνη που προέκυψε μετά από έκλυση από την κολώνα με τη χρήση θρομβίνης αναλύθηκε σε πηκτή ακρυλαμίδης παρουσία ή μη αναγωγικού μέσου έτσι ώστε να εξακριβωθεί η οξειδωτική της κατάσταση. Η Mia40 έχει το χαρακτηριστικό γνώρισμα ότι μετακινείται διαφορετικά σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση στην οποία βρίσκεται (Mesecke et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα η ενδογενής πλήρως οξειδωμένη μορφή μετακινείται γρηγορότερα σε πηκτή ακρυλαμίδης σε σχέση με την πλήρως ανηγμένη μορφή (διαδρομές 9,10). Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώθηκε ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απομονώνεται σε οξειδωμένη κατάσταση ακριβώς όπως η ενδογενής μιτοχονδριακή Mia40 (διαδρομές 7-12). Η αποτελεσματικότητα καθαρισμού της ανασυνδυασμένης Mia40 εξετάσθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS πολυακρυλαμιδίου των δειγμάτων από τα διαδοχικά στάδια καθαρισμού και φαίνεται στην εικόνα 25.



**Εικόνα 25: Στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης Mia40.**

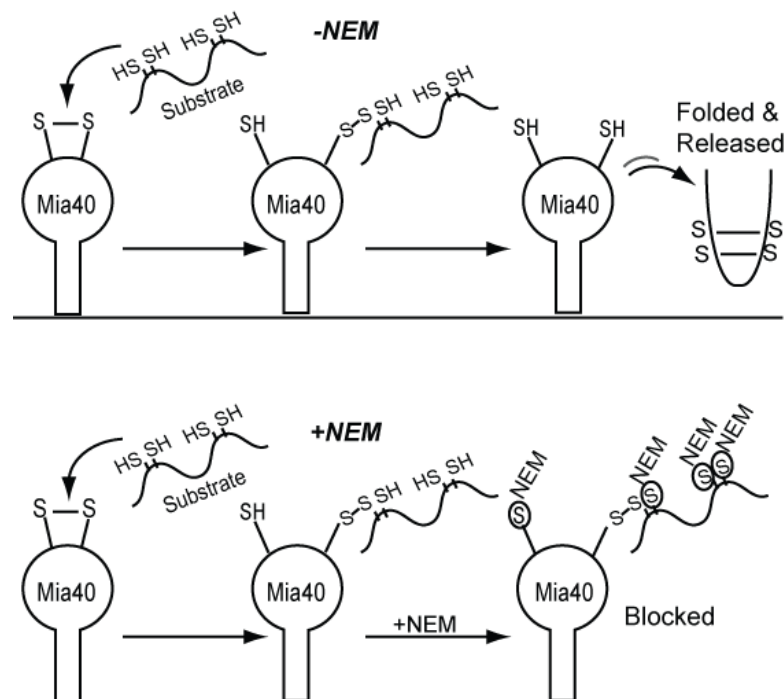
SDS ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης δειγμάτων από τα διαδοχικά στάδια καθαρισμού της ανασυνδυασμένης Mia40. 1 και 2: δείγμα βακτηρίων πριν και μετά την επαγωγή έκφρασης με IPTG. 3 και 4: τμήμα του ιζήματος των λυμένων κυττάρων σε 8M ουρία και υπερκείμενο (διαλυτή φάση) μετά την λύση των κυττάρων. 5: υλικό που έχει δεσμευτεί στην στήλη μετά από ξεπλύματα με αυξημένο αλάτι. 6: υλικό που δεσμεύτηκε στην στήλη μη ειδικά και απομακρύνθηκε με ξεπλύματα αυξημένου αλατιού. 7 και 8: δείγμα μετά την έκλουση με θρομβίνη και ανάλυση απουσία και παρουσία αναγωγικού μέσου. Στα δείγματα 1-8 έγινε χρώση των πρωτεϊνών με κυανούν του Coomassie. 9-10 50μg απομονωμένων αγρίου τύπου μιτοχονδρίων απουσία και παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και ανοσοαποτόπωση με αντίσωμα της Mia40. 11-12: 0.1μg ανασυνδυασμένης Mia40 απουσία και παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και ανοσοαποτόπωση με αντίσωμα της Mia40.

**5.3 *In vitro* ανασύσταση της αλληλεπίδρασης Mia40 με το υπόστρωμα.**

Για να γίνει εφικτή η μελέτη της βιοχημικής λειτουργίας της Mia40 χρειάστηκε να αναπτυχθεί μια *in vitro* πειραματική τεχνική μέσω της οποίας θα ελέγχετε η αλληλεπίδραση της Mia40 με το υπόστρωμα. Σημαντικό κριτήριο στην ανάπτυξη αυτής της τεχνικής αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης παγιδευμένων μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων που προκύπτουν στην διαδικασία μεταφοράς ενός δισουλφιδικού δεσμού από την οξειδάση στο υπόστρωμα (βλέπε εικόνα 1). Μια από τις σημαντικότερες δυσκολίες στην παρακολούθηση οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων αποτελεί η ταχύτητα με την οποία ολοκληρώνονται. Η αλληλεπίδραση της οξειδάσης με το υπόστρωμα είναι στιγμιαία γεγονός που καθιστά την παρατήρηση μικτών δισουλφιδίων πολύ δύσκολη. Συγκεκριμένα με την οξειδοαναγωγή DsbA στο βακτηριακό περίπλασμα δεν έχει παγιδευτεί ακόμα μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με υπόστρωμα. Συνεπώς έπρεπε να βρεθούν οι συνθήκες που θα επιτρέπουν τον σχηματισμό αλλά και την παγίδευση μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων μεταξύ της Mia40 και του υποστρώματος.

Η πειραματική τεχνική η οποία αναπτύχθηκε για την παρατήρηση μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων είναι η ακόλουθη (εικόνα 26). Το ανηγμένο, ραδιενεργό υπόστρωμα παρουσιάζεται σε οξειδωμένη Mia40 η οποία είναι ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Η αντίδραση είναι παροδική και ολοκληρώνεται

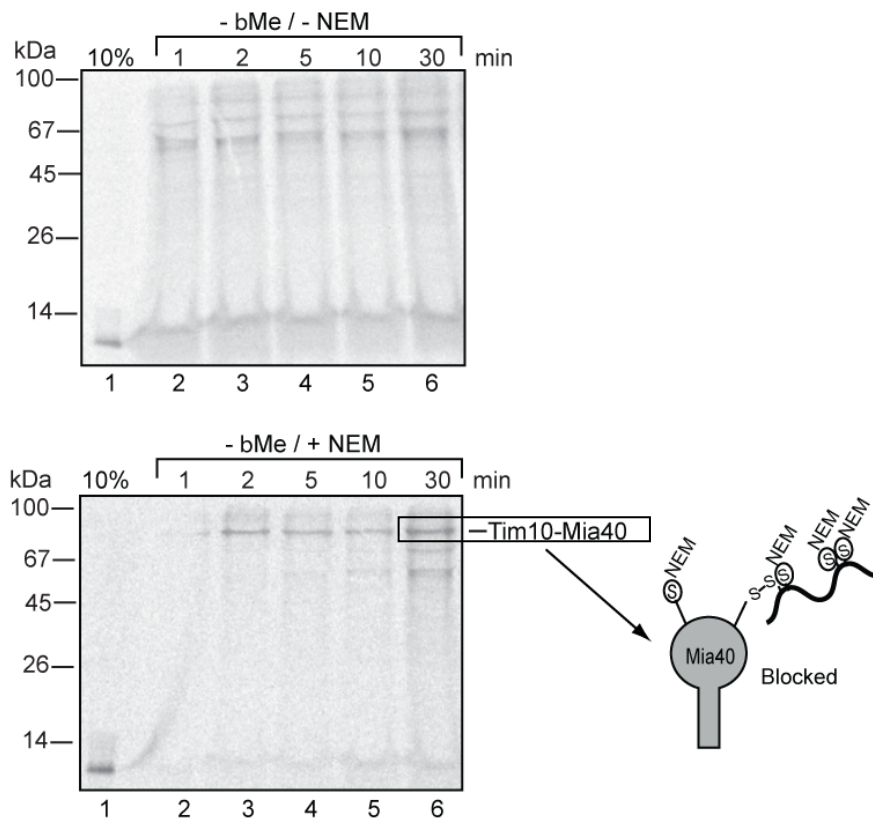
με την πλήρη οξείδωση του υποστρώματος και την απελευθέρωση αυτού σε αναδιπλωμένη μορφή από την οξειδάση (εικόνα 3, πάνω). Προκειμένου να ‘παγώσουμε’ την αντίδραση την στιγμή της αλληλεπίδρασης προστίθεται ένας αλκυλιωτικός παράγοντας (NEM) ο οποίος προσδένεται μη αναστρέψιμα σε ελεύθερες σουλφυδριλομάδες. Με αυτό τον τρόπο σταθεροποιείται το μικτό ενδιάμεσο μεταξύ της Mia40 και του υποστρώματος εμποδίζοντας την ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή του μικτού δισουλφιδίου από το δεύτερο θειολικό ανιόν και ως εκ τούτου την ολοκλήρωση της αντίδρασης (εικόνα 3 κάτω πάνελ).



**Εικόνα 26: Παγίδευση μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων μεταξύ Mia40 και υποστρώματος.** Σχηματική απεικόνιση της βιοχημικής τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανασυσταθεί *in vitro* η αλληλεπίδραση της Mia40 με το υπόστρωμα.

Στην εικόνα 26 φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος ανασύστασης της αλληλεπίδρασης της Mia40 χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την πρωτεΐνη Tim10. Αγρίου τύπου ραδιενεργή Tim10 επώασθηκε για τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα με ακινητοποιημένη σε Mia40 σφαιρίδια. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS πολυακρυλαμιδίου σε μη-αναγωγικές συνθήκες όπου

τελικά φαίνεται ότι η προσθήκη NEM (N-ethyl maleimide) είναι απαραίτητη για την παγίδευση μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων.



**Εικόνα 27: *In vitro* ανασύσταση της αλληλεπίδρασης Mia40 με το Tim10 υπόστρωμα.**

Πάνω: ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθιόνης Mia40 επώαστηκε με ραδιοενεργή Tim10 για τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και αναλύθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Κάτω: όπως και πάνω αλλά στο τέλος της αντίδρασης έχει προστεθεί NEM. Τα αποτελέσματα έχουν απεικονιστεί με αυτοραδιογραφία. Κάτω δεξιά: σχηματική απεικόνιση του παγιδευμένου υποστρώματος στην Mia40 λόγω προσθήκης NEM.

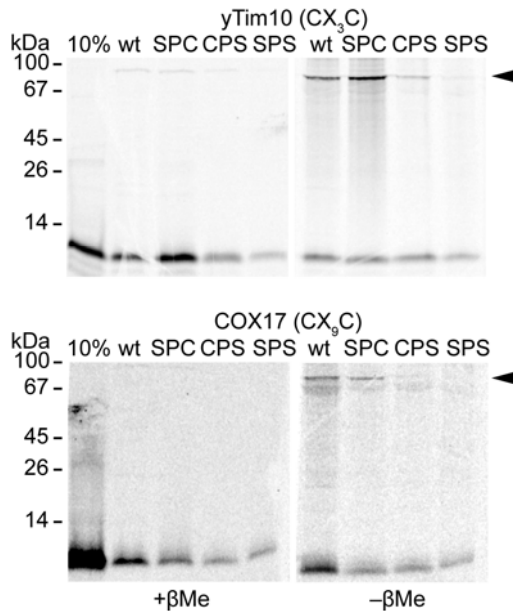
#### 5.4 Η οξείδωση των υποστρωμάτων εξαρτάται από την δευτέρα κυστεΐνη του μοτίβου CPC της Mia40.

Εξετάσαμε τον λειτουργικό ρόλο των κυστεϊνών της Mia40 μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης προκειμένου να βρούμε το καταλυτικό της κέντρο. Μελετήσαμε την πρόσδεση και αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων με τις μεταλλαγμένες μορφές της Mia40 χρησιμοποιώντας ως πειραματική προσέγγιση το σύστημα που αναπτύχθηκε για την ανασυγκρότηση του μηχανισμού (§ 5.3). Πραγματοποιήθηκαν

σημειακές μεταλλαγές των κυστεϊνών του CPC μοτίβου σε σερίνες. Τα μεταλλάγματα φέρουν GST επίτοπο και εκφράστηκαν σε βακτήρια, απομονώθηκαν και ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Τρία είδη υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν για να εξακριβωθεί ποιο είναι το καταλυτικό κέντρο της Mia40. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Tim10 ως CX3C υπόστρωμα, η πρωτεΐνη Cox17 που περιέχει διπλό CX9C μοτίβο, και η Etn1 ως ένα CX2C υπόστρωμα. Τα υποστρώματα σημαίνονται με ραδιενεργό θείο ( $S^{35}$ ) με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης της Promega. Το ανηγμένο, ραδιενεργό υπόστρωμα παρουσιάζεται στην εκάστοτε μεταλλαγμένη Mia40 η οποία είναι ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια και η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη του αλκυλιωτικού παράγοντα NEM. Το NEM προσδένεται μη αναστρέψιμα στις ελεύθερες σουλφυδριλομάδες σταθεροποιώντας έτσι τα μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα του υποστρώματος με την Mia40.

Παρατηρήσαμε ότι όλα τα υποστρώματα σχηματίζουν μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την αγρίου τύπου Mia40 που είναι ευαίσθητο στην προσθήκη αναγωγικού μέσου (εικόνα 28, βέλος). Αντίθετα τα CPS, SPC και SPS μεταλλάγματα παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα. Συγκεκριμένα η Mia40 που φέρει μεταλλαγή και των δύο κυστεϊνών σε σερίνη στο CPC μοτίβο (SPS) χάνει τελείως την ικανότητα αλληλεπίδρασης και με τα τρία υποστρώματα. Η Mia40 με την μεταλλαγή SPC δεν παρουσίασε πρόβλημα στην αλληλεπίδραση και τα ποσοστά αλληλεπίδρασης είναι αντίστοιχα με αυτά της αγρίου τύπου Mia40 ενώ παράλληλα το CPS μετάλλαγμα είχε μειωμένο σε μεγάλο βαθμό το ποσοστό προσδεμένου υποστρώματος. Διακρίναμε ότι η συμπεριφορά των μεταλλαγμάτων της Mia40 ήταν κάθε φορά η ίδια ανεξάρτητα από το είδος

υποστρώματος που χρησιμοποιούσαμε στο πείραμα, γεγονός που καταδεικνύει ότι οι μεταλλαγές επηρεάζουν τον τρόπο λειτουργίας της Mia40 γενικότερα.

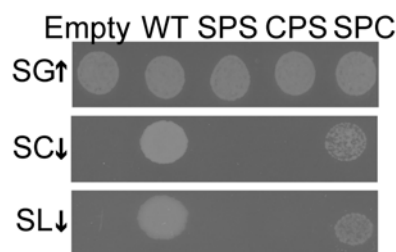


**Εικόνα 28: Η δεύτερη κυστεΐνη του CPC μοτίβου είναι αναγκαία *in vitro*.**

Ακίνητοποιημένη Mia40 και μεταλλαγμένες εκδόσεις αυτής στο CPC μοτίβο επώαστηκαν με ραδιενεργό υπόστρωμα (Tim10, πάνω) (Cox17, κάτω) για 10 λεπτά στους 4°C. Η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη NEM και τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης με (αριστερή στήλη) ή χωρίς (δεξιά στήλη) β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν με αυτοραδιογραφία. Το βέλος δείχνει το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με το υπόστρωμα.

Παράλληλα εξετάστηκε ο ρόλος των κυστεϊνών και η επίπτωση των μεταλλαγών *in vivo* με πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας χρησιμοποιώντας το στέλεχος σακχαρομύκητα που έχει το ενδογενές γονίδιο της Mia40 υπό τον έλεγχο του υποκινητή γαλακτόζης (GAL1-10). Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία μετασχηματίζουμε το *GALMia40* στέλεχος με πλασμίδιο που φέρει την εκάστοτε μεταλλαγμένη μορφή της Mia40 υπό τον ενδογενή υποκινητή του γονιδίου. Στη συνέχεια καταστέλλουμε την έκφραση της ενδογενούς Mia40 χρησιμοποιώντας τα θρεπτικό που φέρει γλυκόζη και ελέγχουμε αν η βιωσιμότητα του κυττάρου επηρεάζεται από την εκάστοτε μετάλλαξη. Δεδομένου ότι η Mia40 είναι μια πρωτεΐνη ζωτικής σημασίας για το κύτταρο η απουσία της λόγω καταστολής με

γλυκόζη θα είναι θνησιγόνα για το κύτταρο και η βιωσιμότητα τους θα επαφίεται στην λειτουργικότητα των μεταλλαγμένων *Mia40* που έχουν μετασχηματιστεί σε αυτά. Παρατηρήσαμε ότι στην περίπτωση που τα κύτταρα ήταν μετασχηματισμένα με αγρίου τύπου *Mia40* τα κύτταρα δεν αντιμετώπιζαν πρόβλημα ανάπτυξης (εικόνα 29). Αντίθετα στην περίπτωση που είχαν μετασχηματιστεί με κενό πλασμίδιο, δηλαδή με πλασμίδιο που δεν φέρει κανένα γονίδιο, τα κύτταρα δεν επιβίωναν σε συνθήκες καταστολής της ενδογενούς *Mia40* (SC και SL). Αντίστοιχο φαινότυπο παρουσίασαν και τα πλασμίδια που φέρουν τις μεταλλάξεις SPS και CPS γεγονός που συμφωνεί με το *in vitro* πείραμα όπου τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα χάνουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα. Το στέλεχος που είναι μετασχηματισμένο με πλασμίδιο που φέρει την μετάλλαξη SPC στην *Mia40* φαίνεται πως δεν αναπτύσσεται στον ίδιο βαθμό όπως αυτό που φέρει την αγρίου τύπου *Mia40* αλλά ωστόσο καταφέρνει να επιβιώσει.



**Εικόνα 29: Γενετική συμπληρωματικότητα μεταλλαγμάτων της *Mia40* στο CPC μοτίβο.**

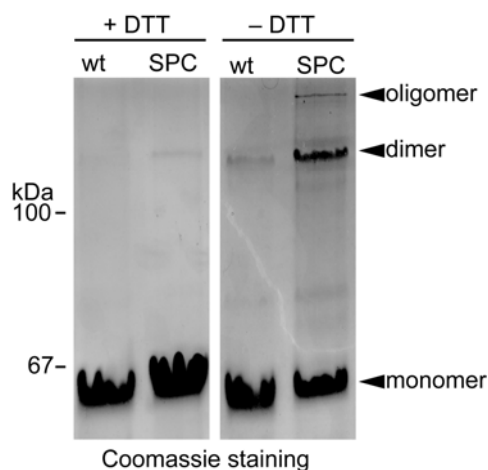
*GalMia40* στέλεχος σακχαρομύκητα μετασχηματίστηκε με πλασμίδια που φέρουν μεταλλαγμένες εκδόσεις της *Mia40* στο CPC μοτίβο υπό τον έλεγχο του ενδογενή υποκινητή της *Mia40*. Τα κύτταρα μεγάλωσαν σε θρεπτικό υγρό με γαλακτόζη και μετά έγινε αλλαγή σε θρεπτικό με γλυκόζη για 18 ώρες προκειμένου να κατασταλεί το ενδογενές γονίδιο. Τα κύτταρα απλώθηκαν σε πιάτο με γαλακτόζη (SG), με γλυκόζη (SC), και με γαλακτικό οξύ με 0.2% γλυκόζη (SL). Τα βέλη στα αντίστοιχα θρεπτικά υποδεικνύουν την καταστολή (προς τα κάτω) ή την επαγωγή (προς τα πάνω) της ενδογενούς *Mia40*. (*empty*: πλασμίδιο που φέρει τον υποκινητή της *Mia40* χωρίς γονίδιο.)

Τα *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το καταλυτικό κέντρο της *Mia40* έγκειται στο CPC μοτίβο και μάλιστα ότι η ενεργή δράση εξαρτάται από την δεύτερη κυστεΐνη του μοτίβου (C55 στην ανθρώπινη *MIA40* και C298 στου



σακχαρομύκητα η οποία εφεξής θα αναφέρεται ως ενεργή κυστεΐνη). Ο τρόπος αλληλεπίδρασης και οξειδωσης της Mia40 φαίνεται να είναι γενικός και να μην εξαρτάται από το είδος του υποστρώματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

Αναρωτηθήκαμε τι είναι αυτό που καθιστά την Mia40 με την SPC μεταλλαγή ενεργή *in vitro* και μη-θνησιγόνα *in vivo* δεδομένου ότι έχει ελεύθερη μόνο μια σουλφυδριλομάδα. Ελέγξαμε την οξειδωτική κατάσταση της απομονωμένης πρωτεΐνης και είδαμε ότι το συγκεκριμένο μετάλλαγμα έχει την τάση να σχηματίζει DTT ευαίσθητα ολιγομερή *in vitro* (εικόνα). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την ικανότητα της πρωτεΐνης να αλληλεπιδράει με το υπόστρωμα δεδομένου ότι σαν διαμοριακό διμερές μεταξύ των ελεύθερων κυστεϊνών θα μπορούσε να προσβληθεί πυρηνόφιλα από μια ελεύθερη σουλφυδριλομάδα του υποστρώματος.



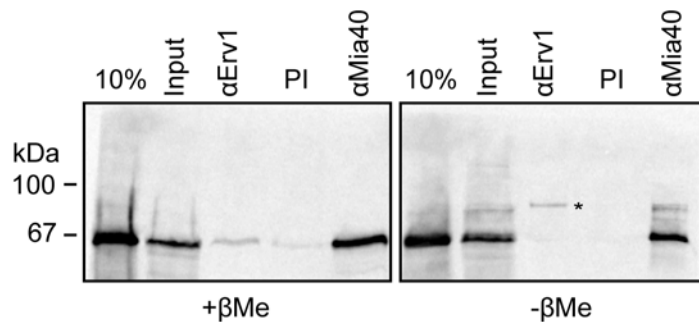
**Εικόνα 30: Η Mia40 SPC σχηματίζει DTT ευαίσθητα ολιγομερή *in vitro*.**

5μg απομονωμένης αγρίου τύπου Mia40 και Mia40 SPC αναλύθηκαν με SDS ηλεκτροφόρηση με ή χωρίς 10 mM DTT. Στα δείγματα έγινε χρώση με κυανούν του Coomassie.

Επιπλέον ελέγξαμε τι συμβαίνει *in organello* πραγματοποιώντας πείραμα εισόδου του συγκεκριμένου μεταλλάγματος σε απομονωμένα μιτοχόνδρια αγρίου τύπου σακχαρομύκητα. Παρατηρήσαμε ότι στην διαδικασία εισόδου ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια σχηματίζεται ένα μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο που παραμένει στην διάρκεια του χρόνου. Εικάσαμε ότι θα μπορούσε να είναι μεταξύ

της νέο-εισερχόμενης Mia40 και της ενδογενούς Ern1 εφόσον το ενεργό κέντρο της Mia40 θεωρείται ότι οξειδώνεται από την σουλφυδριλοξειδάση Ern1.

Πραγματοποιήσαμε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας αντίσωμα της Erv1 και παρατηρήσαμε ότι πράγματι το νέο-εισερχόμενο SPC Mia40 πρόδρομο μόριο αλληλεπιδρά ομοιοπολικά με την ενδογενή Erv1 (εικόνα). Θα μπορούσε λοιπόν το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της Mia40-SPC και της Erv1 να οξειδώνει σε ένα βαθμό τα υποστρώματα και λόγω αυτού να επιβιώνει το κύτταρο.

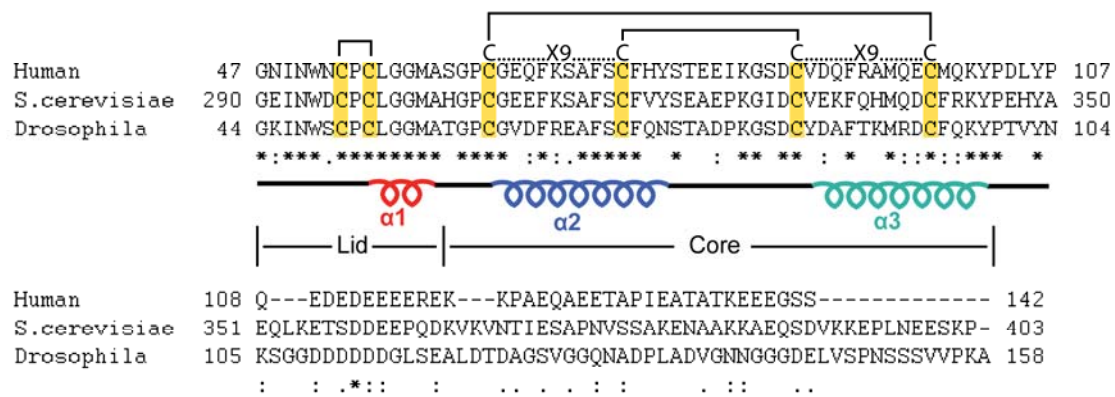


**Εικόνα 31: Η Mia40 SPC παγιδεύεται στην Erv1 στα μιτοχόνδρια.** Είσοδος ραδιενεργής Mia40 SPC σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για 20 λεπτά. Το εισαχθέν προϊόν ανοσοκατακρημνίστηκε είτε με αντίσωμα αMia40 είτε με αErv1. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης σε αναγωγικές και μη συνθήκες και εμφανίστηκαν με αυτοραδιογραφία. Ο αστερίσκος υποδεικνύει στο μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της Mia40 SPC και της ενδογενούς Erv1.

### 5.5 Η ανθρώπινη Mia40 είναι λειτουργική σε ετερόλογο σύστημα και έχει αντίστοιχο τρόπο δράσης με αυτή του σακχαρομύκητα.

Σε συνεργασία με το εργαστήριο του I. Bertini (Magnetic Resonance Center CERM, University of Florence, Italy) έγινε μια προσπάθεια δομικής ανάλυσης και χαρακτηρισμού του ανθρώπινου ορθόλογου της Mia40 με NMR. Η ανθρώπινη Mia40 (εφεξής MIA40) διαφέρει από αυτήν του σακχαρομύκητα στην πρωτοταγή τους δομή δηλαδή στο μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη αποτελείται από συνολικά 142 αμινοξέα ενώ αυτή του σακχαρομύκητα από 403 αμινοξέα. Από προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι τα πρώτα 67 αμινοξέα της Mia40 στον σακχαρομύκητα αποτελούν το σινιάλο στόχευσης στο μιτοχόνδριο και εμπέδωσης στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου μέσω του μονοπατιού της μεταθετάσης TIM23. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη δεν περιέχει αυτό το πολυπεπτιδικό τμήμα και ως εκ

τούτου εντοπίζεται διαλυτή στο διαμεμβρανικό χώρο. Επιπλέον έχει δειχθεί από *in vivo* πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας και από *in vitro* πειράματα ανασύστασης ότι λειτουργικότητα του μορίου της Mia40 του σακχαρομύκητα έγκειται στα αμινοξέα 290 – 348 με τα οποία παρουσιάζεται και η μεγαλύτερη ομολογία με το ανθρώπινο ορθόλογο (>50%). Στην περιοχή μεγαλύτερης ομολογίας μεταξύ των δυο ορθόλογων εντοπίζεται το καταλυτικό κέντρο CPC όπως επίσης και το διπλό CX9C μοτίβο, χαρακτηριστικά που είναι συντηρημένα σε όλους τους οργανισμούς.



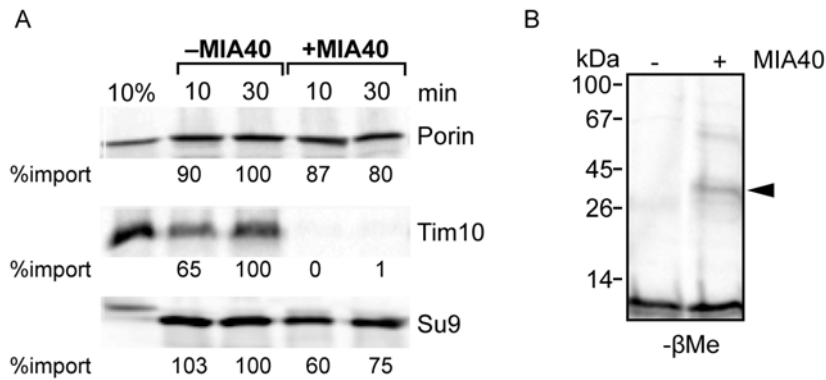
**Εικόνα 32: Ευθυγράμμιση ορθόλογων πρωτεϊνών της Mia40.**

Η δευτεροταγής δομή φαίνεται κάτω από τις αλληλουχίες. Το αμινοτελικό ‘κάλυμμα’ καθώς και η ‘κεντρική δομική περιοχή’ της Mia40 είναι σημασμένα ως lid και core αντίστοιχα. Οι κυστεΐνες καθώς και ο τρόπος που οργανώνονται φαίνονται με κίτρινο και με αντίστοιχες γραμμές. Οι τρεις έλικες που φαίνονται στην δομή της πρωτεΐνης φαίνονται ως α1, α2 και α3, τα χρώματα των οποίων είναι σε αντιστοιχία με την εικόνα.

Ελέγξαμε την λειτουργικότητα της ανθρώπινης πρωτεΐνης απομονωμένης ύστερα από υπερέκφραση σε βακτήρια *E.coli* με δυο τρόπους. Πρώτον, εξετάσαμε την δυνατότητα πρόσδεσης σε ένα αυθεντικό υπόστρωμα (Tim10) και σε δύο μη-φυσιολογικά υποστρώματα (την υπομονάδα 9 της ATP συνθάσης – Su9 - και την πορίνη) *in organello*. Συγκεκριμένα επαναλάβαμε ένα πείραμα που χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενη μελέτη για να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα του απομονωμένου συμπλόκου TIM10. Αναλυτικότερα τα τρία υποστρώματα (Tim10, Su9, porin) σημαίνονται με ραδιενεργό θείο με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης

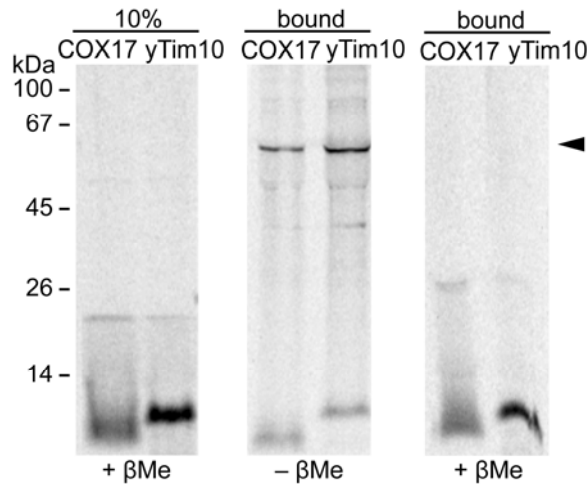
της Promega. Στη συνέχεια επωάζονται πρώτα με ανασυνδυασμένη MIA40, η οποία έχει απομονωθεί σε αερόβιες συνθήκες και έχει το ενεργό της κέντρο οξειδωμένο, και μετά με αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Τελικά ελέγχουμε το ποσοστό του ραδιοσημασμένου υποστρώματος που έχει εισέλθει στα μιτοχόνδρια.

Τα τρία υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στοχεύονται σε διαφορετικό διαμέρισμα του μιτοχονδρίου και με αυτό τον τρόπο ελέγχουμε πως επηρεάζονται τρία διαφορετικά μονοπάτια εισόδου στα μιτοχόνδρια. Η πορίνη εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη και χρησιμοποιεί το σύμπλοκο SAM για την εμπέδωση της, το υπόστρωμα Tim10 στοχεύεται στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού της Mia40, και τέλος η υπομονάδα 9 (Su9) εντοπίζεται στην μήτρα του μιτοχονδρίου μέσω της συμπλόκου μεταθετάσης TIM23. Ουσιαστικά αυτό το πείραμα στοχεύει στην επιλεκτική παρεμπόδιση της εισόδου του ραδιοσημασμένου υποστρώματος λόγω εξειδικευμένης πρόσδεσης στην MIA40 έξω από τα μιτοχόνδρια. Παρατηρήσαμε ότι η MIA40 αναστέλλει επιλεκτικά την είσοδο του Tim10 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99% και τα υπόλοιπα υποστρώματα σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά της τάξης του 20% (εικόνα 33, A). Ελέγξαμε αν η πρωτεΐνη MIA40 εμπλέκεται άμεσα στην αναστολή εισόδου του υποστρώματος Tim10 στα μιτοχόνδρια, δημιουργώντας μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με το υπόστρωμα. Αναλύσαμε το δείγμα απουσία αναγωγικού μέσου και εντοπίσαμε τον σχηματισμό μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ του ραδιενεργού υποστρώματος και της MIA40 εξωτερικά των μιτοχονδρίων.



**Εικόνα 33: Η MIA40 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Tim10 και αναστέλλει την είσοδο του στα μιτοχόνδρια.** Α) Πείραμα ανταγωνισμού εισόδου της ραδιενεργής πορίνης, Tim10, και Su9 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια παρουσία ή απουσία απομονωμένης 10 μM MIA40 για 10 και 30 λεπτά. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS σε αναγωγικές συνθήκες. Το ποσοστό ραδιενεργού υποστρώματος που έχει εισέλθει στα μιτοχόνδρια φαίνεται κάτω από κάθε δείγμα. Β) Όπως στο Α αλλά το δείγμα του Tim10 που δεν εισήλθε στα μιτοχόνδρια κατακρημνίστηκε με 10% TCA και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS σε μη- αναγωγικές συνθήκες.

Παράλληλα ελέγξαμε αν η MIA40 που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση με NMR μπορεί να αλληλεπιδράσει ομοιοπολικά με τα υποστρώματα Tim10 και Cox17 σε αντίστοιχο πείραμα ανασύστασης *in vitro*. Ακίνητοποιημένη MIA40 σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης επωάστηκε με CX9C υπόστρωμα - ανθρώπινη COX17 - και με CX3C υπόστρωμα - Tim10 σακχαρομύκητα - σε αντίστοιχο πείραμα με αυτό που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την Mia40 σακχαρομύκητα. Παρατηρήσαμε ότι σχηματίζεται μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της ανθρώπινης MIA40 και του ανθρώπινου Cox17 υποστρώματος και του Tim10 σακχαρομύκητα (εικόνα 34, βέλος) που είναι ευαίσθητο στην προσθήκη αναγωγικού μέσου. Από τα παραπάνω καταλήγουμε ότι η ανθρώπινη MIA40 όπως απομονώνεται από βακτήρια είναι λειτουργική ακόμα και με ετερόλογα υποστρώματα και επιπλέον αντικατοπτρίζει την συμπεριφορά της Mia40 του σακχαρομύκητα.



**Εικόνα 34: Η MIA40 σχηματίζει δισουλφιδικά ενδιάμεσα με COX17 και γTim10 *in vitro*.**

Ακίνητοποιημένη MIA40 επώαστηκε με ραδιενεργό υπόστρωμα Tim10 σακχαρομύκητα και ανθρώπινη Cox17 για 10 λεπτά στους 4°C. Η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη NEM και τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης με (δεξιά στήλη) ή χωρίς (μεσαία στήλη) β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν με αυτοραδιογραφία. Με βέλος υποδεικνύεται το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την MIA40.

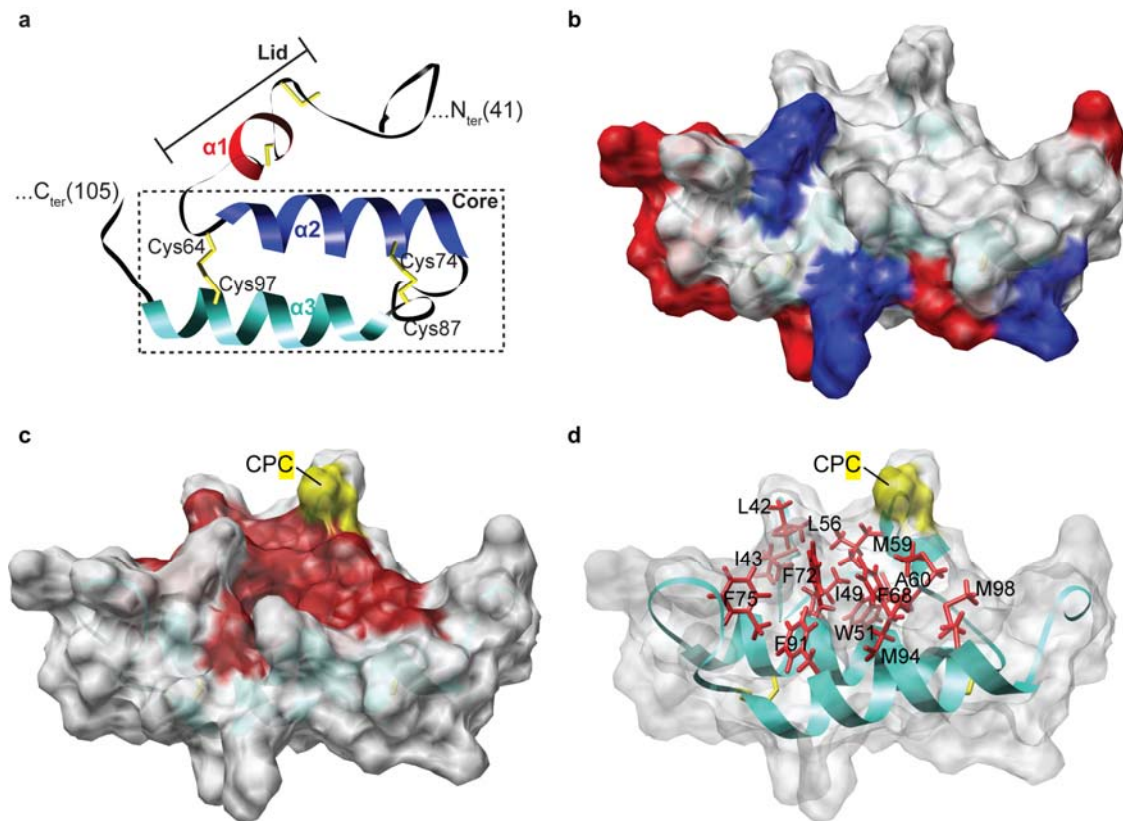
### 5.6 Δομικός χαρακτηρισμός της MIA40.

