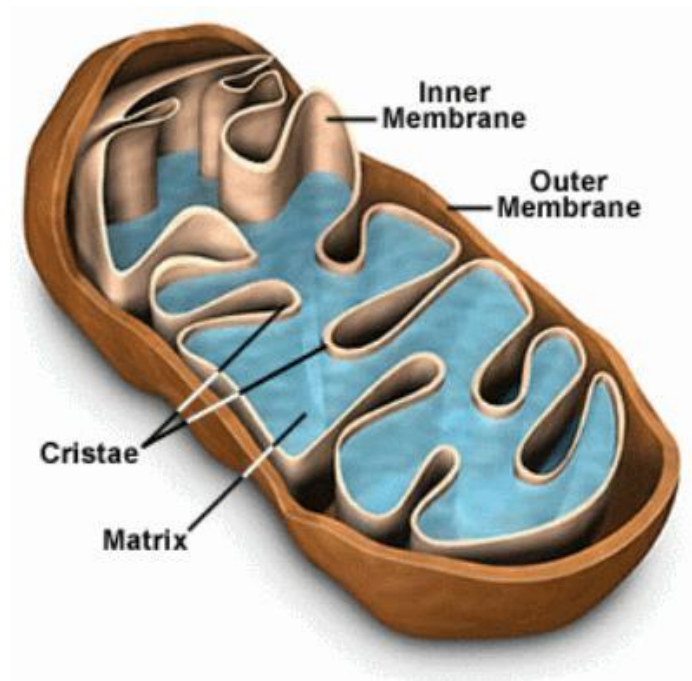


# Μοριακοί μηχανισμοί στόχευσης πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη και στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

Διδακτορική διατριβή  
Νικόλαου Πετράκη



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

Ηράκλειο, 2009

Το έργο συγχρηματοδοτήθηκε κατά: 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ΄ Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

## **Πίνακας Περιεχομένων**

<b>Πίνακας Περιεχομένων</b>	<b>2</b>
<b>Ευχαριστίες</b>	<b>7</b>
<b>Περίληψη</b>	<b>8</b>
<b>Abstract</b>	<b>9</b>
<b>Κατάλογος Σχημάτων</b>	<b>10</b>
<b>Κατάλογος Πινάκων</b>	<b>12</b>
<b>Συντομογραφίες</b>	<b>13</b>
<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Προέλευση Μιτοχονδρίου</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Στόχευση Πρωτεϊνών στο Μιτοχόνδριο</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Διαπέραση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω του     καναλιού TOM</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Μεταθετάση της εσωτερικής μεμβράνης TIM23</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Μονοπάτι TIM22 για την εισαγωγή πρωτεϊνών στην εσωτερική     μεμβράνη με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα</b>	<b>26</b>
<b>1.6 Συντηρημένο μονοπάτι εισόδου στην εσωτερική μεμβράνη – Oxa1     μονοπάτι.</b>	<b>28</b>
<b>1.7 Στόχευση πρωτεϊνών με δομή β-βαρελιού στην εξωτερική     μεμβράνη</b>	<b>29</b>
<b>1.8 Εισαγωγή πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης προσδεμένων μέσω     αλληλουχίας σήματος (Signal-anchored proteins)</b>	<b>30</b>

<b>1.9 Εισαγωγή πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού της οξειδωτικής αναδίπλωσης (oxidative folding pathway)</b>	<b>31</b>
<b>1.10 Βιογένεση των μικρών Tim πρωτεϊνών.</b>	<b>35</b>
<b>1.11 Δομή των μικρών Tim συμπλόκων</b>	<b>37</b>
<b>1.12 Στόχευση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης.</b>	<b>39</b>
<b>1.13 Σήματα στόχευσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών</b>	<b>40</b>
<b>1.14 Πρόβλεψη της στόχευσης πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο</b>	<b>40</b>
<b>1.15 Υπομονάδα e της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης (Subunit e of the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP – synthase)</b>	<b>41</b>
<b>Κεφάλαιο 2: Υλικά και μέθοδοι.</b>	<b>47</b>
<b>2.1 Κλωνοποίηση πλασμιδίων.</b>	<b>48</b>
<b>2.2 Μεταλλαξιγένεση της Su e</b>	<b>49</b>
<b>2.3 Απομόνωση μιτοχονδρίων</b>	<b>49</b>
<b>2.4 Απομόνωση ανασυνδιασμένης Su e-His, ΔN23 Su e-His, HisTim9 και HisTim10 από βακτήρια.</b>	<b>50</b>
<b>2.5 Απομόνωση Tim10 από βακτήρια</b>	<b>51</b>
<b>2.6 Καθαρισμός πρωτεϊνών ΔN244Mia40, ΔN244Mia40 SPS, ΔN290Mia40, ΔN290Mia40SPS, ΔN30Tim10 και ΔN39Tim10</b>	<b>51</b>
<b>2.7 Εισαγωγή ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης σε μιτοχόνδρια</b>	<b>52</b>
<b>2.8 Ενσωμάτωση σε μιτοπλάστες</b>	<b>53</b>
<b>2.9 Παρασκευή λιποσωμάτων</b>	<b>53</b>
<b>2.10 Πρόσδεση στα λιποσώματα</b>	<b>53</b>
<b>2.11 In vitro πρόσδεση σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης</b>	

<b>(Ni-NTA Beads)</b>	<b>54</b>
<b>2.12 Μέθοδος συστοιχίας πεπτιδίων</b>	<b>55</b>
<b>2.13 Υπολογιστικές μέθοδοι</b>	<b>55</b>
<b>2.14 Φασματοσκοπία φθορισμού</b>	<b>56</b>
<b>Κεφάλαιο 3: Μελέτη της στόχευσης και της εισαγωγής της υπομονάδας <i>e</i> της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ως ένα παράδειγμα πρωτεΐνης με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπικό σήμα στόχευσης.</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Εισαγωγή</b>	<b>58</b>
<b>3.2 Αποτελέσματα</b>	<b>58</b>
<i>3.2.1 Η Su e εισάγεται στα μιτοχόνδρια και προσδένεται στην εσωτερική μεμβράνη παρουσία βαθμίδωσης δυναμικού (+ΔΨ).</i>	<b>58</b>
<i>3.2.2 Η Su e μπορεί να ενσωματωθεί απευθείας στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη</i>	<b>60</b>
<i>3.2.3 Η Su e μπορεί να εισαχθεί σε λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης</i>	<b>61</b>
<i>3.2.4 Το αμινοτελικό τμήμα της υπομονάδας <i>e</i> περιέχει τη πληροφορία για τη στόχευσή της στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το φορτίο στη θέση <math>\delta</math> είναι σημαντικό.</i>	<b>62</b>
<i>3.2.5 Αναγνώριση της Su e από τον υποδοχέα της εξωτερικής μεμβράνης Tom20 με βάση τη δομή του.</i>	<b>65</b>
<i>3.2.6 Το αμινοτελικό τμήμα της Su e προσδένεται στη πρωτεΐνη Tim10 και στο σύμπλοκο TIM9.10</i>	<b>66</b>
<i>3.2.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου με τα χαρακτηριστικά της Su e</i>	<b>69</b>
<b>3.3 Συζήτηση</b>	<b>69</b>

**Κεφάλαιο 4: Προσδιορισμός του σήματος εντοπισμού στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού της Mia40** **73**

**4.1 Εισαγωγή** **74**

**4.2 Αποτελέσματα** **75**

*4.2.1 Το εννιαπεπτίδιο που βρίσκεται πριν από τη πρώτη κυστεΐνη της Tim10 είναι σημαντικό για τη πρόσδεση της Tim10 στη Mia40.* **75**

*4.2.2 Το εννιαπεπτίδιο που βρίσκεται πριν από τη πρώτη κυστεΐνη της Tim10 αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή της Mia40 και την ανάγει* **77**

*4.2.3 Οι μικρές Tim πρωτεΐνες έχουν κοινά χαρακτηριστικά στην αλληλουχία τους πριν τη πρώτη κυστεΐνη της αλληλουχίας τους που δρουν ως σήμα για την αναγνώρισή τους από τη Mia40.* **79**

*4.2.4 Το σήμα στόχευσης της Cox17 βρίσκεται στο τμήμα που βρίσκεται μετά την τρίτη κυστεΐνη* **80**

*4.2.5 Πρόβλεψη των πιθανών σημάτων στόχευσης στη Mia40 των γνωστών υποστρωμάτων της* **81**

**4.3 Συζήτηση** **84**

**Κεφάλαιο 5: Γενικά συμπεράσματα** **86**

**Κεφάλαιο 6: Βιβλιογραφία** **89**

**Παράρτημα: Δημοσιεύσεις**

**I. Mutation of conserved charged residues in mitochondrial TIM10 subunits precludes TIM10 complex assembly, but does not abolish growth of yeast cells.**

Vergnolle MA, Alcock FH, Petrakis N, Tokatlidis K.

**J Mol Biol. 2007 Aug 31;371(5):1315-24**

**II. MITOCHONDRIAL ATP-INDEPENDENT CHAPERONES**

Nikos Petrakis, Felicity Alcock and Kostas Tokatlidis

**IUBMB Life, 2009, 61(9):909-14**

**III. Import in mitochondria of subunit e of F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP synthase as an example of a single membrane domain protein of the inner membrane without any typical presequence.**

Nikos Petrakis and Kostas Tokatlidis

**J Biol Chem. 2009, Submitted**

**IV. A novel targeting signal primes precursors for cysteine docking onto Mia40 in mitochondrial oxidative folding**

Dionisia P. Sideris, Nikos Petrakis, Nitsa Katrakili<sup>1</sup>, Despina Mikropoulou, Angelo Gallo, Simone Ciofi-Baffoni, Lucia Banci, Ivano Bertini and Kostas Tokatlidis

**J Cell Biol. 2009, accepted**

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να είχε πραγματοποιηθεί χωρίς τη βοήθεια και τη συμπαράσταση πολλών ανθρώπων. Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Κώστα Τοκατλίδη που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και για τη καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου. Ακόμη, τον καθηγητή Αθανάσιο Κουτσολέλο και την Παναγιώτα Ποϊράζη, για τη συμμετοχή τους στη τριμελή μου επιτροπή. Ευχαριστώ θερμά τα όλα παιδιά που συμπέσαμε στο εργαστήριο για την ευχάριστη ατμόσφαιρα και την άψογη συνεργασία και ειδικά τη Νίτσα Κατρακίλη, τη Τζένη Σιδέρη, την Ειρήνη Λιονάκη και τη Βαγγελιώ Γρισμπολάκη που περάσαμε το μεγαλύτερο μέρος μαζί, όπως επίσης όλους τους φοιτητές και εργαζόμενους στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και στο Τμήμα Χημείας. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τις Felicity Alcock και Carin de Marcos για τη καθοδήγηση και την υπομονή τους κατά το ξεκίνημά μου στο εργαστήριο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ΙΓΕ για τη χρηματοδότηση που μου παρείχε. Ακόμη, ευχαριστώ τους φίλους μου, για την ειλικρινή συμπαράσταση που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, Λεωνίδα και Μαρία και όλη την οικογένειά μου για την υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



## Περίληψη

Το μιτοχόνδριο στον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* περιέχουν περισσότερες από 900 διαφορετικές πρωτεΐνες. Από αυτές η πλειονότητα συντίθεται στο κυτταρόπλασμα, μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο και στοχεύεται στο κατάλληλο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού που περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Διαφορετικές κατηγορίες μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια στόχευσης στο μιτοχόνδριο.

Πολλά διαφορετικά μονοπάτια στόχευσης στο μιτοχόνδριο έχουν μελετηθεί, λίγα είναι όμως γνωστά για το μονοπάτι ενσωμάτωσης στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης. Στη παρούσα εργασία μελετήσαμε την εισαγωγή στο μιτοχόνδριο και την ενσωμάτωση στη μεμβράνη της υπομονάδας  $e$  της  $F_0/F_1$  ATP συνθάσης ( $Su e$ ) ως παράδειγμα αυτής της κατηγορίας πρωτεϊνών. Βρέθηκε ότι το μονοπάτι στόχευσης της  $Su e$  εξαρτάται από τις μικρές Tim πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου ενώ η εισαγωγή της στη μεμβράνη μπορεί να γίνει απουσία των γνωστών συμπλόκων που ενσωματώνουν πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη. Ακόμη, βρέθηκε το σήμα στόχευσης της πρωτεΐνης στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης καθώς επίσης ότι το θετικό φορτίο στη θέση 8 της αλληλουχίας είναι απαραίτητο για τη στόχευση της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο.

Παράλληλα, μελετήθηκε το σήμα στόχευσης των υποστρωμάτων της Mia40, της οξειδάσης που αναδιπλώνει τις πρωτεΐνες στο διαμεμβρανικό χώρο και ο μηχανισμός πρόσδεσης αυτών των υποστρωμάτων στη Mia40. Το σήμα στόχευσης για τη πρωτεΐνη Tim10 βρίσκεται στα αμινοξέα 30 ως 39 της αλληλουχίας. Αυτό το σήμα στόχευσης προσδέεται στη Mia40 μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η αλληλουχία αυτή είναι ικανή να στοχεύσει στη Mia40 πρωτεΐνες που δεν είναι φυσιολογικά υποστρώματα της Mia40.

## **Abstract**

Mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* contain more than 900 different proteins. Most of those are synthesized to the cytosol and they have to be targeted to the right submitochondrial compartment via a very complex mechanism which is consisted of many different protein complexes. Different types of protein are targeted to the mitochondrion via different import pathways.

Many different import pathways are well-studied, but very little is known about the insertion pathway to the inner membrane of proteins with one transmembrane domain and without a typical presequence. In the current work, we studied the import and the insertion to the membrane of Subunit e of the  $F_0/F_1$  ATP synthase (Su e) as an example of inner membrane protein with one transmembrane domain without a typical presequence. We found that its import pathway includes small Tim chaperones of the intermembrane space and that its insertion to the membrane can be performed without the presence of any of the known complexes that insert proteins to the inner membrane. Also, we found that the targeting signal is at the N-terminal part of the protein and that the positive charge at position 8 is very important for its import.

Furthermore, we studied the targeting signal Mia40 substrates to Mia40, the oxidase which folds the proteins to the intermembrane space. The targeting signal to the intermembrane space of Tim10 is at aminoacids 30 to 39 to its sequence and that sequence binds the proteins to Mia40 via hydrophobic interactions. This sequence can target non physiological substrates to Mia40. Also, the prerequisites of a sequence to be a targeting signal for Mia40 were found, giving us the ability to predict the targeting to Mia40.

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχ.	Σελ	
1.1	Τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο	16
1.2	Το μιτοχόνδριο αποτελείται από διάφορα διαφορετικά διαμερίσματα.	17
1.3	Το κανάλι TOM της εξωτερικής μεμβράνης	19
1.4	Εισαγωγή πρωτεΐνης στη μιτοχονδριακή μήτρα	21
1.5	Εισαγωγή πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη και στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού TIM23.	23
1.6	Εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού TIM22	25
1.7	Ενσωμάτωση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού της Oxa1	27
1.8	Εισαγωγή στην εξωτερική μεμβράνη πρωτεϊνών με δομή β-βαρελίου. Η πρωτεΐνη εισάγεται μέσω του καναλιού TOM	28
1.9	Το μονοπάτι της οξειδωτικής αναδίπλωσης για την εισαγωγή πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο	30
1.10	Η δομή NMR σε διάλυμα του κεντρικού τμήματος της ανθρώπινης Mia40	31
1.11	Μηχανισμός δημιουργίας δισουλφιδικών στα μικρά Tim από τη Mia40	34
1.12	Κρυσταλλικές δομές των μικρών Tim συμπλόκων	36
1.13	Κρυσταλλικές δομές των prefoldin και Skp	37
1.14	Η ATP συνθάση του μιτοχονδρίου στη διμερική της μορφή	41
1.15	Η συμμετοχή της Su e στον σχηματισμό των ολιγομερών της ATP συνθάσης	43

3.1	Εισαγωγή της Su e στα μιτοχόνδρια	58
3.2	Ενσωμάτωση της αγρίου τύπου Su e σε μιτοπλάστες και μιτοπλάστες μετά τη προσθήκη PK	59
3.3	Πρόσδεση της Su e και της ΔN23 Su e σε λιποσώματα ή σε λιποσώματα με δυναμικό που προκλήθηκε από διάχυση ιόντων καλίου μετά την προσθήκη βαλινομυκίνης	60
3.4	Στόχευση μεταλλαγμάτων της Su e σε μιτοχόνδρια αγρίου τύπου	62
3.5	Ενσωμάτωση μεταλλαγμάτων της Su e σε μιτοπλάστες	63
3.6	Δομή του κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα Tom20 με αλληλουχίες στόχευσης	64
3.7	Αλληλεπίδραση της Su e με τις μικρές Tim πρωτεΐνες	66
3.8	Μέθοδος συστοιχίας πεπτιδίων	67
4.1	Αλληλουχίες αμινοξέων των Mia40 και Tim10	73
4.2	Πρόσδεση διάφορων ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών στη ΔN290Mia40SPS σε διάφορες θερμοκρασίες	74
4.3	Εξάρτηση της πρόσδεσης της Tim10 στη Mia40 από τη συγκέντρωση NaCl και τη συγκέντρωση απορρυπαντικού	76
4.4	Φάσματα φθορισμού της ΔN244Mia40	77
4.5	Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών και απεικονίσεις α-έλικας	78
4.6	Ευθυγράμμιση αλληλουχιών από πρωτεΐνες Cox17 από διάφορους οργανισμούς και απεικόνιση α-έλικας	79