Προηγούμενες μελέτες της Mia40 του σακχαρομύκητα είχαν δείξει με φασματομετρία μάζας και περιορισμένη θρυψινόλυση ότι οι κυστεΐνες της Mia40 συμμετέχουν στον σχηματισμό τριών δισουλφιδικών δεσμών (Grumbt et al., 2007). Συγκεκριμένα είχαν παρατηρήσει ότι στο διπλό μοτίβο CX9C οι κυστεΐνες οργανώνονται αντι-παράλληλα, δηλαδή η πρώτη κυστεΐνη σχηματίζει μια εξωτερική δισουλφιδική γέφυρα με την τέταρτη κυστεΐνη ενώ οι εσωτερικές 2 και 3 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Παράλληλα είχε δειχτεί ότι οι κυστεΐνες στο CPC μοτίβο είναι οξειδωμένες μεταξύ τους. Η λύση της τριτοταγούς δομής της MIA40 με NMR από το εργαστήριο του I. Bertini εξηγεί δομικά τους λόγους για τους οποίους η δεύτερη κυστεΐνη συγκεκριμένα είναι η ενεργή κυστεΐνη του μορίου.

Η δομή της ανθρώπινης MIA40 λύθηκε και για την πλήρως οξειδωμένη πρωτεΐνη (3 δισουλφιδικές γέφυρες) και για την μερικώς ανηγμένη (2 δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των κυστεϊνών στο CX9C μοτίβο). Παρατηρήσαμε ότι και στις δύο μορφές

της πρωτεΐνης σχηματίζεται μια μικρή  $\alpha$ -έλικα κοντά στο CPC μοτίβο (έλικα  $\alpha_1$ , αμινοξέα 56-59) και δύο μεγαλύτερες  $\alpha$ -έλικες στο εκάστοτε CX9C μοτίβο (έλικα  $\alpha_2$ , αμινοξέα 65-77, και έλικα  $\alpha_3$ , αμινοξέα 88-100). Ενδιαφέρον είναι ότι το 80% της πρωτεΐνης, κυρίως το αμινο- και καρβοξυ- τελικό άκρο, δεν έχει κάποια συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών είναι αρκετά ευέλικτο (flexible). Το αποτέλεσμα αυτό ισχυροποιείται και από το γεγονός ότι το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο δεν είναι απαραίτητα για την βιωσιμότητα του κυττάρου (Naoe et al., 2004).

Το αναδιπλωμένο τμήμα της MIA40 χαρακτηρίζεται από τις περιοχές lid and core. Η κεντρική δομική περιοχή (core) απαρτίζεται από τις αντιπαράλληλες, σε δομή φουρκέτας, έλικες  $\alpha_2$  (κατάλοιπα 65-77) και  $\alpha_3$  (κατάλοιπα 88-100) που συγκρατούνται από δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δισουλφιδικές γέφυρες σχηματίζονται από παράλληλα τοποθετημένες κυστεΐνες του διπλού CX9C μοτίβου και συγκεκριμένα από τα κυστεϊνικά ζεύγη C64-C97 (εξωτερική δισουλφιδική γέφυρα) και C74-C87 (εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα). Η περιοχή κάλυμμα (lid) αναδιπλώνεται πάνω στην κεντρική δομική περιοχή και παρόλο που δεν περιέχει δευτεροταγή στοιχεία, με την εξαίρεση της μικρής  $\alpha$ -έλικας ( $\alpha_1$ , κατάλοιπα 56-59) είναι δομικά σταθερή περιοχή. Ενδιαφέρον είναι ότι η περιοχή στο καταλυτικό κέντρο CPC είναι σταθερή όταν οι κυστεΐνες είναι οξειδωμένες ενώ τοπικά γίνεται πιο ευέλικτη σε περίπτωση που είναι ανηγμένες. Η διαφορά στην δομική σταθερότητα του μοτίβου ανάλογα με την οξειδωτική μορφή στην οποία βρίσκεται μπορεί να αντικατοπτρίζει την λειτουργική σημασία του καταλυτικού κέντρου.



### Εικόνα 35: Χαρακτηρισμός της δομής της MIA40 με NMR.

Α) Διάγραμμα κορδέλας που δείχνει τις τρεις  $\alpha$ -έλικες στην δομή της MIA40. Η περιοχή κάλυμμα (lid) και η κεντρική δομική περιοχή (core) αναγράφονται στην εικόνα. Η  $\alpha$ -έλικα στο αμινοτελικό κάλυμμα αναγράφεται με  $\alpha 1$  και φαίνεται με κόκκινο. Οι δύο  $\alpha$ -έλικες στην κεντρική δομική περιοχή που σχηματίζουν την δομή φουρκέτας αναγράφονται με  $\alpha 2$  και  $\alpha 3$  και φαίνονται με μπλε και κυανό χρώμα αντίστοιχα. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και οι ελεύθερες σουλφυδριλομάδες φαίνονται με κίτρινο. Β) Χωροπληρωτικό μοντέλο της MIA40 που δείχνει τα φορτισμένα αμινοξέα (με μπλε τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, με κόκκινο τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα, με άσπρο τα μη-φορτισμένα). Γ) Χωροπληρωτικό μοντέλο της MIA40 που δείχνει με κόκκινο την υδρόφοβη κοιλότητα και με κίτρινο την ενεργή κυστεΐνη. Με διαυγές κυανό χρώμα φαίνεται η δομή φουρκέτας. Δ) Τα αμινοξέα που απαρτίζουν την υδρόφοβη κοιλότητα φαίνονται με κόκκινο. Η ενεργή κυστεΐνη C55 στο μοτίβο CPC φαίνεται με κίτρινο και τοποθετείται κοντά στην υδρόφοβη κοιλότητα. Η δομή φουρκέτας φαίνεται με κυανό.

Άλλο ένα χαρακτηριστικό που διαφαίνεται από την δομή της πρωτεΐνης είναι ότι στην περιοχή 'κάλυμμα' υπάρχουν συντηρημένα υδρόφοβα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα τοποθετημένα στην κεντρική δομική περιοχή. Η περιοχή που αλληλεπιδρούν τα υδρόφοβα αμινοξέα εντοπίζεται σε κεντρικό σημείο της πρωτεΐνης και μάλιστα σχηματίζει ένα ρηχό αυλάκι (shallow cleft), ενώ ταυτόχρονα τα φορτισμένα αμινοξέα τοποθετούνται σε εξωτερικά σημεία της πρωτεΐνης (εικόνα 35, Β). Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του καλύμματος



και της κεντρικής περιοχής βοηθούν στο να βρίσκεται το CPC μοτίβο καλά εκτεθειμένο στο διάλυμα έτσι ώστε να προεξέχει της υδρόφοβης κοιλότητας (cleft) που απαρτίζεται από τα συντηρημένα υδρόφοβα και αρωματικά αμινοξέα L42, I43, W51, L56, M59, A60, F68, F72, F75, F91, M94, και M98 (εικόνα 35, Δ). Η δεύτερη ενεργή κυστεΐνη C55 του καταλυτικού κέντρου CPC (εικόνα 35, με κίτρινο) τοποθετείται ακριβώς από πάνω από την υδρόφοβη περιοχή της MIA40.

Συμπερασματικά εξετάζοντας την δομή της MIA40 καταλήγουμε σε τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά. Πρώτον, υπάρχει μεγάλο ποσοστό μη-δομημένων τμημάτων στα αμινο- και καρβόξυ- τελικά άκρα της πρωτεΐνης. Δεύτερον, υπάρχει μια κεντρική δομημένη περιοχή από δύο αντι-παράλληλες α-έλικες που σταθεροποιείται από δισουλφιδικούς δεσμούς. Τρίτον, εντοπίζονται πολλά υδρόφοβα αμινοξέα στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης σχηματίζοντας μια χαρακτηριστική υδρόφοβη περιοχή. Τέλος, το καταλυτικό κέντρο φαίνεται εκτεθειμένο στη δομή της πρωτεΐνης, με την ενεργή κυστεΐνη να βρίσκεται σε γειτνίαση με την υδρόφοβη περιοχή στοιχειοθετώντας έτσι μια πιθανή περιοχή πρόσδεσης για το υπόστρωμα.

### **5.7 Η αναγνώριση του υποστρώματος εξαρτάται από την υδρόφοβη περιοχή της Mia40.**

Εξετάζοντας την δομή της MIA40 παρατηρήσαμε ότι υπάρχει μια περιοχή εκτεταμένων υδρόφοβων αμινοξέων που οριοθετούν ένα ρηχό αυλάκι. Αναρωτηθήκαμε αν η συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να λειτουργεί και ως περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος ώστε αυτό να είναι προσβάσιμο στην ενεργή κυστεΐνη που φαίνεται ιδανικά τοποθετημένη σε γειτνίαση της υδρόφοβης περιοχής για να μπορεί να συμμετέχει στην οξειδωση. Πραγματοποιήσαμε σημειακές πολλαπλές αντικαταστάσεις των υδρόφοβων αμινοξέων που απαρτίζουν την υδρόφοβη πιθανή

περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος σε αλανίνες. Στην υποενότητα 5.5 δείξαμε ότι λειτουργικό ανάλογο της ανθρώπινης MIA40 αποτελεί η ορθόλογη πρωτεΐνη στον σακχαρομύκητα. Λόγω του ότι μπορούμε να αξιοποιήσουμε το *GALMia40* στέλεχος του σακχαρομύκητα για να μελετήσουμε *in vivo* τον φαινότυπο των μεταλλαγών αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε τις μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη Mia40 του σακχαρομύκητα. Αναλυτικότερα οι μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στην εικόνα 36 καθώς και οι αντιστοιχίες στα αμινοξέα της ανθρώπινης Mia40.

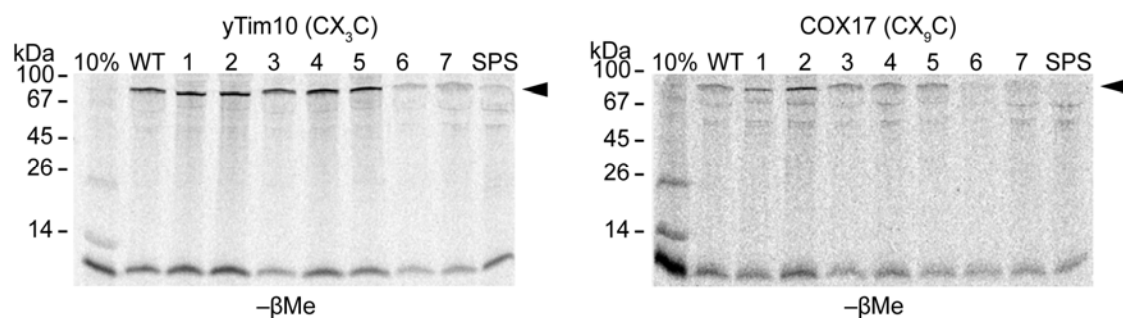
No	<i>γ</i> Mia40	MIA40
1	I292A W294A F311A F315A	I49A W51A F72A F75A
2	L299A M302A F311A F315A	L56A M59A F72A F75A
3	F311A F315A F334A M337A	F72A F75A F91A M94
4	I292A W294A L299A M302A F311A F315A	I49A W51A L56A M59A F72A F75
5	I292A W294A F311A F315A F334A M337A	I49A W51A F72A F75A F91A M94
6	L299A M302A F311A F315A F334A M337A	L56A M59A F72A F75A F91A M94A
7	I292A W294A L299A M302A F311A F315A F334A M337A	I49A W51A L56A M59A F72A F75A F91A M94A

**Εικόνα 36: Πίνακας μεταλλάξεων στην *γ*Mia40 και αντιστοιχία αμινοξέων στην MIA40.**

Στην αριστερή στήλη φαίνονται οι μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στην Mia40 σακχαρομύκητα και στην δεξιά στήλη η αντιστοιχία των μεταλλαγών στην ανθρώπινη MIA40.

Ελέγξαμε την λειτουργικότητα των πρωτεϊνών Mia40 που φέρουν τις μεταλλάξεις που ορίζονται στην εικόνα με *in vitro* ανασύσταση της αντίδρασης με το υπόστρωμα (εικόνα 37). Ραδιενεργά υποστρώματα Tim10 και Cox17 επώαστηκαν με τις μεταλλαγμένες εκδόσεις της Mia40 που φαίνονται στην εικόνα ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθιόνης-αγαρόζης. Παρατηρήσαμε ότι το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο δεν σχηματίστηκε στην περίπτωση που η Mia40 είχε περισσότερες από 6 αντικαταστάσεις υδρόφοβων αμινοξέων σε αλανίνες. Τα τετραπλά καθώς και δύο εξαπλά μεταλλάγματα δεν είχαν πρόβλημα στην αλληλεπίδραση και πρόσδεση του υποστρώματος. Αντίθετα όταν αντικαταστήσαμε όλη την υδρόφοβη περιοχή με

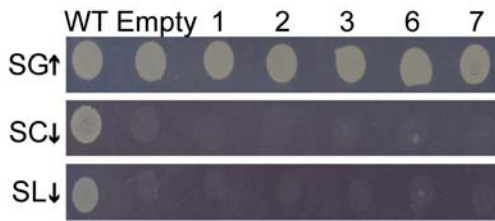
αλανίνες (οκτώ αμινοξέα) διαπιστώσαμε ότι χάνεται η ικανότητα αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα. Τα *in vitro* αποτελέσματα είναι ίδια ανεξάρτητα από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για το πείραμα υποδεικνύοντας έτσι σε ένα γενικότερο τρόπο αναγνώρισης των υποστρωμάτων από την Mia40. Το γεγονός ότι χρειάζεται να αντικαταστήσουμε αρκετά αμινοξέα προκειμένου να έχουμε ένα μετρήσιμο πρόβλημα στην πρόσδεση του υποστρώματος υποδηλώνει την ασθενή φύση της διαμοριακής μη-ομοιοπολικής υδρόφοβης αλληλεπίδρασης. Επιπλέον είναι λογικό και αναμενόμενο η αλληλεπίδραση της οξειδάσης με το υπόστρωμα να είναι παροδική και ασθενής δεδομένου ότι το υπόστρωμα πρέπει να απελευθερωθεί από την Mia40 και να μην παγιδευτεί μόνιμα σε αυτήν.



**Εικόνα 37: *In vitro* έλεγχος αλληλεπίδρασης υδρόφοβων μεταλλαγμάτων με υποστρώματα.** Ραδιενεργό Tim10 (αριστερά) και Cox17 (δεξιά) επώαστηκαν για 10 λεπτά με μεταλλαγμένες εκδόσεις της Mia40 ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια γλουταθιόνης. Το προσδεμένο υπόστρωμα αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Το βέλος δείχνει το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της Mia40 και του υποστρώματος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις μεταλλαγμένες εκδόσεις της Mia40 που αναφέρονται στον πίνακα της εικόνας 36.

Παράλληλα μελετήσαμε *in vivo* την επίπτωση των μεταλλαγών στην βιωσιμότητα των κυττάρων σακχαρομύκητα με πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας ακριβώς όπως είχε πραγματοποιηθεί και για τις μεταλλαγές στο CPC μοτίβο (§ 5.4). Παρατηρήσαμε ότι οι μεταλλαγές στην υδρόφοβη περιοχή της Mia40 δεν είναι ανεκτικές από το κύτταρο και οδηγούν στη θνησιμότητα του στελέχους ακόμα και όταν μεταλλάσουμε μόλις δύο αμινοξέα (εικόνα 38). Συμπερασματικά μπορούμε να καταλήξουμε ότι η συγκεκριμένη περιοχή έχει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του

υποστρώματος και ότι τα *in vitro* προβλήματα αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα αντικατοπτρίζονται στον θνησιγόνο φαινότυπο *in vivo*.



**Εικόνα 38: Γενετική συμπληρωματικότητα υδρόφοβων μεταλλαγμάτων της Mia40.**

Όπως περιγράφεται και στην εικόνα 29. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις της Mia40 που αναφέρονται στον πίνακα της εικόνας 36.

## 5.8 Συζήτηση

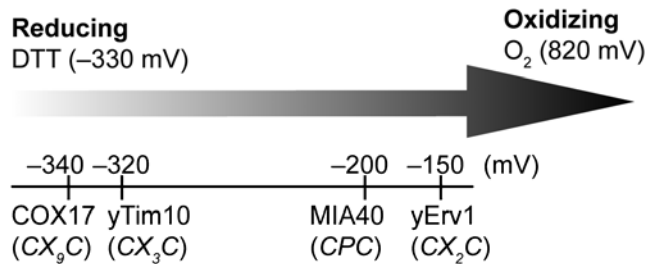
Η δομή της MIA40 δεν φέρει καμία ομοιότητα με άλλες κυτταρικές οξειδοαναγωγάσες, ορίζοντας έτσι μια νέα κατηγορία ενζύμου. Ένα κοινό χαρακτηριστικό που απαντάται σε άλλες οξειδοαναγωγάσες εκτός της Mia40, όπως είναι η ευκαρυωτική PDI και η βακτηριακή DsbA, είναι το μοτίβο θειορεδοξίνης. Το όνομα έχει προκύψει από το μοτίβο που βρίσκεται στην θειορεδοξίνη, μια μικρή πανταχού παρούσα πρωτεΐνη που έχει καταλυτικό ρόλο στην απόσβεση ελευθέρων ριζών στο κύτταρο και αποτελείται από τέσσερις β-πτυχωτές θαμμένες από τέσσερις α-έλικες από όπου προβάλλει το καταλυτικό CXXC κέντρο της πρωτεΐνης. Η MIA40 δεν περιέχει το συγκεκριμένο μοτίβο και μάλιστα το δομημένο της τμήμα (66 αμινοξέα) είναι πολύ μικρότερο από το μοτίβο θειορεδοξίνης (127 αμινοξέα). Υπό αυτή την έννοια η MIA40 αποτελεί παράδειγμα του μικρότερου οξειδοαναγωγικού τμήματος που έχει χαρακτηριστεί ως τώρα.

Η MIA40 περιέχει μια κεντρική δομική περιοχή που αποτελείται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες που σταθεροποιούνται από δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η MIA40 φαίνεται να μοιάζει δομικά με τα

υποστρώματα της. Μπορεί επομένως η MIA40 και τα υποστρώματα της εξελικτικά να έχουν προκύψει από ένα κοινό πρόγονο. Η λειτουργική και δομική τους διαφοροποίηση φαίνεται να έγκειται στις διαφορές τους στο αμινοτελικό άκρο. Συγκεκριμένα το αμινοτελικό 'κάλυμμα' της MIA40 είναι δομικά πιο οργανωμένο και άκαμπτο σε σχέση με τα αμινοτελικά τμήματα της Cox17 και του Tim10. Επιπλέον το αμινοτελικό 'κάλυμμα' της MIA40 σταθεροποιείται στην κεντρική δομική περιοχή με εκτεταμένες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που είναι μοναδικές στην MIA40 και δεν απαντώνται στα υποστρώματα της. Τέλος στην MIA40 έχει προστεθεί το καταλυτικό CPC μοτίβο ιδανικά τοποθετημένο σε γειτνίαση της υδρόφοβης περιοχής. Αντίθετα τα υποστρώματά της δεν περιέχουν κάποιο αντίστοιχο μοτίβο, ενώ στην περίπτωση του Cox17 το CC μοτίβο στο αμινοτελικό άκρο, υπεύθυνο για την πρόσδεση που μετάλλου, είναι τοποθετημένο σε μικρότερη απόσταση από την διπλή α-έλικα. Τα μοναδικά χαρακτηριστικά του αμινοτελικού 'καλύμματος' προικοδοτούν την MIA40 με τη οξειδοαναγωγική της δράση και την διαφοροποιούν από τα υποστρώματα της.

Επιπλέον με *in vitro* πειράματα ανασύστασης της αλληλεπίδρασης της MIA40 με τα υποστρώματα της προσδιορίσαμε ότι το καταλυτικό της κέντρο εντοπίζεται στο CPC μοτίβο ενώ η ενεργή δράση του μοτίβου περιορίζεται στην δεύτερη κυστεΐνη. Στην ενεργότητα του ενζύμου δεν υπεισέρχονται καθόλου οι δομικές κυστεΐνες του CX9C μοτίβου. Από την δομή φαίνεται ότι το μοτίβο είναι εκτεθειμένο στο δομή της πρωτεΐνης και μάλιστα καίρια τοποθετημένο ώστε να επιτρέπει την άμεση και ευχερή μεταφορά δισουλφιδικού δεσμού στο υπόστρωμα. Η οξειδοαναγωγική ικανότητα (redox potential) του CPC μοτίβου υπολογίστηκε στα  $-200 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ , γεγονός που ευνοεί θερμοδυναμικά την οξείδωση των υποστρωμάτων με μικρότερες οξειδωτικές ικανότητες όπως  $-340 \text{ mV}$  για την COX17 (CX9C) και  $-320 \text{ mV}$  για τα μικρά Tim

(CX3C). Με αντίστοιχο τρόπο ευνοείται η οξείδωση του CPC μοτίβου από την πιο οξειδωτική Ern1 (ικανότητα οξείδωσης -150 mV). Θερμοδυναμικά λοιπόν υποστηρίζεται το πειραματικό μοντέλο ροής ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα, στο CPC μοτίβο της MIA40, στην Ern1 και τέλος στο κυτόχρωμα c (εικόνα 39).



**Εικόνα 39: Οξειδωτικό δυναμικό πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της Mia40.**

Παράλληλα φαίνεται ότι το μοτίβο προβάλλει από μία υδρόφοβη περιοχή που σχηματίζεται και σταθεροποιείται από συντηρημένα υδρόφοβα και αρωματικά κατάλοιπα στο κεντρικό δομικό τμήμα της πρωτεΐνης. Εξετάσαμε τον πιθανό ρόλο της υδρόφοβης περιοχής ως περιοχή αναγνώρισης του υποστρώματος με μεταλλαξιγένεση στα συγκεκριμένα κατάλοιπα που οριοθετούν αυτή την περιοχή. Αντικαθιστώντας έξι υδρόφοβα αμινοξέα με αλανίνες παρατηρήσαμε ότι χάνεται η αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα ενώ ταυτόχρονα οι μεταλλαγές δεν είναι ανεκτές για την βιωσιμότητα του κυττάρου. Τα *in vitro* αποτελέσματα είναι ίδια ανεξάρτητα από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για το πείραμα υποδεικνύοντας έτσι σε ένα γενικότερο τρόπο αναγνώρισης των υποστρωμάτων από την Mia40.

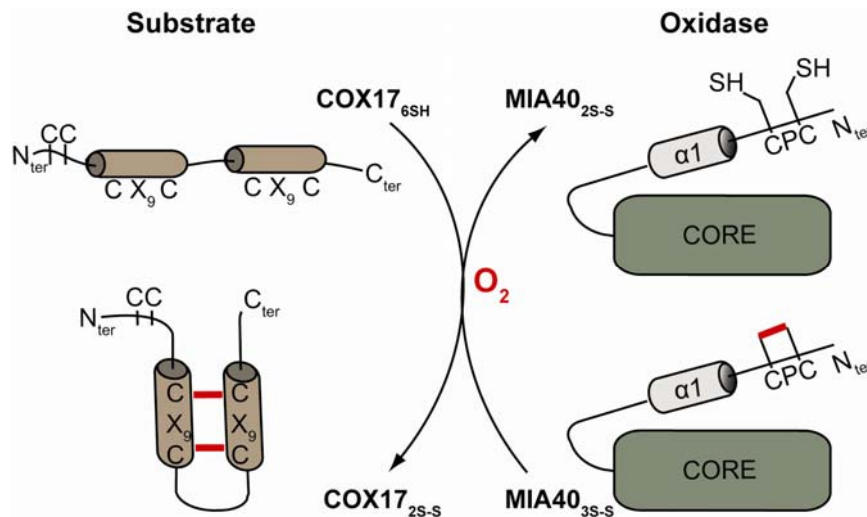
Διαπιστώσαμε ότι χρειάζεται να αντικαταστήσουμε αρκετά αμινοξέα προκειμένου να χαθεί η πρόσδεση του υποστρώματος γεγονός που χαρακτηρίζει την αναμενόμενη ασθενή φύση της διαμοριακής υδρόφοβης αλληλεπίδρασης. Ταυτόχρονα εξηγεί και τον διπλό ρόλο που έχει η MIA40 στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου ως υποδοχέας εισόδου στα μιτοχόνδρια και οξειδάση υποστρωμάτων. Η υδρόφοβη

περιοχή δύναται να λειτουργεί ως περιοχή αναγνώρισης και πρόσδεσης των νέο-εισερχόμενων υποστρωμάτων σταθεροποιώντας τα αρχικά με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και τοποθετώντας τα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι προσβάσιμα στο CPC μοτίβο του αμινοτελικού ‘καλύμματος’. Με αυτό τον τρόπο η MIA40 μπορεί να επιτελεί τους δύο λειτουργικούς της ρόλους.

Παράλληλα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο του I. Bertini (Magnetic Resonance Center CERM, University of Florence, Italy) είχαν ως σκοπό την διερεύνηση του μηχανισμού οξειδωτικής κατάλυσης του υποστρώματος. Με NMR έλεγξαν την οξειδωτική κατάσταση ανηγμένου Cox17 πριν και μετά την αλληλεπίδραση σε διάλυμα με MIA40. Παρατήρησαν ότι η πρωτεΐνη σε διάστημα 12 ωρών δεν οξειδώθηκε αυθόρμητα μέσω οξυγόνου. Αντίθετα μόλις επώαστηκε με πλήρως οξειδωμένη MIA40 σε αναλογία 1:1 για διάστημα 30 λεπτών παρατήρησαν την πλήρη οξείδωση του υποστρώματος, την δημιουργία δηλαδή δύο δισουλφιδικών δεσμών με την ταυτόχρονη αναγωγή του καταλυτικού κέντρου της MIA40. Το γεγονός ότι βρίσκουμε την MIA40 ανηγμένη υποδηλώνει ότι το οξυγόνο συμμετέχει στην δημιουργία ενός δισουλφιδικού δεσμού στο υπόστρωμα. Αν η MIA40 κατέλυε και την δεύτερη αντίδραση θα σήμαινε ότι ανακυκλώνεται το ενεργό της κέντρο από το οξυγόνο και συνεπώς θα έπρεπε οποιαδήποτε στιγμή να βρεθεί σε οξειδωμένη κατάσταση. Επώαση του μερικώς ανηγμένου υποστρώματος με MIA40 δηλαδή αυτού που έχει ανηγμένο το CPC μοτίβο δεν οδήγησε σε οξείδωση του υποστρώματος, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός ενός δισουλφιδικού δεσμού από την MIA40 είναι αναγκαία προϋπόθεση για τον σχηματισμού του δεύτερου από το οξυγόνο.

Συμπερασματικά μπορούμε να συνοψίσουμε τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου σε ένα μοντέλο μεταφοράς ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στην MIA40 που φαίνεται στην εικόνα 40. Η πλήρης οξειδωση του ανηγμένου υποστρώματος (Cox17) από το οξυγόνο δεν ευνοείται κινητικά. Η MIA40 καταλύει την δημιουργία μιας δισουλφιδικής γέφυρας στο υπόστρωμα μέσω της δεύτερης ενεργής κυστεΐνης του CPC καταλυτικού κέντρου. Μόλις σχηματιστεί ο πρώτος δισουλφιδικός δεσμός στην Cox17 μέσω της MIA40, οι άλλες δυο κυστεΐνες έχουν τοποθετηθεί αντιπαράλληλα ώστε να σχηματιστεί ο δεύτερος από το οξυγόνο. Στο κύτταρο είναι πιθανόν να σχηματίζεται ο δεύτερος δισουλφιδικός δεσμός μέσω της Egn1, που έχει βρεθεί σε σύμπλοκο με την MIA40 κάτω από ορισμένες συνθήκες, ή μέσω άλλων πρωτεϊνών ή και μικρών οξειδωτικών μορίων (Mesecke et al., 2005; Muller et al., 2008). Η κατάλυση μιας δισουλφιδικής γέφυρας από την MIA40 φαίνεται να ισχύει για την Cox17 (CX9C υπόστρωμα) και για την Tim10 (CX3C υπόστρωμα) υποδεικνύοντας σε ένα γενικότερο τρόπο δράσης. Φαίνεται πως η δημιουργία μιας δισουλφιδικής γέφυρας είναι αρκετή για να φέρει τις άλλες κυστεΐνες σε γειτνίαση ώστε να οξειδωθούν ανεξάρτητα από το πόσα αμινοξέα παρεμβάλλονται μεταξύ των δύο δισουλφιδικών δεσμών. Η απόσταση των  $n$  αμινοξέων στο CX $n$ C μοτίβο είναι σημαντική για την τελική σταθεροποίηση του υποστρώματος είτε σε δύο ευθυγραμμισμένες  $\alpha$ -έλικες όπως είναι στην περίπτωση της Cox17 ( $n = 9$ ), είτε σε δύο  $\alpha$ -έλικες σε μερική κλίση η μια από την άλλη όπως είναι στην περίπτωση των μικρών Tim ( $n = 3$ ). Στο τέλος της αντίδρασης το υπόστρωμα έχει οξειδωθεί πλήρως ενώ η MIA40 είναι ανηγμένη στο καταλυτικό της κέντρο.





**Εικόνα 40: Μοντέλο οξείδωσης του υποστρώματος COX17 από την MIA40**

Σχηματική απεικόνιση της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης μεταξύ της MIA40<sub>3S-S</sub> και COX17<sub>6SH</sub> όπως παρατηρήθηκε *in vitro* με NMR. Το καταλυτικό μοτίβο CPC της MIA40 (με κόκκινο) ανάγεται και μεταφέρεται στο υπόστρωμα COX17. Ο δεύτερος δισουλφιδικός δεσμός του υποστρώματος πιθανά καταλύεται από το οξυγόνο.

Σε αυτό το κεφάλαιο μελετήσαμε τον τρόπο δράσης και οξείδωσης αυθεντικών μιτοχονδριακών υποστρωμάτων από την Mia40. Τα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά αποτελέσματα στηρίζουν βιοχημικά την λειτουργική πληροφορία που αντλούμε από την δομή της MIA40, και αποσαφηνίζουν την διαδικασία οξειδωτικής αναδίπλωσης των υποστρωμάτων σε μοριακό επίπεδο. Ο μηχανισμός δράσης στον οποίο καταλήγουμε είναι γενικός και μπορεί να εξηγήσει το μεγάλο εύρος υποστρωμάτων για την Mia40.

Τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου έχουν πραγματοποιηθεί σε συνεργασία με το εργαστήριο του I. Bertini και έχουν δημοσιευθεί περιοδικό *Nature Structural and Molecular Biology*, Banci L, Bertini I, Cefaro C, Cioffi-Baffoni S, Gallo A, Martinelli M, Sideris DP, Katrakili N, Tokatlidis K. 2009, 16(2), 198-206.

(Banci et al., 2009a), ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### **Η οξειδωτική αναδίπλωση των μικρών Tim μέσω της Mia40 καθοδηγείται από συγκεκριμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα του υποστρώματος**

#### **6.1 Εισαγωγή**

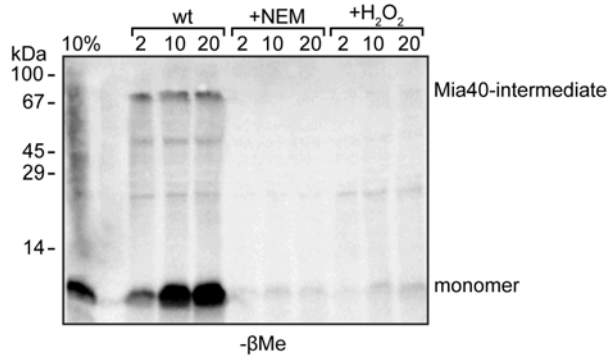
Η οξειδωτική αναδίπλωση των νεο-εισερχόμενων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στηρίζεται σε έναν πρόσφατα αναγνωρισμένο πρωτεϊνικό μηχανισμό. Σε αυτό το κεφάλαιο μελετάμε τις μηχανιστικές παραμέτρους που ορίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του υποστρώματος και της οξειδάσης Mia40. Ως μοντέλο υπόστρωμα χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη Tim10 η οποία περιέχει ένα χαρακτηριστικό διπλό συντηρημένο CX3C μοτίβο. Με την δημιουργία σημειακών μεταλλαγών του μοτίβου σε σερίνες μελετήσαμε ποια κυστεϊνικά κατάλοιπα είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση της οξειδάσης Mia40 με το υπόστρωμα Tim10. Με αυτή την μελέτη δείχνουμε πως η πρώτη κυστεΐνη του υποστρώματος είναι υπεύθυνη για την ακινητοποίηση του πάνω στην οξειδάση, ενώ η απομάκρυνση του υποστρώματος στην πλήρως οξειδωμένη κατάσταση εξαρτάται από την δημιουργία της εξωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας. Παράλληλα εξετάζουμε αν ο μηχανισμός αναγνώρισης και πρόσδεσης συγκεκριμένης κυστεΐνης στα μικρά Tim, ισχύει και για άλλη κατηγορία υποστρωμάτων υποδεικνύοντας έτσι σε ένα γενικότερο τρόπο δράσης της Mia40.

#### **6.2 Το Tim10 οξειδώνεται στα μιτοχόνδρια μέσω του μονοπατιού της Mia40.**

Προκειμένου να επαληθεύσουμε ότι το υπόστρωμα χρειάζεται να βρίσκεται σε ανηγμένη και ξεδίπλωτη κατάσταση για να εισέλθει στο μιτοχόνδριο πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου ραδιενεργού Tim10 υποστρώματος. Με το *in*

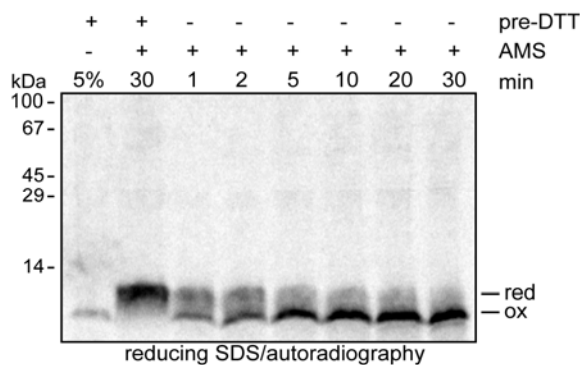
*in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης της Promega το υπόστρωμα Tim10 σημαίνεται με ραδιενεργό θείο παρουσία 1 mM DTT ποσότητα αρκετή για να διατηρήσει το υπόστρωμα σε ανηγμένη κατάσταση. Πριν την επώαση με τα μιτοχόνδρια το υπόστρωμα επεξεργάστηκε με τον αλκυλιωτικό παράγοντα NEM ή με υπεροξείδιο του υδρογόνου προκειμένου να δεσμεύσουμε τις ελεύθερες σουλφυδριλομάδες και να οξειδώσουμε το υπόστρωμα αντίστοιχα. Η ραδιενεργή πρωτεΐνη Tim10 εισάγεται σε μιτοχόνδρια απομονωμένα από αγρίου τύπου κύτταρα σακχαρομούκητα για συγκεκριμένα διαστήματα χρόνου. Στην συνέχεια επεξεργαζόμαστε τα μιτοχόνδρια με χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνάσης K εξασφαλίζοντας έτσι την αποικοδόμηση του υποστρώματος που δεν έχει εισέλθει στα μιτοχόνδρια. Το ραδιενεργό υπόστρωμα που έχει εισέλθει στα μιτοχόνδρια και άρα είναι προστατευμένο από την πρωτεΐνάση διαχωρίζεται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με ηλεκτροφόρηση SDS παρουσία αναγωγικού μέσου και φαίνεται με αυτοραδιογραφία.

Παρατηρήσαμε ότι το μη επεξεργασμένο υπόστρωμα εισέρχεται στα μιτοχόνδρια ενώ η συνολική ποσότητα αυξάνεται στην διάρκεια του χρόνου (εικόνα 41). Παράλληλα στην περίπτωση που οι ελεύθερες σουλφυδριλομάδες είναι δεσμευμένες με τον αλκυλιωτικό παράγοντα NEM το υπόστρωμα δεν εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, όπως επίσης και στην περίπτωση που εξαναγκάζουμε την δημιουργία οξειδωμένου υποστρώματος με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συμπερασματικά λοιπόν φαίνεται ότι για την είσοδο του υποστρώματος στα μιτοχόνδρια χρειάζεται να είναι σε ξεδίπλωτη κατάσταση και οι κυστεΐνες του να είναι ελεύθερες και ανηγμένες.