## Κατάλογος Πινάκων

Σχ.	Σελ	
1.1	Υποστρώματα της Mia40.	32
1.2	Κατάλογος των διαθέσιμων εργαλείων πρόβλεψης της στόχευσης στο μιτοχόνδριο	40
1.3	Οι υπομονάδες που της $F_0/F_1$ ATP συνθάσης του μιτοχονδρίου που έχουν μέχρι στιγμής ανακαλυφθεί στον σακχαρομύκητα	42
3.1	Οι πρωτεΐνες που ανιχνευτήκαν στο πρωτέομα του μιτοχονδρίου με τα χαρακτηριστικά της Su e και πιθανότατα στοχεύονται με τον ίδιο μηχανισμό όπως η Su e.	68
4.1	Πρόβλεψη αλληλουχιών στόχευσης	81

## Συντομογραφίες

<b>ΔG</b>	Gibbs free energy difference – Μεταβολή στη ελεύθερη ενέργεια Gibbs
<b>ALDH</b>	Alcohol Dehydrogenase
<b>AAC</b>	ADT/ATP Carrier – Μεταφορέας του ADT και του ATP
<b>ADP</b>	Adenosine di phoshpate - 5' Διφωσφορική αδενοσίνη
<b>ALR</b>	Augmenter of liver regeneration
<b>ATP</b>	Adenosine tri phoshaste - 5' Τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>BB</b>	Breaking Buffer
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CCCP</b>	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
<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>ITC</b>	Isothermal Titration Calorimetry – Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης

<b>ITS</b>	Intermembrane space Targeting Signal – Σήμα στόχευσης στο διαμεμβρανικό χώρο
<b>K<sub>d</sub></b>	Dissociation Constant – Σταθερά αποδιάταξης
<b>Mia</b>	Mitochondrial Import and Assembly
<b>MPP</b>	Matrix Presequence Peptidase
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide – νικοτινοαμιδο αδενοδινουκλεοτίδιο
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance - πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
<b>OD<sub>600</sub></b>	Optical Density at 600 nm – Οπτική πυκνότητα στα 600 nm
<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>POTRA</b>	Polypeptide Translocase Associated
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene Fluoride
<b>SAM</b>	Sorting and Assembly Machinery
<b>SDS</b>	Sodium Docecyl Sulfate
<b>Su e</b>	SubUnit e of the ATP synthase
<b>TCA</b>	TriCloroAcetic 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



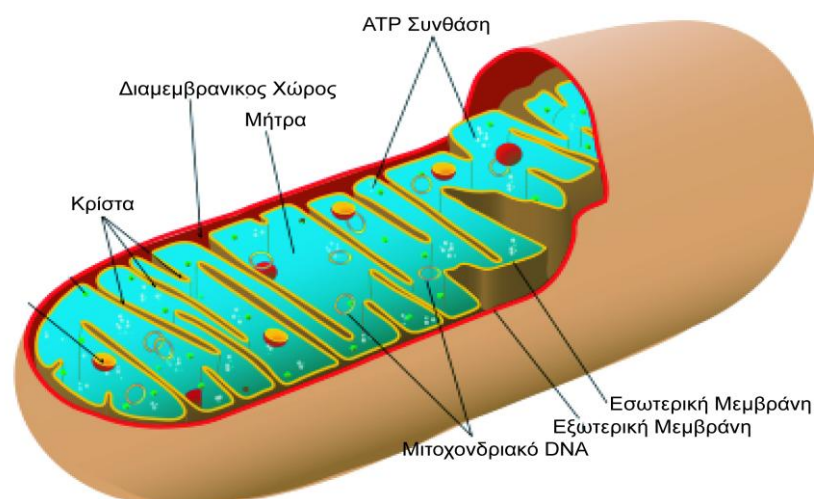
# **Κεφάλαιο 1**

## **Εισαγωγή**

Το ευκαρυωτικό κύτταρο, σε αντίθεση με το προκαρυωτικό, αποτελείται από διαφορετικά μέρη, τα οποία περιβάλλονται από λιπιδικές μεμβράνες, τα οργανίδια. Σε αυτά περιλαμβάνονται τους πυρήνες, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα υπεροξυσώματα (σχήμα 1.1). Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια του κυττάρου στα οποία παράγεται η πλειονότητα του ATP που χρειάζεται ένα κύτταρο για τη λειτουργία του. Ακόμη, τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες βιολογικές λειτουργίες, όπως η απόπτωση, η ρύθμιση της οξειδωτικής κατάστασης του κυττάρου, και η σύνθεση της αίμης και των στεροειδών. Εξελικτικά, πιθανότατα προήλθαν από την ενσωμάτωση ενός ενδοσυμβιωτικού βακτηρίου, και περιέχουν το δικό τους γονιδίωμα οπότε μπορούν και συνθέτουν μόνα τους κάποιες από τις πρωτεΐνες τους. Είναι παρόντα στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως οι μύκητες, τα φυτά και τα ζώα. Στον άνθρωπο, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι εμπλεγμένη σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανόμενου του καρκίνου (Armstrong 2006), όπως επίσης στους μηχανισμούς γήρανσης (Reeve, Krishnan et al. 2008) και κυτταρικού θανάτου (Green and Kroemer 2004). Τα παραπάνω κάνουν τη μελέτη της λειτουργίας και της βιογένεσης του μιτοχονδρίου ιδιαίτερα σημαντική.



**Σχήμα 1.1.** Σχηματική αναπαράσταση τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου



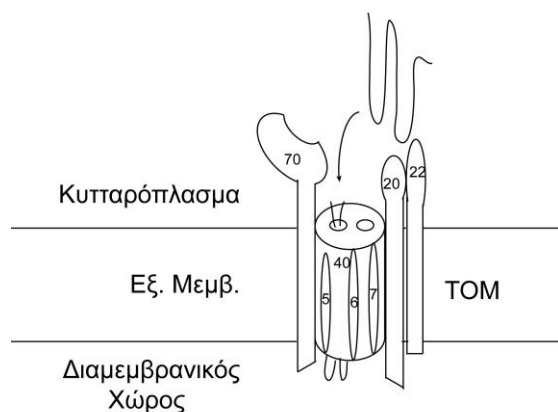
**Σχήμα 1.2.** Το μιτοχόνδριο αποτελείται από διάφορα διαφορετικά διαμερίσματα. Την εξωτερική μεμβράνη, την εσωτερική μεμβράνη, τον διαμεμβρανικό χώρο και τη μήτρα. Η εσωτερική μεμβράνη φέρει αναδιπλώσεις (κρίστα). Το μιτοχόνδριο έχει το δικό του DNA.

## 1.1 Προέλευση Μιτοχονδρίου

Το μιτοχόνδριο πιθανότατα έχει προέλθει από ένα προκαρυωτικό βακτήριο το οποίο εισέβαλλε μέσα σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο περίπου πριν από ένα δισεκατομμύριο χρόνια. Τα δύο κύτταρα ανέπτυξαν ενδοσυμβιωτική σχέση και με τον καιρό έχασαν την αυτονομία τους (Gray, Burger et al. 1999). Το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος του βακτηρίου μεταφέρθηκε σταδιακά στον πυρήνα του κυττάρου και ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα του ευκαρυωτικού οργανισμού. Η προέλευση του μιτοχονδρίου από βακτήριο είναι φανερή από τη δομή και τη λειτουργία του. Το μιτοχόνδριο διατηρεί το δικό του γονιδίωμα, παρόλο που κωδικοποιεί μικρό μόνο μέρος από τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Πολλά από τα χαρακτηριστικά του μιτοχονδριακού DNA θυμίζουν έντονα το βακτηριακό. Περικλείεται από διπλή μεμβράνη, όπως τα gram<sup>-</sup> βακτήρια με διαμεμβρανικό χώρο μεταξύ των δύο μεμβρανών. Ακόμη, αρκετές από τις πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου είναι ομόλογες τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία με βακτηριακές.