**Εικόνα 41: Το υπόστρωμα Tim10 εισέρχεται στα μιτοχόνδρια μόνο σε ανηγμένη κατάσταση.** Ραδιενεργό υπόστρωμα επώαστηκε με 5 mM NEM ή 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 10 λεπτά στους 30°C και χρησιμοποιήθηκε για είσοδο σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα στους 30°C. Με πρωτεΐνάση K απομακρύνθηκε το μη-εισερχόμενο υπόστρωμα και τα δείγματα αναλύθηκαν σε μη-αναγωγικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Η εικόνα είναι προϊόν αυτοραδιογραφίας.

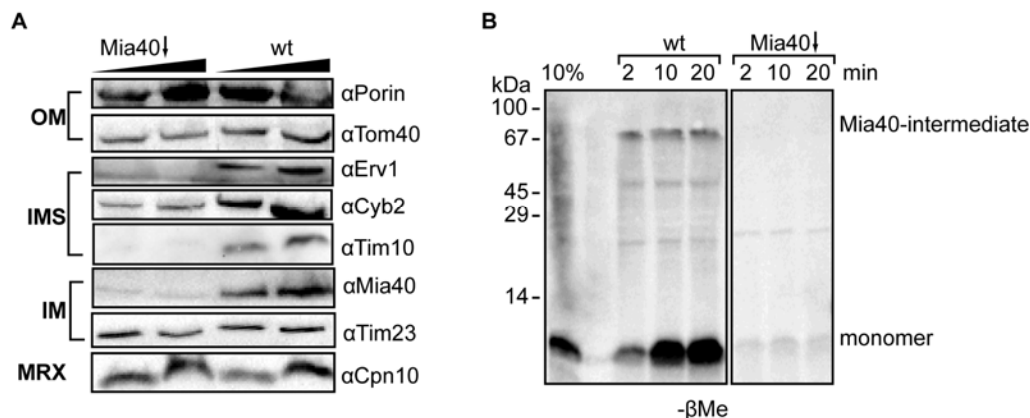
Παράλληλα ελέγξαμε αν το υπόστρωμα οξειδώνεται μετά την είσοδό του σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου με ραδιενεργό υπόστρωμα και παρακολουθήσαμε την οξείδωση του στην διάρκεια του χρόνου χρησιμοποιώντας τον αλκυλιωτικό παράγοντα AMS που προσδένεται στις ελεύθερες σουλφυδριλομάδες προσθέτοντας 500 Da. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να ελέγξουμε αν οι κυστεΐνες του υποστρώματος παραμένουν σε ανηγμένη (+AMS) ή οξειδωμένη κατάσταση (-AMS) μέσα στο μιτοχόνδριο στην διάρκεια του χρόνου. Παρατηρήσαμε ότι το υπόστρωμα οξειδώνεται πολύ γρήγορα στα μιτοχόνδρια, αφού ήδη από το δεύτερο λεπτό παύει να προσδένεται στο Tim10 ο αλκυλιωτικός παράγοντας AMS (εικόνα 42).



**Εικόνα 42: Το υπόστρωμα Tim10 οξειδώνεται στα μιτοχόνδρια.**

Ραδιενεργό υπόστρωμα Tim10 επώαστηκε με μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα και αμέσως προστέθηκε AMS. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και φαίνονται με αυτοραδιογραφία. Μετατόπιση ραδιενεργού σήματος συνεπάγεται ανηγμένο υπόστρωμα.

Τέλος παρατηρήσαμε ότι σε κύτταρα που απουσιάζει η Mia40 μειώνονται δραστικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποστρώματος Tim10 (εικόνα 43, A) σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες ενώ σε απομονωμένα μιτοχόνδρια όπου απουσιάζει η Mia40 το υποστρώμα δεν εισάγεται στα μιτοχόνδρια (εικόνα 43, B). Από τα παραπάνω πειράματα συμπερασματικά μπορούμε να καταλήξουμε ότι για την είσοδο και αναδίπλωση του υποστρώματος στα μιτοχόνδρια χρειάζεται το μόριο να βρίσκεται σε ανηγμένη και ξεδίπλωτη κατάσταση, ότι η κατάλυση των δισουλφιδικών δεσμών πραγματοποιείται μέσα στο μιτοχόνδριο και ότι η είσοδος και βιογένεση των υποστρωμάτων στα μιτοχόνδρια είναι μια διαδικασία άρρηκτα συνδεδεμένη και εξαρτώμενη από την παρουσία της Mia40.



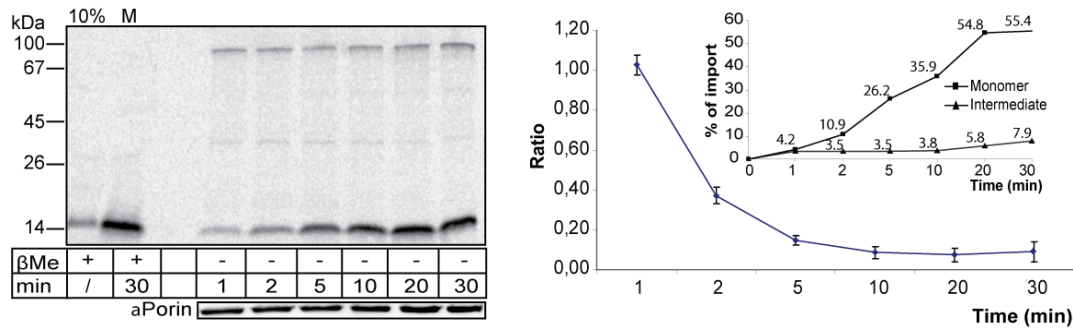
**Εικόνα 43: Η είσοδος Tim10 στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την παρουσία Mia40.**

A) 20 και 40 μg από αγρίου τύπου και *GalMia40* μιτοχόνδρια φορτώθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση με αντισώματα για πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OM), εσωτερικής (IM), μήτρας (MRX) και διαμεμβρανικού χώρου (IMS). B) Είσοδος ραδιοσημασμένης Tim10 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια και *GalMia40* μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Ανάλυση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και εμφάνιση με αυτοραδιογραφία.

### 6.3 Το Tim10 σχηματίζει παροδικά μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα με την Mia40 στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

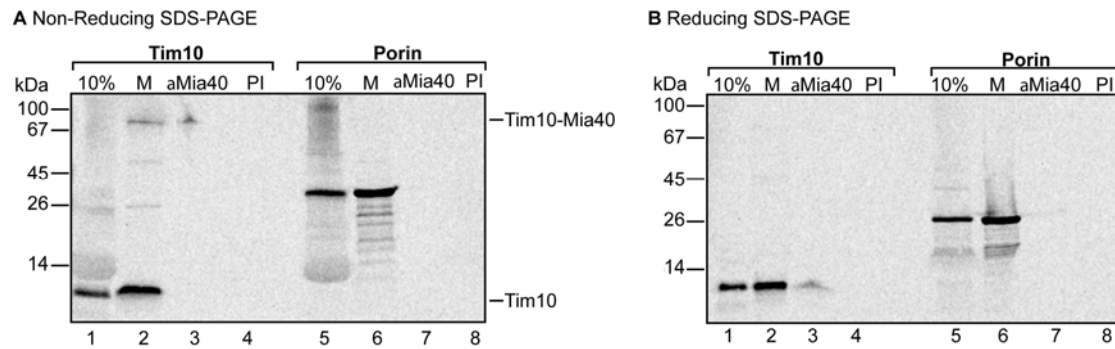
Σε προηγούμενες μελέτες είχαν αποδοθεί διαφορετικοί ρόλοι των κυστεϊνικών καταλοίπων στα μικρά Tims όσον αφορά στην αναδίπλωση και στο σχηματισμό του συμπλόκου TIM (Allen et al., 2003). Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος τους στην

αλληλεπίδραση με την Mia40 πραγματοποιήθηκαν πειράματα εισόδου ραδιενεργού υποστρώματος σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Αρχικά αναπτύξαμε μια πειραματική τεχνική που θα μας επέτρεπε να παρακολουθήσουμε την αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την Mia40 στο φυσιολογικό τους περιβάλλον, το μιτοχόνδριο. Συγκεκριμένα πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια ραδιοσημασμένης Tim10 και χρησιμοποίησαμε τον αλκυλιωτικό παράγοντα NEM για να παγιδεύσουμε μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα στην διάρκεια οξείδωσης του υποστρώματος στα μιτοχόνδρια. Τα δείγματα που προκύπτουν μετά το πείραμα εισόδου και παγίδευσης διαμοριακών δισουλφιδικών ενδιάμεσων με το νέο-εισερχόμενο υπόστρωμα διαχωρίζονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με ηλεκτροφόρηση SDS απουσία αναγωγικού μέσου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 44 ένα μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο σχηματίζεται από το πρώτο λεπτό κιάλας στα 70kDa. Αυτό το ενδιάμεσο είναι ευαίσθητο στην προσθήκη αναγωγικού μέσου όπως αναμένεται (εικόνα 44, διαδρομή 2). Παρατηρήθηκε επιπλέον ότι το μονομερές Tim10 αυξάνεται κατά την διάρκεια του χρόνου. Ο λόγος του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου προς το μονομερές Tim10 μειώνεται δραστικά όσο περνάει ο χρόνος υποδηλώνοντας ότι το μονομερές που απελευθερώνεται είναι προϊόν αλληλεπίδρασης που ωριμάζει μετά την αλληλεπίδραση με την Mia40, και όχι ένα ατέρμο δισουλφιδικό ενδιάμεσο. Είναι αναμενόμενο άλλωστε δεδομένου ότι το υπόστρωμα αλληλεπιδρά παροδικά με την Mia40 πριν απελευθερωθεί σε οξειδωμένη μορφή και αλληλεπιδράσει τελικά με την υπομονάδα Tim9.



**Εικόνα 44: Το Tim10 υποστρώμα σχηματίζει μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα στο μιτοχόνδριο.** Είσοδος ραδιενεργού Tim10 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης απουσία αναγωγικού μέσου και εμφανίστηκαν με αυτοραδιογραφία. Δεξιά: Ποσοτικοποίηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου και του μονομερούς (εσωτερική γραφική παράσταση) / λόγος των δύο (εξωτερική γραφική παράσταση).

Παράλληλα πιστοποιήσαμε ότι το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται στα 70 kDa είναι μεταξύ του νέο-εισερχόμενου υποστρώματος και της ενδογενούς Mia40, πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα ενάντια στην Mia40. Πράγματι το ραδιενεργό σήμα εντοπίστηκε στο δείγμα που έγινε επώαση με το αMia40 αντίσωμα και όχι με ορό κουνελιού πριν την ανοσοποίηση (pre-immune serum) (εικόνα 45). Όπως είναι αναμενόμενο σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αναγωγικού μέσου το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο που ανοσοκατακρημνίζεται στα 70 kDa χάνεται ενώ ταυτόχρονα εμφανίζεται ραδιενεργό σήμα ίδιας έντασης στα 10 kDa. Χρησιμοποιήσαμε ως αρνητικό μάρτυρα ελέγχου του πειράματος ραδιενεργή πορίνη και παρατηρήσαμε ότι επώαζοντας με αντίσωμα ενάντια στην Mia40 δεν εντοπίζεται ραδιενεργό σήμα επαληθεύοντας έτσι το αποτέλεσμα ανοσοκατακρήμισης με την Tim10. Τα αποτελέσματα ανοσοκατακρήμισης επιβεβαιώνουν την ομοιοπολική αλληλεπίδραση του νέο-εισερχόμενου Tim10 υποστρώματος με την ενδογενή Mia40 και καθιστούν την δοκιμασία εισόδου στα μιτοχόνδρια (εικόνα 43) μια αξιόπιστη πειραματική βάση για την ανάλυση των μηχανιστικών παραμέτρων που καθορίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ Tim10 και Mia40.

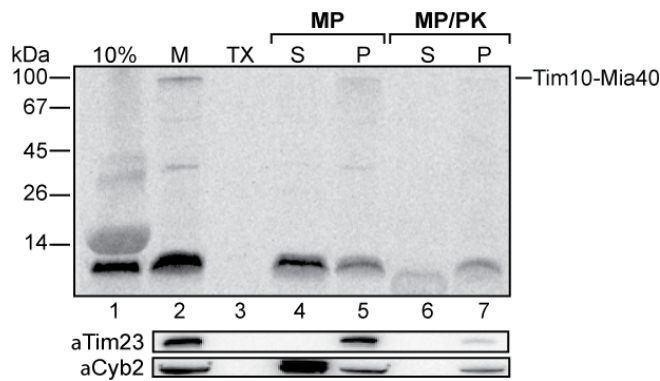


**Εικόνα 45: Η πρωτεΐνη Tim10 αλληλεπιδρά ομοιοπολικά με την Mia40 *in organello*.**

Είσοδος ραδιενεργού Tim10 και πορίνης σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για 10 λεπτά στους 30°C. Το εισαχθέν προϊόν ανοσοκατακρημνίστηκε με αντίσωμα αMia40. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε αναγωγικό (B) και μη (A) πήκτωμα ακρυλαμίδης και εμφανίστηκαν με αυτοραδιογραφία.

Η Mia40 περιέχει μια αμφιμερή αλληλουχία στόχευσης (bipartite presequence) και τοποθετείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου μέσω του μονοπατιού διακοπής της μεταφοράς (stop-transfer pathway) (Chacinska et al., 2004; Naoe et al., 2004). Το αν η αλληλουχία στόχευσης αποκόπτεται με αποτέλεσμα η Mia40 να απελευθερώνεται στον διαμεμβρανικό χώρο είναι διαφορούμενο θέμα. Ελέγξαμε τον εντοπισμό του ενδιάμεσου δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ της νέο-εισερχόμενης πρωτεΐνης Tim10 και της Mia40 στα εσωτερικά διαμερίσματα του μιτοχονδρίου. Δημιουργήσαμε μιτοπλάστες (μιτοχόνδρια των οποίων η εξωτερική μεμβράνη έχει με οσμωτικό σοκ) μετά από είσοδο ραδιενεργού Tim10 σε μιτοχόνδρια και παρατηρήσαμε ότι το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο εντοπίζεται στους μιτοπλάστες (εικόνα 46, διαδρομή 6). Επώαση των μιτοπλαστών με πρωτεϊνάση K αποικοδομεί το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο (εικόνα 46, διαδρομή 7) γεγονός που δείχνει ότι η Tim10-Mia40 ενδιάμεσο εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Η κατανομή του Tim23 (πρωτεϊνικός δείκτης της εσωτερικής μεμβράνης) και του cytochrome b2 (πρωτεϊνικός δείκτης του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου) επιβεβαιώνουν την ακρίβεια στην παρασκευή των μιτοπλαστών.



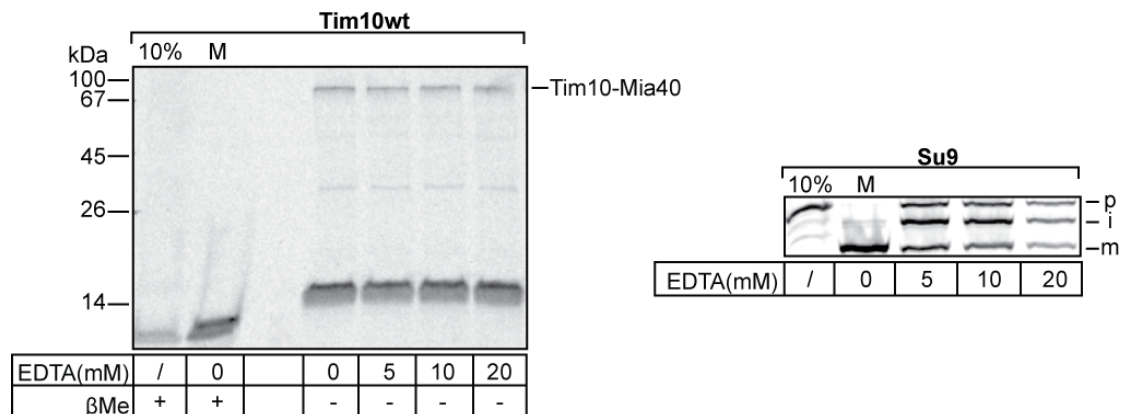


**Εικόνα 46:** Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της Mia40 και του Tim10 σχηματίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ραδιενεργό Tim10 εισήχθηκε στα μιτοχόνδρια για 10 λεπτά στους 30°C (M). Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με πρωτεΐνάση K προκειμένου να απομακρυνθεί το μη-εισερχόμενο υπόστρωμα. Ένα δείγμα επεξεργάστηκε με Triton X (TX) και πρωτεΐνάση K για να ελεγχθεί η δράση της πρωτεάση. Δύο δείγματα επεξεργάστηκαν με υποτονικό διάλυμα προκειμένου να δημιουργηθούν μιτοπλάστες (MP) και επώαστηκαν είτε όχι με πρωτεΐνάση K (PK). Το υπερκείμενο (S) και η πελέτα (P) μετά τους μιτοπλάστες φορτώθηκαν σε μη-αναγωγικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Τα αποτελέσματα είναι προϊόν αυτοραδιογραφίας.

#### 6.4 Η δημιουργία του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου Tim10-Mia40 δεν εξαρτάται από δισθενή κατιόντα

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει από τη μία ότι η ανασυνδυασμένη Mia40 μπορεί να προσδένει δισθενή κατιόντα, συγκεκριμένα ιόντα ψευδαργύρου και χαλκού, (Terziyska et al., 2005) και από την άλλη ότι η αλληλεπίδραση της Mia40 με το εισερχόμενο υπόστρωμα εξαρτάται από αυτά (Chacinska et al., 2004). Γνωρίζοντας ότι για τον σχηματισμό του συμπλόκου TIM χρειάζονται ενδομοριακά οξειδωμένες υπομονάδες Tim9 και Tim10 (Lu et al., 2004a), απαλλαγμένες από παρουσία μετάλλου, θελήσαμε να ελέγξουμε αν για την πρόσδεση του υποστρώματος Tim10 στην Mia40 είναι απαραίτητη η παρουσία μετάλλου. Για αυτό τον σκοπό πραγματοποιήθηκε πείραμα εισόδου ραδιοσημασμένης Tim10 σε μιτοχόνδρια που είχαν επωασθεί με τον χηλικό παράγοντα EDTA και επιπλέον με ο-φαινανθρολίνη ο οποίος έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την δράση μιτοχονδριακών μεταλλο-ενζύμων όπως την MPP (mitochondrial processing zinc-dependent peptidase) (Luciano et al., 1998).

Στο συγκεκριμένο πείραμα που φαίνεται στην εικόνα 47 το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ του υποστρώματος και της Mia40 δεν επηρεάζεται στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις EDTA. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της δράσης του χηλικού παράγοντα χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργή υπομονάδα 9 (Su9) της ATP συνθάσης της οποίας η ωρίμανση στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την μεταλλοπρωτεάση MPP. Παρατηρούμε ότι το EDTA με την ο-φαινανθρολίνη έχουν δράσει ικανοποιητικά μιας και το νέο-εισερχόμενο Su9 συσσωρεύεται στην πρόδρομη και ενδιάμεση μορφή (p, i) και ένα πολύ μικρό ποσοστό ωριμάζει στην μήτρα του μιτοχονδρίου (m) (εικόνα47, διαδρομές 2,5). Συμπερασματικά, φαίνεται λοιπόν πως η αλληλεπίδραση του νέο-εισερχόμενου υποστρώματος Tim10 με την Mia40 μπορεί να πραγματοποιηθεί απουσία κάποιου δισθενούς μετάλλου.



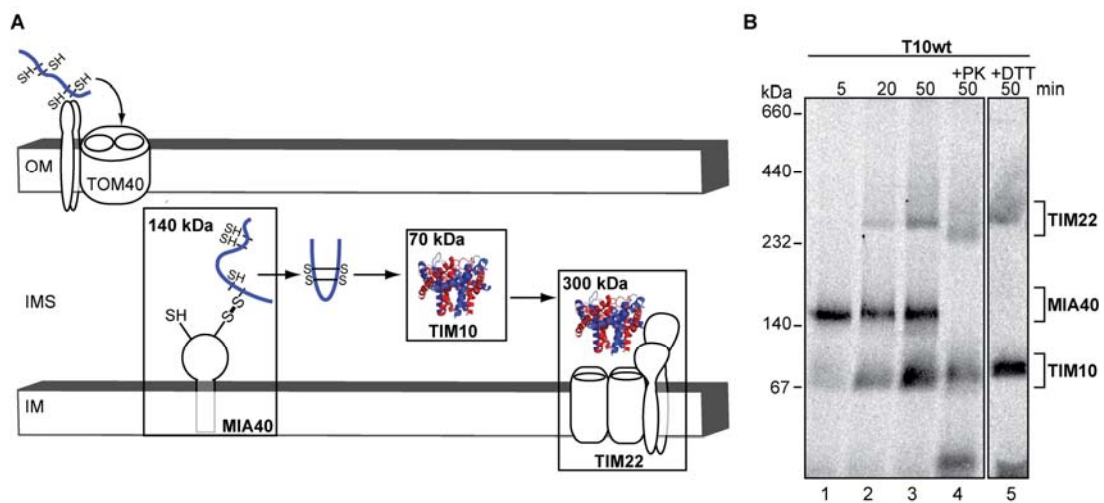
**Εικόνα 47: Ο σχηματισμός του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ Mia40 και Tim10 δεν επηρεάζεται από χηλικό παράγοντα.**

A) Ραδιενεργό Tim10 εισήχθηκε σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για 10 λεπτά στους 30°C. Τα μιτοχόνδρια είχαν ήδη επεξεργαστεί με 2 mM ο-phenanthroline και τις αντίστοιχες ποσότητες EDTA στους 25°C για 10 λεπτά. Το εισαχθέν προϊόν αναλύθηκε σε μη-αναγωγικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και επεξεργάστηκε με αυτοραδιογραφία. B) Όπως στο A αλλά με ραδιενεργή υπομονάδα 9 (Su9) (m = ώριμη μορφή, i = ενδιάμεση μορφή, p = υπόστρωμα).

### 6.5 Παρακολούθηση Tim10 εξαρτώμενων συμπλόκων στα μιτοχόνδρια.

Θελήσαμε να εδραιώσουμε πειραματικά τα στάδια ωρίμανσης του νέο-εισερχόμενου αγρίου τύπου υποστρώματος Tim10. Πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου

ραδιενεργού υποστρώματος σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ελέγξαμε την πρόσδεση και αλληλεπίδραση του ραδιενεργού υποστρώματος με ενδογενή σύμπλοκα του μιτοχονδρίου με εγγενή ηλεκτροφόρηση. Τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε ήπιο μη-ιοντικό απορρυπαντικό διάλυμα DDM, με ή χωρίς πρωτεϊνάση K ή DTT και έγινε ανάλυση σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης βαθμιδωτής συγκέντρωσης 6-16%. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με αυτοραδιογραφία και φαίνονται στην εικόνα 48.



#### Εικόνα 48: Στάδια εισόδου Tim10 στα μιτοχόνδρια.

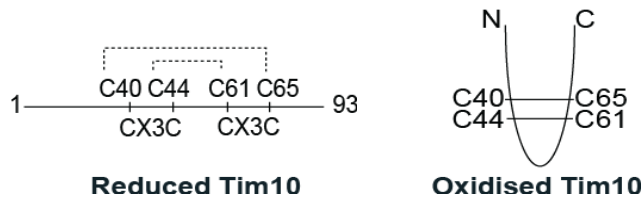
A) Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων που σχηματίζονται στα μιτοχόνδρια όταν εισέρχεται Tim10 υπόστρωμα (μπλε). Το υπόστρωμα αλληλεπιδρά ομοιοπολικά πρώτα με την Mia40 (140 kDa), μετά οξειδωμένο αλληλεπιδρά με την υπομονάδα Tim9 (κόκκινο) σχηματίζοντας το σύμπλοκο TIM10 (70 kDa). Τέλος το σύμπλοκο TIM10 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο μεταθετάσης TIM22 (300 kDa). B) Πείραμα εισόδου ραδιενεργού Tim10 στα μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ένα δείγμα επεξεργάστηκε με πρωτεϊνάση K, ένα δείγμα με DTT. Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν με ήπιο απορρυπαντικό DDM και μετά αναλύθηκαν με εγγενή ηλεκτροφόρηση. Τα συμπλοκα που σχηματίζονται αναφέρονται με αγκύλες στο πλάι.

Παρατηρούμε ότι από τα πρώτα λεπτά εισόδου του ραδιενεργού υποστρώματος στα μιτοχόνδρια σχηματίζεται ομοιοπολικό σύμπλοκο με την Mia40 που είναι ευαίσθητο στην προσθήκη αναγωγικού μέσου (δείγμα 5). Το σύμπλοκο με την Mia40 αντικατοπτρίζεται στα 140 kDa σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που εντοπίζουν την ενδογενή Mia40 στο ίδιο μοριακό βάρος απουσία αποδιατακτικού μέσου (Chacinska et al., 2004). Η ωρίμανση του πρόδρομου μορίου Tim10

προχωράει μετά την αλληλεπίδραση με την Mia40 στον σχηματισμό του εξαμερούς TIM10 συμπλόκου με την υπομονάδα Tim9 (απεικονίζεται στα 70 kDa) και ολοκληρώνεται με την πρόσδεση του στο TIM22 σύμπλοκο (απεικονίζεται στα 300 kDa. Σχηματικά τα σύμπλοκα που σχηματίζονται στην διάρκεια εισόδου του υποστρώματος Tim10 φαίνονται στην εικόνα 48A. Επιπλέον παρατηρούμε ότι το σύμπλοκο με την Mia40 είναι ευαίσθητο σε προσθήκη πρωτεΐνης K. Η λύση της δομής της Mia40 επιβεβαιώνει ότι η πρωτεΐνη έχει πολλά αποδιαταγμένα τμήματα που δύναται να είναι ευαίσθητα σε πρωτεόλυση (Banci et al., 2009a). Τα στάδια ωρίμανσης του Tim10 υποστρώματος που διαφαίνονται μετά από ανάλυση σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες είναι σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Chacinska et al., 2004) και ως εκ τούτου το πειραματικό σύστημα εγγενής ηλεκτροφόρησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ανάλυση των μεταλλαγμένων εκδόσεων του Tim10.

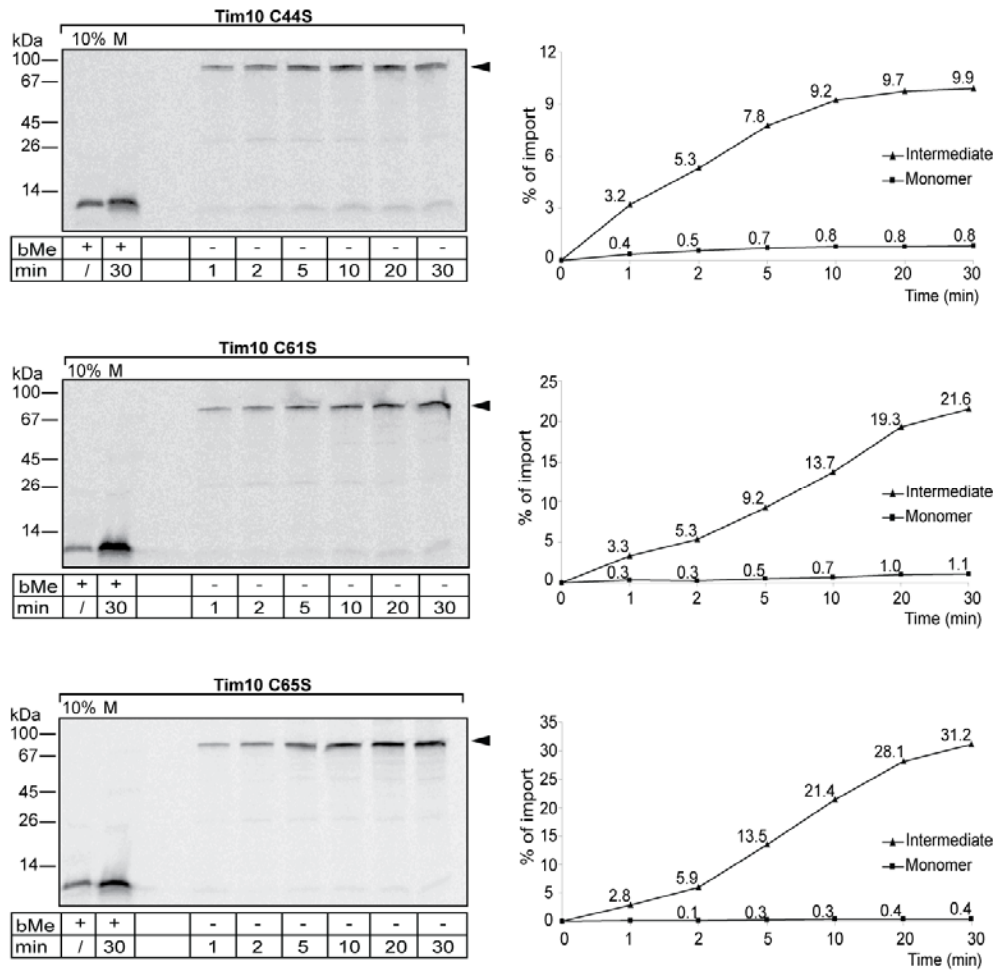
#### **6.6 Η αναγνώριση και πρόσδεση στην Mia40 εξαρτάται από το αμινοτελικό κυστεϊνικό κατάλοιπο του υποστρώματος Tim10.**

Το υπόστρωμα Tim10 σταθεροποιείται στην αναδιπλωμένη του μορφή μέσω δύο ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών. Οι κυστεΐνες του διπλού CX3C μοτίβου οργανώνονται έτσι ώστε οι αντιπαράλληλες κυστεΐνες να σχηματίζουν δύο δισουλφιδικές γέφυρες. Η εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα σχηματίζεται από τα κυστεϊνικά κατάλοιπα C44 και C65 ενώ η εξωτερική από τα κατάλοιπα C40 και C61 (εικόνα 49). Ο σχηματισμός του εσωτερικού δισουλφιδικού δεσμού είναι κρίσιμο βήμα στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης και στην λειτουργία της ως σαπερόνη (Lu et al., 2004a).



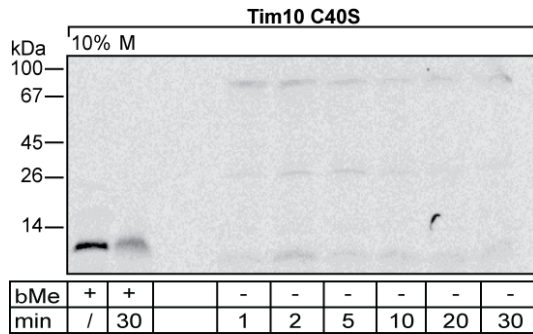
**Εικόνα 49:** Σχηματική απεικόνιση της συνδεσιμότητας των κυστεϊνών της ανηγμένης και οξειδωμένης Tim10.

Με γνώμονα τον συγκεκριμένο τρόπο δημιουργίας των ενδομοριακών δισουλφιδίων στο υπόστρωμα, όπως αυτός επιβεβαιώνεται και από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου TIM10 (Webb et al., 2006), θελήσαμε να ελέγξουμε αν οι διαφορετικές κυστεΐνες αναγνωρίζονται με διαφορετικό τρόπο από την Mia40. Προκειμένου λοιπόν να εξετασθεί ποιά κυστεϊνικά κατάλοιπα είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση της Mia40 με το υπόστρωμα Tim10 δημιουργήθηκαν σημειακές μονές και πολλαπλές μεταλλάξεις των κυστεϊνών του υποστρώματος σε σερίνες. Τα μεταλλάγματα αυτά εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα εισόδου και σχηματισμού του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 στα μιτοχόνδρια με τον ίδιο τρόπο όπως έγινε και στην εικόνα 44. Παρατηρήσαμε ότι οι σημειακές μεταλλάξεις των κυστεϊνών C44, C61 και C65 σε σερίνες διατηρούν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40 (εικόνα 50). Επιπλέον φάνηκε πως τα υποστρώματα χάνουν την ικανότητα αποδέσμευσης από την Mia40 μιας και το ποσοστό του μονομερούς που απελευθερώνεται από την Mia40 και συγκεντρώνεται στο διαμεμβρανικό χώρο είναι μηδαμινό. Τέλος παρατηρήθηκε πως το ποσοστό του υποστρώματος που δεσμεύεται στην Mia40 αυξάνεται όσο οι μεταλλάξεις των κυστεϊνών απομακρύνονται από την πρώτη αμινοτελική κυστεΐνη.



**Εικόνα 50: Διαφορετικές απαιτήσεις κυστεϊνών του Tim10 για την πρόσδεση στην Mia40.** Αριστερά: ραδιοενεργά Tim10 υποστρώματα επώαστηκαν με αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Το μη-εισαχθέν υπόστρωμα απομακρύνθηκε με επώαση με πρωτεϊνάση K. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS σε μη-αναγωγικές συνθήκες. Με βέλος υποδεικνύεται το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40. Δεξιά: ποσοτικοποίηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου και του μονομερούς.

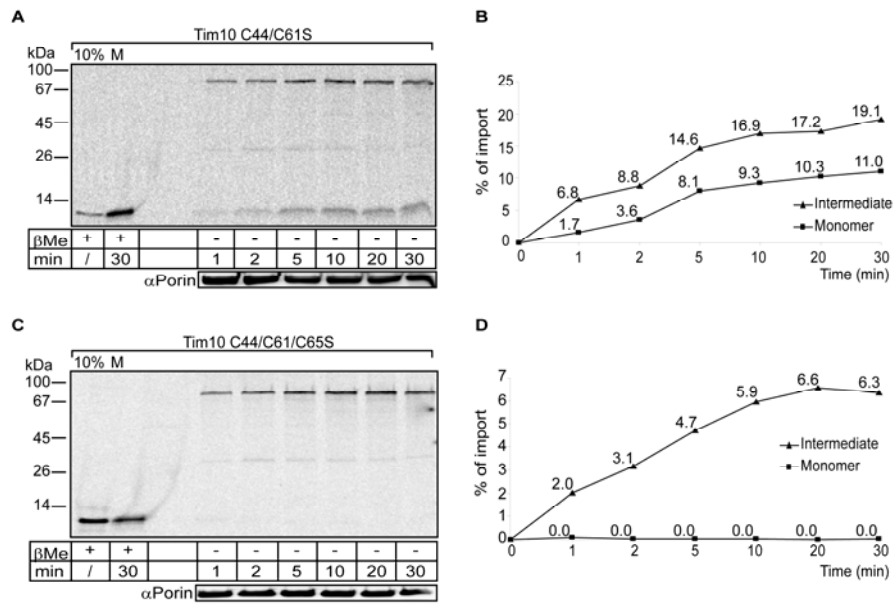
Στην περίπτωση όμως που πραγματοποιήθηκε μεταλλαγή της κυστεΐνης στο αμινοτελικό άκρο (C40) (εικόνα 51), δεν σχηματίστηκε καθόλου μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 παρόλο που οι υπόλοιπες κυστεΐνες του υποστρώματος ήταν ανέπαφες. Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η πρώτη κυστεΐνη C40 είναι υπεύθυνη για την ακινητοποίηση του υποστρώματος πάνω στην οξειδάση και εφεξής θα αναφέρεται ως κυστεΐνη πρόσδεσης.



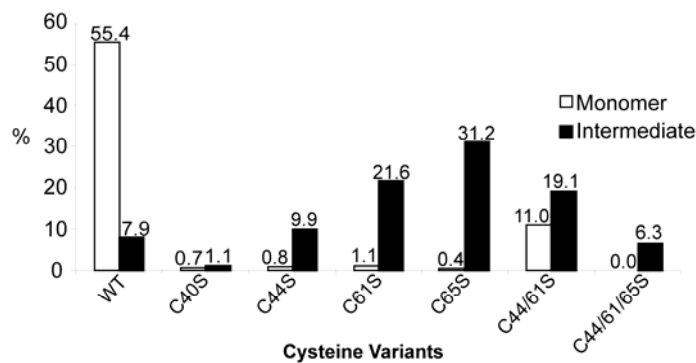
**Εικόνα 51: Η αλληλεπίδραση του Tim10 με την Mia40 εξαρτάται από την πρώτη κυστεΐνη.** Ραδιενεργό υπόστρωμα επώαστηκε με αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Το μη-εισαχθέν υπόστρωμα απομακρύνθηκε με πρωτεΐνάση K. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS σε μη-αναγωγικές συνθήκες.