## 1.2 Στόχευση Πρωτεϊνών στο Μιτοχόνδριο

Στον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (μαγιά – Baker's Yeast), ο οργανισμός-πρότυπο για τη μελέτη του συστήματος στόχευσης πρωτεϊνών που έχει μελετηθεί περισσότερο, έχουν βρεθεί περισσότερες από 900 πρωτεΐνες να βρίσκονται στο μιτοχόνδριο (Sickmann, Reinders et al. 2003; Reinders, Zahedi et al. 2006). Από αυτές μόνο οι οκτώ κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA, ενώ οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και κατόπιν μεταφέρονται στο μιτοχόνδριο με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών-συννοδών (chaperones - σαπερόνες) (Lithgow, Cuezva et al. 1997), όπου στοχεύονται στο σωστό μιτοχονδριακό τμήμα. Το μιτοχόνδριο αποτελείται από δύο μεμβράνες, η μία μέσα στην άλλη, με έναν ενδιάμεσο διαμεμβρανικό χώρο. Το εσωτερικό μέρος που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη, και στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι κυρίως μεταβολικές λειτουργίες του μιτοχονδρίου όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος ονομάζεται μήτρα (Σχήμα 1.2). Κάθε μέρος του μιτοχονδρίου έχει τη δική του ξεχωριστή λειτουργία και τις δικές του ξεχωριστές πρωτεΐνες. Οπότε, έχει αναπτυχθεί ένας πολύπλοκος μηχανισμός για να ταξινομεί τις διαφορετικές πρωτεΐνες στα διαφορετικά τμήματα, την εξωτερική μεμβράνη, το διαμεμβρανικό χώρο, την εσωτερική μεμβράνη και τη μήτρα (Neupert and Herrmann 2007).



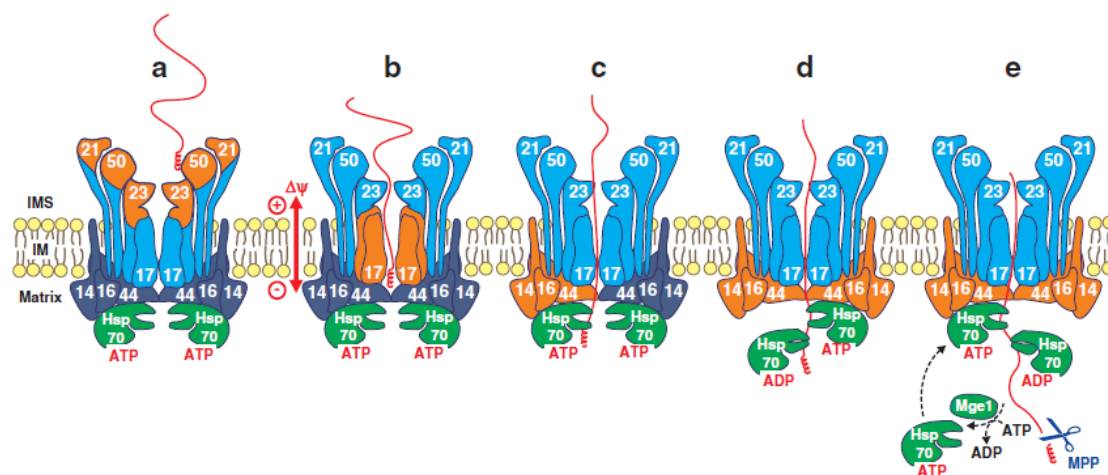
**Σχήμα 1.3.** Το κανάλι TOM της εξωτερικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς που είναι εκτεθειμένοι στο κυτταρόπλασμα (Tom70, Tom20 και Tom22) δεσμεύουν τη πρόδρομη πρωτεΐνη και την οδηγούν στο κανάλι που σχηματίζεται από τη Tom40. Οι μικρές TOM πρωτεΐνες (Tom5, Tom6 και Tom7) είναι ενσωματωμένες στην εξωτερική μεμβράνη.

### 1.3 Διαπέραση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω του καναλιού TOM

Στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, οι πρωτεΐνες που προορίζονται για το μιτοχόνδριο αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες-υποδοχείς. Υπάρχουν τρεις κύριοι υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης, ο Tom70 και ο Tom20 και ο Tom22 (Endo and Kohda 2002). Ο Tom70 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης μεγέθους 70 kDa με το μεγαλύτερο μέρος της να εξέχει στο κυτταρόπλασμα (Hase, Riezman et al. 1983; Hines, Brandt et al. 1990). Ο υποδοχέας αυτός προσδένει και βοηθάει την εισαγωγή στο μιτοχόνδριο κυρίως πρωτεΐνες της οικογένειας των μεταφορέων μεταβολιτών (metabolite carrier family), οι οποίες περιέχουν εσωτερικό σήμα στόχευσης (Schlossmann, Dietmeier et al. 1994), παραλαμβάνοντάς τις από τις κυτταροπλασματικές σαπερόνες και προσδένοντάς τις σε μία μεγάλη κοιλότητα στο καρβοξυ-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης (Wu and Sha 2006). Ο υποδοχέας Tom20 είναι μία πρωτεΐνη προσδεμένη στην εξωτερική μεμβράνη μεγέθους 20 kDa. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης έχει την ικανότητα να προσδένει πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες με αλληλουχίες στόχευσης (presequences), σε μία υδρόφοβη κοιλότητα της πρωτεΐνης. Ο Tom20 έχει την ικανότητα να ξεχωρίζει μιτοχονδριακές αλληλουχίες στόχευσης από αλληλουχίες στόχευσης για άλλα οργανίδια (Abe, Shodai et al. 2000; Muto, Obita et al. 2001; Obita, Muto et al. 2003). Ο Tom22, δρα συνεργατικά με την Tom20 αναγνωρίζοντας

τα φορτία της αλληλουχίας στόχευσης (Yano, Hoogenraad et al. 2000). Μετά την αναγνώριση της πρόδρομης πρωτεΐνης από τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης, η πρωτεΐνη Tom5 αναλαμβάνει τη μεταφορά της από τους υποδοχείς στο κεντρικό κανάλι εισόδου (Dietmeier, Honlinger et al. 1997; van Wilpe, Ryan et al. 1999).

Μετά την αναγνώρισή τους από τους υποδοχείς, οι πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μεταφέρονται στο κεντρικό κανάλι εισόδου TOM (Translocase of the Outer Membrane) (Σχήμα 1.3). Το κανάλι εισόδου TOM αποτελείται από το κεντρικό κανάλι εισόδου Tom40 και από τις μικρές Tom πρωτεΐνες Tom5, Tom6 και Tom7. Ο ρόλος της Tom5, όπως προαναφέρθηκε, είναι πιθανότατα να οδηγεί τις πρόδρομες πρωτεΐνες από τους υποδοχείς στο κανάλι. Για τις άλλες μικρές Tom πρωτεΐνες έχει προταθεί ότι έχουν ρόλο στη διατήρηση της συνοχής του καναλιού TOM, χωρίς να είναι πλήρως γνωστός ο ρόλος τους (Dembowski, Kunkele et al. 2001). Το κεντρικό κανάλι Tom40 είναι μία πρωτεΐνη με δομή β-βαρελιού (β-barrel), η οποία σχηματίζει ένα υδρόφιλο πόρο μέσω του οποίου οι αποδιαταγμένες ή μερικώς αναδιπλωμένες πρόδρομες πρωτεΐνες εισάγονται στο μιτοχόνδριο (Hill, Model et al. 1998; Ahting, Thieffry et al. 2001; Esaki, Kanamori et al. 2003).



**Σχήμα 1.4.** Εισαγωγή πρωτεΐνης στη μιτοχονδριακή μήτρα. α. Η Tim50 δρα ως υποδοχέας και οδηγεί τη πρόδρομη πρωτεΐνη στο κανάλι του TIM23. β. Το κανάλι εισάγει το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης. γ. Το PAM σύμπλοκο παραλαμβάνει τη πρόδρομη πρωτεΐνη. δ. Η mtHsp70 χρησιμοποιεί την υδρόλυση του ATP για να τραβήξει τη πρωτεΐνη στη μήτρα. ε. Η πρωτεάση της μήτρας MPP κόβει το σήμα στόχευσης και η Mge1 ανταλλάσει το ADP με ATP στην mtHsp70 (Neupert and Herrmann 2007).

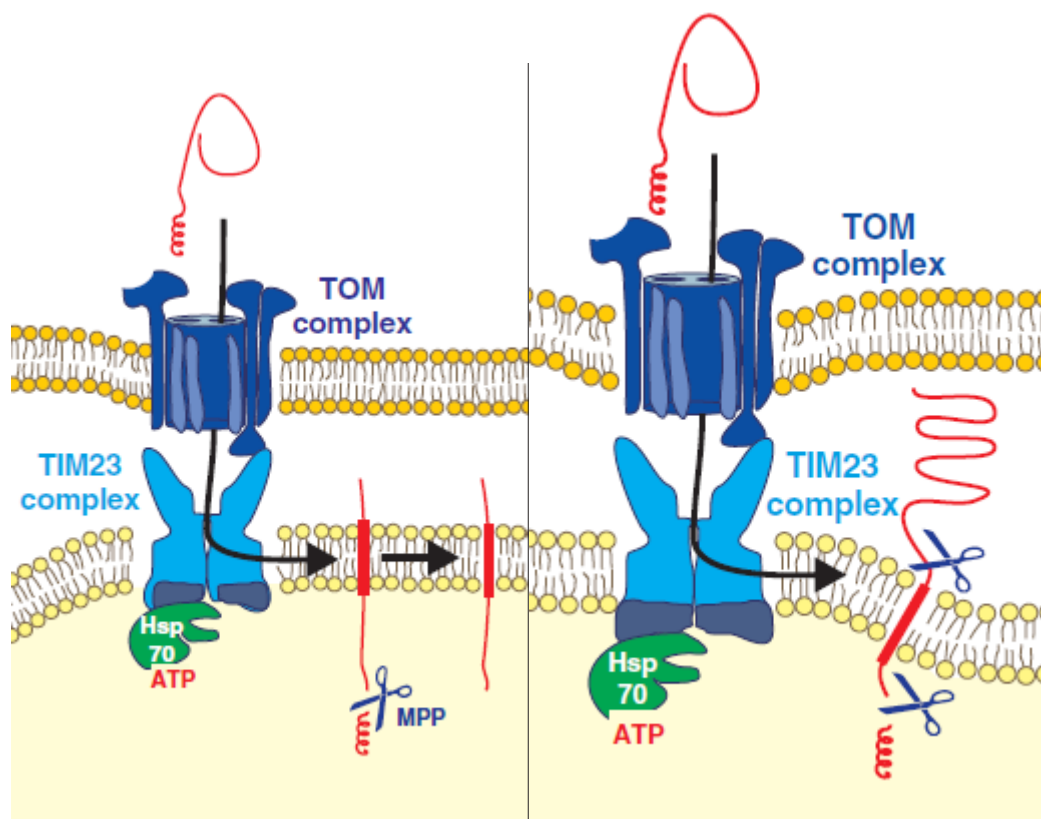
#### 1.4 Μεταθετάση της εσωτερικής μεμβράνης TIM23

Μετά τη μεταφορά τους διαμέσω της εξωτερικής μεμβράνης από το κανάλι TOM, η κάθε πρόδρομη πρωτεΐνη ακολουθεί το δικό της μονοπάτι στόχευσης ανάλογα το μιτοχονδριακό διαμέρισμα για το οποίο προορίζεται και ανάλογα με τις ιδιότητές της. Μεγάλο μέρος από τις πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μετά το TOM, περνάνε στο σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης TIM23 (Translocase of the Inner Membrane) (σχήμα 1.4). Το TIM23 αποτελείται από δύο μέρη, το μεμβρανικό μέρος που το απαρτίζουν οι πρωτεΐνες Tim21, Tim50, Tim23 και Tim17, και το σύμπλοκο PAM (Presequence-translocase-Associated import Motor complex) που αποτελείται από την Tim44, Tim14, Tim16, mtHsp70 και Mge1 στη πλευρά της μήτρας (Neupert and Herrmann 2007). Για τη λειτουργία του το TIM23 αντλεί ενέργεια από το ηλεκτρικό δυναμικό διαμέσω της εσωτερικής μεμβράνης ( $\Delta\Psi$ ) (Bauer, Sirrenberg et al. 1996) και την υδρόλυση του ATP. Το μεμβρανικό τμήμα του TIM23 παραλαμβάνει τις πρωτεΐνες από το TOM σύμπλοκο και τις μεταφέρει διαμέσω της μεμβράνης, ενώ το σύμπλοκο PAM δρα ως μηχανή που τραβάει τις πρωτεΐνες μέσα στη μήτρα, χρησιμοποιώντας ως ενέργεια την υδρόλυση του ATP (Kubrich, Keil et al. 1994). Η διαδικασία αυτή υποβοηθείται από τη διαφορά δυναμικού μεταξύ της μήτρας και του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων

(ΔΨ). Μετά την εισαγωγή τους μέσα στη μήτρα, το σήμα στο αμινοτελικό τους κομμάτι αποκόπτεται από την πεπτιδάση MPP. Όπως προαναφέρθηκε, το μεμβρανικό τμήμα της TIM23 αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες. Από αυτές η Tim23 και Tim17 είναι βυθισμένες στην εσωτερική μεμβράνη με τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα η κάθε μία και σχηματίζουν το βασικό κανάλι εισαγωγής (Bomer, Rassow et al. 1996; Truscott, Kovermann et al. 2001). Ο ακριβής ρόλος της κάθε μίας στη διαδικασία δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη. Η Tim50 έχει ένα διαμεμβρανικό τμήμα που τη προσδένει στην εσωτερική μεμβράνη και ένα εκτεθειμένο στο διαμεμβρανικό χώρο τμήμα. Ο ρόλος της είναι να δρα σαν υποδοχέας που παραλαμβάνει τις πρόδρομες πρωτεΐνες και τις περνάει στο κανάλι (Mokranjac, Sichting et al. 2009; Tamura, Harada et al. 2009). Επίσης, έχει ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας του καναλιού (Meinecke, Wagner et al. 2006). Για το ρόλο της Tim21 λίγα είναι γνωστά. Έχει δείχθει πως δρα ως σύνδεσμος μεταξύ του καναλιού TOM της εξωτερικής μεμβράνης και του TIM23 (Chacinska, Lind et al. 2005; Mokranjac, Popov-Celeketic et al. 2005). Επίσης, έχει δείχθει η ύπαρξη δύο διαφορετικών μορφών του TIM23, μία χωρίς την Tim21 με το PAM σύμπλοκο προσδεμένο, που εισάγει τις πρωτεΐνες στη μήτρα και μία με την Tim21, χωρίς το PAM σύμπλοκο προσδεμένο που εισάγει τις πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (van der Laan, Meinecke et al. 2007).

Το μεμβρανικό τμήμα της TIM23 μπορεί εισάγει μόνο το ακραίο τμήμα του αμινοτελικού άκρου της πρόδρομης πρωτεΐνης στη μήτρα. Μετά αναλαμβάνει το σύμπλοκο PAM το οποίο βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη από τη πλευρά της μήτρας. Το κεντρικό τμήμα της PAM αποτελείται από τη πρωτεΐνη Tim44, η οποία συνδέει τις διάφορες υπομονάδες της Pam με την Tim23 (Bomer, Maarse et al. 1998; Strub, Rottgers et al. 2002). Επίσης έχει ρυθμιστικό ρόλο για την mtHsp70 (Schiller, Cheng et al. 2008). Η mtHsp70 είναι η μιτοχονδριακή ανάλογη πρωτεΐνη της Hsp70. Ο ρόλος της Hsp70 στο μα είναι να παραλαμβάνει τις νεοσυντιθέμενες από το ριβόσωμα και να τις κατανέμει στα διάφορα κυτταρικά μέρη όπου αναδιπλώνονται, μεταφέρονται διαμέσω μεμβρανών στα οργανίδια ή αποικοδομούνται (Gething and Sambrook 1992). Με ανάλογο τρόπο η mtHsp70 παραλαμβάνει νέες πρωτεΐνες από το Tim23 και βοηθάει στην αναδίπλωσή τους στη μήτρα. Η mtHsp70 είναι μία σαπερόνη που χρησιμοποιεί την υδρόλυση του ATP για