### 6.7 Η απελευθέρωση του υποστρώματος από την Mia40 εξαρτάται από την καρβοξυτελική κυστεΐνη.

Προκειμένου να μελετήσουμε την απελευθέρωση του υποστρώματος Tim10 από την Mia40 πραγματοποιήσαμε διπλούς και τριπλούς συνδυασμούς σημειακών μεταλλαγών στις κυστεΐνες. Συγκεκριμένα έγινε μεταλλαγή των κυστεϊνών C44 και C61 που σχηματίζουν την εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα. Σε πείραμα εισόδου στα μιτοχόνδρια παρατηρήθηκε ότι το μετάλλαγμα σχηματίζει το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 και επιπλέον ότι στην διάρκεια του χρόνου συσσωρεύεται ένα ποσοστό μονομερούς Tim10 (11% στα 30 λεπτά) (εικόνα 52, A-B). Σε αντίθεση το τριπλό μετάλλαγμα που είχε μόνο την κυστεΐνη πρόσδεσης ελεύθερη συσσωρεύτηκε όλο στην Mia40 (εικόνα 52, Γ-Δ). Προσδιορίσαμε την ποσότητα του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου και του μονομερούς Tim10 που απελευθερώνεται σε όλα τα μεταλλάγματα και διαπιστώσαμε ότι στην μόνη περίπτωση που έχουμε μια σημαντική ποσότητα μονομερούς είναι όταν μεταλλάσσουμε τις κυστεΐνες που απαρτίζουν την εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα του υποστρώματος (εικόνα 53).



**Εικόνα 52: Η απελευθέρωση του Tim10 από την Mia40 εξαρτάται από την καρβοξυτελική κυστεΐνη.** Αριστερά (Α-Γ): ραδιενεργά Tim10 υποστρώματα επώαστηκαν με αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Το μη-εισαχθέν υπόστρωμα απομακρύνθηκε με πρωτεΐνάση K. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS σε μη-αναγωγικές συνθήκες. Δεξιά (B-Δ): ποσοτικοποίηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου και του μονομερούς.

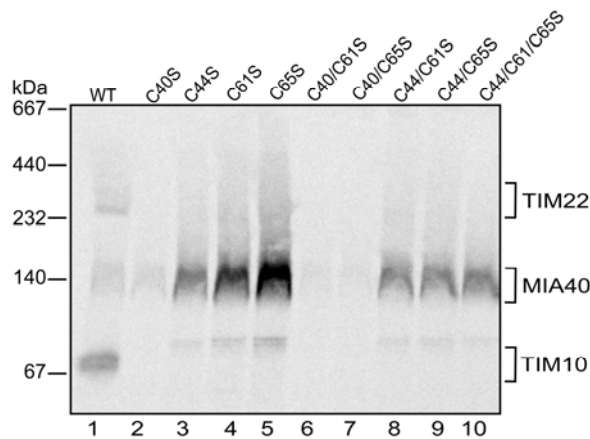


**Εικόνα 53: Ποσοτική μέτρηση του μονομερούς και δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ της Mia40 και νέο-εισερχόμενων μεταλλαγμάτων της Tim10.** Η ποσοτικοποίηση έγινε στα δείγματα μετά από είσοδο σε αγρίου μιτοχόνδρια για 30 λεπτά. Το μονομερές φαίνεται με λευκό χρώμα και το δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 με μαύρο. Τα ποσοστά αναγράφονται πάνω στις ράβδους.

Ελέγξαμε περαιτέρω τα μεταλλάγματα αναλύοντας τα στάδια σχηματισμού συμπλόκων σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (εικόνα 54). Στους συνδυασμούς μεταλλαγών όπου η πρώτη C40 κυστεΐνη είναι μεταλλαγμένη δεν σχηματίζεται σύμπλοκο με την Mia40 (διαδρομές 2,6,7). Επιπλέον είδαμε ότι όλα τα μεταλλάγματα έχουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40 και ότι στην περίπτωση που έχουμε την σημειακή μεταλλαγή στην κυστεΐνη C65 παρατηρείται η



μεγαλύτερη συσσώρευση στο σύμπλοκο με την Mia40 (διαδρομή 5). Τέλος φαίνεται πως στην περίπτωση που είναι μεταλλαγμένες οι κυστεΐνες C44 και C61 δεν μπορεί να σχηματιστεί το σύμπλοκο TIM10, δηλαδή το εξαμερές Tim9-Tim10, παρόλο που απελευθερώνεται ένα ποσοστό από την Mia40 (διαδρομή 8).

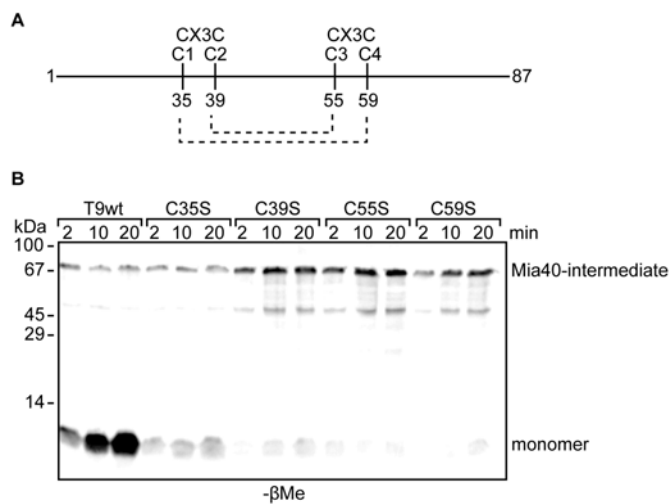


**Εικόνα 54: Τα κυστεϊνικά μεταλλάγματα του Tim10 παγιδεύονται σε 140 kDa σύμπλοκο με την Mia40.** Πραγματοποιήθηκε πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια για 60 λεπτά με ραδιοενεργά υποστρώματα Tim10. Τα μιτοχόνδρια διαλυτοποιήθηκαν σε ήπιο απορρυπαντικό (DDM) και αναλύθηκαν με εγγενή ηλεκτροφόρηση. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται αναγράφονται σε αγκύλες στα δεξιά.

Τα αποτελέσματα της εγγενούς ηλεκτροφόρησης έρχονται σε συμφωνία με τα προηγούμενα πειράματα και συγκλίνουν στα παρακάτω συμπεράσματα. Πρώτον, η πρώτη κυστεΐνη που είναι πλησιέστερη στο αμινοτελικό άκρο είναι η ενεργή κυστεΐνη και δρα ως κυστεΐνη πρόσδεσης μιας και σε όλες τις περιπτώσεις που το συγκεκριμένο κατάλοιπο ήταν μεταλλαγμένο δεν υπήρχε σχηματισμός του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40. Δεύτερον, η εξωτερική δισουλφιδική γέφυρα είναι απαραίτητη και επαρκής για την απελευθέρωση του υποστρώματος από την Mia40. Τρίτον, ο σχηματισμός της εσωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας στο υπόστρωμα δεν είναι απαραίτητος για να ολοκληρωθεί η αλληλεπίδραση με την Mia40 αλλά χρειάζεται κυρίως για τον σχηματισμό του συμπλόκου TIM10 με το Tim9.

## 6.8 Η αμινοτελική κυστεΐνη πρόσδεσης είναι συντηρημένη στα μικρά Tim

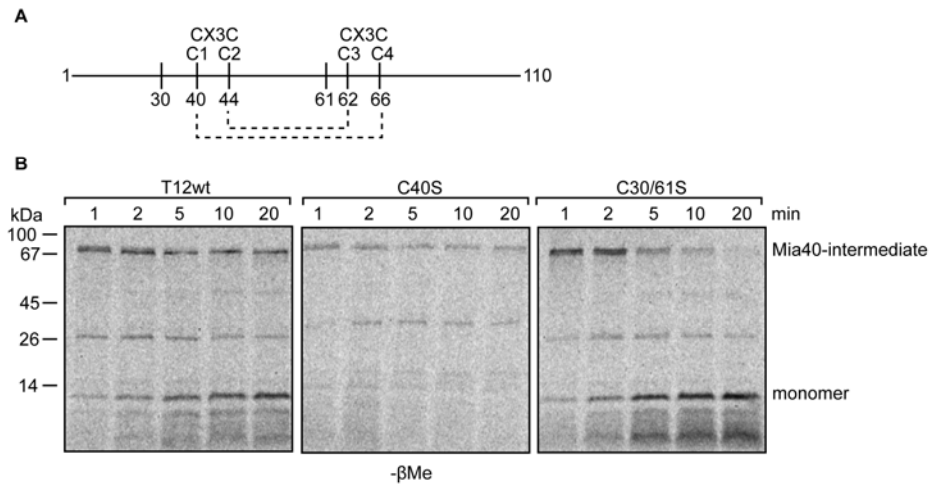
Θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν η αμινοτελική κυστεΐνη πρόσδεσης του υποστρώματος Tim10 αποτελεί έναν γενικότερο μηχανισμό αναγνώρισης των πρωτεϊνών της οικογένειας Tim. Πραγματοποιήσαμε αντίστοιχες σημειακές μεταλλάξεις με αυτές του Tim10 στα υποστρώματα Tim9 και Tim12 (εικόνες 55A και 56A). Τα μεταλλάγματα ελέγχθηκαν μετά από πείραμα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (εικόνες 55B και 56B).



**Εικόνα 55: Η πρόσδεση του Tim9 στην Mia40 εξαρτάται από την αμινοτελική κυστεΐνη.**

A) Συνδεσιμότητα κυστεϊνών στο υπόστρωμα Tim9. B) Πραγματοποιήθηκε πείραμα εισόδου σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα διαστήματα χρόνου. Το μη-εισαχθέν υπόστρωμα απομακρύνθηκε με πρωτεϊνάση K. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS σε μη-αναγωγικές συνθήκες.

Και στα δύο υποστρώματα παρατηρήσαμε ότι μεταλλάσσοντας την πρώτη αμινοτελική κυστεΐνη υπάρχει μειωμένη πρόσδεση του υποστρώματος στην ενδογενή Mia40. Στην περίπτωση του υποστρώματος Tim9 παρατηρήσαμε επιπλέον ότι μεταλλάσσοντας τις κυστεΐνες 2,3 ή 4 το υπόστρωμα ακινητοποιείται στην ενδογενή Mia40 σε συμφωνία με τα αποτελέσματα εισόδου των μεταλλαγμάτων Tim10 (εικόνες 50 και 55).



**Εικόνα 56: Η πρόσδεση του Tim12 στην Mia40 εξαρτάται από την αμινοτελική κυστεΐνη.**

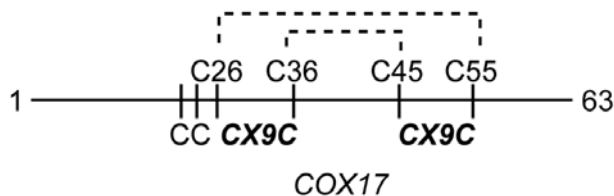
A) Συνδεσιμότητα κυστεϊνών στο υπόστρωμα Tim12. B) Πραγματοποιήθηκε πείραμα εισόδου σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια όπως και στην εικόνα 55.

Στο υπόστρωμα Tim12 εντοπίζεται μια ιδιαιτερότητα σε σχέση με τον αριθμό των κυστεϊνών. Εκτός από το διπλό μοτίβο CX3C εντοπίζονται δύο επιπλέον κυστεΐνες, μια εκ των οποίων είναι στο αμινοτελικό άκρο, οι οποίες έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στον διμερισμό του μορίου (Baud et al., 2007). Ελέγξαμε αν εμπλέκονται αυτές οι κυστεΐνες στην αλληλεπίδραση με την Mia40. Παρατηρήσαμε ότι και στην περίπτωση του Tim12 υποστρώματος η κυστεΐνη πρόσδεσης είναι η πρώτη του διπλού μοτίβου CX3C και όχι η πιο αμινοτελική C30. Συμπερασματικά φαίνεται ότι στην οικογένεια των μικρών Tim η κυστεΐνη που αναγνωρίζεται από την Mia40 είναι η αμινοτελική πρώτη κυστεΐνη που ανήκει στο διπλό μοτίβο CX3C.

### 6.9 Αναγνώριση της πρωτεΐνης Cox17, ένα CX9C υπόστρωμα από την Mia40.

Αναρωτηθήκαμε αν η αναγνώριση της αμινοτελικής κυστεΐνης αποτελεί έναν γενικότερο μηχανισμό αλληλεπίδρασης της Mia40 με τα υποστρώματα της. Χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη Cox17 που έχει δειχθεί ότι είναι ένα αυθεντικό υπόστρωμα της Mia40 του οποίου η οξειδωση και τελική αναδίπλωση εξαρτάται από την δράση της Mia40 (Banci et al., 2009a). Το συγκεκριμένο υπόστρωμα αποτελεί

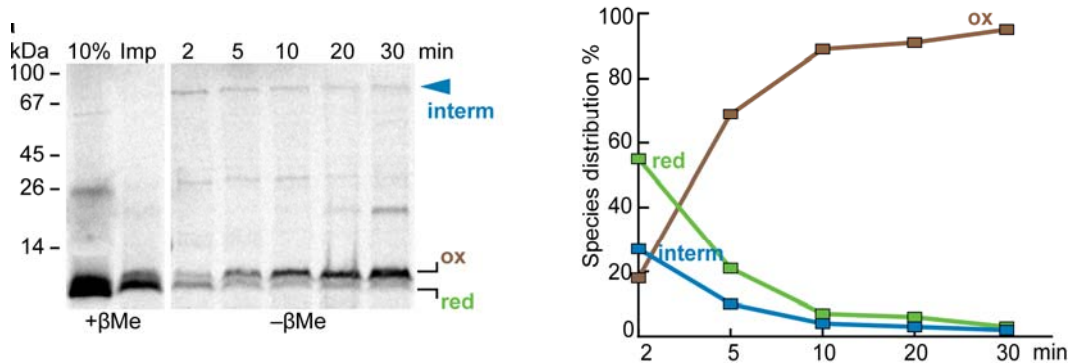
μια δεύτερη κατηγορία υποστρωμάτων της Mia40 και διαφέρει από τα μικρά Tim στο ότι οι κυστεΐνες του είναι οργανωμένες σε διπλό CX9C μοτίβο. Οι κυστεΐνες στην Cox17, όπως και στα μικρά Tim, τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε οι αντιπαράλληλες κυστεΐνες να σχηματίζουν δύο δισουλφιδικές γέφυρες σταθεροποιώντας έτσι την πρωτεΐνη στην αναδιπλωμένη της μορφή (εικόνα 57 (Banci et al., 2008b)). Ουσιαστικά λοιπόν οι δύο κατηγορίες υποστρωμάτων διαφέρουν στην απόσταση που έχουν οι κυστεΐνες μεταξύ τους και όχι στον τρόπο που συνδέονται.



Εικόνα 57: Σχηματική απεικόνιση της συνδεσιμότητας των κυστεϊνών στην πρωτεΐνη Cox17.

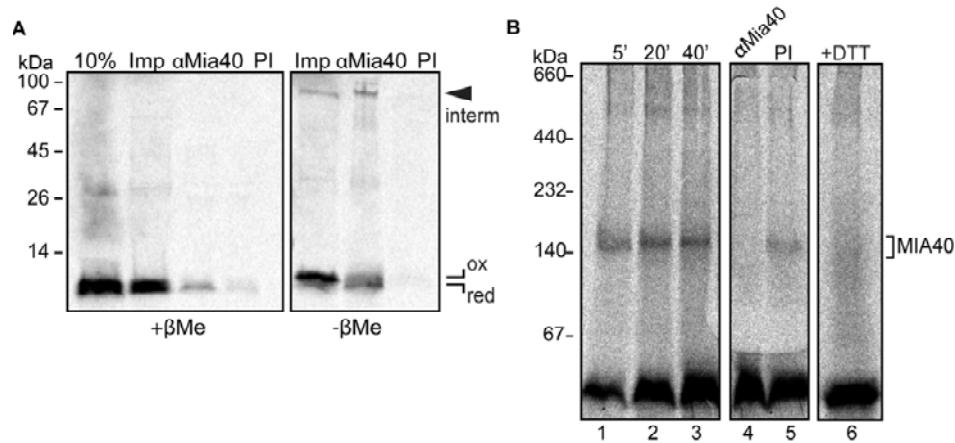
Αρχικά ελέγξαμε αν μπορούμε να παρακολουθήσουμε την οξειδωση του υποστρώματος στα μιτοχόνδρια χρησιμοποιώντας την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Cox17. Δεδομένου ότι χρησιμοποιούμε το ανθρώπινο ορθόλογο της Cox17, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα NMR με την MIA40 (κεφάλαιο 5), ήταν σημαντικό να επαληθεύσουμε ότι η διαδικασία εισόδου σε μιτοχόνδρια που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση των μικρών Tim υποστρωμάτων ήταν πειραματικά εφικτή σε ένα ετερόλογο σύστημα. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη ραδιοσημάνθηκε με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης της Promega και επώαστηκε με απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για συγκεκριμένα διαστήματα χρόνου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 58 ένα παροδικό μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο σχηματίζεται από το πρώτο κιάλας λεπτό στα 70kDa το οποίο είναι ευαίσθητο στην προσθήκη αναγωγικού μέσου (εικόνα 58, διαδρομή 2). Ταυτόχρονα παρατηρήσαμε

ότι το νέο-εισερχόμενο ανηγμένο υπόστρωμα (πράσινο βέλος) στην διάρκεια του χρόνου οξειδωνόταν (καφέ βέλος) καθώς το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μειωνόταν (μπλε βέλος) (εικόνα 58 ποσοτική ανάλυση των μορφών της Cox17).



**Εικόνα 58: Η Cox17 σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο και οξειδώνεται *in organello*.** Αριστερά: Πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια με ραδιενεργό υπόστρωμα Cox17 για συγκεκριμένα διαστήματα χρόνου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS σε μη-αναγωγικές συνθήκες. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο (μπλε) καθώς και η οξειδωμένη (καφέ) και ανηγμένη (πράσινη) μορφή της πρωτεΐνης επισημαίνονται στο πλάι. Δεξιά: Γραφική παράσταση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου και της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής που σχηματίζονται στην διάρκεια του χρόνου.

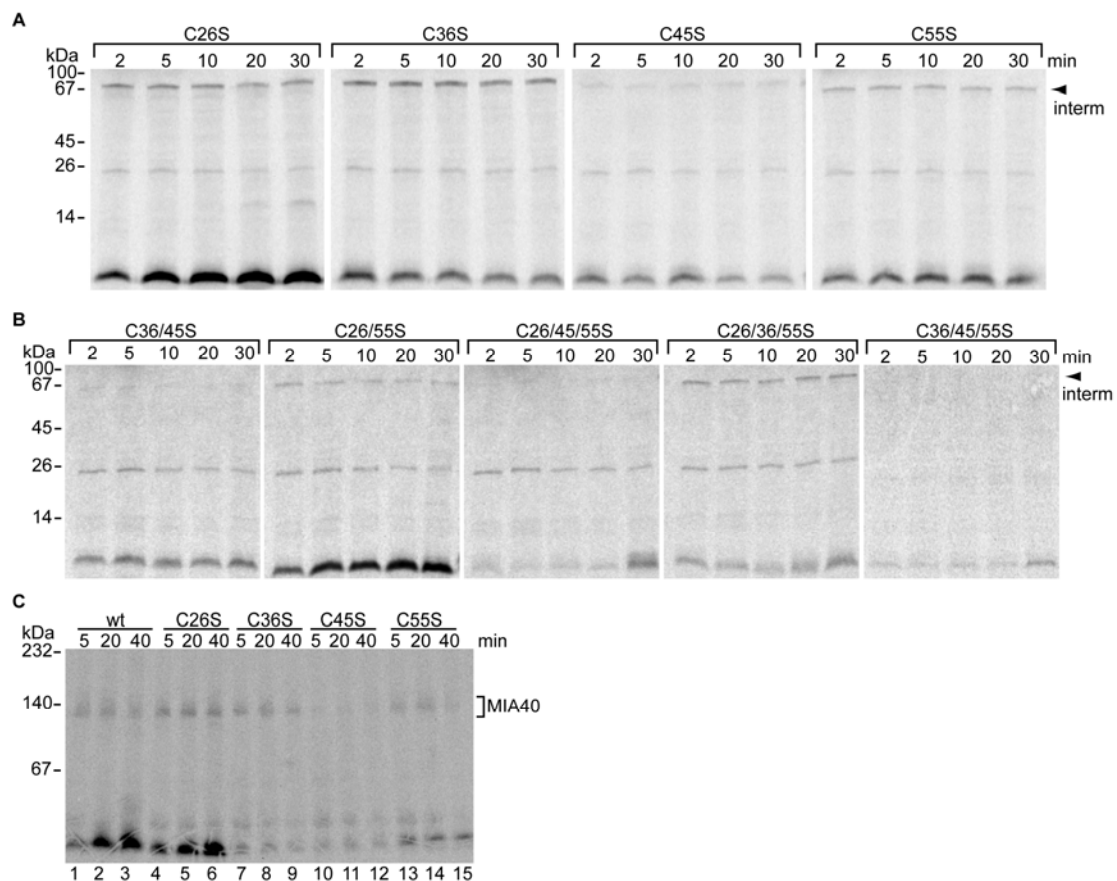
Επαληθεύσαμε ότι το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται στα 70kDa είναι μεταξύ του νέο-εισερχόμενου υποστρώματος και της ενδογενούς Mia40. Πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα ενάντια στην Mia40 μετά από πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια όπως και στην εικόνα 45. Πράγματι το ραδιενεργό σήμα εντοπίστηκε στο δείγμα που έγινε επώαση με το αMia40 αντίσωμα και όχι με ορό κουνελιού πριν την ανοσοποίηση (pre-immune serum) (εικόνα 59A). Στη περίπτωση που το αντίστοιχο πείραμα αναλύθηκε σε εγγενή ηλεκτροφόρηση παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του συμπλόκου στα 140kDa (εικόνα 59B, διαδρομή 1-3), το οποίο είναι ευαίσθητο στο DTT (εικόνα 59B, διαδρομή 6) και τέλος ότι εξαρτάται από την Mia40 μιας και το ραδιενεργό σήμα χάνεται στην περίπτωση που κατακρημνίζουμε με το αντίσωμα της Mia40 (εικόνα 59B, διαδρομή 4-5).



**Εικόνα 59:** Η πρωτεΐνη Cox17 σχηματίζει μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα με την Mia40 *in organello*. Είσοδος ραδιενεργού Cox17 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για 10 λεπτά στους 30°C. Το εισαχθέν προϊόν ανοσοκατακρημνίστηκε με αντίσωμα αMia40. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε αναγωγικό (B) και μη (A) πήκτωμα ακρυλαμίδης και εμφανίστηκαν με αυτοραδιογραφία.

Προκειμένου να εξετασθεί ποιά κυστεϊνικά κατάλοιπα είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση της Mia40 με το υπόστρωμα Cox17 και το αν ο μηχανισμός αναγνώρισης είναι συντηρημένος στα υποστρώματα της, δημιουργήθηκαν σημειακές μονές και πολλαπλές μεταλλαγές των κυστεϊνών του υποστρώματος σε σερίνες κατ'αντιστοιχία την μελέτης με τα μικρά Tim. Τα μεταλλάγματα αυτά εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα εισόδου και σχηματισμού του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 στα μιτοχόνδρια με τον ίδιο τρόπο όπως έγινε και στην εικόνα 50. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι οι σημειακές μεταλλαγές των κυστεϊνών C26, C36 και C55 σε σερίνες διατηρούν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40 (εικόνα 60A). Στην περίπτωση όμως που πραγματοποιήθηκε μεταλλαγή της τρίτης κυστεϊνης (C45), το ποσοστό του νέο-εισερχόμενου υποστρώματος που αλληλεπιδράει με την Mia40 μειώθηκε δραστικά. Επιβεβαιώσαμε το παραπάνω αποτέλεσμα δημιουργώντας πολλαπλές μεταλλαγές κυστεϊνών και με αντίστοιχο πείραμα εισόδου όπως και στο A παρατηρήσαμε ότι σε οποιαδήποτε περίπτωση απουσιάζει η τρίτη κυστεϊνή δεν σχηματίζεται το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 (εικόνα 60B). Το ίδιο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και στην

περίπτωση που το πείραμα εισόδου αναλύθηκε σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης με εγγενή ηλεκτροφόρηση (εικόνα 60Γ) όπου στο μετάλλαγμα που έχει αντικατασταθεί η τρίτη κυστεΐνη C45 με σερίνη το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 στα 140kDa δεν σχηματίζεται ενώ ταυτόχρονα μειώνεται συνολικά η ποσότητα υποστρώματος που εισέρχεται στα μιτοχόνδρια. Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εσωτερική τρίτη κυστεΐνη C45 που συμμετέχει στην δημιουργία της εσωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας είναι υπεύθυνη για την ακινητοποίηση του υποστρώματος πάνω στην οξειδάση, σε αντιδιαστολή με την οικογένεια των μικρών Tim που είναι απαραίτητη η αμινοτελική κυστεΐνη.



**Εικόνα 60: Η εσωτερική κυστεΐνη 3 του Cox17 είναι κυστεΐνη πρόσδεσης στην Mia40.**

Πείραμα εισόδου ραδιενεργών μεταλλαγμένων εκδόσεων της Cox17 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα διαστήματα χρόνου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS (A-B) ή με εγγενή ηλεκτροφόρηση (Γ) απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 φαίνεται με βέλος.

## 6.10 Συζήτηση

Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάστηκαν *in organello* οι μηχανιστικοί παράμετροι που ορίζουν την είσοδο και αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων Tim και Cox17 με την οξειδάση Mia40 στα μιτοχόνδρια. Αρχικά επιβεβαιώθηκε ότι το υπόστρωμα για να εισέλθει στα μιτοχόνδρια πρέπει να βρίσκεται σε ανηγμένη κατάσταση. Ένα υπόστρωμα που έχει ενδομοριακά σχηματισμένες τις δύο δισουλφιδικές του γέφυρες και άρα έχει την τελική του αναδιπλωμένη μορφή δεν εισέρχεται στα μιτοχόνδρια. Σε μια πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί *in vitro* ότι η οξείδωση του υποστρώματος εξωτερικά του μιτοχονδρίου ανταγωνίζεται την είσοδο του και τοποθέτηση στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Morgan et al., 2009). Σε φυσιολογικές συνθήκες βέβαια δεδομένου ότι το περιβάλλον του κυτταροπλάσματος είναι αναγωγικό, είναι ενεργειακά προτιμότερο να εισέρχεται το υπόστρωμα στο μιτοχόνδριο και να οξειδώνεται μέσω του μονοπατιού της Mia40. Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι το υπόστρωμα οξειδώνεται στην διάρκεια του χρόνου μέσα στο μιτοχόνδριο και ότι η οξείδωση εξαρτάται και είναι άμεσα συνδεδεμένη με την λειτουργία της Mia40. Σε περίπτωση που λείπει η Mia40 από τα μιτοχόνδρια και στην περίπτωση που μπλοκάρουμε τις ελεύθερες σουλφυδριλομάδες του υποστρώματος με αλκυλιωτικό παράγοντα αυτό δεν εισέρχεται στα μιτοχόνδρια. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η είσοδος του πρόδρομου Tim10 μορίου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την αλληλεπίδραση με την Mia40 στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου.

Πολλές μελέτες που εξέταζαν την δομή και οξείδωση των μικρών Tim υποστρωμάτων ισχυρίζονταν ότι η δομή της αντιπαράλληλης α-έλικας σταθεροποιείται στον διαμεμβρανικό χώρο από την πρόσδεση μετάλλου στις ελεύθερες σουλφυδριλομάδες των κυστεϊνών (Lutz et al., 2003). Επιπλέον



προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει από τη μία ότι η ανασυνδυασμένη Mia40 μπορεί να προσδένει δισθενή κατιόντα, συγκεκριμένα ιόντα ψευδαργύρου και χαλκού, και μάλιστα ότι αυτά προσδίδουν δομική σταθερότητα στην πρωτεΐνη (Terziyska et al., 2005) και από την άλλη ότι η αλληλεπίδραση της Mia40 με το εισερχόμενο υπόστρωμα εξαρτάται από αυτά (Chacinska et al., 2004). Η χρήση φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με περιορισμένη θρυψινόλυση καθώς επίσης και η μετέπειτα λύση της κρυσταλλικής δομής του TIM10 συμπλόκου απέδειξε ότι η δομή του υποστρώματος σταθεροποιείται από την παρουσία δυο ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών που σχηματίζονται από αντι-παράλληλες σε α-έλικες κυστεΐνες. Προκειμένου να ελέγξουμε αν χρειάζεται μέταλλο στα στάδια οξειδωσης του υποστρώματος από την Mia40 πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου παρουσία χηλικού παράγοντα. Με το συγκεκριμένο πείραμα επιβεβαιώσαμε ότι στην οξειδωση του υποστρώματος δεν εμπλέκεται μεταφορά μετάλλου. Από την άλλη ο προτεινόμενος ρόλος δισθενών μετάλλων στην διατήρηση της δομικής σταθερότητας της Mia40 είναι κάτι που δεν επιβεβαιώνεται από την λύση της δομής της Mia40. Όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο κεφάλαιο η πρωτεΐνη απομονώνεται παρουσία χηλικού παράγοντα και την σταθερότητα του μορίου την διατηρούν οι δύο δισουλφιδικές γέφυρες στο διπλό CX9C μοτίβο.

Στη συνέχεια θέλαμε να απαντήσουμε στο ερώτημα αν η Mia40 αναγνωρίζει με διαφορετικό τρόπο τις κυστεΐνες του υποστρώματος. Αν δηλαδή μπορούμε να αποδώσουμε διαφορετικούς ρόλους στις κυστεΐνες του υποστρώματος όσον αφορά στην αναγνώριση από την οξειδάση. Σε προηγούμενες μελέτες είχε μελετηθεί η συνεισφορά των κυστεϊνών στην διατήρηση της δομικής σταθερότητας του μορίου, στον σχηματισμό του TIM10 συμπλόκου και στην αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα (Allen et al., 2003; Lu et al., 2004a). Συγκεκριμένα είχε δειχθεί ότι η εσωτερική

δισουλφιδική γέφυρα που σχηματίζεται από τις κυστεΐνες 44 και 61 συμμετέχει στην διατήρηση της δομικής σταθερότητας που χρειάζεται το μόριο. Η τελική αναδιπλωμένη δομή εξαρτάται από τον σχηματισμό των ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών και είναι ο καταλυτικός παράγοντας που τις παγιδεύει στο διαμεμβρανικό χώρο. Είχε διαπιστωθεί ότι η δημιουργία ενός σωστά οξειδωμένου μορίου είναι βασική προϋπόθεση για τον σχηματισμό του TIM10 συμπλόκου στα μιτοχόνδρια μεταξύ των μορίων Tim9 και Tim10. Σημειακές μεταλλάξεις των κυστεϊνών μειώναν σε σημαντικό βαθμό τον σχηματισμό του συμπλόκου *in vitro*.

Χρησιμοποιήσαμε τις σημειακές μεταλλάξεις των κυστεϊνών της πρωτεΐνης Tim10 σε πειράματα εισόδου σε μιτοχόνδρια για να εξακριβώσουμε από την μία αν αναγνωρίζεται συγκεκριμένα κάποια από την Mia40 και κατ' επέκταση να εδραιώσουμε αν η Mia40 είναι μια εξειδικευμένη οξειδάση που ξεχωρίζει τα υποστρώματα της. Αρχικά δημιουργήσαμε τις συνθήκες και καθιερώσαμε την πειραματική διαδικασία που μας επέτρεπε από την μία να ελέγχουμε για τον σχηματισμό του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 και δεύτερον για τον σχηματισμό του TIM10 συμπλόκου *in organello*. Πράγματι με πείραμα εισόδου ραδιενεργού ανηγμένου υποστρώματος διαπιστώσαμε τον σχηματισμό ενός παροδικού ομοιοπολικού συμπλόκου ανώτερου μοριακού βάρους το οποίο με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης πιστοποιήσαμε ότι περιέχει Mia40.

Το παραπάνω αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκε ως πειραματική βάση για την εξακρίβωση των μηχανιστικών παραμέτρων που ορίζουν την αλληλεπίδραση της Mia40 με το Tim10 υπόστρωμα. Διαχωρίσαμε την αλληλεπίδραση σε δύο στάδια, σε αυτό της πρόσδεσης και σε αυτό της απελευθέρωσης και φαίνεται ότι εξαρτώνται από συγκεκριμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα του υποστρώματος. Η αρχική αναγνώριση και

ομοιοπολική πρόσδεση του υποστρώματος στην Mia40 εξαρτάται αυστηρά από την αμινοτελική πρώτη κυστεΐνη του υποστρώματος μιας και σε περίπτωση μεταλλαγής αυτής χάνεται η αλληλεπίδραση των δύο. Μεταλλάσσοντας οποιαδήποτε άλλη κυστεΐνη πλην της αμινοτελικής δεν επηρεάζεται ο σχηματισμός του διαμοριακού δισουλφιδικού ενδιάμεσου. Επιπλέον φαίνεται να συσχετίζεται ο βαθμός πρόσδεσης στην Mia40 με την απόσταση από την πρώτη κυστεΐνη του υποστρώματος. Συγκεκριμένα το μεγαλύτερο ποσοστό μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου και ταυτόχρονα το μικρότερο ποσοστό απελευθερωμένου μονομερούς επιτυγχάνεται στην περίπτωση που είναι μεταλλαγμένη η τέταρτη, καρβοξυτελική κυστεΐνη. Ταυτόχρονα επιβεβαιώνεται ο ρόλος της αμινοτελικής κυστεΐνης ως κυστεΐνη πρόσδεσης μιας και στο τριπλό μετάλλαγμα C44/C61/C65S όπου μόνο η πρώτη κυστεΐνη είναι ανέπαφη διατηρείται η ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40. Πράγματι φαίνεται πως σε όλους τους συνδυασμούς μεταλλαγών όπου η πρώτη κυστεΐνη έχει αντικατασταθεί από σερίνη χάνεται το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο. Παράλληλα διαπιστώσαμε σε πειράματα εισόδου χρησιμοποιώντας μεταλλαγές των κυστεϊνών στις πρωτεΐνες Tim9 και Tim12 ότι ο μηχανισμός αναγνώρισης από την Mia40 είναι συντηρημένος στην οικογένεια των μικρών Tim. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με αντίστοιχα αποτελέσματα από ανεξάρτητο εργαστήριο (Milenkovic et al., 2007a) αποτελούν αδιάψευστα πειστήρια για τον ρόλο της αμινοτελικής κυστεΐνης των CX3C υποστρωμάτων ως κυστεΐνη πρόσδεσης.

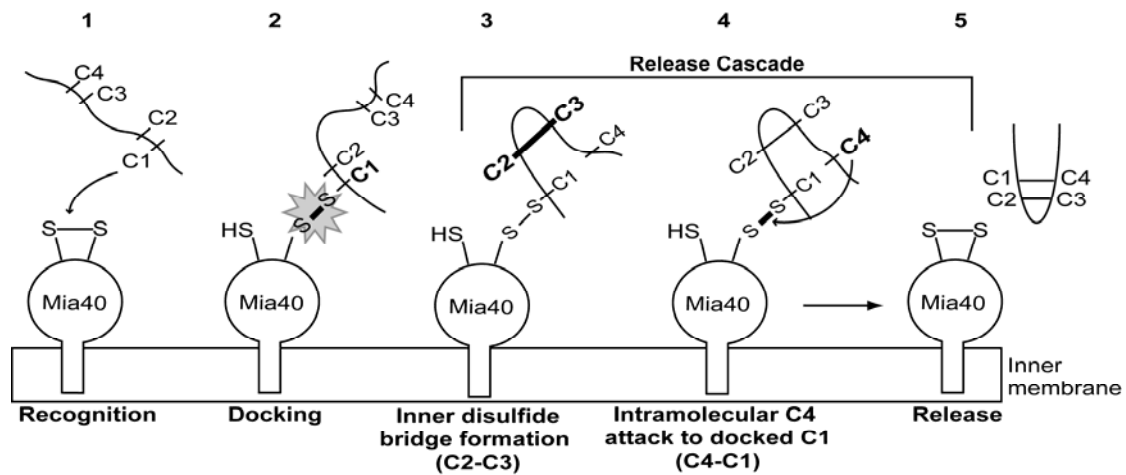
Τι συμβαίνει όμως μετά την πρόσδεση του υποστρώματος στην Mia40? Πρέπει με κάποιο τρόπο να απελευθερώνεται το υπόστρωμα από την Mia40 και μάλιστα σε σωστά οξειδωμένη κατάσταση έτσι ώστε να σχηματίσει το TIM10 σύμπλοκο με την υπομονάδα Tim9. Παρατηρήσαμε ότι η τέταρτη κυστεΐνη C65 πρέπει να συμμετέχει και να είναι σημαντική σε αυτή την διαδικασία. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι στο

μετάλλαγμα της τελευταίας κυστεΐνης μετά από πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια ποσοστιαία απελευθερώνεται το λιγότερο μονομερές συγκριτικά με τα άλλα μεταλλάγματα (εικόνα 53). Παράλληλα στο υπόστρωμα Tim10 όπου και οι δύο κυστεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό της εσωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας είναι μεταλλαγμένες (C44/C61S) παρατηρούμε την απελευθέρωση του υποστρώματος από την Mia40 σε σημαντικά ποσοστά. Φαίνεται λοιπόν πως ο σχηματισμός της εξωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ της πρώτης και της τέταρτης κυστεΐνης είναι επαρκής για την απελευθέρωση από την Mia40. Εντούτοις το απελευθερωμένο μονομερές υπόστρωμα δεν είναι ικανό στο να σχηματίσει το σύμπλοκο TIM10 με την υπομονάδα Tim9 όπως φαίνεται από ανάλυση σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα. Το παραπάνω αποτέλεσμα συμφωνεί με προηγούμενες *in vitro* μελέτες (Allen et al., 2003). Συγκρίνοντας τα ποσοστά απελευθέρωσης με αυτά του αγρίου τύπου υποστρώματος διαπιστώνουμε ότι η εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα πρέπει να βοηθάει στην ταχύτητα απελευθέρωσης από την Mia40. Με τον σχηματισμό της εσωτερικής γέφυρας ίσως να γίνεται πιο προσβάσιμος ο μικτός δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ της ενεργής κυστεΐνης της Mia40 και της κυστεΐνης πρόσδεσης του υποστρώματος στην τέταρτη κυστεΐνη έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η πυρηνόφιλη προσβολή της κυστεΐνης C1 από την C4 και μεταφορά του δισουλφιδικού δεσμού στο υπόστρωμα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα επιταχύνει τον ρυθμό απελευθέρωσης του υποστρώματος από την Mia40 και επιπλέον ότι είναι σημαντική για την δομική σταθερότητα και για την αλληλεπίδραση με την υπομονάδα Tim9. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν επιπλέον ένα σημαντικό ρόλο πολικών αμινοξικών κατάλοιπων στην θηλιά που σχηματίζεται μεταξύ των δύο κυστεϊνών της εσωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας στο υπόστρωμα

για τον σχηματισμό του συμπλόκου TIM10 (Vergnolle et al., 2007). Φαίνεται λοιπόν ότι η εσωτερική γέφυρα οργανώνει δομικά και προσδίδει σταθερότητα στην περιοχή της θηλιάς. Στην περίπτωση που δεν σχηματίζεται η εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα, όπως συμβαίνει στο διπλό C44/C61S μετάλλαγμα, είναι πιθανόν η θηλιά να είναι πιο εύκαμπτη και ευέλικτη και για αυτό τον λόγο να υπάρχει πρόβλημα στην κινητική απελευθέρωσης του υποστρώματος από την Mia40 αλλά και στην αλληλεπίδραση με την υπομονάδα Tim9.