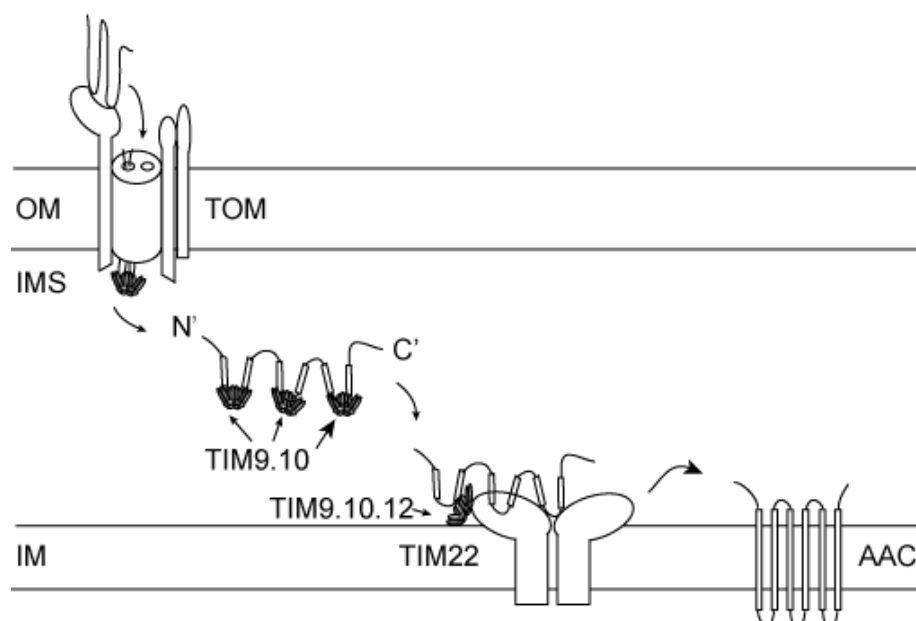
**Σχήμα 1.5.** Εισαγωγή πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη (αριστερά) και στο διαμεμβρανικό χώρο (δεξιά) μέσω του μονοπατιού TIM23. Η εισαγωγή των πρωτεϊνών γίνεται μέσω του μηχανισμού που εισάγει τις πρωτεΐνες στη μήτρα, μέχρι την αναγνώριση του σήματος διακοπής από την TIM23. Η πρωτεΐνη τότε, εισάγεται στην εσωτερική μεμβράνη. Από εκεί, μπορεί να ελευθερωθεί στον διαμεμβρανικό χώρο μέσω πρωτεόλυσης (Neupert and Herrmann 2007).

την λειτουργία της. Προσδένει τη πρωτεΐνη ενώ αυτή βρίσκεται μέσα στο Tim23 κανάλι και έτσι εμποδίζει την ολίσθησή της πίσω στο διαμεμβρανικό χώρο. Έπειτα, χρησιμοποιώντας την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP, τραβάει τη πρωτεΐνη μέσα στη μήτρα (Moro, Sirrenberg et al. 1999). Η μορφή με το ATP προσδεμένο προσδένεται στη Tim44, ενώ η μορφή με το ADP που προκύπτει μετά την υδρόλυση του ATP αποδεσμεύεται από αυτήν (Horst, Oppliger et al. 1996; Moro, Okamoto et al. 2002). Ο ρόλος της Mge1 είναι η ανταλλαγή του ADP με το ATP στην mtHsp70, με ανάλογο τρόπο που δρα η ομόλογη βακτηριακή πρωτεΐνη GrpE (Laloraya, Gambill et al. 1994; Westermann, Prip-Buus et al. 1995; Deloche and Georgopoulos 1996). Οι πρωτεΐνες Tim16 και Tim14 βοηθούν την mtHsp70 να αναγνωρίζει και να προσδένει τα υποστρώματά της (Mokranjac, Bourenkov et al. 2006; Iosefson, Levy et al. 2007; Mokranjac, Berg et al. 2007). Η ωρίμανση των πρόδρομων πρωτεϊνών στη μήτρα ολοκληρώνεται με αποκοπή της αλληλουχίας στόχευσης από τη πεπτιδάση

MPP (Matrix Processing Peptidase), μία μεταλοπρωτεάση της μήτρας (Luciano, Tokatlidis et al. 1998; Gakh, Cavadini et al. 2002).

Το σύμπλοκο TIM23 μπορεί να εισάγει πρωτεΐνες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω του μονοπατιού διακοπής της μεταφοράς (Stop-transfer pathway). Αυτό το μονοπάτι ακολουθούν πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης των οποίων η πρόδρομη πρωτεΐνη περιέχει αποκοπτόμενη αλληλουχία στόχευσης. Στη περίπτωση αυτών των πρωτεϊνών, ένα εσωτερικό σήμα αναγνωρίζεται από το σύμπλοκο TIM23 και διακόπτει τη μεταφορά της πρωτεΐνης στη μήτρα και έπειτα η πρωτεΐνη εισάγεται στην εσωτερική μεμβράνη (Miller and Cumsky 1993; Meier, Neupert et al. 2005). Η εισαγωγή της πρωτεΐνης στην εσωτερική μεμβράνη δεν απαιτεί την πρόσδεση του PAM συμπλόκου στη TIM23, αλλά γίνεται από μια μορφή του καναλιού TIM23 χωρίς το PAM (Gartner, Voos et al. 1995; van der Laan, Meinecke et al. 2007) (σχήμα 1.5).

Επιπλέον των παραπάνω, το TIM23 κανάλι εισάγει πρωτεΐνες οι οποίες καταλήγουν στο διαμεμβρανικό χώρο. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μία αμφιμερή αλληλουχία στόχευσης (Bipartite Presequence) και εισάγονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω του μονοπατιού διακοπής της μεταφοράς. Έπειτα, πεπτιδάσες του διαμεμβρανικού χώρου, όπως το σύμπλοκο IMP (Burri, Strahm et al. 2005), αποκόπτουν τις πρωτεΐνες από τις μεμβράνες, με αποτέλεσμα να ελευθερώνονται στον διαμεμβρανικό χώρο (σχήμα 1.5) (Nunnari, Fox et al. 1993; Esser, Tursun et al. 2002).



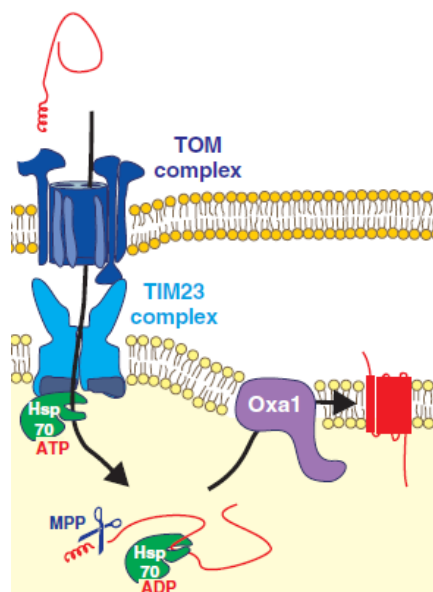
**Σχήμα 1.6.** Εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη της πρωτεΐνης AAC μέσω του μονοπατιού TIM22. Ο υποδοχέας Tom70 παραλαμβάνει τις πρωτεΐνες και τις οδηγεί στο κανάλι TOM. Από εκεί, τα σύμπλοκα των μικρών Tim (TIM9.10) παραλαμβάνουν τις πρόδρομες πρωτεΐνες και τις οδηγούν στο κανάλι TIM22, το οποίο τις εισάγει στην εσωτερική μεμβράνη με τη βοήθεια του συμπλόκου TIM9.10.12

### 1.5 Μονοπάτι TIM22 για την εισαγωγή πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα

Για την εισαγωγή πρωτεϊνών με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα στην εσωτερική μεμβράνη χωρίς τυπικό σήμα στόχευσης (presequence), ένα διαφορετικό μονοπάτι εισόδου ακολουθείται μετά την εισαγωγή διαμέσω της εξωτερικής μεμβράνης από το κανάλι TOM. Τα υποστρώματα που ακολουθούν αυτό το μονοπάτι είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μεταφορέων μεταβολιτών (metabolite carrier proteins) όπως η AAC (ADP/ATP Carrier) και πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στην στόχευση πρωτεϊνών όπως οι Tim17, Tim23 και Tim22. Οι μεταφορείς μεταβολιτών είναι ομόλογες πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης με έξι διαμεμβρανικά τμήματα, ενώ οι Tim17, Tim23 και Tim22 έχουν από τέσσερα. Το μονοπάτι εισαγωγής τους περιλαμβάνει τα σύμπλοκα σαπερονών του διαμεμβρανικού χώρου των μικρών Tim (small Tim complexes) και το σύμπλοκο-κανάλι της εσωτερικής μεμβράνης TIM22 (σχήμα 1.6).