Συμπερασματικά μπορούμε να συνοψίσουμε τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου σε ένα μοντέλο εισόδου και αλληλεπίδρασης των μικρών Tim υποστρωμάτων στα μιτοχόνδρια (εικόνα 61). Το υπόστρωμα σε αποδιαταγμένη και ανηγμένη κατάσταση εισέρχεται και αναγνωρίζεται από την Mia40 στα μιτοχόνδρια (στάδιο 1, αναγνώριση). Η αμινοτελική πρώτη κυστεΐνη C1 προσβάλλει πυρηνόφιλα τον δισουλφιδικό δεσμό της οξειδωμένης Mia40 και προσδέεται μέσω αυτής στην ενεργή κυστεΐνη C298 της Mia40 (στάδιο 2, πρόσδεση). Με άγνωστο μηχανισμό σχηματίζεται η ενδομοριακή εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα στο υπόστρωμα μεταξύ των κυστεϊνών C2 και C3 και ενώ το υπόστρωμα βρίσκεται ακινητοποιημένο στην Mia40 (στάδιο 3). Η δημιουργία της ενδομοριακής εσωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας επιτρέπει στην τέταρτη κυστεΐνη C4 να προσβάλλει πυρηνόφιλα το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της κυστεΐνης πρόσδεσης και της ενεργής κυστεΐνης της Mia40 (στάδιο 4). Ο σχηματισμός της ενδομοριακής εξωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας επιτρέπει στο υπόστρωμα να απελευθερωθεί από την Mia40 σε οξειδωμένη και αναδιπλωμένη μορφή έτσι ώστε να σχηματίσει το σύμπλοκο TIM10 στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (στάδιο 5, απελευθέρωση).



**Εικόνα 61: Μοντέλο οξειδωσης των Tim υποστρωμάτων από την Mia40.**

Η οξείδωση του υποστρώματος από την Mia40 πραγματοποιείται σε πέντε στάδια. **1)** Οξειδωμένη Mia40 αναγνωρίζει την πρώτη κυστεΐνη (C1) του νέο-εισερχόμενου υποστρώματος. **2)** Το υπόστρωμα ακινητοποιείται στην Mia40 μέσω μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ της ενεργής κυστεΐνης της Mia40 και της πρώτης κυστεΐνης του υποστρώματος. **3)** Σχηματισμός ενδομοριακής δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ των εσωτερικών κυστεϊνών του υποστρώματος (C2-C3 με έντονα γράμματα) **4)** Πυρηνόφιλη προσβολή (βέλος) της κυστεΐνης C4 στην C1 που βρίσκεται ακόμα ακινητοποιημένη στην Mia40. **5)** Απελευθέρωση του υποστρώματος σε οξειδωμένη, αναδιπλωμένη κατάσταση. Το στάδιο 5 συνδέεται άμεσα με το στάδιο 4 μιας και το υπόστρωμα θα παραμείνει ακινητοποιημένο στην Mia40 αν δεν προκύψει πυρηνόφιλη προσβολή από την C4. Το απελευθερωμένο υπόστρωμα είναι οξειδωμένο και μπορεί να αλληλεπιδράσει με την υπομονάδα Tim9 για να σχηματίσουν το σύμπλοκο TIM10.

Από τα αποτελέσματα των δύο κεφαλαίων μπορούμε να αντλήσουμε και ορισμένα συμπεράσματα για την λειτουργία της Mia40 ως οξειδάση. Πρώτον διαπιστώνουμε ότι η αναγνώριση των υποστρωμάτων γίνεται με εξειδικευμένο τρόπο. Η Mia40 προσδένεται σε μια καθορισμένη κυστεΐνη που διαφέρει ανάλογα με το υπόστρωμα υποστηρίζοντας έτσι την ιδέα ότι η δράση της δεν είναι γενική και ακαθόριστη αλλά συγκεκριμένη και πολύ ειδική. Επιπλέον τα οργανωμένα στάδια τελικής οξείδωσης του υποστρώματος ενισχύουν τον επεξεργαστικό χαρακτήρα δράσης της Mia40 ο οποίος είναι διαφορετικός από τις άλλες κυτταρικές οξειδάσες, συγκεκριμένα της DsbA και της PDI στο περίπλασμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο αντίστοιχα. Στα μονοπάτια οξείδωσης του περιπλάσματος και του ενδοπλασματικού δικτύου έχει δειχθεί ότι απαιτείται και ισομερίωση των υποστρωμάτων μετά την οξείδωση τους έτσι ώστε να διορθωθούν οι λανθασμένες συνδέσεις (mis-oxidized species). Στα υποστρώματα του μονοπατιού της Mia40 φαίνεται να μην είναι απαραίτητη η

ισομερίωση, λόγω της αυστηρής επιλεκτικότητας στην κυστεΐνη που θα αναγνωρισθεί κάθε φορά από την Mia40. Στην τόσο ειδική και επακριβή δράση της Mia40 αποδίδεται και η δυνατότητα απομόνωσης μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων με τα υποστρώματα της, πιθανώς λόγω του ότι η ειδική πρόσδεση αλλά και τα συγκεκριμένη ακολουθία στα στάδια τελικής οξειδωσης καθυστερούν συνολικά την αντίδραση. Αντίθετα στα οξειδοαναγωγικά συστήματα του περιπλάσματος και του ενδοπλασματικού δικτύου είναι πολύ δύσκολο να παγιδευτούν μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα με τα υποστρώματα λόγω της ταχύτητας της αντίδρασης, άμεση συνέπεια της μη-ειδικής οξειδωσης των υποστρωμάτων. Υπό αυτή την έννοια το μιτοχονδριακό μονοπάτι οξειδωσης παρουσιάζει τεχνικό πλεονέκτημα στην λεπτομερή *in organello* μελέτη των οξειδοαναγωγικών μηχανισμών και σημαντική διαφοροποίηση από τους άλλους αντίστοιχους μηχανισμούς στο κύτταρο.

Τέλος σε μια προσπάθεια ελέγχου αν η αναγνώριση του υποστρώματος και η πρόσδεση στην Mia40 πραγματοποιείται στα πλαίσια ενός γενικότερου και /ομόλογου μηχανισμού, ελέγξαμε αν οι παράμετροι που ορίσαμε για τα μικρά Tim, για CX3C υποστρώματα δηλαδή, είναι σε πλήρη αντιστοιχία με ένα CX9C υπόστρωμα. Παρατηρήσαμε ότι και σε αυτή την περίπτωση η Mia40 επιλεκτικά προσδέεται σε μια κυστεΐνη αλλά στην περίπτωση του Cox17 η κυστεΐνη αυτή δεν είναι η αμινοτελική αλλά η εσωτερική τρίτη κυστεΐνη. Σε αυτό το σημείο δεν γνωρίζουμε ακριβώς ποιο είναι το στοιχείο που καθορίζει ποια θα είναι η κυστεΐνη πρόσδεσης στην Mia40 και τον λόγο για τον οποίο στην περίπτωση της οικογένειας των μικρών Tim είναι η αμινοτελική πρώτη κυστεΐνη ενώ στην περίπτωση της Cox17 είναι η εσωτερική κυστεΐνη 3. Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι η συγκεκριμένη και ειδική αναγνώριση του υποστρώματος είναι ένα χαρακτηριστικό της Mia40 που διατηρείται ανεξάρτητα από την φύση του υποστρώματος. Ο λόγος για τον οποίο προσδένονται

διαφορετικές κυστεΐνες ανάλογα με το υπόστρωμα είναι ένας τομέας που θέλει περαιτέρω μελέτη. Δυνητικά θα μπορούσε η κυστεΐνη πρόσδεσης να επιλέγεται με βάση τον προσανατολισμό της πεπτιδικής αλυσίδας με τον οποίο εισέρχεται στα μιτοχόνδρια. Στην περίπτωση των μικρών Tim ίσως να επιβάλλεται από τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης η αμινοτελική είσοδος στα μιτοχόνδρια και έτσι να καθοδηγείται η πρώτη κυστεΐνη στην Mia40. Πράγματι στην οικογένεια των μικρών Tim δεν έχει εντοπιστεί ακόμα το σινιάλο στόχευσης στα μιτοχόνδρια και το ενδεχόμενο να εισέρχονται στα μιτοχόνδρια με συγκεκριμένο πεπτιδικό προσανατολισμό παραμένει ανεξερεύνητο. Αυτά τα ερωτήματα απαντώνται στο επόμενο κεφάλαιο.

*Τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου έχουν δημοσιευθεί στο περιοδικό *Molecular Microbiology*, Dionisia P. Sideris and Kostas Tokatlidis, 2007, 65(5),1360-73.*

***(Sideris and Tokatlidis, 2007), ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2***



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

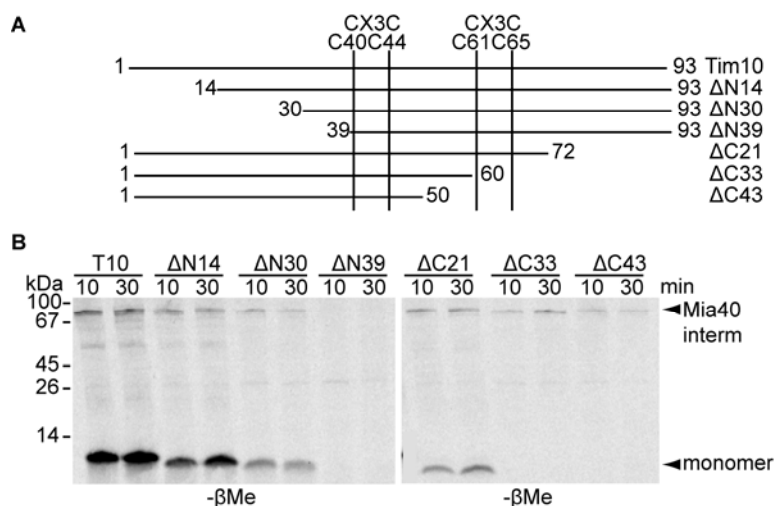
### **Προσδιορισμός του σινιάλου στόχευσης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων μέσω του μονοπατιού της Mia40.**

#### **7.1 Εισαγωγή**

Στο προηγούμενο κεφάλαιο παρατηρήσαμε πως η Mia40 αναγνωρίζει διαφορετικά κυστεϊνικά κατάλοιπα σε διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, η απαραίτητη για την αναγνώριση κυστεΐνη στην περίπτωση της οικογένειας των μικρών Tim είναι η αμινοτελική, ενώ στην περίπτωση της Cox17 είναι η εσωτερική κυστεΐνη 3. Επιπλέον η λύση της δομής της Mia40 φανέρωσε την ύπαρξη μιας εκτεταμένης υδρόφοβης κοιλότητας (hydrophobic cleft) σε γειτνίαση με το ενεργό CPC κέντρο που δύναται να δρα ως περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος (substrate binding domain). Όπως είδαμε και στο πρώτο κεφάλαιο, μεταλλαγές στην συγκεκριμένη περιοχή φαίνεται να μην είναι ανεκτές στο κύτταρο και επιπλέον φαίνεται να μειώνουν την ικανότητα δημιουργίας μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με τα υποστρώματα. Προτείνουμε ότι η υδρόφοβη περιοχή της Mia40 αλληλεπιδρά μη-ομοιοπολικά με συγκεκριμένο πεπτιδικό τμήμα του υποστρώματος. Σε αυτό το κεφάλαιο προσδιορίζουμε τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος που καθοδηγούν και τοποθετούν μη-ομοιοπολικά το ενεργό κέντρο της οξειδάσης Mia40 σε συγκεκριμένο κυστεϊνικό κατάλοιπο του υποστρώματος. Από αυτή την μελέτη προκύπτει ότι στα υποστρώματα του μονοπατιού της Mia40 υπάρχει σινιάλο στόχευσης (ITS - Intermembrane space Targeting Signal) για τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και επιπλέον ότι αυτό το σινιάλο καθορίζει την σωστή αλληλεπίδραση με την Mia40.

## 7.2 Προσδιορισμός του σινιάλου στόχευσης (ITS) για το Tim10.

Προκειμένου να μελετήσουμε ποιο είναι το σινιάλο που κατευθύνει συγκεκριμένη κάθε φορά κυστεΐνη του υποστρώματος στην Mia40 χρησιμοποίησαμε ως μοντέλο υπόστρωμα την πρωτεΐνη Tim10. Συγκεκριμένα δημιουργήσαμε μεταλλαγμένες μορφές της Tim10 πρωτεΐνης με απαλειμμένα είτε αμινοτελικά κατάλοιπα είτε καρβοξυτελικά (εικόνα 62A). Τα μεταλλάγματα ραδιοσημάνθηκαν και εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα εισόδου και σχηματισμού του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 στα μιτοχόνδρια (εικόνα 62B). Παρατηρήσαμε ότι όσο μεγαλύτερες ήταν οι ελλείψεις του αμινοτελικού άκρου τόσο μεγαλύτερο πρόβλημα υπήρχε στην αλληλεπίδραση με την Mia40.



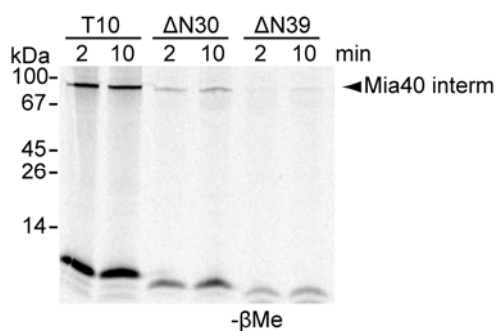
**Εικόνα 62: Κατασκευή ελλείψεων στην πρωτεΐνη Tim10**

A) Σχηματική απεικόνιση των κατασκευών ελλείψεων στην πρωτεΐνη Tim10. B) Πείραμα εισόδου ραδιενεργών απαλειμμένων εκδόσεων του υποστρώματος Tim10 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στους 30°C. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS απουσία αναγωγικού μέσου. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο καθώς και το απελευθερωμένο μονομερές υποδεικνύονται με βέλος.

Αντίθετα φαίνεται πως τα μεταλλάγματα που έχουν διαγραμμένα αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο διατηρούν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40. Παράλληλα τα μεταλλάγματα ΔC33 και ΔC43 παρουσιάζουν ένα ακόμα χαρακτηριστικό. Φαίνεται πως ενώ σχηματίζεται κανονικά το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο ταυτόχρονα χάνουν την ικανότητα αποδέσμευσης από την Mia40 μιας και

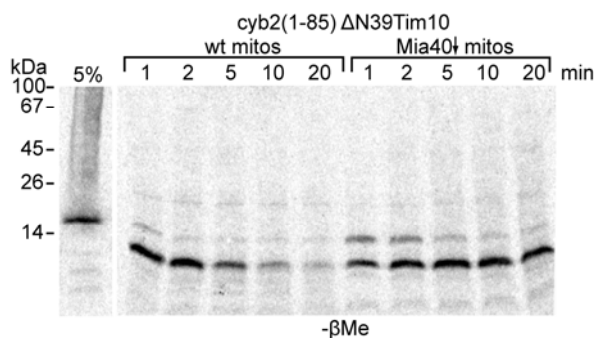
δεν παρατηρείται συγκέντρωση μονομερούς στα μιτοχόνδρια. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του δεύτερου κεφαλαίου (εικόνα 47) μιας και τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα δεν περιέχουν την κυστεΐνη 4 η οποία έχουμε ήδη δείξει πως είναι απαραίτητη για να ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο οξειδωσης και απελευθέρωσης του υποστρώματος από την Mia40. Τέλος φαίνεται ότι στο μετάλλαγμα όπου λείπουν 39 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο χάνεται τελείως το σήμα που αντιστοιχεί σε εισαγμένη Tim10.

Το αρνητικό αποτέλεσμα εισόδου για το ΔN39 Tim10 μπορεί να ερμηνευτεί με δύο πιθανούς τρόπους: (i) είτε το πεπτιδικό τμήμα 30-39 χρειάζεται για την μετατόπιση από την εξωτερική μεμβράνη στον διαμεμβρανικό χώρο ή (ii) μπορεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια αλλά δεν μπορεί πλέον να αλληλεπιδράσει με την Mia40 και πρωτεολύεται. Προκειμένου να αποδώσουμε το αποτέλεσμα σε μια από τις δύο υποθέσεις ελέγξαμε την αλληλεπίδραση των μεταλλαγμάτων του Tim10 σε απομονωμένη Mia40 *in vitro*. Ραδιενεργά Tim10 υποστρώματα που φέρουν αμινοτελικές ελλείψεις επώαστηκαν με ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια καθαρισμένη Mia40 (εικόνα 63). Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μείωση πρόσδεσης του ΔN30Tim10 ενώ η πρόσδεση στην Mia40 χάνεται τελείως με το ΔN39Tim10 συμφωνία με το πείραμα εισόδου (εικόνα).



**Εικόνα 63:** Το υπόστρωμα ΔN39Tim10 δεν αλληλεπιδρά ομοιοπολικά με την Mia40 *in vitro*. Ραδιενεργά Tim10 υποστρώματα επώαστηκαν στους 4°C για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα με Mia40 ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια γλουταθιόνης. Τα προσδεμένα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η αδυναμία αλληλεπίδρασης του ΔN39Tim10 με την Mia40 αντικατοπτρίζεται και στο φυσιολογικό περιβάλλον του μιτοχονδρίου, συγχωνεύσαμε το σινιάλο στόχευσης του κυτοχρώματος b2 έτσι ώστε να εξαναγκάσουμε την είσοδο του υποστρώματος στα μιτοχόνδρια και την τοποθέτηση του στον διαμεμβρανικό χώρο παρακάμπτοντας όμως το μονοπάτι της Mia40. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να ελέγξουμε αν στο φυσιολογικό περιβάλλον του διαμεμβρανικού χώρου μπορεί να αλληλεπιδράσει το ΔN39Tim10 με την ενδογενή Mia40. Το υπόστρωμα ραδιοσημάνθηκε και ελέγχθηκε για την ικανότητα εισόδου σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια και μιτοχόνδρια που απουσιάζει η Mia40 (galMia40) για συγκεκριμένα διαστήματα χρόνου (εικόνα 64). Παρατηρήσαμε ότι το υπόστρωμα cyb2(1-85)ΔN39Tim10 εισέρχεται στα μιτοχόνδρια αλλά δεν αλληλεπιδρά με την Mia40 ώστε να σχηματιστεί μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο σε συμφωνία με τα προηγούμενα *in vitro* και *in organello* πειράματα.



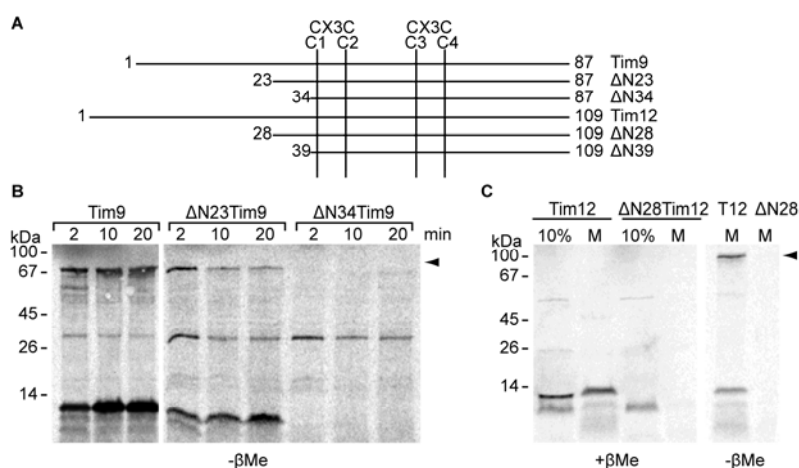
**Εικόνα 64: Το υπόστρωμα ΔN39Tim10 δεν αλληλεπιδρά με την Mia40 *in vivo*.**

Ραδιοενεργό υπόστρωμα ΔN39Tim10 συνενωμένο με την αλληλουχία στόχευσης του κυτοχρώματος β2 εισήχθη σε αγρίου τύπου και galMia40 μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη.

Συνολικά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η πεπτιδική αλληλουχία των εννέα αμινοξέων 32-40 του Tim10 εμπλέκεται άμεσα στην αλληλεπίδραση με την Mia40 και συμπεριφέρεται σαν σινιάλο στόχευσης του διαμεμβρανικού χώρου. Εφεξής αυτό το νέο σινιάλο στόχευσης θα αναφέρεται ως ITS (intermembrane space targeting signal).

### 7.3 Το σινιάλο στόχευσης ITS είναι συντηρημένο στα μικρά Tim

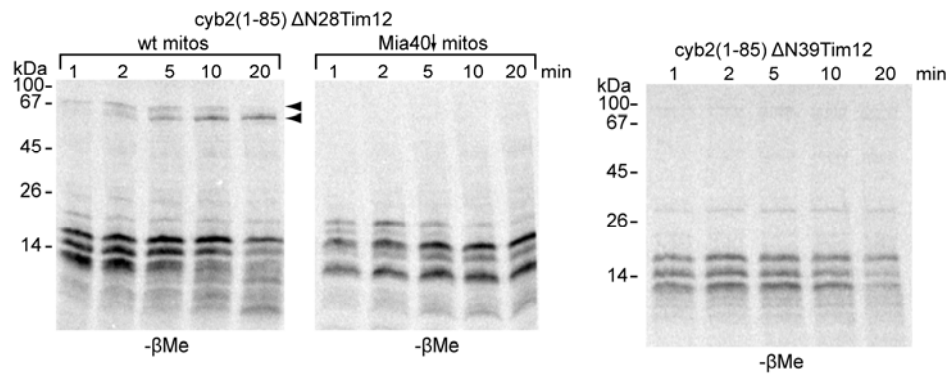
Θα περίμενε κανείς πως το σινιάλο στόχευσης που βρέθηκε για το Tim10 δύναται να απαντάται και στις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας Tim, δεδομένου ότι όλες οξειδώνονται μέσω του μονοπατιού της Mia40 και μάλιστα μέσω της αλληλεπίδρασης με την αμινοτελική τους κυστεΐνη. Για να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση κατασκευάσαμε τις αντίστοιχες αμινοτελικές απαλείψεις με αυτές του Tim10 στις πρωτεΐνες Tim9 και Tim12 (εικόνα 65A) και εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα εισόδου στα μιτοχόνδρια. Παρατηρήσαμε στην περίπτωση του Tim9 ότι η διαγραφή των πρώτων 23 αμινοξέων δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση με την Mia40 ενώ στο μετάλλαγμα ΔN34 όπου είναι διαγραμμένο το αντίστοιχο σινιάλο στόχευσης με αυτό του Tim10 χάνεται τελείως το ραδιενεργό σήμα σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Tim10. Για το Tim12 υποστρώμα παρατηρήσαμε πως το ραδιενεργό σήμα χάνεται ήδη από την απαλοιφή των αμινοτελικών 28 αμινοξέων παρόλο που σε αυτό το μετάλλαγμα το σινιάλο στόχευσης δεν έχει απομακρυνθεί (εικόνα 65Γ).



**Εικόνα 65: Κατασκευές ελλείψεων στα υποστρώματα Tim9 και Tim12.**

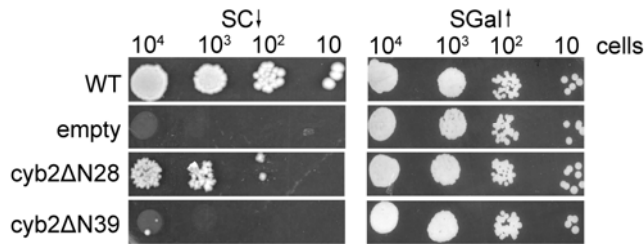
A) Σχηματική απεικόνιση των κατασκευών ελλείψεων στις Tim9 και Tim12. Β-Γ) Πείραμα εισόδου ραδιενεργών απαλειμμένων εκδόσεων του υποστρώματος Tim9 (B) και Tim12 (Γ) σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στους 30°C. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS απουσία αναγωγικού μέσου. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο υποδεικνύεται με βέλος.

Προκειμένου να ελέγξουμε αν το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται σε πρόβλημα μετατόπισης διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου ή συγκεκριμένα στην αλληλεπίδραση με την Mia40 προσπαθήσαμε να παρακάμψουμε τυχόν πρόβλημα μετατόπισης συγχωνεύοντας το καλά χαρακτηρισμένο σινιάλο στόχευσης του κυτοχρώματος b2 στο απαλειμμένο ΔN28Tim12. Παρατηρήσαμε πως το συγκεκριμένο υπόστρωμα εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και ότι αλληλεπιδρά ειδικά με την Mia40 (εικόνα 66, βέλος), μιας και σε μιτοχόνδρια στα οποία απουσιάζει η Mia40 χάνεται το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο. Καταλήγουμε λοιπόν ότι το συγκεκριμένο μετάλλαγμα ΔN28Tim12 διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40. Προκειμένου να ελέγξουμε αν η ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40 αποδίδεται στην ύπαρξη του σινιάλου στόχευσης, απαλείψαμε 39 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο απομακρύνοντας έτσι το θεωρητικό σινιάλο στόχευσης του Tim12. Επιπλέον στο συγκεκριμένο μετάλλαγμα συγχωνεύσαμε το σινιάλο στόχευσης του κυτοχρώματος b2 έτσι ώστε να παρακάμψουμε το πρόβλημα μετατόπισης από την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπως ακριβώς έγινε και για το ΔN28Tim12. Το μετάλλαγμα cyb2(1-85)ΔN39Tim12 ραδιοσημάνθηκε και πραγματοποιήθηκε πείραμα εισόδου σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια (εικόνα 66). Παρατηρήσαμε ότι το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 δεν μπορεί να σχηματισθεί παρόλο που αυτό το υπόστρωμα εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και παρόλο που περιέχει την απαραίτητη για την αλληλεπίδραση αμινοτελική κυστεΐνη.



**Εικόνα 66: Το Tim12 ITS είναι απαραίτητο για την ομοιοπολική πρόσδεση στην Mia40 *in vivo*.** Ραδιενεργό υπόστρωμα ΔN28Tim12 (αριστερά) και ΔN39Tim12 (δεξιά) συνενωμένα με την αλληλουχία στόχευσης του κυτοχρώματος β2 εισήχθησαν σε αγρίου τύπου και galMia40 μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Με βέλος υποδεικνύεται το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την ενδογενή Mia40.

Η χρήση του σινιάλου στόχευσης του κυτοχρώματος β2 στα δύο μεταλλάγματα (cyb2(1-85)ΔN28Tim12 και cyb2(1-85)ΔN39Tim12) βοήθησε στο να αποσυνδέσουμε την είσοδο του πρόδρομου μορίου στα μιτοχόνδρια από την αλληλεπίδραση με την Mia40. Χρησιμοποιώντας αυτά ως εργαλείο μπορούμε να ελέγξουμε *in vivo* αν η αλληλεπίδραση με την Mia40 είναι ζωτικής σημασίας για την λειτουργία της πρωτεΐνης Tim12 ή αν απλά αρκεί να εισέλθει το πρόδρομο μόριο στα μιτοχόνδρια. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας (εικόνα 67). Παρατηρήσαμε ότι το μετάλλαγμα που δεν έχει απαλειμμένο το σινιάλο στόχευσης και διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Mia40 μπορεί να αποκαταστήσει την βιωσιμότητα του κυττάρου σε ένα σημαντικό βαθμό, υποστηρίζοντας έτσι ότι όταν η αλληλεπίδραση με την Mia40 διατηρείται, αυτό οδηγεί σε ένα λειτουργικό μόριο Tim12. Αντίθετα το στέλεχος που φέρει το μετάλλαγμα cyb2(1-85)ΔN39Tim12 που δεν περιέχει το ITS και δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την Mia40 δεν επιβιώνει παρόλο που στοχεύεται στο μιτοχόνδριο λόγω του κυτοχρώματος β2.



**Εικόνα 67: Το ITS του Tim12 είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο.**

*GalTim12* στέλεχος σακχαρομύκητα μετασηματίστηκε με πλασμίδια που φέρουν απαλειμμένες εκδόσεις του Tim12 υπό τον έλεγχο του ενδογενή υποκινητή Tim12. Τα κύτταρα μεγάλωσαν σε θρεπτικό υγρό με γαλακτόζη και μετά έγινε αλλαγή σε θρεπτικό με γλυκόζη για 36 ώρες προκειμένου να κατασταλεί το ενδογενές γονίδιο. Τα κύτταρα απλώθηκαν σε πιάτο με γαλακτόζη (SG) ή με γλυκόζη (SC). Τα βέλη στα αντίστοιχα θρεπτικά υποδεικνύουν την καταστολή (προς τα κάτω) ή την επαγωγή (προς τα πάνω) της ενδογενούς Tim12. (*empty*: πλασμίδιο που φέρει τον υποκινητή του Tim12 χωρίς γονίδιο.)

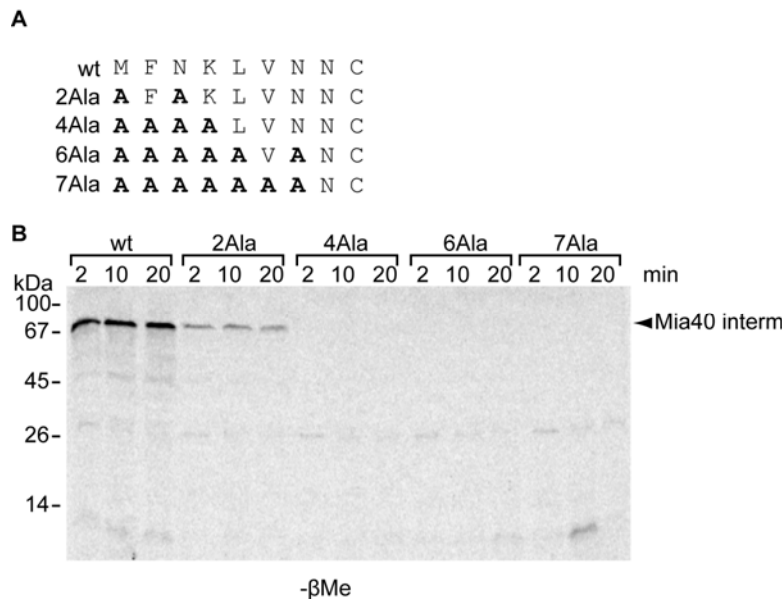
Συμπερασματικά φαίνεται ότι i) το σινιάλο στόχευσης (ITS) είναι συντηρημένο στην οικογένεια των μικρών Tim και ii) ότι αυτό καθοδηγεί την ζωτικής σημασίας αλληλεπίδραση με την Mia40.

#### 7.4 Προσδιορισμός των απαραίτητων αμινοξέων στο σινιάλο στόχευσης (ITS) του Tim10.

Είδαμε λοιπόν ότι το σινιάλο στόχευσης και αναγνώρισης από την Mia40 εξαρτάται από το σινιάλο στόχευσης ITS, από μια αλληλουχία δηλαδή 9 αμινοξέων. Θελήσαμε να προσδιορίσουμε τα σημαντικά αμινοξέα για την αλληλεπίδραση με την Mia40. Για τον σκοπό αυτό αντικαταστήσαμε τα αμινοξέα από το 9-πεπτιδικό σινιάλο σε αλανίνες (εικόνα 68A). Οι αλλαγές πραγματοποιήθηκαν στο υπόστρωμα Tim10 το οποίο επιπλέον είχε τις κυστεΐνες 44, 61 και 65 μεταλλαγμένες σε σερίνες έτσι ώστε να ελέγχουμε μόνο για τον σχηματισμό του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40. Τα μεταλλάγματα ραδιοσημάνθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα εισόδου σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια (εικόνα 68B). Παρατηρήσαμε ότι ήδη από την αντικατάσταση δυο αμινοξέων σε αλανίνες (2A1a), συγκεκριμένα τα αμινοξέα M32 και N34, το ποσοστό του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου που σχηματίζεται με την Mia40 μειώνεται σε μεγάλο βαθμό. Όταν αντικαταστήσαμε



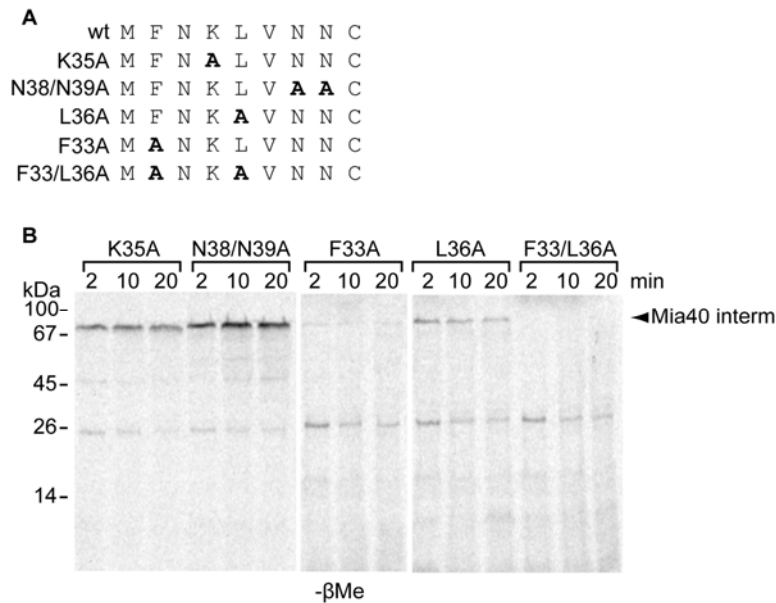
επιπλέον της M32, N34 και τα αμινοξέα F33 και K35 δημιουργώντας έτσι ένα μεταλλαγμένο υπόστρωμα που είχε στο ITS 4 συνολικά αλανίνες (4Ala), δεν σχηματίστηκε ο διαμοριακός δισουλφιδικός δεσμός. Σε πλήρη αντιστοιχία με το τετραπλό μετάλλαγμα, το εξαπλό (6Ala) όσο και το επταπλό (7Ala) είχαν πρόβλημα στην δημιουργία του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40.



**Εικόνα 68: Μετατροπή του ITS σε αλανίνες επηρεάζει την πρόσδεση στην Mia40 in organello.** A) Αντικαταστάσεις σε αλανίνη αμινοξέων στην αλληλουχία ITS του Tim10 που χρησιμοποιήθηκαν για το B. B) Πείραμα εισόδου ραδιενεργών μεταλλαγμάτων του Tim10 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στους 30°C. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS απουσία αναγωγικού μέσου. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο υποδεικνύεται με βέλος.

Αποφασίσαμε να αναλύσουμε ξεχωριστά τον ρόλο του κάθε αμινοξέος στο πόσο συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με την Mia40. Πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλαγές στα αμινοξέα F33, K35 και L36 (εικόνα 69A). Τα μεταλλάγματα ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα εισόδου και αλληλεπίδρασης με την Mia40 στα μιτοχόνδρια. Παρατηρήσαμε ότι η μεταλλαγή F33 σε αλανίνη είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη κατάργηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 καθιστώντας έτσι το συγκεκριμένο αμινοξύ σημαντικό για την αλληλεπίδραση (εικόνα 69B). Αντίθετα, στις μεταλλαγές των αμινοξέων K35 και L36 σε αλανίνες διαπιστώθηκε ότι ο σχηματισμός του μικτού δισουλφιδίου είχε επηρεαστεί σε ένα

βαθμό σε σχέση με την αγρίου τύπου Tim10 αλλά όχι τόσο ώστε να καταργηθεί τελείως η αλληλεπίδραση όπως στην περίπτωση του F33A. Ειδικότερα στην περίπτωση της διπλής μεταλλαγής των αμινοξέων N38/N39 σε αλανίνες παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει κανένα πρόβλημα αλληλεπίδρασης παρά το γεγονός ότι αυτά τα αμινοξέα είναι τα πιο κοντινά στην κυστεΐνη πρόσδεσης C40.

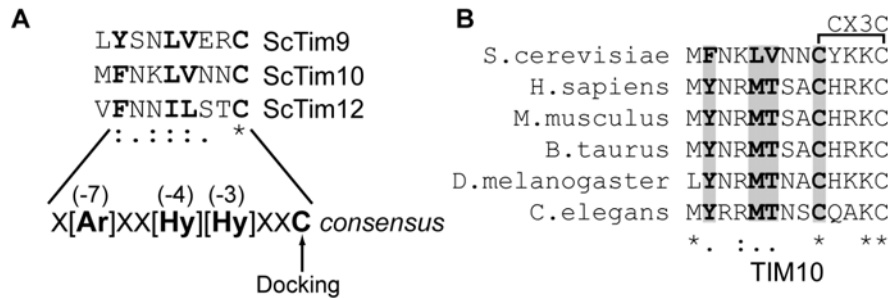


**Εικόνα 69: Τα υδρόφοβα αμινοξέα στο ITS είναι σημαντικά για την πρόσδεση στην Mia40.**

A) Σημειακές μεταλλαγές στην αλληλουχία ITS του Tim10 που χρησιμοποιήθηκαν για το B. B) Πείραμα εισόδου ραδιενεργών μεταλλαγμάτων του Tim10 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα στους 30°C. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS απουσία αναγωγικού μέσου. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο υποδεικνύεται με βέλος.

Συμπερασματικά λοιπόν από τα παραπάνω πειράματα προκύπτει ότι κάποια από τα αμινοξέα που απαρτίζουν το σινιάλο στόχευσης είναι απαραίτητα για την σωστή τοποθέτηση και άρα αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την Mia40. Από την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση ξεχωρίζουν σε σημαντικότητα τα αμινοξέα F33 και L36. Ελέγξαμε αν τα συγκεκριμένα αμινοξέα απαντώνται και στα υπόλοιπα Tim υποστρώματα και παρατηρήσαμε ότι στην θέση -7 σε σχέση με την κυστεΐνη πρόσδεσης βρίσκεται πάντα ένα αρωματικό αμινοξύ ενώ στις θέσεις -4 και -3

βρίσκεται ένα υδρόφοβο (εικόνα 70A). Τα αμινοξέα αυτά φαίνεται να είναι συντηρημένα και σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (εικόνα 70B).



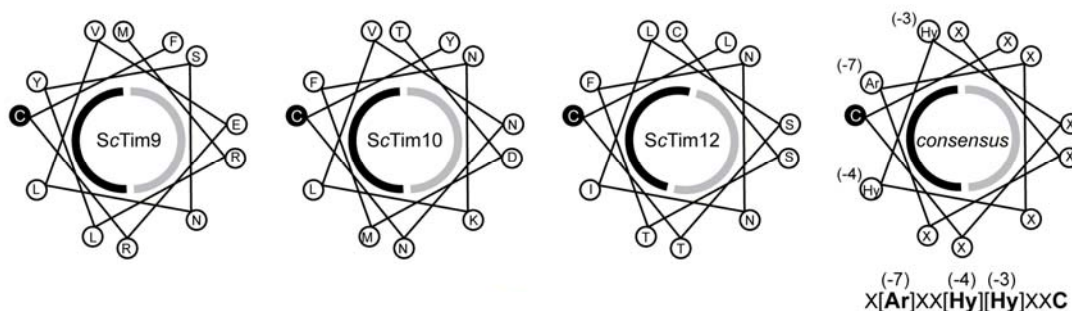
**Εικόνα 70: Ευθυγράμμιση μικρών Tim και προσδιορισμός του γενικότερου σινιάλου ITS.**

A) Ευθυγράμμιση την αλληλουχίας ITS στις Tim9, Tim10 και Tim12 του σακχαρομύκητα. Η κοινή αλληλουχία του ITS (consensus) φαίνεται κάτω από την ευθυγράμμιση. Με βέλος φαίνεται η κυστεΐνη πρόσδεσης στην Mia40. Με έντονα γράμματα φαίνονται τα απαραίτητα αμινοξέα για την λειτουργικότητα του ITS και η θέση τους σε σχέση με την κυστεΐνη πρόσδεσης σε παρένθεση. B) Ευθυγράμμιση της αλληλουχίας ITS του Tim10 σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς με ClustalW.

### 7.5 Δομική βάση για την αλληλεπίδραση του ITS με την Mia40.

Σκεφτήκαμε ότι για να υπάρχει συγκεκριμένη κυστεΐνη πρόσδεσης του υποστρώματος για την Mia40 θα πρέπει το σινιάλο ITS να τοποθετείται με συγκεκριμένη δομή ώστε να υπάρχει η βέλτιστη δυνατή αλληλεπίδραση με την Mia40. Προβάλλαμε την εννιαπεπτιδική αλληλουχία του ITS σε ελικωτή ρόδα (helical wheel) και παρατηρήσαμε ότι σχηματίζει μια αμφι-παθητική α-έλικα με την κυστεΐνη πρόσδεσης τοποθετημένη στον χώρο ακριβώς δίπλα στο καιρίο αρωματικό κατάλοιπο της θέσης -7 (εικόνα 71). Πράγματι τα απαραίτητα αμινοξέα για την αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την Mia40 στις θέσεις -7, -4 και -3 βρίσκονται όλα στην υδρόφοβη μεριά της α-έλικας μαζί με την κυστεΐνη πρόσδεσης ενώ από την άλλη μεριά της έλικας τοποθετούνται πλευρικές αλυσίδες υδρόφιλων αμινοξέων που είναι επουσιώδη για την αλληλεπίδραση. Παράλληλα παρατηρήσαμε ότι η ελικωτή πρόβλεψη είναι όμοια για το εννιαπεπτίδιο των μικρών Tim 9, 10 και 12 και

ταυτόσημη με την κρυσταλλική δομή των πρωτεϊνών Tim9 και Tim10 τόσο του σακχαρομύκητα όσο και του ανθρώπου.

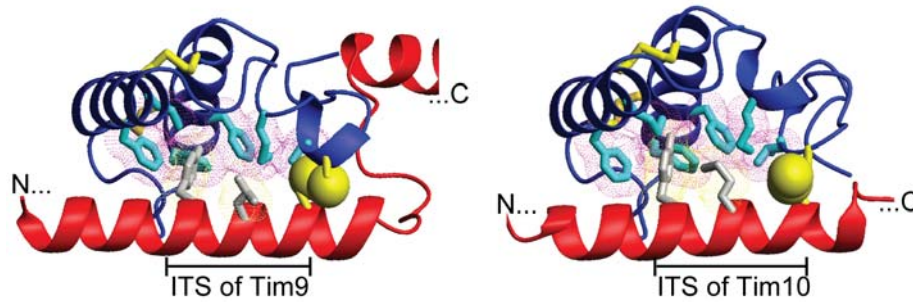


**Εικόνα 71: Απεικόνιση  $\alpha$ -έλικας του ITS στην Tim9, Tim10 και Tim12.**

Το μαύρο ημικόκλιο δείχνει την υδρόφοβη πλευρά της  $\alpha$ -έλικας, ενώ το γκρι την υδρόφιλη πλευρά. Η κοινή αλληλουχία ITS φαίνεται στα δεξιά.

Φαίνεται λοιπόν πως αυτά τα στοιχεία του ITS θα μπορούσαν να αποτελέσουν την δομική βάση για την πρόσδεση του εννιαπεπτιδίου στην υδρόφοβη περιοχή της Mia40. Με την βοήθεια των Angelo Gallo και Simone Cioffi-Baffoni (University of Florence, Italy) ελέγξαμε με θεωρητική μοντελοποίηση την πρόσδεση του Tim9 και Tim10 υποστρώματος στην Mia40 χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα HADDOCK. Για το μοντέλο χρησιμοποιήσαμε τις δομές της ανθρώπινης Tim9 και Tim10 (κωδικός pdb 2BSK) και της ανθρώπινης Mia40 (κωδικός pdb 2K3J) και θέσαμε ως παραμέτρους ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο προϋποθέτει τον σχηματισμό ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της αμινοτελικής κυστεΐνης του υποστρώματος και της δεύτερης κυστεΐνης του CPC μοτίβου της Mia40. Το θεωρητικό μοντέλο μεταξύ της Mia40 και του Tim9 ή του Tim10 φαίνεται στην εικόνα 72 ενώ το πρόγραμμα παρέχει τιμές για την περιοχή αλληλεπίδρασης  $2090 \pm 60 \text{ \AA}^2$  και  $1471 \pm 36 \text{ \AA}^2$  αντίστοιχα, ενδεικτικές καλής επιφανειακής πληρότητας μεταξύ του ITS και της υδρόφοβης περιοχής της Mia40. Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο η βέλτιστη πρόσδεση του υποστρώματος με την Mia40 συμβαίνει μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις -7 και -4, όσον αφορά την κυστεΐνη πρόσδεσης, της υδρόφοβης μεριάς της

έλικας του ITS (με γκρι) και των υδρόφοβων αμινοξέων (με κυανό) στην προτεινόμενη περιοχή πρόσδεσης των υποστρωμάτων της Mia40. Επιπλέον στο μήκος της υδρόφοβης κοιλότητας της Mia40 φαίνεται να ‘χωράει’ ιδανικά η εννιαπεπτιδική αλυσίδα του ITS ώστε να πραγματοποιηθεί ο μικτός δισουλφιδικός δεσμός (κίτρινα σφαιρίδια) μεταξύ των δύο.

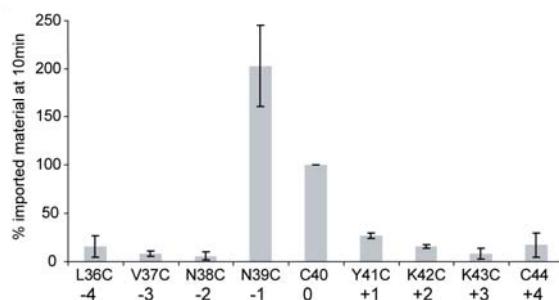
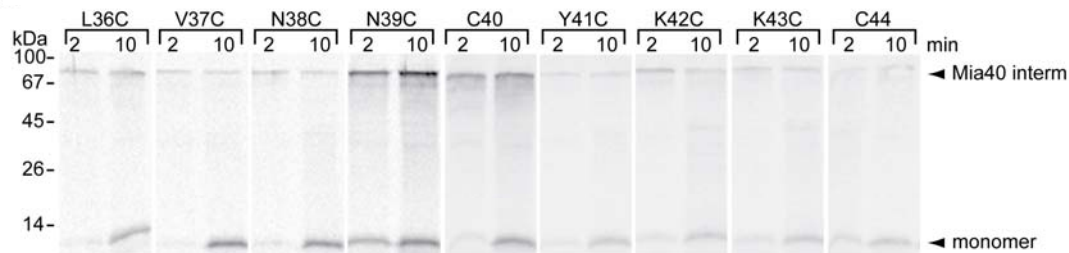


**Εικόνα 72: Θεωρητικό μοντέλο πρόσδεσης του ITS των Tim9 και Tim10 στην Mia40.**

Θεωρητικό μοντέλο πρόσδεσης της ανθρώπινης Tim9 και Tim10 στην ανθρώπινη MIA40 χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα HADDOCK. Οι πρωτεΐνες Tim φαίνονται με κόκκινο ενώ η MIA40 φαίνεται με μπλε. Τα υδρόφοβα αμινοξέα της MIA40 που εμπλέκονται στηναλληλεπίδραση με τα μικρά Tim φαίνονται με κυανό, ενώ τα συντηρημένα υδρόφοβα αμινοξέα των μικρών Tim φαίνονται με γκρι. Οι κυστεΐνες φαίνονται με κίτρινο ενώ οι κυστεΐνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ των δύο πρωτεϊνών φαίνονται σαν κίτρινες σφαίρες.

Βάση του θεωρητικού μοντέλου πρόσδεσης του εννιαπεπτιδίου στην Mia40 είναι πιθανόν το εννιαπεπτίδιο να πρέπει να βρίσκεται σε δομή α-έλικας κατά την αλληλεπίδραση με την Mia40. Σκεφτήκαμε να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση αντικαθιστώντας ένα-ένα τα αμινοξέα στην περιοχή πριν και μετά την κυστεΐνη πρόσδεσης με μια μοναδική κυστεΐνη. Θεωρήσαμε ότι στην περίπτωση που το ITS είναι ξεδίπλωτο κατά την αλληλεπίδραση με την Mia40 τότε τοποθετώντας την κυστεΐνη πρόσδεσης μέχρι 4 θέσεις πριν ή μετά δεν θα είχε σημαντικό αντίκτυπο στον σχηματισμό μικτού δισουλφιδικού δεσμού με την Mia40. Με την συνεργασία της Δέσποινας Μικροπούλου (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) αντικαταστήσαμε τα αμινοξέα σε έκταση μιας α-έλικας πριν και μετά την κυστεΐνη πρόσδεσης, συγκεκριμένα στις θέσεις 36,37,38,39,41,42,43,44, με μια μοναδική κυστεΐνη σε υπόστρωμα Tim10 που και οι τέσσερις ενδογενής κυστεΐνες είναι

μεταλλαγμένες σε σερίνη. Τα αντίστοιχα μεταλλάγματα ελέγχθηκαν για την ικανότητα εισόδου και σχηματισμού του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 στα μιτοχόνδρια (εικόνα 73). Παρατηρήσαμε ότι υπάρχει αυστηρός συσχετισμός μεταξύ της απόστασης της εμβόλιμης κυστεΐνης από την φυσιολογική θέση της κυστεΐνης πρόσδεσης στην θέση 40 με την ικανότητα δημιουργίας του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι η μεταφορά της φυσιολογικής κυστεΐνης σε οποιαδήποτε θέση, δεν είναι ανεκτή όσον αφορά στην αλληλεπίδραση με την Mia40 (με την εξαίρεση της κυστεΐνης στην θέση -1, όπου το ποσοστό μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου διπλασιάζεται). Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν στο ότι η πρόσδεση της κυστεΐνης εξαρτάται από την τάση του ITS να αναδιπλώνεται σε μορφή  $\alpha$ -έλικας η οποία θα καθοδηγήσει την κυστεΐνη πρόσδεσης σε γειτνίαση με την ενεργή κυστεΐνη της Mia40.

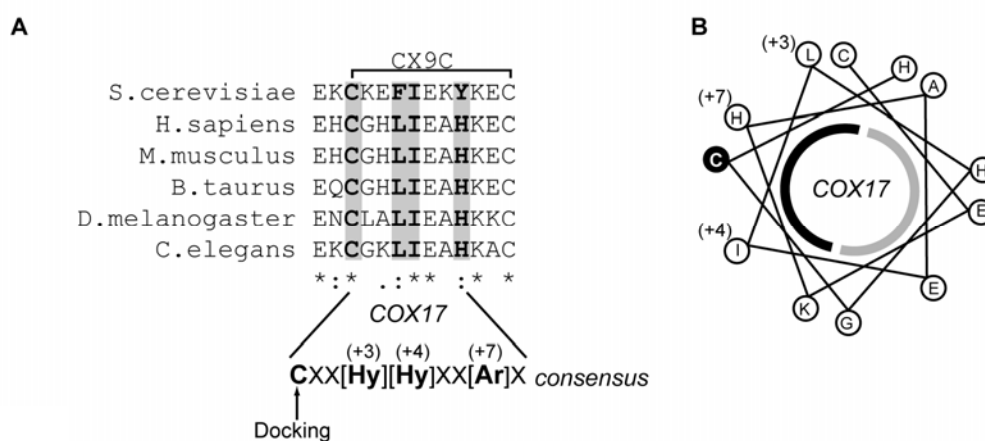


**Εικόνα 73: Το ITS πρέπει να βρίσκεται σε δομή  $\alpha$ -έλικας για να προσδεθεί στην Mia40.**

Πάνω: Πείραμα εισόδου ραδιοενεργών μεταλλαγμάτων Tim10 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για 2 και 10 λεπτά. Το εισαχθέν δείγμα αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS χωρίς  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη. Κάτω: Ποσοτικοποίηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 μετά από 10 λεπτά εισόδου σε μιτοχόνδρια. Το στατιστικό λάθος έχει προκύψει από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

## 7.6 Προσδιορισμός σινιάλου στόχευσης ITS στο υπόστρωμα Cox17.

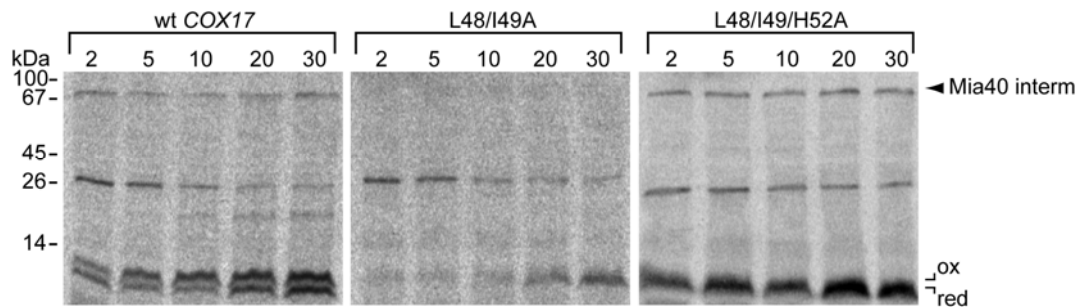
Αναρωτηθήκαμε μήπως υπάρχει αντίστοιχη αλληλουχία ITS με αυτή των μικρών Tim στο υπόστρωμα Cox17 παρόλο που αυτό δεν έχει καμία ομολογία με την οικογένεια των πρωτεϊνών Tim. Η παρουσία ενός πιθανού ITS κοντά στην ενεργή κυστεΐνη 3 του Cox17 υποστρώματος θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί αναγνωρίζεται αυτή η κυστεΐνη από την Mia40. Ελέγξαμε την περιοχή γύρω από την κυστεΐνη 3 και παρατηρήσαμε ότι στην αλληλουχία εντοπίζονται χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να την καθιστούν αντίστοιχο σινιάλο στόχευσης ITS με αυτό των μικρών Tim. Συγκεκριμένα εντοπίσαμε συντηρημένα κατάλοιπα στις ίδιες θέσεις με αυτές των μικρών Tim με την διαφορά ότι βρίσκονται μετά (downstream) την κυστεΐνη πρόσδεσης (θέσεις +3, +4, +7) (εικόνα 74A). Προβολή του σινιάλου στόχευσης του υποστρώματος Cox17 σε ελικωτή ρόδα έδειξε ότι η κυστεΐνη πρόσδεσης C3 βρίσκεται σε γειννίαση με τα υδρόφοβα αμινοξέα στις θέσεις +3, +4, +7, ενώ η άλλη όψη της έλικας περιέχει υδρόφιλα κατάλοιπα (εικόνα). Φαίνεται λοιπόν ότι τα χαρακτηριστικά του ITS στα μικρά Tim διατηρούνται και στην πρωτεΐνη Cox17.



**Εικόνα 74: Ευθυγράμμιση των ομόλογων πρωτεϊνών στην Cox17 και προσδιορισμός του ITS.**

A) Ευθυγράμμιση της πρωτεΐνης Cox17 σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα συντηρημένα αμινοξέα που σχηματίζουν την κοινή αλληλουχία ITS φαίνονται με γκρι και έντονα γράμματα. Η αλληλουχία ITS βρίσκεται μετά την κυστεΐνη πρόσδεσης (C3). B) Απεικόνιση α-έλικας της αλληλουχίας ITS της πρωτεΐνης Cox17. Η κυστεΐνη πρόσδεσης φαίνεται με μαύρο ενώ το μαύρο ημικύκλιο δείχνει την υδρόφοβη πλευρά της α-έλικας.

Ελέγξαμε αν το εννιαπεπτίδιο που εντοπίσαμε στο υπόστρωμα Cox17 είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με την Mia40 αντικαταστήσαμε με αλανίνες τα αμινοξέα λευκίνης και ισολευκίνης στις θέσεις +3 και +4 που είναι συντηρημένα σε άλλους οργανισμούς και επίσης απαντώνται και στο ITS των μικρών Tim. Τα μεταλλάγματα ελέγχθηκαν για την ικανότητα σχηματισμού του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40 σε ετερόλογο σύστημα μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα (εικόνα 75). Παρατηρήσαμε ότι το συγκεκριμένο μετάλλαγμα χάνει την ικανότητα σχηματισμού του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με την Mia40. Παράλληλα αντικαθιστώντας και την ιστιδίνη στην θέση +7 με αλανίνη παρατηρούμε ότι αντιστρέφουμε το πρόβλημα αλληλεπίδρασης με την Mia40 και μάλιστα ενισχύουμε το ποσοστό μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου, γεγονός που υποδεικνύει ότι το αμινοξύ στην θέση +7 είναι σημαντικό για την αλληλεπίδραση.



**Εικόνα 75: Τα υδρόφοβα αμινοξέα στο ITS του Cox17 επηρεάζουν την πρόσδεση στην Mia40.** Πείραμα εισόδου μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Cox17 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40 φαίνεται με βέλος.

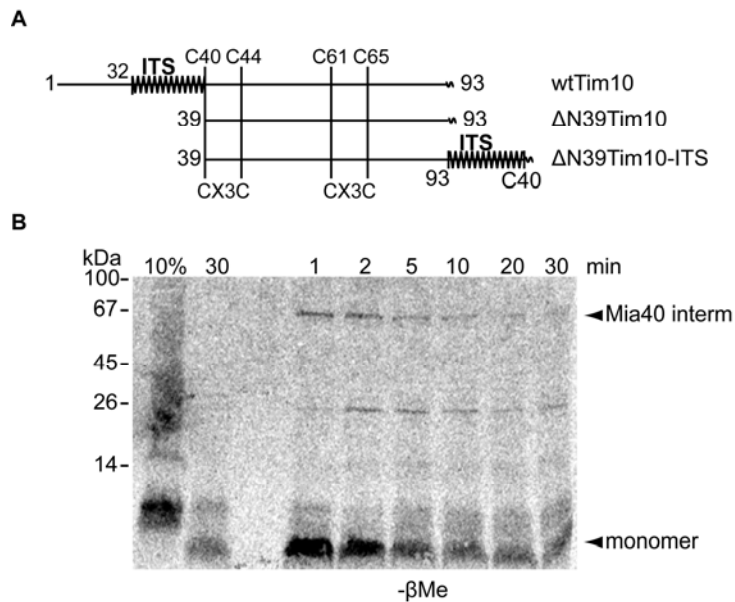
Φαίνεται λοιπόν ότι όντως εντοπίζεται ένα ITS και στην Cox17 με αντίστοιχα δομικά στοιχεία των μικρών Tim με την διαφορά ότι βρίσκεται μετά την κυστεΐνη πρόσδεσης. Επιπλέον σημαντικό στοιχείο που συνηγορεί στην μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση της Mia40 με συγκεκριμένα αμινοξέα είναι το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Cox17 διατηρεί δομή α-έλικας όταν παρουσιάζεται στην MIA40 σε ανηγμένη κατάσταση ((Banci et al., 2008b). Συνολικά τα αποτελέσματα συγκλίνουν σε ένα



γενικό μηχανισμό στόχευσης και πρόσδεσης των υποστρωμάτων στην Mia40 μέσω του σινιάλου ITS.

### **7.7 Η στόχευση στο μονοπάτι της Mia40 μέσω του σινιάλου ITS δεν εξαρτάται από την θέση του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του υποστρώματος.**

Η παρουσία του ITS κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του Cox17 υποδηλώνει σε ένα βαθμό ότι η στόχευση του υποστρώματος μέσω του σινιάλου ITS γίνεται ανεξάρτητα από την θέση του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Ελέγξαμε την παραπάνω υπόθεση συγχωνεύοντας το σινιάλο ITS στο καρβοξυτελικό άκρο του ΔN39Tim10 το οποίο δεν αλληλεπιδρά με την Mia40 (§ 7.2) (εικόνα 76A). Το μετάλλαγμα ελέγχθηκε για την ικανότητα εισόδου και αλληλεπίδρασης με την Mia40 σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Από το αποτέλεσμα του πειράματος φαίνεται ότι η παρουσία του ITS ακόμα και στο καρβοξυτελικό άκρο του υποστρώματος μπορεί να επαναφέρει την στόχευση στο μιτοχόνδριο και την αλληλεπίδραση με την Mia40 (εικόνα 76B). Επιπλέον παρατηρούμε ότι το πρόδρομο νέο-εισερχόμενο μόριο στην διάρκεια του χρόνου πρωτεολύεται μέσα στο μιτοχόνδριο πιθανώς λόγω του ότι δεν μπορεί να αναδιπλωθεί σωστά. Το αποτέλεσμα αυτό θυμίζει και το μετάλλαγμα *cyb2(1-85)ΔN39Tim10* (εικόνα 64). Στην συγκεκριμένη περίπτωση παρόλο που παρακάμψαμε το πρόβλημα εισόδου στα μιτοχόνδρια χρησιμοποιώντας το σινιάλο στόχευσης του κυτοχρώματος το υπόστρωμα επίσης αποικοδομείται πιθανώς λόγω του ότι το μόριο δεν μπορεί να αναγνωριστεί και να οξειδωθεί από την Mia40 και άρα δεν μπορεί να αποκτήσει την τελική λειτουργική του δομή. Η παρουσία του ITS στο αμινοτελικό άκρο του υποστρώματος εξασφαλίζει την σωστή αναδίπλωση του μορίου.

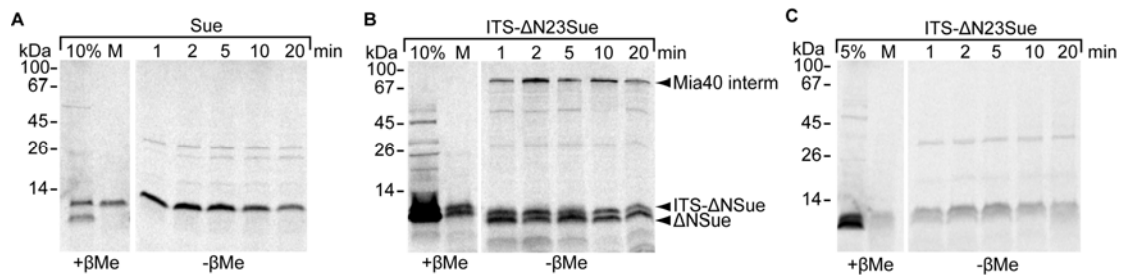


**Εικόνα 76: Τοποθέτηση του σινιάλου ITS στην καρβοξυτελική περιοχή του υποστρώματος δεν επηρεάζει την στόχευση στο μονοπάτι της Mia40.** Α) Σχηματική απεικόνιση της αλληλουχίας ITS στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη Tim10 και στην περίπτωση που έγινε ένθεση στο καρβοξυτελικό άκρο της ΔN39Tim10. Β) Πείραμα εισόδου ραδιενεργής ΔN39Tim10-ITS σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο και το μονομερές φαίνονται με βέλος.

### 7.8 Το ITS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την στόχευση πρωτεϊνών που δεν είναι φυσιολογικά υποστρώματα του μονοπατιού της Mia40.

Συνολικά από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως το ITS καθοδηγεί τα υποστρώματα στο μονοπάτι της Mia40 ανεξάρτητα από την θέση του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του υποστρώματος και είναι αυτό που ορίζει κάθε φορά ποια θα είναι η ενεργή κυστεΐνη πρόσδεσης. Θελήσαμε να ελέγξουμε αν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το ITS εννιαπεπτίδιο για να δημιουργήσουμε μη-φυσιολογικά υποστρώματα για την Mia40. Χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη Tim11/Sue (υπομονάδα ε της μιτοχονδριακής F1F0ATP συνθάσης του σακχαρομύκητα) η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες στοχεύεται και τοποθετείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής στο αμινοτελικό της άκρο ανεξάρτητα από την Mia40. Το μετάλλαγμα που έχει απαλειμμένα τα 23 πρώτα αμινοξέα υπεύθυνα για την αγκυροβόληση της Sue στην εσωτερική μεμβράνη, χάνει

την ικανότητα εισόδου στο μιτοχόνδριο (εικόνα 77). Σε αυτό το υπόστρωμα ενθέσαμε την εννιαπεπτιδική αλυσίδα του Tim10 ITS στο αμινοτελικό άκρο και παρατηρήσαμε i) ότι η στόχευση στο μιτοχόνδριο αποκαθίσταται και ii) ότι αλληλεπιδρά με την Mia40 σχηματίζοντας μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο. Το αντίστοιχο πείραμα σε μιτοχόνδρια που απουσιάζει η Mia40 αποδεικνύει ότι η στόχευση γίνεται μέσω του μονοπατιού της Mia40 (εικόνα 77Γ).

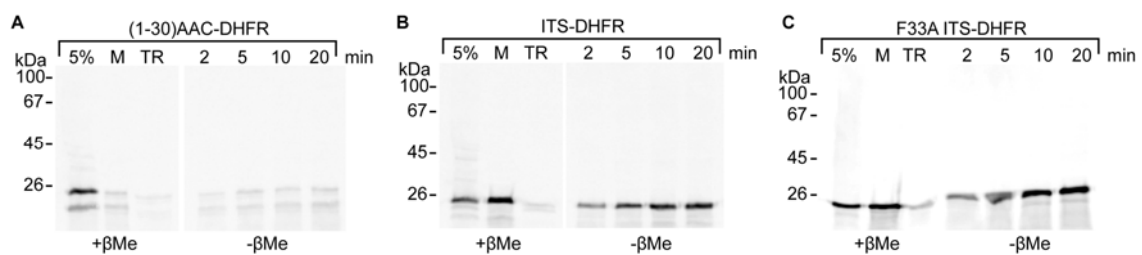


**Εικόνα 77: Η πρωτεΐνη Sue μετατρέπεται σε υπόστρωμα της Mia40 με την προσθήκη του ITS.** Πείραμα εισόδου ραδιενεργής Sue (A) και ITS-ΔN23Sue (B) σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο και το μονομερές φαίνονται με βέλος. Γ) όπως στο B αλλά σε μιτοχόνδρια που απουσιάζει η ενδογενής Mia40.

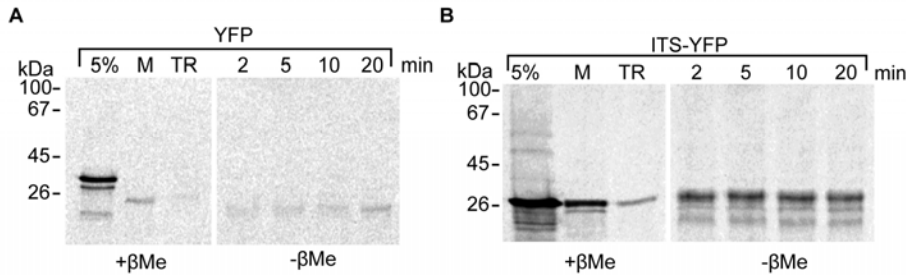
### 7.9 Το ITS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την στόχευση μη-μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο.

Προκειμένου να ελέγξουμε αν το σινιάλο ITS μπορεί να λειτουργήσει και σε μη-μιτοχονδριακές πρωτεΐνες το τοποθετήσαμε στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης DHFR (mouse dihydrofolate reductase) και της YFP (yellow fluorescent protein) και πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου στα μιτοχόνδρια. Η πρωτεΐνη DHFR είναι μια μικρή, καλά αναδιπλωμένη σε δομή έλικας πρωτεΐνη που δεν περιέχει μιτοχονδριακό σινιάλο στόχευσης και έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί σε πειράματα εισόδου στα μιτοχόνδρια. Ελέγξαμε, σαν μάρτυρα, την ικανότητα εισόδου της πρωτεΐνης DHFR συνενωμένης στο αμινοτελικό άκρο με τα πρώτα 30 αμινοξέα της πρωτεΐνης της εσωτερικής μεμβράνης AAC (ADP/ATP carrier) και παρατηρήσαμε ότι το ποσοστό

που εισέρχεται στα μιτοχόνδρια είναι πολύ μικρό (εικόνα 78A). Αντίθετα όταν συγχωνεύσαμε το σινιάλο στόχευσης ITS του Tim10 στην DHFR σημαντικό ποσοστό ραδιενεργής πρωτεΐνης εισήλθε στα μιτοχόνδρια συνιστώντας ότι το ITS έχει την ικανότητα να στοχεύσει μια μη-μιτοχονδριακή πρωτεΐνη διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης. Ωστόσο δεν σχηματίζεται μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την ενδογενή Mia40 στο ίδιο πείραμα. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη DHFR συγχωνεύθηκε στο ITS του Tim10 που είχε μεταλλαγμένη την F33A (απαραίτητο κατάλοιπο για την αλληλεπίδραση του Tim10 με την Mia40) και ακόμα και σε αυτή την περίπτωση το ITS δρα ως σινιάλο στόχευσης στα μιτοχόνδρια. Πήραμε τα ίδια αποτελέσματα χρησιμοποιώντας και την YFP (καλά αναδιπλωμένη πρωτεΐνη σε δομή β-βαρελιού) ως ένα δεύτερο μη-μιτοχονδριακό υπόστρωμα (εικόνα 79). Η πρωτεΐνη μόνη της δεν εισέρχεται στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, παρουσία του αμινοτελικού σινιάλου ITS στοχεύεται στα μιτοχόνδρια αλλά, όπως και για το DHFR, δεν σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40.



**Εικόνα 78: Το μη-μιτοχονδριακό υπόστρωμα DHFR εισέρχεται στα μιτοχόνδρια παρουσία ITS** Πείραμα εισόδου των (1-30)AAC DHFR (A), ITS-DHFR (B) και F33A ITS-DHFR (Γ) σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με πρωτεΐνάση K προκειμένου να απομακρυνθεί το μη-εισερχόμενο υπόστρωμα. Ένα δείγμα επεξεργάστηκε με Triton X (TR) και πρωτεΐνάση K για να ελεγχθεί η δράση της πρωτεάσης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη.



**Εικόνα 79: Η πρωτεΐνη YFP εισέρχεται στα μιτοχόνδρια παρουσία ITS.**

Πείραμα εισόδου των YFP (A) και ITS-YFP (B) σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα όπως στην εικόνα 78.

Συνολικά τα αποτελέσματα των δύο υποστρώματων υποδεικνύουν ότι το ITS μπορεί να λειτουργήσει ως σινιάλο στόχευσης μη-μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, αλλά ανεξάρτητα την Mia40. Σε αυθεντικά υποστρώματα της Mia40, η μετατόπιση διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την οξείδωση τους μέσω της Mia40. Αντίθετα σε μη-μιτοχονδριακές πρωτεΐνες το ITS έχει την πληροφορία μετατόπισης από την εξωτερική μεμβράνη αλλά σε μετέπειτα στάδιο δεν προσδένεται ομοιοπολικά στην Mia40, πιθανώς επειδή η κυστεΐνη πρόσδεσης του ITS δεν είναι προσβάσιμη σε καλά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες όπως η DHFR και η YFP. Ωστόσο οι δύο αυτές πρωτεΐνες συνενωμένες με το ITS μας επιτρέπουν για πρώτη φορά να αποσυνδέσουμε την διαδικασία μετατόπισης από την εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με την Mia40-εξαρτώμενη οξείδωση, που όπως έχουμε δει στο κεφάλαιο 6 είναι ταυτισμένες έννοιες για αυθεντικά υποστρώματα, και να δείξουμε ότι το σινιάλο στόχευσης εμπλέκεται και στις δύο λειτουργίες.