Μετά την εισαγωγή τους μέσω του πόρου του TOM, οι πρωτεΐνες του μονοπατιού TIM22 παραλαμβάνονται από τα σύμπλοκα των μικρών Tim του διαμεμβρανικού χώρου. Η οικογένεια των μικρών Tim περιλαμβάνει πέντε πρωτεΐνες μοριακού βάρους από 8 έως 13 kDa οι οποίες έχουν ομόλογη αλληλουχία αμινοξέων. Σχηματίζουν δύο σύμπλοκα στον διαμεμβρανικό χώρο, το TIM9.10 σύμπλοκο, που είναι ένα ετεροεξαμερικό σύμπλοκο που αποτελείται από τρεις υπομονάδες Tim9 και τρεις υπομονάδες Tim10, και το TIM8.13 σύμπλοκο, που είναι ένα επίσης ετεροεξαμερικό σύμπλοκο που αποτελείται από τρεις υπομονάδες Tim8 και τρεις υπομονάδες Tim13. Το πέμπτο μέλος της οικογένειας, η Tim12, βρίσκεται σε συνοχή με την εσωτερική μεμβράνη. Η δομή, η βιογένεση και το σήμα στόχευσης αυτών των πρωτεϊνών αναλύονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια παρακάτω στην εισαγωγή και το κεφάλαιο 3. Ο ρόλος τους είναι να δρουν ως σαπερόνες του διαμεμβρανικού χώρου εμποδίζοντας τη κατακρήμνιση των υδρόφοβων μεμβρανικών πρωτεϊνών κατά τη μεταφορά τους διαμέσω του υδατικού διαμεμβρανικού χώρου.

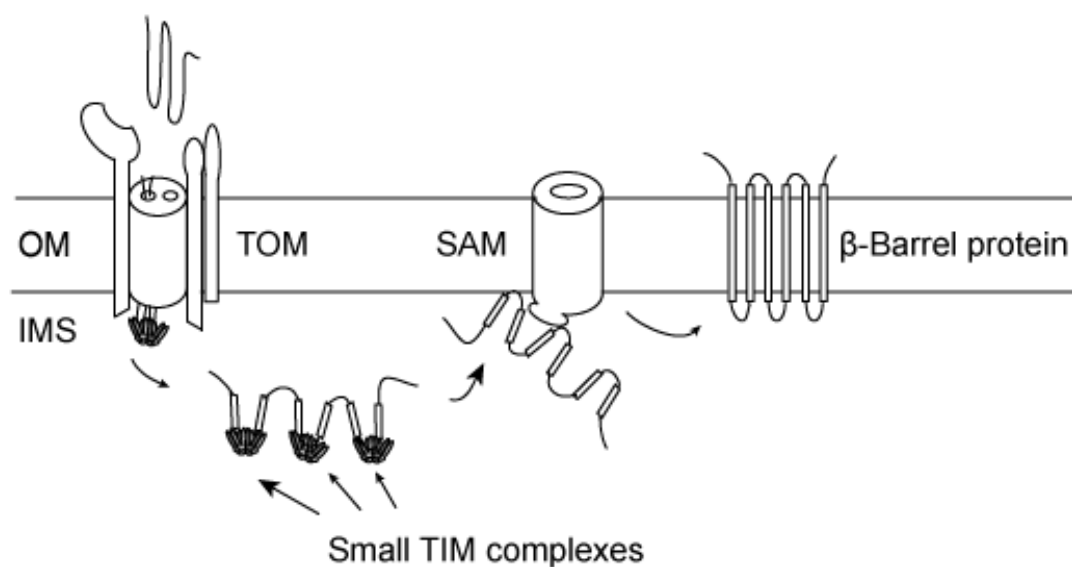
Κατόπιν, τα σύμπλοκα των μικρών Tim παραδίδουν τις πρωτεΐνες στο σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης TIM22. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, την Tim54, την Tim22 και την Tim18. Η Tim22 είναι μία πρωτεΐνη ομόλογη με τις Tim17 και Tim23 και σχηματίζει το κυρίως κανάλι του συμπλόκου (Sirrenberg, Bauer et al. 1996; Kerscher, Holder et al. 1997; Kovermann, Truscott et al. 2002). Ο ρόλος των υπομονάδων Tim54 και Tim18 δεν είναι πλήρως κατανοητός (Kerscher, Sepuri et al. 2000; Koehler, Murphy et al. 2000).



**Σχήμα 1.7.** Ενσωμάτωση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού της Oxa1. Η πρωτεΐνη εισάγεται στη μήτρα μέσω του κανονικού μονοπατιού Tim23, και μετά τη πρωτεολυτική επεξεργασία της, παραλαμβάνεται από την Oxa1, η οποία την εισάγει στην εσωτερική μεμβράνη (Neupert and Herrmann 2007).

## 1.6 Συντηρημένο μονοπάτι εισόδου στην εσωτερική μεμβράνη – Oxa1 μονοπάτι.

Το συντηρημένο μονοπάτι στόχευσης ακολουθείται από πρωτεΐνες με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα και τυπικό αποκοπτόμενο σήμα στόχευσης (cleavable presequence). Αυτές οι πρωτεΐνες εισάγονται στη μιτοχονδριακή μήτρα ακολουθώντας το τυπικό μονοπάτι εισόδου στη μήτρα (TIM23) και έπειτα η πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης Oxa1 ενσωματώνει τις πρωτεΐνες αυτές στην εσωτερική μεμβράνη (Hell, Herrmann et al. 1998; Herrmann and Bonnefoy 2004). Η Oxa1 ανήκει σε μία μεγάλη οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών συντηρημένες από τα βακτήρια ως τους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Kuhn, Stuart et al. 2003; Reif, Randelj et al. 2005). Επίσης, η Oxa1 χρησιμοποιείται για την εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA (He and Fox 1997; Hell, Herrmann et al. 1998) (σχήμα 1.7).



**Σχήμα 1.8.** Εισαγωγή στην εξωτερική μεμβράνη πρωτεϊνών με δομή β-βαρελιού. Η πρωτεΐνη εισάγεται μέσω του καναλιού TOM. Έπειτα, τα σύμπλοκα των μικρών Tim (small tim proteins) παραλαμβάνουν τις πρόδρομες πρωτεΐνες και τις οδηγούν στο κανάλι SAM της εξωτερικής, το οποίο τις εισάγει στην εξωτερική μεμβράνη.

### 1.7 Στόχευση πρωτεϊνών με δομή β-βαρελιού στην εξωτερική μεμβράνη

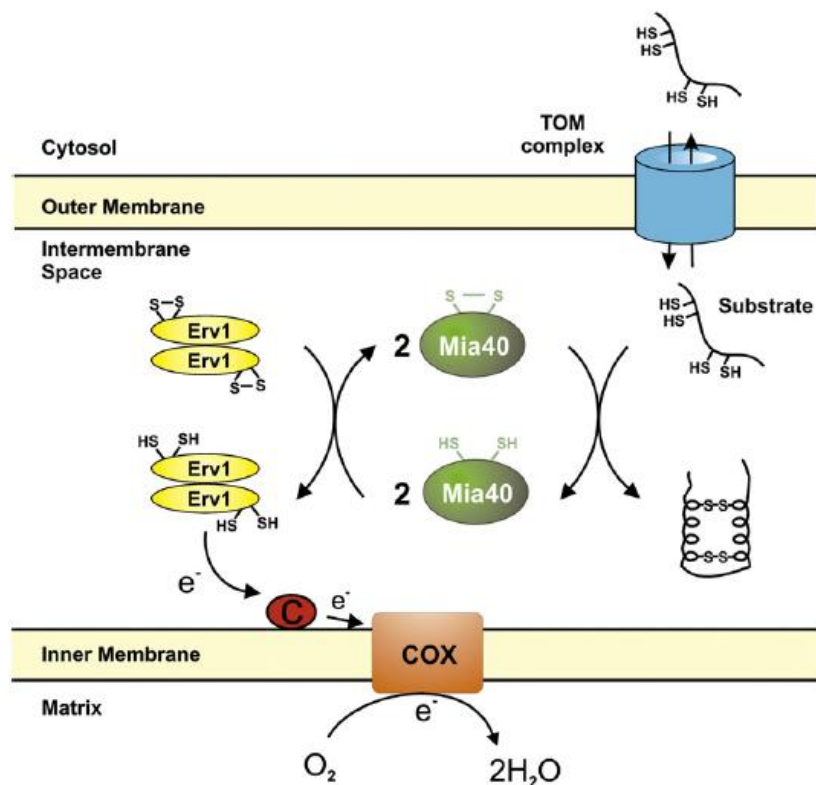
Μεγάλο μέρος των μεμβρανικών πρωτεϊνών της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης έχουν δομή β-βαρελιού (β-barrel). Οι πρωτεΐνες με δομή β-βαρελιού έχουν αντιπαράλληλα διαμεμβρανικά τμήματα από β-πτυχώσεις αναδιπλωμένες έτσι να δημιουργούν μία κυλινδρική β-πτυχωτή επιφάνεια, σχηματίζοντας έναν υδρόφιλο πόρο που διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη. Τέτοιες πρωτεΐνες έχουν βρεθεί στις εξωτερικές μεμβράνες των  $gram^-$  βακτηρίων, των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών (Wimley 2003).