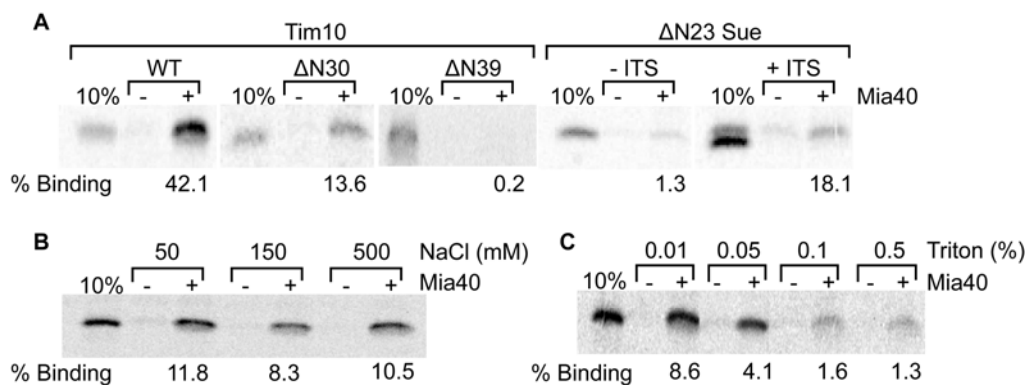
### **7.10 Η αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την Mia40 μέσω του ITS καθοδηγείται από υδρόβοφες αλληλεπιδράσεις.**

Η λύση της δομής της Mia40 αποκάλυψε την ύπαρξη μιας εκτεθειμένης υδρόφοβης κοιλότητας που δύναται να λειτουργεί ως περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος λόγω της καίριας τοποθέτησης της ενεργής κυστεΐνης C55/C298 του CPC μοτίβου

στην περιοχή αυτή. Ο προσδιορισμός του ITS, ο σημαντικός ρόλος των υδρόφοβων αμινοξέων για την πρόσδεση του υποστρώματος στην Mia40, καθώς και η τοποθέτηση αυτών στην ίδια πλευρά της έλικας με την κυστεΐνη πρόσδεσης, υποδεικνύουν ότι σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την Mia40 παίζουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εκτός από την ομοιοπολική πρόσδεση στην Mia40. Σκεφτήκαμε ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις πρέπει να είναι αρκετά ισχυρές για να οριοθετούν την περιοχή τοποθέτησης του υποστρώματος στην Mia40 έτσι ώστε σε δεύτερο στάδιο να προσδεθεί μέσω διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού με την Mia40. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αυτή την θεωρία πραγματοποιήσαμε σε συνεργασία με τον Νίκο Πετράκη (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) *in vitro* πειράματα πρόσδεσης παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλατιού και απορρυπαντικού και επιπλέον μετρήσαμε την συγγένεια των δύο πρωτεϊνών με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης. Για τα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήσαμε την Mia40 που έχει απαλειμμένα τα πρώτα 290 αμινοξέα και επιπλέον έχει τις κυστεΐνες του καταλυτικού της κέντρου CPC μεταλλαγμένο σε σερίνες. Τρεις λόγοι μας ώθησαν στην κατασκευή αυτής της πρωτεΐνης, i) τα πρώτα 290 αμινοξέα δεν είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα (Chacinska et al., 2008; Terziyska et al., 2009), ii) το τμήμα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται παρουσιάζει την υψηλότερη ομολογία με την ανθρώπινη MIA40 που χαρακτηρίστηκε με NMR (κεφάλαιο 5) και iii) μεταλλάσσοντας το καταλυτικό κέντρο της Mia40 εξετάζουμε την μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα.

Ραδιενεργά υποστρώματα επώαστηκαν με ακινητοποιημένη Mia40 σε σφαιρίδια νικελίου και αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με ηλεκτροφόρηση(εικόνα 80). Παρατηρήσαμε ότι τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν τα πειράματα εισόδου στα

μιτοχόνδρια μιας και το ΔN39Tim10 δεν αλληλεπιδρά με τη Mia40 και επιπλέον η πρωτεΐνη Sue προσδένεται στην Mia40 μόνο παρουσία του σινιάλου στόχευσης ITS. Στην συνέχεια ελέγξαμε την επίπτωση υψηλής συγκέντρωσης αλατιού και απορρυπαντικού στην μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση της Mia40 με το Tim10. Παρατηρήσαμε ότι υψηλή συγκέντρωση αλατιού δεν επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος στην Mia40 που σημαίνει ότι ηλεκτροστατικές δυνάμεις δεν έχουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση (εικόνα 80B). Αντίθετα αυξάνοντας την συγκέντρωση απορρυπαντικού κατά την διάρκεια της αντίδρασης μειώνουμε σταδιακά το ποσοστό πρόσδεσης του υποστρώματος (εικόνα 80Γ) γεγονός που σημαίνει ότι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εμπλέκονται στην αντίδραση και συνάδουν με τα προηγούμενα αποτελέσματα μεταλλαξιγένεσης των υδρόφοβων αμινοξέων στο ITS.

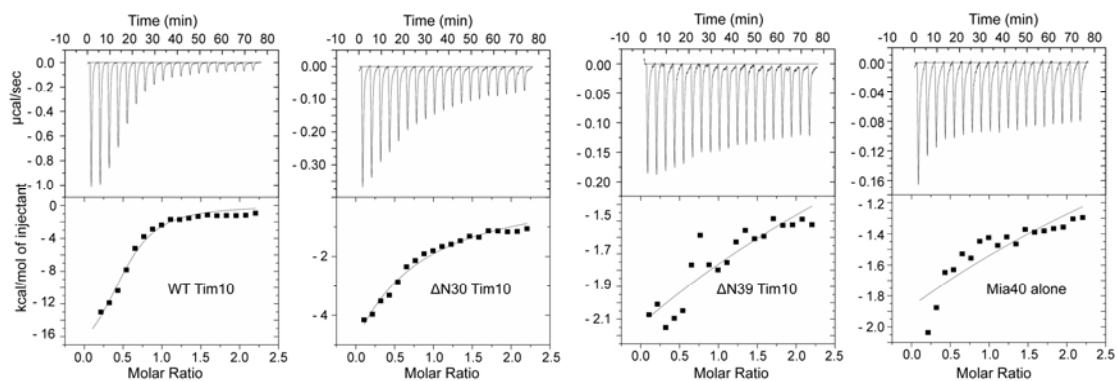


**Εικόνα 80: *In vitro* μη-ομοιοπολική πρόσδεση του Tim10 στην Mia40.**

A) Ραδιενεργά υποστρώματα επώαστηκαν με σφαιρίδια νικελίου που στην μια περίπτωση είχαν ακινητοποιημένη ΔN290Mia40SPS και στην άλλη όχι, για 2 ώρες στους 15°C. Το προσδεμένο δείγμα αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS παρουσία αναγωγικού μέσου. B) Ραδιενεργό Tim10 επώαστηκε όπως στο A, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων NaCl. Γ) όπως στο B αλλά παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Triton X-100.

Τέλος μετρήσαμε την συγγένεια των δύο πρωτεϊνών με θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (εικόνα). Η τεχνική αυτή είναι πολύ ευαίσθητη σε μικρές αλλαγές στην ενέργεια που απορροφάται ή εκλύεται κατά την διάρκεια αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών και ως εκ τούτου χρησιμοποιήσαμε την Mia40 με μεταλλαγμένο το

καταλυτικό της κέντρο σε σερίνες έτσι ώστε να μην παρεμβάλλεται μέτρηση από την ομοιοπολική πρόσδεση του υποστρώματος στην Mia40. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης με την Tim10 μετρήθηκε η σταθερά αποδιάταξης  $K_d$  και η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια  $\Delta G$  ( $K_d = 3.3 \times 10^{-6} \pm 0.7 \times 10^{-6} \text{ M}$  και  $\Delta G = -7.42 \text{ kcal/mol}$ ). Η μέτρηση αυτή είναι αναμενόμενη για μια αντίδραση ειδικής αλληλεπίδρασης *in vivo*. Παραδείγματα ειδικών αλληλεπιδράσεων αποτελούν η πρόσδεση πεπτιδίου στην μεταθετάση SecA ( $K_d = 3 \text{ }\mu\text{M}$ ) και η αλληλεπίδραση αντισώματος με  $\beta$ -αμυλοειδές πεπτίδιο ( $K_d = 30 \text{ nM}$ ) (Brockhaus et al., 2007; Gelis et al., 2007). Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε η  $\Delta N30\text{Tim10}$  μετρήθηκε σταθερά αποδιάταξης 19 φορές μεγαλύτερη ( $K_d = 6.29 \times 10^{-5} \pm 0.14 \times 10^{-5} \text{ M}$  και  $\Delta G = -5.68 \text{ kcal/mol}$ ) που σημαίνει λιγότερο ισχυρή πρόσδεση στην Mia40 σε σχέση με την αγρίου τύπου Tim10 που ωστόσο παραμένει τιμή ενδεικτική για ειδικές και φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος χρησιμοποιώντας την  $\Delta N39\text{Tim10}$  παίρνουμε διαφορές ενέργειας παρόμοιες με αυτές που δίνει η Mia40 μόνη της γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν έχουμε πλέον πρόσδεση της Tim10 σε συμφωνία με τα *in vitro* πειράματα πρόσδεσης.



**Εικόνα 81: Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης μεταξύ Tim10 και Mia40 SPS**

0.25mM  $\Delta N290\text{Mia40SPS}$  επώαστηκαν είτε με 0.025mM αγρίου τύπου Tim10 (αριστερά) είτε με  $\Delta N30\text{Tim10}$  (αριστερά) είτε με  $\Delta N39\text{Tim10}$  (δεξιά). Οι μετρήσεις έγιναν με μικροθερμιδόμετρο VP-ITC (Microcal).



## 7.11 Συζήτηση

Στο κεφάλαιο 6 παρατηρήσαμε ήδη ότι η Mia40 αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα μέσω συγκεκριμένης κυστεΐνης που όμως διαφέρει ανάλογα με το υπόστρωμα. Σε αυτό το κεφάλαιο προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε τον λόγο για τον οποίο παρατηρείται αυτή η διαφοροποίηση, τον λόγο δηλαδή για τον οποίο στην οικογένεια των μικρών Tim χρειάζεται η πρώτη αμινοτελική κυστεΐνη για πρόσδεση στην Mia40 ενώ στην Cox17 χρειάζεται η εσωτερική κυστεΐνη 3. Εντοπίσαμε μια αλληλουχία 9 αμινοξέων που είναι συντηρημένη στα μικρά Tim και στην Cox17 και επιτρέπει σε μια συγκεκριμένη κυστεΐνη, διαφορετική σε κάθε υπόστρωμα, να προσδεθεί στην Mia40. Στην αλληλουχία στόχευσης, ITS, εντοπίζουμε συγκεκριμένα συντηρημένα στοιχεία που ισχυροποιούν την πεποίθηση ότι δρα ως αλληλουχία αναγνώρισης από την Mia40. Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι το εννιαπεπτίδιο αποτελείται από το κοινή αλληλουχία  $x[Ar]xx[Hy][Hy]xxC$  που τοποθετείται πριν την κυστεΐνη πρόσδεσης στα μικρά Tim και μετά από την κυστεΐνη πρόσδεσης στην Cox17. Με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση δείχνουμε ότι το αρωματικό αμινοξύ στην θέση -7 είναι ζωτικής σημασίας για την αλληλεπίδραση με την Mia40 ενώ το υδρόφοβο αμινοξύ στην θέση -4 και -3 είναι σημαντικά αλλά όχι απαραίτητα. Η αλληλουχία στόχευσης ITS επιπλέον εντοπίζεται σε δομή  $\alpha$ -έλικας όπου τα υδρόφοβα αμινοξέα βρίσκονται στην ίδια πλευρά της έλικας με την κυστεΐνη πρόσδεσης. Θεωρητική πρόβλεψη της πρόσδεσης του υποστρώματος στην περιοχή πρόσδεσης της Mia40 δείχνει ότι υπάρχει πολύ καλή επιφάνεια κάλυψης και ότι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ITS και των αλειφατικών πλευρικών ομάδων της περιοχής πρόσδεσης της Mia40 τοποθετούν ιδανικά την κυστεΐνη πρόσδεσης στην δεύτερη κυστεΐνη του καταλυτικού CPC μοτίβου της Mia40. Η ίδια αλληλουχία στόχευσης εντοπίζεται και στην Cox17 συγκεκριμένα μετά την εσωτερική κυστεΐνη πρόσδεσης και έχει ακριβώς τα ίδια

δομικά χαρακτηριστικά. Θεωρητική πρόβλεψη της πρόσδεσης του υποστρώματος Cox17 στην υδρόφοβη κοιλότητα της Mia40 ενισχύει τον ίδιο τρόπο αλληλεπίδρασης και τοποθέτησης του ITS σε τέτοιο σημείο ώστε να έρχεται σε γειτνίαση η ενεργή κυστεΐνη της Mia40 με την κυστεΐνη πρόσδεσης του Cox17 όπως παρατηρείται και στην περίπτωση των μικρών Tim.

Ο εντοπισμός της αλληλουχίας στόχευσης ITS μετά την κυστεΐνη πρόσδεσης στο Cox17 υπόστρωμα υποδεικνύει ότι το σινιάλο αναγνωρίζεται ανεξάρτητα από την θέση του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του υποστρώματος. Για να επιβεβαιώσουμε αυτή την θεωρία μεταφέραμε το σινιάλο στόχευσης ITS στο καρβοξυτελικό άκρο του υποστρώματος Tim10 και παρατηρήσαμε ότι το υπόστρωμα μπορεί να σχηματίσει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Mia40. Επιπλέον επιβεβαιώσαμε την λειτουργική σημασία του ITS συνενώνοντας το σε μη-αυθεντικά μιτοχονδριακά υποστρώματα και σε μη-μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Παρατηρήσαμε ότι στην περίπτωση που το τοποθετήσαμε στο αμινοτελικό άκρο της μιτοχονδριακή πρωτεΐνης Sue την μετατρέψαμε σε υπόστρωμα του μονοπατιού της Mia40. Επιπλέον επιβεβαιώσαμε ότι το ITS περιέχει την πληροφορία για μετατόπιση στην εξωτερική μεμβράνη μιας και στοχεύει μη-μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (DHFR και YFP) στο μιτοχόνδριο χωρίς την απαίτηση της Mia40. Χρησιμοποιώντας αυτά τα υποστρώματα καταφέραμε να αποσυνδέσουμε την διαδικασία εισόδου στα μιτοχόνδρια με το μονοπάτι της Mia40 που στην περίπτωση των αυθεντικών υποστρωμάτων είναι συνυφασμένες έννοιες.

Τέλος μετρήσαμε για πρώτη φορά την μη-ομοιοπολική συγγένεια της οξειδάσης Mia40 και του υποστρώματος Tim10. Χρησιμοποιήσαμε την Mia40 που έχει μεταλλαγμένο το καταλυτικό της κέντρο σε σερίνες (SPS). Με θερμιδομετρία

ισοθερμικής τιτλοδότησης παρατηρήσαμε ότι οι δύο πρωτεΐνες έχουν σημαντική συγγένεια πρόσδεσης με Kd περίπου 3  $\mu$ M που χάνεται όταν χρησιμοποιούμε το Tim10 υποστρώμα χωρίς την αλληλουχία στόχευσης ITS. Αυτή η τιμή συνάδει με μια ειδική αναγνώριση του υποστρώματος Tim10 πριν την ομοιοπολική πρόσδεση στην Mia40. Ταυτόχρονα εξηγεί θερμοδυναμικά την βιογένεση του Tim10 υποστρώματος που αρχικά αλληλεπιδρά με την Mia40 αλλά μετά πρέπει να απελευθερωθεί και να σχηματίσει το TIM10 σύμπλοκο με την υπομονάδα Tim9. Από προηγούμενες μελέτες γνωρίζουμε ότι η οξειδωμένη υπομονάδα Tim9 έχει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με την οξειδωμένη υπομονάδα Tim10 με Kd περίπου 30 nM (Lu et al., 2004b; Vergnolle et al., 2007), δύο τάξης μεγέθους μεγαλύτερη από αυτήν με την Mia40 γεγονός που στηρίζει την παροδική πρόσδεση του υποστρώματος με την Mia40 έτσι ώστε να απελευθερωθεί και να αλληλεπιδράσει με την έταιρη υπομονάδα του συμπλόκου. Παράλληλα με *in vitro* πειράματα δείξαμε ότι η αλληλεπίδραση του υποστρώματος Tim10 με την Mia40 είναι κυρίως υδρόφοβη μιας και δεν επηρεάστηκε από υψηλή συγκέντρωση αλατιού αλλά μειώθηκε παρουσία απορρυπαντικού.

Το σινιάλο ITS προστίθεται στην λίστα με τα λιγιστά σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης που έχουν εντοπισθεί. Το ITS μοιάζει με την αμφι-παθητική  $\alpha$  έλικα που απαντάται στο μιτοχονδριακό σινιάλο στόχευσης (MTS/Presequence) αν και είναι αρκετά μικρότερο το πεπτιδικό τμήμα που χρειάζεται για την στόχευση. Επιπλέον για την αλληλεπίδραση με την Mia40 χρειάζεται η υδρόφοβη πλευρά της  $\alpha$ -έλικας και όχι η φορτισμένη. Ίσως να χρειάζονται και τα δύο στοιχεία της  $\alpha$ -έλικας για την μετατόπιση στην εξωτερική μεμβράνη σε αντιστοιχία με το σινιάλο στόχευσης MTS (Abe et al., 2000). Η πρωτεΐνη CCHL (cytochrome c heme lyase) εντοπίζεται στον

διαμεμβρανικό χώρο και στοχεύεται μέσω μιας υδρόφιλης αλληλουχίας 60 αμινοξέων και ως εκ τούτου διαφέρει αρκετά από την αλληλουχία ITS.

Συνολικά τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου συνηγορούν στην ύπαρξη μιας νέας πεπτιδικής αλληλουχίας 9 αμινοξέων που στοχεύει το υπόστρωμα στο διαμεμβρανικό χώρο και καθορίζει τον πεπτιδικό προσανατολισμό εισόδου. Επιπλέον υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ορίζουν την θέση πρόσδεσης στην Mia40 ώστε να τοποθετηθεί το ενεργό κέντρο της οξειδάσης Mia40 σε συγκεκριμένο κυστεϊνικό κατάλοιπο του υποστρώματος. Φαίνεται λοιπόν πως η αλληλουχία στόχευσης ITS αποτελεί μια σημαντική ασφαλιστική δικλείδα για την εξειδικευμένη δράση της Mia40 στα υποστρώματα. Οι πληροφορίες που αντλούμε για τα χαρακτηριστικά που προσδιορίζουν την αλληλουχία ITS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια για την *in silico* αναζήτηση καινούριων υποστρωμάτων της Mia40 και επιπλέον για την πρόβλεψη της κυστεϊνης μέσω της οποίας θα γίνει η πρόσδεση στην Mia40. Αυτό είναι ένα σημαντικό εργαλείο γιατί μας βοηθάει στο να κοιτάξουμε στοχευμένα σε μελλοντικά πειράματα εκείνες τις κυστεϊνες που καθορίζονται από ένα ITS πριν ή μετά στην αλληλουχία.

Συμπερασματικά προτείνουμε ένα μοντέλο αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης του υποστρώματος με την Mia40 όπου η αλληλουχία στόχευσης ITS οδηγεί τα υποστρώματα διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης και τα τοποθετεί μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην περιοχή πρόσδεσης της Mia40. Αποτέλεσμα αυτής της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης είναι η τοποθέτηση της ενεργής κυστεϊνης της Mia40 απέναντι από την κυστεϊνη πρόσδεσης του υποστρώματος που επιτρέπει έτσι τον σωστό δισουλφιδικό δεσμό να σχηματιστεί. Αυτός ο μηχανισμός αναγνώρισης

του υποστρώματος εξηγεί την 'προτίμηση' ξεχωριστής κυστεΐνης σε διαφορετικά υποστρώματα του μονοπατιού της Mia40.

*Τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου έχουν κατατεθεί προς δημοσίευση στο περιοδικό *Journal of Cell Biology*, Dionisia P. Sideris, Nikos Petrakis, Nitsa Katrakili, Despina Mikropoulou, Angelo Gallo, Simo Ciofi-Baffoni, Lucia Banci, Ivano Bertini and Kostas Tokatlidis.*

**ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ  
ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Συνολικά στα παραπάνω κεφάλαια μελετήσαμε τον τρόπο δράσης και αλληλεπίδρασης της Mia40 με αυθεντικά υποστρώματα με σκοπό να κατανοήσουμε καλύτερα το οξειδοαναγωγικό σύστημα που πρόσφατα εντοπίστηκε στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Αρχικά εστίασαμε στην πρωτεΐνη Mia40 και τον τρόπο που οξειδώνει τα υποστρώματα της. Με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση και *in vitro* πειράματα καταφέραμε να αναπτύξουμε μια τεχνική παγίδευσης μικτών διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών με τα υποστρώματα της και να προσδιορίσουμε το καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης. Παρατηρήσαμε ότι για την ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου με το υπόστρωμα είναι απαραίτητο το καταλυτικό CPC μοτίβο της Mia40 και συγκεκριμένα η δεύτερη κυστεΐνη. Παράλληλα παρατηρήσαμε ότι το CX9C μοτίβο σταθεροποιεί την δομή της πρωτεΐνης και είναι πολύ ανθεκτικό σε προσθήκη αναγωγικών μέσων, σε αντίθεση με το καταλυτικό κέντρο που είναι ευαίσθητο σε χαμηλές συγκεντρώσεις DTT όπως αρμόζει σε ένα ενεργό οξειδοαναγωγικό κέντρο που πρέπει να οξειδώνει γρήγορα τα υποστρώματα της.

Ταυτόχρονα, σε συνεργασία με το εργαστήριο του I. Bertini (Magnetic Resonance Center CERM, University of Florence, Italy), λύσαμε την δομή της Mia40 με NMR και παρατηρήσαμε ότι στην δομή υπάρχει μια υδρόφοβη κοιλότητα κοντά στην οποία τοποθετείται η ενεργή δεύτερη κυστεΐνη του καταλυτικού κέντρου που δύναται να λειτουργεί ως περιοχή πρόσδεσης των υποστρωμάτων. Με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση των υδρόφοβων αμινοξέων που απαρτίζουν την συγκεκριμένη περιοχή παρατηρήσαμε ότι αλλάζοντας σε μεγάλο βαθμό την υδροφοβικότητα της περιοχής (τουλάχιστον 6 μεταλλαγμένα κατάλοιπα) καταργούμε την ομοιοπολική πρόσδεση των υποστρωμάτων στην Mia40. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για τρεις κατηγορίες υποστρωμάτων, CX3C, CX9C και CX2C, και έτσι καταλήξαμε σε

ένα γενικότερο τρόπο δράσης της Mia40 που επιβεβαιώνεται από *in vitro* πειράματα και συνάδουν με την πληροφορία που αντλούμε από την δομή της οξειδάσης.

Σε ένα δεύτερο στάδιο μελέτης της αλληλεπίδρασης της Mia40 με το υπόστρωμα εξετάσαμε το πως εμπλέκεται η κάθε κυστεΐνη του υποστρώματος στην αναγνώριση και πρόσδεση στην Mia40. Χρησιμοποιήσαμε ως μοντέλο υπόστρωμα την πρωτεΐνη Tim10 και πραγματοποιήσαμε μεταλλαξιγένεση των κυστεϊνών σε σερίνες. Αρχικά αναπτύξαμε μια πειραματική τεχνική για την παρακολούθηση σχηματισμού διαμοριακών δισουλφιδικών ενδιάμεσων του νέο-εισερχόμενου υποστρώματος με την ενδογενή Mia40 *in organello*. Παρατηρήσαμε ότι η πρώτη κυστεΐνη του υποστρώματος είναι υπεύθυνη για την ακινητοποίηση στην Mia40 και επιπλέον ότι η απομάκρυνση του υποστρώματος στην πλήρως οξειδωμένη κατάσταση εξαρτάται από την δημιουργία της εξωτερικής δισουλφιδικής γέφυρας. Παράλληλα ελέγξαμε με αντίστοιχες μεταλλαγές αν η ύπαρξη της πρώτης κυστεΐνης είναι προϋπόθεση για την πρόσδεση στην Mia40 και σε ομόλογες πρωτεΐνες της οικογένειας Tim. Πράγματι επιβεβαιώσαμε ότι στην οικογένεια των μικρών Tim η πρώτη αμινοτελική κυστεΐνη είναι απαραίτητη για την ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου με την Mia40.

Αναρωτηθήκαμε αν είναι γενικότερη η απαίτηση της πρώτης αμινοτελικής κυστεΐνης σε όλα τα υποστρώματα της Mia40 ή αν είναι ένα φαινόμενο που απαντάται μόνο σε υποστρώματα με το χαρακτηριστικό CX3C μοτίβο. Προκειμένου να ελέγξουμε και αυτό το ενδεχόμενο δημιουργήσαμε σημειακές μεταλλαγές στις κυστεΐνες του CX9C υποστρώματος Cox17. Παρατηρήσαμε ότι σε αυτή την περίπτωση το υπόστρωμα προσδέεται στην Mia40 μέσω της εσωτερικής κυστεΐνης 3 και όχι της πρώτης αμινοτελικής κυστεΐνης. Εντοπίσαμε δηλαδή μια σημαντική διαφορά στον τρόπο αναγνώρισης του υποστρώματος παρόλο που η δράση της Mia40 μέσω του



καταλυτικού κέντρου δεν επηρεάζεται από την φύση του υποστρώματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν πρώτον στο ότι δεν χρειάζεται ισομερίωση των υποστρωμάτων που υπόκεινται στο μονοπάτι οξειδωσης της Mia40 μιας και η πρόσδεση και τελική οξειδωση πραγματοποιείται βαθμιαία με την εμπλοκή συγκεκριμένων κυστεϊνών και δεύτερον στο ότι ειδική και επακριβής δράση της Mia40 μέσω συγκεκριμένης κυστεϊνης του υποστρώματος επιβάλλεται από κάποιο άγνωστο μέχρι τώρα στοιχείο στην πεπτιδική αλληλουχία του υποστρώματος.

Τέλος αναρωτηθήκαμε ποια είναι αυτά τα χαρακτηριστικά που επιχρίζουν συγκεκριμένο κατάλοιπο κυστεϊνης σε διαφορετικά υποστρώματα για την πρόσδεση στην Mia40. Δημιουργήσαμε Tim10 εκδόσεις με αμινοτελικές ή καρβοξυτελικές ελλείψεις και παρατηρήσαμε με *in organello* και *in vitro* πειράματα ότι τα αμινοξέα 32-40 αμέσως πριν την κυστεϊνη πρόσδεσης είναι απαραίτητα για την στόχευση και πρόσδεση στην Mia40. Ονομάσαμε την εννιαπεπτιδική αλληλουχία σινιάλο στόχευσης ITS και με αντίστοιχα πειράματα επιβεβαιώσαμε ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία είναι απαραίτητη για την αναγνώριση της πρώτης αμινοτελικής κυστεϊνης από την Mia40 και απαντάται στην οικογένεια των μικρών Tim υποστρωμάτων. Παράλληλα με σημειακές μεταλλαγές προσδιορίσαμε τα αμινοξέα που είναι κρίσιμα για την αναγνώριση του υποστρώματος από την Mia40 και εντοπίσαμε ένα αρωματικό κατάλοιπο στην θέση -7 και δύο υδρόφοβα στις θέσεις -4 και -3 σε σχέση με την κυστεϊνη πρόσδεσης.

Παρατηρήσαμε με υπολογιστικές μεθόδους ότι το σινιάλο ITS βρίσκεται σε δομή αμφι-παθητικής α-έλικας και με μια υδρόφοβη πλευρά και μια φορτισμένη. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα κρίσιμα αμινοξέα βρίσκονται στην ίδια πλευρά της α-έλικας με την κυστεϊνη πρόσδεσης. Μέσω υπολογιστικής

προσομοίωσης της αλληλεπίδρασης με το πρόγραμμα HADDOCK βρέθηκε ότι η αλληλουχία ITS ταιριάζει στην υδρόφοβη κοιλότητα της Mia40 και ότι τα αμινοξέα στις θέσεις -7 και -4 αλληλεπιδρούν με τα υδρόφοβα αμινοξέα της Mia40 με τέτοιο τρόπο ώστε να τοποθετείται ιδανικά η ενεργή κυστεΐνη της Mia40 στην κυστεΐνη πρόσδεσης του υποστρώματος. Παράλληλα εντοπίσαμε ότι η αλληλουχία στόχευσης ITS υφίσταται και στο υπόστρωμα Cox17 αμέσως μετά την κυστεΐνη πρόσδεσης γεγονός που εξηγεί ότι η κυστεΐνη πρόσδεσης σε κάθε υπόστρωμα καθορίζεται από την περιοχή στην οποία βρίσκεται η αλληλουχία στόχευσης.

Τέλος προσδιόρισαμε την συγγένεια των δύο πρωτεϊνών και ταυτοποιήσαμε την φύση της μη-ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης. Συνολικά από αυτή την μελέτη προκύπτει ότι στα υποστρώματα του μονοπατιού της Mia40 υπάρχει σινιάλο στόχευσης για τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και επιπλέον ότι αυτό το σινιάλο καθορίζει και οριοθετεί την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος στην Mia40 με τέτοιο τρόπο ώστε να τοποθετηθεί σε γειτνίαση η ενεργή κυστεΐνη της Mia40 σε γειτνίαση με την κυστεΐνη πρόσδεσης του υποστρώματος. Προτείνουμε ότι η υδρόφοβη αλληλεπίδραση της Mia40 με τα υποστρώματα της πραγματοποιείται σε στάδιο που προηγείται του σχηματισμού του διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού. Η αναγνώριση του σινιάλου στόχευσης ITS στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων δυνητικά θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην στόχευση μη-μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ή τεχνητών υποστρωμάτων για την καταπολέμηση δυσλειτουργιών που σχετίζονται με το μιτοχόνδριο.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης στοιχειοθετούν ένα σημαντικό πλαίσιο για την κατανόηση των βασικών αρχών του πρόσφατα αναγνωρισμένου οξειδωτικού μηχανισμού στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο αρκετά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα

και είναι σημαντικό να διερευνηθούν σε επόμενες μελέτες. Συγκεκριμένα ενδιαφέρον αποτελεί ο μηχανισμός απελευθέρωσης του υποστρώματος Tim από την Mia40 και ο τρόπος συγκρότησης του TIM10 συμπλόκου. Πρόσφατα στοιχεία (Sideris et al, unpublished data) υποδεικνύουν ότι η Ern1 εμπλέκεται με κάποιον τρόπο σε αυτόν τον μηχανισμό. Συγκεκριμένα σε μια πρόσφατη μελέτη η Ern1 εντοπίστηκε σε σύμπλοκο 400 kDa με την Mia40 και το υπόστρωμα (Stojanovski et al., 2008a). Πράγματι δεν είναι ακόμα γνωστό το πώς καταλύεται ο δεύτερος δισουλφιδικός δεσμός στο υπόστρωμα οπότε η συσχέτιση της Ern1 με αυτή την διαδικασία δεν μπορεί να αποκλεισθεί. Ένα πιθανό ενδεχόμενο είναι η Ern1 να βρίσκεται σε δυναμικό σύμπλοκο με την Mia40 που στρατολογείται παρουσία υποστρώματος και δρα στην ανακύκλωση της οξειδωτικής μορφής της Mia40 αλλά ταυτόχρονα και στην κατάλυση του δεύτερου δισουλφιδικού δεσμού στο υπόστρωμα. Σε αυτή την περίπτωση θα φανταζόταν κανείς ότι με χρήση σημειακών μεταλλαγών στις εσωτερικές κυστεΐνες του υποστρώματος θα ήταν δυνατόν να παγιδευτεί μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ της Ern1 και του υποστρώματος. Ωστόσο σε *in vitro* πειράματα ανασύστασης της αλληλεπίδρασης δεν έχουμε καταφέρει να παρατηρήσουμε διαμοριακό δεσμό μεταξύ των δύο. Ενδέχεται να απαιτείται η πρόσδεση με την Mia40 πρώτα πριν μπορέσει να αλληλεπιδράσει με την Ern1. Όμως ούτε σε μιτοχόνδρια έχουμε καταφέρει να παγιδεύσουμε ένα τριπλό διαμοριακό ομοιοπολικό σύμπλοκο μεταξύ της Mia40-υποστρώματος και Ern1. Αντίθετα όλες οι πειραματικές ενδείξεις συνηγορούν στο ότι η Mia40 είναι αρκετή για να οξειδώσει πλήρως το υπόστρωμα σε μοριακή στοιχειομετρία 1:1 παρουσία οξυγόνου (Banci et al., 2009a) και ότι ο ρόλος της Ern1 έγκειται στην ανακύκλωση της Mia40.

Από την άλλη έχουμε παρατηρήσει ότι απουσία Ern1 δεν μπορεί να συγκροτηθεί το TIM10 σύμπλοκο με νέο-εισερχόμενο Tim10 υπόστρωμα στα μιτοχόνδρια ενώ

αντιστρέφεται το φαινόμενο αυτό αν στα ίδια μιτοχόνδρια εισάγουμε πρώτα καθαρισμένη Ern1. Αυτό υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο της Ern1 ως παράγοντας συγκρότησης του συμπλόκου, αποτέλεσμα που έχει παρατηρηθεί και από το δικό μας εργαστήριο και από ανεξάρτητες πειραματικές μελέτες (Allen et al., 2005; Muller et al., 2008; Rissler et al., 2005; Stojanovski et al., 2008a). Σε συμφωνία με αυτό το αποτέλεσμα είναι προκαταρκτικά πειράματα όπου με εγγενή ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης έχουμε παρατηρήσει ότι μπορούμε να ‘κυνηγήσουμε’ το TIM10 σύμπλοκο παρουσία εξωγενούς Ern1 και μάλιστα πριν την συγκρότηση του TIM10 συμπλόκου προηγείται ο σχηματισμός ενός ενδιάμεσου συμπλόκου στα 400 kDa (Sideris et al, unpublished data). Τέλος πρόσφατα έχουμε παρατηρήσει ότι σε υπόστρωμα Tim10 που έχει μεταλλαγμένα τέσσερα φορτισμένα κατάλοιπα στην θηλιά ανάμεσα στις δύο α-έλικες που είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με την Tim9 υπομονάδα και κατά επέκταση στον σχηματισμό του συμπλόκου TIM10, τα στάδια ωρίμανσης του μεταλλαγμένου υποστρώματος ανακόπτονται σε ένα σύμπλοκο 400 kDa. Το ενδιαφέρον με αυτό το υπόστρωμα είναι ότι ο σχηματισμός του 400 kDa συμπλόκου πραγματοποιείται μετά την αλληλεπίδραση με την Mia40 και επιπλέον ότι σε αυτό το σύμπλοκο εντοπίζεται η Ern1. Από τα ως τώρα πρωταρχικά αποτελέσματα προκύπτει ότι για την ωρίμανση και συγκρότηση του συμπλόκου TIM10 στον διαμεμβρανικό χώρο είναι απαραίτητη η τέταρτη κυστεΐνη του υποστρώματος, η έταιρη υπομονάδα Tim9 και η Ern1. Μπορούμε να φανταστούμε να σχηματίζεται ‘on demand’ ένα δυναμικό σύμπλοκο στο οποίο συγκροτείται το TIM10 σύμπλοκο και ανακυκλώνεται η οξειδωτική κατάσταση της Mia40. Μελλοντικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το μετάλλαγμα του Tim10 για παγίδευση του 400 kDa συμπλόκου και να διερευνηθεί με

περιορισμένη θρυψινόλυση και φασματομετρία μάζας ποιες άλλες πρωτεΐνες εντοπίζονται σε αυτό το σύμπλοκο.

Άλλα ερωτήματα που παραμένουν ανεξερεύνητα σχετίζονται με τον ρόλο της Ern1 και τον ακριβή τρόπο δράσης της στην Mia40, αν δηλαδή το μοντέλο δράσης της Ern2 με το κινητό ζεύγος κυστεϊνών (shuttle) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο και από εκεί στο οξυγόνο μέσω του FAD είναι γενικότερος τρόπος δράσης των πρωτεϊνών της οικογένειας Ern/ALR. Από πρόσφατη μελέτη της μακριάς ισομορφής της ALR που εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και περιέχει τις κινητές κυστεΐνες φαίνεται πως αυτές είναι απαραίτητες για την οξειδωση της Mia40. Αντίθετα η κοντή ισομορφή της ALR που εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα και δεν περιέχει τις παλίνδρομες κυστεΐνες δεν μπορεί να οξειδώσει την Mia40 (Daithankar et al., 2009). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν σε ανάλογο μοντέλο δράσης με αυτόν της Ern2. Επιπλέον ενδιαφέρον είναι ότι μέχρι τώρα έχει βρεθεί μόνο ένα υπόστρωμα για την Ern1. Επομένως θα μπορούσε κανείς να προσδιορίσει και άλλα υποστρώματα της πρωτεΐνης που πιθανόν να εμπλέκονται σε λειτουργίες όπως η ζωτικής σημασίας ωρίμανση των συμπλόκων σιδήρου-θείου (Lill and Muhlenhoff, 2008). Επιπρόσθετα ενδιαφέρον θα είναι να μελετηθεί η πιθανή εμπλοκή της Ern1 μέσω της κυτοχρωμικής οξειδάσης και της θειορεδοξίνης σε ένα γενικότερο μηχανισμό διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μεταξύ διαμεμβρανικού χώρου και μήτρας στο μιτοχόνδριο.

Τέλος ενδιαφέρουσα θα είναι η διερεύνηση της ύπαρξης αντίστοιχου σινιάλου επαγωγής πρωτεόλυσης με αυτό του ενδοπλασματικού δικτύου ERAD σε κατάσταση οξειδωτικού στρες και ο ρόλος του μονοπατιού της Mia40 σε αυτό. Προς υποστήριξη αυτής της θεωρίας στο ενδοπλασματικό δίκτυο έχει βρεθεί μια ομόλογη πρωτεΐνη της

PDI, η ERdj5, που λειτουργεί ως αναγωγάση υποστρωμάτων με λανθασμένες δισουλφιδικές συνδέσεις. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι η ERdj5 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του μονοπατιού αποικοδόμησης του ενδοπλασματικού δικτύου (ERAD) όπως είναι οι πρωτεΐνες EDEM και BiP οπότε δύναται μέσω της αναγωγικής της δράσης να βοηθάει στην ξεδίπλωση υποστρωμάτων και στην αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ushioda et al., 2008). Φαίνεται λοιπόν πως οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι ERAD δρουν συνεργατικά με την αναγωγάση ERdj5 προς αποφυγή συσσώρευσης κακώς-οξειδωμένων πρωτεϊνών σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες. Στο μιτοχόνδριο και ειδικά στον διαμεμβρανικό χώρο δεν έχει διερευνηθεί ακόμα η πιθανή ύπαρξη ενός αντίστοιχου μονοπατιού MAD (mitochondrial associated degradation) αν και τελευταία γίνεται προσπάθεια κατανόησης του φαινομένου διατήρησης πρωτεϊνικής ομοιόστασης (proteostasis) στο μιτοχόνδριο. Μια σημαντική πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η λειτουργία της πρωτεάσης ClpP στην μήτρα του μιτοχονδρίου προκαλεί μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα DVE-1 στον πυρήνα και επαγωγή της ubl-5 που εμπλέκεται στην ουβικιτινίωση πρωτεϊνών και της σαπερόνης Hsp60 (Haynes et al., 2007)(Haynes et al 2007 DevCell). Επιπλέον στον διαμεμβρανικό χώρο πρόσφατα βρέθηκε η πρωτεάση Omi της οποίας η δράση επάγεται σε συνθήκες κατάργησης του πρωτεασώματος αλλά ο πιθανός ρόλος της στο μιτοχονδριακό UPR (unfolded protein response) είναι άγνωστος (Broadley and Hartl, 2008; Radke et al., 2008).

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο έχει δειχθεί ότι η Ero1 επηρεάζεται από τα επίπεδα γλουταθιόνης και έχει προταθεί ότι η οξειδωτική κατάσταση των ρυθμιστικών κυστεϊνών στην Ero1 ελέγχουν μέσω της γλουταθιόνης την οξειδωτική κατάσταση της PDI και ως εκ τούτου την δράση της. Δύναται δηλαδή να επάγεται η δράση της PDI ως ισομεράση σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες όπου κρίνεται αναγκαίος ο

ανασχηματισμός των τυχαίων, κακώς-οξειδωμένων υποστρωμάτων κρατώντας τις ρυθμιστικές κυστεΐνες της Ero1 οξειδωμένες (Sevier et al., 2007). Στο μιτοχόνδριο μέσω των πορινών μπορεί η γλουταθιόνη να μετατοπίζεται ελεύθερα στον διαμεμβρανικό χώρο και να επηρεάζει με αυτό τον τρόπο την οξειδωτική κατάσταση της Mia40 ή της Ern1 και κατ'επέκταση την οξειδοαναγωγική τους δράση. Δεδομένου ότι στον διαμεμβρανικό χώρο εντοπίζονται σημαντικές πρωτεΐνες όπως η Pink1 που εμπλέκεται στην ασθένεια Πάρκινσον, είναι σημαντική η διατήρηση οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στον διαμεμβρανικό χώρο (McBride et al., 2006; Silvestri et al., 2005). Τέλος έχει προταθεί η εμπλοκή του μονοπατιού της Mia40 στην απόπτωση μέσω της πρωτεΐνης που ελέγχει την διάρκεια ζωής p66<sup>Shc</sup>. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει βρεθεί ότι σε συνθήκες οξειδωτικού στρες μετατοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων όπου σχηματίζει δύο δισουλφιδικούς δεσμούς απαραίτητους για την ενεργοποίηση της και την επαγωγή αποπτωτικού σιγνάλου (Gertz et al., 2008). Η περαιτέρω μελέτη του μονοπατιού της Mia40 καθώς επίσης και η εξακρίβωση του μηχανισμού διατήρησης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας θα αποτελέσουν σημαντικά βήματα στην κατανόηση ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών όπως της απόπτωσης και της γήρανσης.

## Βιβλιογραφία

- Abajian, C. and Rosenzweig, A.C. (2006) Crystal structure of yeast Sco1. *J Biol Inorg Chem*, **11**, 459-466.
- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-560.
- Abkevich, V.I. and Shakhnovich, E.I. (2000) What can disulfide bonds tell us about protein energetics, function and folding: simulations and bioinformatics analysis. *J Mol Biol*, **300**, 975-985.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J*, **18**, 313-319.
- Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D.P., Lisowsky, T. and Tokatlidis, K. (2005) Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol*, **353**, 937-944.
- Allen, S., Lu, H., Thornton, D. and Tokatlidis, K. (2003) Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem*, **278**, 38505-38513.
- Anfinsen, C.B. and Haber, E. (1961) Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem*, **236**, 1361-1363.
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. and White, F.H., Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **47**, 1309-1314.
- Appenzeller-Herzog, C., Riemer, J., Christensen, B., Sorensen, E.S. and Ellgaard, L. (2008) A novel disulphide switch mechanism in Ero1alpha balances ER oxidation in human cells. *Embo J*, **27**, 2977-2987.
- Arnesano, F., Balatri, E., Banci, L., Bertini, I. and Winge, D.R. (2005) Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure*, **13**, 713-722.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Huffman, D.L. and O'Halloran, T.V. (2001) Solution structure of the Cu(I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry*, **40**, 1528-1539.
- Arolas, J.L., Aviles, F.X., Chang, J.Y. and Ventura, S. (2006) Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. *Trends Biochem Sci*, **31**, 292-301.
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D.P., Gassner, C. and Bardwell, J.C. (1999) Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*, **98**, 217-227.
- Bader, M., Muse, W., Zander, T. and Bardwell, J. (1998) Reconstitution of a protein disulfide catalytic system. *J Biol Chem*, **273**, 10302-10307.



Bader, M.W., Hiniker, A., Regeimbal, J., Goldstone, D., Haebel, P.W., Riemer, J., Metcalf, P. and Bardwell, J.C. (2001) Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *Embo J*, **20**, 1555-1562.

Baker, K.M., Chakravarthi, S., Langton, K.P., Sheppard, A.M., Lu, H. and Bulleid, N.J. (2008) Low reduction potential of Ero1alpha regulatory disulphides ensures tight control of substrate oxidation. *Embo J*, **27**, 2988-2997.

Baker, M.J., Webb, C.T., Stroud, D.A., Palmer, C.S., Frazier, A.E., Guiard, B., Chacinska, A., Gulbis, J.M. and Ryan, M.T. (2009) Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell*, **20**, 769-779.

Balatri, E., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F. and Ciofi-Baffoni, S. (2003) Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein Involved in cytochrome c oxidase assembly. *Structure*, **11**, 1431-1443.

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Ciofi-Baffoni, S., Gonnelli, L. and Mangani, S. (2004) Solution structure of Cox11, a novel type of beta-immunoglobulin-like fold involved in CuB site formation of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*, **279**, 34833-34839.

Banci, L., Bertini, I., Cefaro, C., Ciofi-Baffoni, S., Gallo, A., Martinelli, M., Sideris, D.P., Katrakili, N. and Tokatlidis, K. (2009a) MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 198-206.

Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Hadjiloi, T., Martinelli, M. and Palumaa, P. (2008a) Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 6803-6808.

Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Janicka, A., Martinelli, M., Kozlowski, H. and Palumaa, P. (2008b) A structural-dynamical characterization of human Cox17. *J Biol Chem*, **283**, 7912-7920.

Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Katsari, E., Katsaros, N., Kubicek, K. and Mangani, S. (2005) A copper(I) protein possibly involved in the assembly of CuA center of bacterial cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3994-3999.

Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S. and Tokatlidis, K. (2009b) The coiled coil-helix-coiled coil-helix proteins may be redox proteins. *FEBS Lett*, **583**, 1699-1702.

Bardwell, J.C., Lee, J.O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. and Beckwith, J. (1993) A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1038-1042.

Bardwell, J.C., McGovern, K. and Beckwith, J. (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell*, **67**, 581-589.

Baud, C., de Marcos-Lousa, C. and Tokatlidis, K. (2007) Molecular interactions of the mitochondrial Tim12 translocase subunit. *Protein Pept Lett*, **14**, 597-600.

Bauer, M.F., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Smith, R.J., Gerbitz, K., Neupert, W., Brunner, M. and Hofmann, S. (1999) The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett*, **464**, 41-47.

Becher, D., Kricke, J., Stein, G. and Lisowsky, T. (1999) A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast*, **15**, 1171-1181.

- Becker, T., Vogtle, F.N., Stojanovski, D. and Meisinger, C. (2008) Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1777**, 557-563.
- Bessette, P.H., Cotto, J.J., Gilbert, H.F. and Georgiou, G. (1999) In vivo and in vitro function of the Escherichia coli periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem*, **274**, 7784-7792.
- Bihlmaier, K., Mesecke, N., Kloeppe, C. and Herrmann, J.M. (2008) The disulfide relay of the intermembrane space of mitochondria: an oxygen-sensing system? *Ann N Y Acad Sci*, **1147**, 293-302.
- Bihlmaier, K., Mesecke, N., Terziyska, N., Bien, M., Hell, K. and Herrmann, J.M. (2007) The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol*, **179**, 389-395.
- Bohnert, M., Pfanner, N. and van der Laan, M. (2007) A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Lett*, **581**, 2802-2810.
- Broadley, S.A. and Hartl, F.U. (2008) Mitochondrial stress signaling: a pathway unfolds. *Trends Cell Biol*, **18**, 1-4.
- Brockhaus, M., Ganz, P., Huber, W., Bohrmann, B., Loetscher, H.R. and Seelig, J. (2007) Thermodynamic studies on the interaction of antibodies with beta-amyloid peptide. *J Phys Chem B*, **111**, 1238-1243.
- Carr, H.S. and Winge, D.R. (2003) Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res*, **36**, 309-316.
- Chacinska, A., Guiard, B., Muller, J.M., Schulze-Specking, A., Gabriel, K., Kutik, S. and Pfanner, N. (2008) Mitochondrial biogenesis, switching the sorting pathway of the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem*, **283**, 29723-29729.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuan Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J*, **23**, 3735-3746.
- Chen, Y., Zhang, Y., Yin, Y., Gao, G., Li, S., Jiang, Y., Gu, X. and Luo, J. (2005) SPD--a web-based secreted protein database. *Nucleic Acids Res*, **33**, D169-173.
- Cho, S.H., Porat, A., Ye, J. and Beckwith, J. (2007) Redox-active cysteines of a membrane electron transporter DsbD show dual compartment accessibility. *Embo J*, **26**, 3509-3520.
- Chung, J., Chen, T. and Missiakas, D. (2000) Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulphide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. *Mol Microbiol*, **35**, 1099-1109.
- Collet, J.F. and Bardwell, J.C. (2002) Disulfides out of thin air. *Nat Struct Biol*, **9**, 2-3.
- Collet, J.F., Riemer, J., Bader, M.W. and Bardwell, J.C. (2002) Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J Biol Chem*, **277**, 26886-26892.
- Coppock, D.L. and Thorpe, C. (2006) Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 300-311.

Creighton, T.E. (1988) On the relevance of non-random polypeptide conformations for protein folding. *Biophys Chem*, **31**, 155-162.

Creighton, T.E., Bagley, C.J., Cooper, L., Darby, N.J., Freedman, R.B., Kemmink, J. and Sheikh, A. (1993) On the biosynthesis of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). Structure, processing, folding and disulphide bond formation of the precursor in vitro and in microsomes. *J Mol Biol*, **232**, 1176-1196.

D'Silva, P.D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A. and Craig, E.A. (2003) J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13839-13844.

Dabir, D.V., Leverich, E.P., Kim, S.K., Tsai, F.D., Hirasawa, M., Knaff, D.B. and Koehler, C.M. (2007) A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *Embo J*, **26**, 4801-4811.

Dailey, F.E. and Berg, H.C. (1993) Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1043-1047.

Daithankar, V.N., Farrell, S.R. and Thorpe, C. (2009) Augmenter of liver regeneration: substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space. *Biochemistry*, **48**, 4828-4837.

Darby, N.J. and Creighton, T.E. (1995a) Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, **34**, 16770-16780.

Darby, N.J. and Creighton, T.E. (1995b) Functional properties of the individual thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, **34**, 11725-11735.

Dartigalongue, C., Nikaido, H. and Raina, S. (2000) Protein folding in the periplasm in the absence of primary oxidant DsbA: modulation of redox potential in periplasmic space via OmpL porin. *Embo J*, **19**, 5980-5988.

Daum, G., Bohni, P.C. and 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.

Farrell, S.R. and Thorpe, C. (2005) Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry*, **44**, 1532-1541.

Fass, D. (2008) The Erv family of sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 557-566.

Frand, A.R. and Kaiser, C.A. (1999) Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, **4**, 469-477.

Frazier, A.E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Bilanchone, V., Cumsy, M.G., Truscott, K.N., Pfanner, N. and Rehling, P. (2004) Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 226-233.

Freedman, R.B., Gane, P.J., Hawkins, H.C., Hlodan, R., McLaughlin, S.H. and Parry, J.W. (1998) Experimental and theoretical analyses of the domain architecture of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biol Chem*, **379**, 321-328.

- Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, **64**, 97-112.
- Gabriel, K., Milenkovic, D., Chacinska, A., Muller, J., Guiard, B., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2007) Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol*, **365**, 612-620.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N. and Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111**, 507-518.
- Gelis, I., Bonvin, A.M., Keramisanou, D., Koukaki, M., Gouridis, G., Karamanou, S., Economou, A. and Kalodimos, C.G. (2007) Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell*, **131**, 756-769.
- Gerber, J., Muhlenhoff, U., Hofhaus, G., Lill, R. and Lisowsky, T. (2001) Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem*, **276**, 23486-23491.
- Gertz, M., Fischer, F., Wolters, D. and Steegborn, C. (2008) Activation of the lifespan regulator p66Shc through reversible disulfide bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5705-5709.
- Giorda, R., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sakai, H., Michaelson, J., Francavilla, A., Starzl, T.E. and Trucco, M. (1996) Analysis of the structure and expression of the augments of liver regeneration (ALR) gene. *Mol Med*, **2**, 97-108.
- Gleiter, S. and Bardwell, J.C. (2008) Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 530-534.
- Glick, B.S. (1991) Protein import into isolated yeast mitochondria. *Methods Cell Biol*, **34**, 389-399.
- Glick, B.S. and Pon, L.A. (1995) Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, **260**, 213-223.
- Goldberger, R.F., Epstein, C.J. and Anfinsen, C.B. (1963) Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem*, **238**, 628-635.
- Grauschopf, U., Winther, J.R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. and Bardwell, J.C. (1995) Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell*, **83**, 947-955.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Gross, E., Kastner, D.B., Kaiser, C.A. and Fass, D. (2004) Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell. *Cell*, **117**, 601-610.
- Gross, E., Sevier, C.S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C.A., Thorpe, C. and Fass, D. (2006) Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 299-304.

- Gross, E., Sevier, C.S., Vala, A., Kaiser, C.A. and Fass, D. (2002) A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat Struct Biol*, **9**, 61-67.
- Gruber, C.W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J.L. and Craik, D.J. (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci*, **31**, 455-464.
- Grumbt, B., Stroobant, V., Terziyska, N., Israel, L. and Hell, K. (2007) Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, **282**, 37461-37470.
- Guddat, L.W., Bardwell, J.C., Glockshuber, R., Huber-Wunderlich, M., Zander, T. and Martin, J.L. (1997a) Structural analysis of three His32 mutants of DsbA: support for an electrostatic role of His32 in DsbA stability. *Protein Sci*, **6**, 1893-1900.
- Guddat, L.W., Bardwell, J.C. and Martin, J.L. (1998) Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure*, **6**, 757-767.
- Guddat, L.W., Bardwell, J.C., Zander, T. and Martin, J.L. (1997b) The uncharged surface features surrounding the active site of Escherichia coli DsbA are conserved and are implicated in peptide binding. *Protein Sci*, **6**, 1148-1156.
- Guigueno, A., Belin, P. and Boquet, P.L. (1997) Defective export in Escherichia coli caused by DsbA'-PhoA hybrid proteins whose DsbA' domain cannot fold into a conformation resistant to periplasmic proteases. *J Bacteriol*, **179**, 3260-3269.
- Guilhot, C., Jander, G., Martin, N.L. and Beckwith, J. (1995) Evidence that the pathway of disulfide bond formation in Escherichia coli involves interactions between the cysteines of DsbB and DsbA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9895-9899.
- Gunter, T.E. and Pfeiffer, D.R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, **258**, C755-786.
- Gunther, R., Srinivasan, M., Haugejorden, S., Green, M., Ehbrecht, I.M. and Kuntzel, H. (1993) Functional replacement of the Saccharomyces cerevisiae Trg1/Pdi1 protein by members of the mammalian protein disulfide isomerase family. *J Biol Chem*, **268**, 7728-7732.
- Hatahet, F. and Ruddock, L.W. (2007) Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *Febs J*, **274**, 5223-5234.
- Hawkins, H.C., de Nardi, M. and Freedman, R.B. (1991) Redox properties and cross-linking of the dithiol/disulphide active sites of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biochem J*, **275** ( Pt 2), 341-348.
- Haynes, C.M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y. and Ron, D. (2007) ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in C. elegans. *Dev Cell*, **13**, 467-480.
- Heaton, D., Nittis, T., Srinivasan, C. and Winge, D.R. (2000) Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J Biol Chem*, **275**, 37582-37587.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, **73**, 1019-1049.
- Hell, K. (2008) The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 601-609.

- Heras, B., Edeling, M.A., Schirra, H.J., Raina, S. and Martin, J.L. (2004) Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8876-8881.
- Herrmann, J.M. and Hell, K. (2005) Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, **30**, 205-211.
- Herrmann, J.M. and Kohl, R. (2007) Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria. *J Cell Biol*, **176**, 559-563.
- Hofhaus, G., Lee, J.E., Tews, I., Rosenberg, B. and Lisowsky, T. (2003) The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre. *Eur J Biochem*, **270**, 1528-1535.
- Hofmann, S., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Baiker, K., Hell, K. and Bauer, M.F. (2005) Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *J Mol Biol*, **353**, 517-528.
- Hofmann, S., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Neupert, W., Gerbitz, K.D., Brunner, M. and Bauer, M.F. (2002) The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1.TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, **277**, 23287-23293.
- Hogg, P.J. (2003) Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci*, **28**, 210-214.
- Holst, B., Tachibana, C. and Winther, J.R. (1997) Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **138**, 1229-1238.
- Hooper, K.L., Glynn, N.M., Burnside, J., Coppock, D.L. and Thorpe, C. (1999) Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. *J Biol Chem*, **274**, 31759-31762.
- Hooper, K.L., Joneja, B., White, H.B., 3rd and Thorpe, C. (1996) A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem*, **271**, 30510-30516.
- Horibe, T., Gomi, M., Iguchi, D., Ito, H., Kitamura, Y., Masuoka, T., Tsujimoto, I., Kimura, T. and Kikuchi, M. (2004) Different contributions of the three CXXC motifs of human protein-disulfide isomerase-related protein to isomerase activity and oxidative refolding. *J Biol Chem*, **279**, 4604-4611.
- Hornig, Y.C., Cobine, P.A., Maxfield, A.B., Carr, H.S. and Winge, D.R. (2004) Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem*, **279**, 35334-35340.
- Hu, J., Dong, L. and Outten, C.E. (2008) The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem*, **283**, 29126-29134.
- Inaba, K. and Ito, K. (2002) Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. *Embo J*, **21**, 2646-2654.
- Inaba, K. and Ito, K. (2008) Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 520-529.

- Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K. and Ito, K. (2006a) Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, **127**, 789-801.
- Inaba, K., Takahashi, Y.H., Fujieda, N., Kano, K., Miyoshi, H. and Ito, K. (2004) DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation. *J Biol Chem*, **279**, 6761-6768.
- Inaba, K., Takahashi, Y.H., Ito, K. and Hayashi, S. (2006b) Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in de novo disulfide bond generation by DsbB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 287-292.
- Ito, K. and Inaba, K. (2008) The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 450-458.
- Jander, G., Martin, N.L. and Beckwith, J. (1994) Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *Embo J*, **13**, 5121-5127.
- Jiang, X. and Wang, X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **73**, 87-106.
- Joly, J.C. and Swartz, J.R. (1997) In vitro and in vivo redox states of the Escherichia coli periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry*, **36**, 10067-10072.
- Kadokura, H., Bader, M., Tian, H., Bardwell, J.C. and Beckwith, J. (2000) Roles of a conserved arginine residue of DsbB in linking protein disulfide-bond-formation pathway to the respiratory chain of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10884-10889.
- Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J.C. and Beckwith, J. (2004) Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science*, **303**, 534-537.
- Kamitani, S., Akiyama, Y. and Ito, K. (1992) Identification and characterization of an Escherichia coli gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *Embo J*, **11**, 57-62.
- Kimball, R.A., Martin, L. and Saier, M.H., Jr. (2003) Reversing transmembrane electron flow: the DsbD and DsbB protein families. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **5**, 133-149.
- Kishigami, S., Akiyama, Y. and Ito, K. (1995a) Redox states of DsbA in the periplasm of Escherichia coli. *FEBS Lett*, **364**, 55-58.
- Kishigami, S., Kanaya, E., Kikuchi, M. and Ito, K. (1995b) DsbA-DsbB interaction through their active site cysteines. Evidence from an odd cysteine mutant of DsbA. *J Biol Chem*, **270**, 17072-17074.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J*, **18**, 3981-3989.
- Kobayashi, T., Kishigami, S., Sone, M., Inokuchi, H., Mogi, T. and Ito, K. (1997) Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing Escherichia coli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11857-11862.

- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. and Schatz, G. (1998a) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, **279**, 369-373.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Tokatlidis, K. (1998b) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo J*, **17**, 6477-6486.
- Kutik, S., Guiard, B., Meyer, H.E., Wiedemann, N. and Pfanner, N. (2007) Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import. *J Cell Biol*, **179**, 585-591.
- Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Kruger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N. and Wiedemann, N. (2008) Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell*, **132**, 1011-1024.
- Laboissiere, M.C., Sturley, S.L. and Raines, R.T. (1995) The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *J Biol Chem*, **270**, 28006-28009.
- Lamb, A.L., Torres, A.S., O'Halloran, T.V. and Rosenzweig, A.C. (2000) Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry*, **39**, 14720-14727.
- Lamb, A.L., Wernimont, A.K., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V. and Rosenzweig, A.C. (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol*, **6**, 724-729.
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G. and Lill, R. (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep*, **2**, 715-720.
- Lee, J., Hofhaus, G. and Lisowsky, T. (2000) Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett*, **477**, 62-66.
- Leggate, E.J. and Hirst, J. (2005) Roles of the disulfide bond and adjacent residues in determining the reduction potentials and stabilities of respiratory-type Rieske clusters. *Biochemistry*, **44**, 7048-7058.
- Lesnefsky, E.J., Gudz, T.I., Moghaddas, S., Migita, C.T., Ikeda-Saito, M., Turkaly, P.J. and Hoppel, C.L. (2001) Aging decreases electron transport complex III activity in heart interfibrillar mitochondria by alteration of the cytochrome c binding site. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 37-47.
- Leuenberger, D., Curran, S.P., Wong, D. and Koehler, C.M. (2003) The role of Tim9p in the assembly of the TIM22 import complexes. *Traffic*, **4**, 144-152.
- Levitan, A., Danon, A. and Lisowsky, T. (2004) Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *J Biol Chem*, **279**, 20002-20008.
- Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem*, **77**, 669-700.
- Lionaki, E., de Marcos Lousa, C., Baud, C., Vougioukalaki, M., Panayotou, G. and Tokatlidis, K. (2008) The essential function of Tim12 in vivo is ensured by the assembly interactions of its C-terminal domain. *J Biol Chem*, **283**, 15747-15753.



- Lisowsky, T. (1992) Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet*, **232**, 58-64.
- Lisowsky, T. (1994) ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **26**, 15-20.
- Liu, Q., D'Silva, P., Walter, W., Marszalek, J. and Craig, E.A. (2003) Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science*, **300**, 139-141.
- Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P. and Tokatlidis, K. (2004a) Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 18952-18958.
- Lu, H., Golovanov, A.P., Alcock, F., Grossmann, J.G., Allen, S., Lian, L.Y. and Tokatlidis, K. (2004b) The structural basis of the TIM10 chaperone assembly. *J Biol Chem*, **279**, 18959-18966.
- Luciano, P., Tokatlidis, K., Chambre, I., Germanique, J.C. and Geli, V. (1998) The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase. *J Mol Biol*, **280**, 193-199.
- Luciano, P., Vial, S., Vergnolle, M.A., Dyall, S.D., Robinson, D.R. and Tokatlidis, K. (2001) Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex. *Embo J*, **20**, 4099-4106.
- Lundstrom, J. and Holmgren, A. (1993) Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry*, **32**, 6649-6655.
- Lutz, T., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Embo J*, **22**, 4400-4408.
- Ma, L.C. and Anderson, S. (1997) Correlation between disulfide reduction and conformational unfolding in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, **36**, 3728-3736.
- Malojčić, G., Owen, R.L., Grimshaw, J.P. and Glockshuber, R. (2008) Preparation and structure of the charge-transfer intermediate of the transmembrane redox catalyst DsbB. *FEBS Lett*, **582**, 3301-3307.
- Mamathambika, B.S. and Bardwell, J.C. (2008) Disulfide-linked protein folding pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **24**, 211-235.
- Margulis, L. (1970) Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? *J Theor Biol*, **26**, 337-342.
- Martin, J.L., Bardwell, J.C. and Kuriyan, J. (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature*, **365**, 464-468.
- McBride, H.M., Neuspiel, M. and Wasiak, S. (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, **16**, R551-560.
- McCarthy, A.A., Haebel, P.W., Torronen, A., Rybin, V., Baker, E.N. and Metcalf, P. (2000) Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol*, **7**, 196-199.

- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. and Herrmann, J.M. (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, **121**, 1059-1069.
- Mezghrani, A., Fassio, A., Benham, A., Simmen, T., Braakman, I. and Sitia, R. (2001) Manipulation of oxidative protein folding and PDI redox state in mammalian cells. *Embo J*, **20**, 6288-6296.
- Milenkovic, D., Gabriel, K., Guiard, B., Schulze-Specking, A., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2007a) Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem*, **282**, 22472-22480.
- Milenkovic, D., Muller, J., Stojanovski, D., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2007b) Diverse mechanisms and machineries for import of mitochondrial proteins. *Biol Chem*, **388**, 891-897.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1993) Identification and characterization of the Escherichia coli gene dsbB, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7084-7088.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1994) The Escherichia coli dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *Embo J*, **13**, 2013-2020.
- Molinari, M., Galli, C., Piccaluga, V., Pieren, M. and Paganetti, P. (2002) Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J Cell Biol*, **158**, 247-257.
- Morgan, B., Ang, S.K., Yan, G. and Lu, H. (2009) Zinc can play chaperone-like and inhibitor roles during import of mitochondrial small Tim proteins. *J Biol Chem*, **284**, 6818-6825.
- Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1459**, 370-382.
- Muller, J.M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2008) Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell*, **19**, 226-236.
- Murphy, M.P., Leuenberger, D., Curran, S.P., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2001) The essential function of the small Tim proteins in the TIM22 import pathway does not depend on formation of the soluble 70-kilodalton complex. *Mol Cell Biol*, **21**, 6132-6138.
- Nakamoto, H. and Bardwell, J.C. (2004) Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the Escherichia coli periplasm. *Biochim Biophys Acta*, **1694**, 111-119.
- Naoe, M., Ohwa, Y., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S., Yamamoto, H. and Endo, T. (2004) Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*, **279**, 47815-47821.
- Narayan, M., Welker, E., Wedemeyer, W.J. and Scheraga, H.A. (2000) Oxidative folding of proteins. *Acc Chem Res*, **33**, 805-812.
- Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, **76**, 723-749.

- Pace, C.N., Grimsley, G.R., Thomson, J.A. and Barnett, B.J. (1988) Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J Biol Chem*, **263**, 11820-11825.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4**, 2411-2423.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *Embo J*, **19**, 6392-6400.
- Pollard, M.G., Travers, K.J. and Weissman, J.S. (1998) Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, **1**, 171-182.
- Porat, A., Cho, S.H. and Beckwith, J. (2004) The unusual transmembrane electron transporter DsbD and its homologues: a bacterial family of disulfide reductases. *Res Microbiol*, **155**, 617-622.
- Radke, S., Chander, H., Schafer, P., Meiss, G., Kruger, R., Schulz, J.B. and Germain, D. (2008) Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi. *J Biol Chem*, **283**, 12681-12685.
- Reddehase, S., Grumbt, B., Neupert, W. and Hell, K. (2009) The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1. *J Mol Biol*, **385**, 331-338.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kuhlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N. and Pfanner, N. (2003) Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, **299**, 1747-1751.
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G. and Beckwith, J. (1997) Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol*, **179**, 6602-6608.
- Rissler, M., Wiedemann, N., Pfannschmidt, S., Gabriel, K., Guiard, B., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2005) The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol*, **353**, 485-492.
- Roesch, K., Curran, S.P., Tranebjaerg, L. and Koehler, C.M. (2002) Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet*, **11**, 477-486.
- Rozhkova, A., Stirnimann, C.U., Frei, P., Grauschopf, U., Brunisholz, R., Grutter, M.G., Capitani, G. and Glockshuber, R. (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *Embo J*, **23**, 1709-1719.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-231.

- Scheraga, H.A., Wedemeyer, W.J. and Welker, E. (2001) Bovine pancreatic ribonuclease A: oxidative and conformational folding studies. *Methods Enzymol*, **341**, 189-221.
- Schierle, C.F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D. and Beckwith, J. (2003) The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the Escherichia coli periplasm via the signal recognition particle pathway. *J Bacteriol*, **185**, 5706-5713.
- Schmidt, B., Ho, L. and Hogg, P.J. (2006) Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry*, **45**, 7429-7433.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Segatori, L., Murphy, L., Arredondo, S., Kadokura, H., Gilbert, H., Beckwith, J. and Georgiou, G. (2006) Conserved role of the linker alpha-helix of the bacterial disulfide isomerase DsbC in the avoidance of misoxidation by DsbB. *J Biol Chem*, **281**, 4911-4919.
- Senkevich, T.G., White, C.L., Koonin, E.V. and Moss, B. (2000) A viral member of the ERV1/ALR protein family participates in a cytoplasmic pathway of disulfide bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12068-12073.
- Senkevich, T.G., White, C.L., Koonin, E.V. and Moss, B. (2002) Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6667-6672.
- Sevier, C.S., Cuozzo, J.W., Vala, A., Aslund, F. and Kaiser, C.A. (2001) A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol*, **3**, 874-882.
- Sevier, C.S. and Kaiser, C.A. (2002) Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 836-847.
- Sevier, C.S. and Kaiser, C.A. (2006a) Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 797-811.
- Sevier, C.S. and Kaiser, C.A. (2006b) Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol Biol Cell*, **17**, 2256-2266.
- Sevier, C.S. and Kaiser, C.A. (2008) Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 549-556.
- Sevier, C.S., Qu, H., Heldman, N., Gross, E., Fass, D. and Kaiser, C.A. (2007) Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell*, **129**, 333-344.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13207-13212.
- Sideris, D.P. and Tokatlidis, K. (2007) Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. *Mol Microbiol*, **65**, 1360-1373.

- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M. and Casari, G. (2005) Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet*, **14**, 3477-3492.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912-915.
- Stafford, S.J., Humphreys, D.P. and Lund, P.A. (1999) Mutations in dsbA and dsbB, but not dsbC, lead to an enhanced sensitivity of Escherichia coli to Hg<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. *FEMS Microbiol Lett*, **174**, 179-184.
- Staley, J.P. and Kim, P.S. (1990) Role of a subdomain in the folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Nature*, **344**, 685-688.
- Stein, G. and Lisowsky, T. (1998) Functional comparison of the yeast scERV1 and scERV2 genes. *Yeast*, **14**, 171-180.
- Stewart, E.J., Katzen, F. and Beckwith, J. (1999) Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of Escherichia coli. *Embo J*, **18**, 5963-5971.
- Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2007) Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins. *J Cell Biol*, **179**, 881-893.
- Stojanovski, D., Milenkovic, D., Muller, J.M., Gabriel, K., Schulze-Specking, A., Baker, M.J., Ryan, M.T., Guiard, B., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2008a) Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase. *J Cell Biol*, **183**, 195-202.
- Stojanovski, D., Muller, J.M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2008b) The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 610-617.
- Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R. and Culotta, V.C. (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*, **276**, 38084-38089.
- Terziyska, N., Grumbt, B., Bien, M., Neupert, W., Herrmann, J.M. and Hell, K. (2007) The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett*, **581**, 1098-1102.
- Terziyska, N., Grumbt, B., Kozany, C. and Hell, K. (2009) Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria. *J Biol Chem*, **284**, 1353-1363.
- Terziyska, N., Lutz, T., Kozany, C., Mokranjac, D., Mesecke, N., Neupert, W., Herrmann, J.M. and Hell, K. (2005) Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett*, **579**, 179-184.
- Thornton, J.M. (1981) Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol*, **151**, 261-287.

- Thorpe, C. and Coppock, D.L. (2007) Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J Biol Chem*, **282**, 13929-13933.
- Tian, G., Xiang, S., Noiva, R., Lennarz, W.J. and Schindelin, H. (2006) The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell*, **124**, 61-73.
- Tienson, H.L., Dabir, D.V., Neal, S.E., Loo, R., Hasson, S.A., Boontheung, P., Kim, S.K., Loo, J.A. and Koehler, C.M. (2009) Reconstitution of the Mia40-Erv1 Oxidative Folding Pathway for the Small Tim Proteins. *Mol Biol Cell*.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T. and Larsson, N.G. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, **429**, 417-423.
- Truscott, K.N., Pfanner, N. and Voos, W. (2001) Transport of proteins into mitochondria. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **143**, 81-136.
- Truscott, K.N., Voos, W., Frazier, A.E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Muller, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P. and Pfanner, N. (2003) A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*, **163**, 707-713.
- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F. and Ferraro, A. (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*, **193**, 154-163.
- Tzamarias, D. and Struhl, K. (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, **369**, 758-761.
- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D.Y. and Nagata, K. (2008) ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science*, **321**, 569-572.
- Vasiljev, A., Ahting, U., Nargang, F.E., Go, N.E., Habib, S.J., Kozany, C., Panneels, V., Sinning, I., Prokisch, H., Neupert, W., Nussberger, S. and Rapaport, D. (2004) Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Mol Biol Cell*, **15**, 1445-1458.
- Vergnolle, M.A., Alcock, F.H., Petrakis, N. and Tokatlidis, K. (2007) Mutation of conserved charged residues in mitochondrial TIM10 subunits precludes TIM10 complex assembly, but does not abolish growth of yeast cells. *J Mol Biol*, **371**, 1315-1324.
- Vergnolle, M.A., Baud, C., Golovanov, A.P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L.Y. and Tokatlidis, K. (2005) Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition. *J Mol Biol*, **351**, 839-849.
- Vermeer, C. (1990) Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J*, **266**, 625-636.
- Vitu, E., Bentzur, M., Lisowsky, T., Kaiser, C.A. and Fass, D. (2006) Gain of function in an ERV/ALR sulfhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide. *J Mol Biol*, **362**, 89-101.

- Wagner, K., Gebert, N., Guiard, B., Brandner, K., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Pfanner, N. and Rehling, P. (2008) The assembly pathway of the mitochondrial carrier translocase involves four preprotein translocases. *Mol Cell Biol*, **28**, 4251-4260.
- Walther, D.M., Papic, D., Bos, M.P., Tommassen, J. and Rapaport, D. (2009) Signals in bacterial beta-barrel proteins are functional in eukaryotic cells for targeting to and assembly in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2531-2536.
- Walther, D.M. and Rapaport, D. (2009) Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 42-51.
- Webb, C.T., Gorman, M.A., Lazarou, M., Ryan, M.T. and Gulbis, J.M. (2006) Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell*, **21**, 123-133.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M. and Scheraga, H.A. (2000) Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, **39**, 7032.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E. and Scheraga, H.A. (2002) Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry*, **41**, 14637-14644.
- Weissman, J.S. and Kim, P.S. (1991) Reexamination of the folding of BPTI: predominance of native intermediates. *Science*, **253**, 1386-1393.
- Weissman, J.S. and Kim, P.S. (1993) Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulphide isomerase. *Nature*, **365**, 185-188.
- Weissman, J.S. and Kim, P.S. (1995) A kinetic explanation for the rearrangement pathway of BPTI folding. *Nat Struct Biol*, **2**, 1123-1130.
- Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2004) Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J Biol Chem*, **279**, 18188-18194.
- Wilkinson, B. and Gilbert, H.F. (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*, **1699**, 35-44.
- Williams, J.C., Sue, C., Banting, G.S., Yang, H., Glerum, D.M., Hendrickson, W.A. and Schon, E.A. (2005) Crystal structure of human SCO1: implications for redox signaling by a mitochondrial cytochrome c oxidase "assembly" protein. *J Biol Chem*, **280**, 15202-15211.
- Xiao, R., Wilkinson, B., Solovyov, A., Winther, J.R., Holmgren, A., Lundstrom-Ljung, J. and Gilbert, H.F. (2004) The contributions of protein disulfide isomerase and its homologues to oxidative protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **279**, 49780-49786.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. and Endo, T. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*, **111**, 519-528.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. and Woese, C.R. (1985) Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4443-4447.

Zapun, A., Bardwell, J.C. and Creighton, T.E. (1993) The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry*, **32**, 5083-5092.

Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. and Creighton, T.E. (1995) Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **34**, 5075-5089.

Zhou, Y., Cierpicki, T., Jimenez, R.H., Lukasik, S.M., Ellena, J.F., Cafiso, D.S., Kadokura, H., Beckwith, J. and Bushweller, J.H. (2008) NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation. *Mol Cell*, **31**, 896-908.



## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1**

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2**