Για την εισαγωγή των πρωτεϊνών με δομή β-βαρελιού στην εξωτερική μεμβράνη, οι πρόδρομες πρωτεΐνες εισάγονται στο μιτοχόνδριο μέσω του καναλιού TOM και μετά τα σύμπλοκα των μικρών Tim τα παραλαμβάνουν και τα παραδίδουν στο σύμπλοκο SAM/TOB (Sorting and Assembly Machinery/Topogenesis of outer membrane β-Barrel) που βρίσκεται προσδεμένο στην εξωτερική μεμβράνη. Το σύμπλοκο SAM αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, τη Sam50, τη Sam35 και τη Sam37 (Hoppins and Nargang 2004; Waizenegger, Habib et al. 2004; Habib, Waizenegger et al. 2005). Το κεντρικό μέρος του συμπλόκου SAM σχηματίζεται από την πρωτεΐνη Sam50 (Model,

Prinz et al. 2002; Humphries, Streimann et al. 2005). Η πρωτεΐνη είναι ομόλογη με τη βακτηριακή πρωτεΐνη Omp85, η οποία εισάγει τις πρωτεΐνες με δομή β-βαρελίου στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων. Στο αμινοτελικό μέρος της πρωτεΐνης βρέθηκε ένα υδρόφιλο μέρος εκτεθειμένο στο διαμεμβρανικό χώρο με τη χαρακτηριστική δομή POTRA (POLypeptide TRanslocation Associated). Η δομή POTRA είναι σχετισμένη με την αναγνώριση πολυπεπτιδίων που μεταφέρονται διαμέσω μεμβρανών (Gentle, Burri et al. 2005; Habib, Waizenegger et al. 2007). Το καρβοξυτελικό μέρος της πρωτεΐνης σχηματίζει τον πόρο του καναλιού και έχει δομή β-βαρελίου. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Sam35 και Sam37 δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, έχει όμως βρεθεί ότι η απουσία τους μπλοκάρει την εισαγωγή και τη συγκρότηση πρωτεϊνών με δομή β-βαρελίου (Kozjak, Wiedemann et al. 2003; Paschen, Waizenegger et al. 2003; Gentle, Gabriel et al. 2004) (σχήμα 1.8).

### **1.8 Εισαγωγή πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης προσδεμένων μέσω αλληλουχίας σήματος (Signal-anchored proteins)**

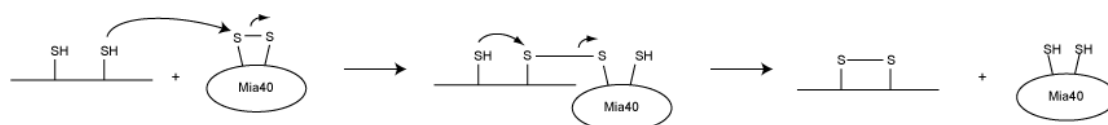
Οι signal anchored πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με προσδεμένο το αμινοτελικό τους τμήμα στην εξωτερική μεμβράνη, ενώ το καρβοξυτελικό τους τμήμα είναι εκτεθειμένο στο κυτταρόπλασμα. Η εισαγωγή αυτών των πρωτεϊνών δεν ενέχει το κανάλι TOM ούτε το σύμπλοκο SAM (Ahting, Waizenegger et al. 2005). Για την εισαγωγή τους, μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, η Mim1 έχει βρεθεί να εμπλέκεται, η οποία έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζει τα μεμβρανικά τμήματα των signal anchored πρωτεϊνών και βοηθάει την εισαγωγή τους στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Becker, Pfannschmidt et al. 2008; Hulett, Lueder et al. 2008; Popov-Celeketic, Waizenegger et al. 2008).



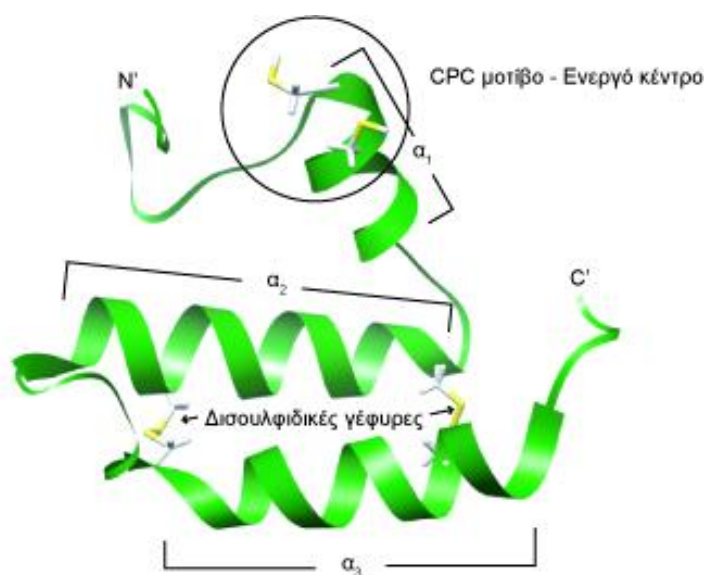
**Σχήμα 1.9.** Το μονοπάτι της οξειδωτικής αναδίπλωσης για την εισαγωγή πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο. Η ανηγμένη πρωτεΐνη εισάγεται στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του TOM. Έπειτα, η οξειδωμένη Mia40 (πράσινο) καταλύει τον σχηματισμό των δισουλφιδικών γεφυρών στο μόριο, αναδιπλώνοντάς το, με αποτέλεσμα να ανάγεται. Η διμερική οξειδωμένη μορφή της Erv1 (κίτρινο) έπειτα, αντιδρά με την ανηγμένη Mia40 και την επανοξειδώνει, με αποτέλεσμα να ανάγεται. Τέλος τα ηλεκτρόνια καταλήγουν από την Erv1 στο οξυγόνο μέσω κυτοχρώματος c και αναπνευστικής αλυσίδας (COX σύμπλοκο – καφέ χρώμα) (Hell 2008).

### 1.9 Εισαγωγή πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού της οξειδωτικής αναδίπλωσης (oxidative folding pathway)

Πολλές από τις πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς στην ώριμη μορφή τους. Οι πρωτεΐνες αυτές διασχίζουν το κανάλι TOM ξεδιπλωμένες και μετά μεταφέρονται στη πρωτεΐνη Mia40 (Mitochondrial Import and Assembly), η οποία καταλύει το σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών με τη βοήθεια της μιτοχονδριακής σουλφιδρυλοξειδάσης Erv1 (Hell 2008). Η αντίδραση που καταλύει η Mia40 φαίνεται παρακάτω:







**Σχήμα 1.10.** Η δομή NMR σε διάλυμα του κεντρικού τμήματος της ανθρώπινης Mia40. Η δομή αποτελείται από δύο  $\alpha$ -έλικες ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) προσδεμένες μεταξύ τους με ενδομοριακές δισουλφιδικές γέφυρες (διπλό CX<sub>9</sub>C μοτίβο) και από μία κοντύτερη  $\alpha$ -έλικα ( $\alpha_1$ ) που προεξέχει πάνω από τις δύο άλλες έλικες και καταλήγει στο ενεργό κέντρο (CPC μοτίβο) της πρωτεΐνης.

Η Mia40 στον σακχαρομύκητα είναι μία πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου προσδεμένη στην εσωτερική μεμβράνη. Εισάγεται στη μεμβράνη μέσω του μονοπατιού διακοπής της μεταφοράς και έπειτα αναδιπλώνεται από την ίδια τη Mia40 (Chacinska, Guiard et al. 2008). Η ομόλογη ανθρώπινη πρωτεΐνη είναι μικρότερη σε μέγεθος. Απουσιάζει το αντίστοιχο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης του σακχαρομύκητα, στο οποίο περιλαμβάνεται το διαμεμβρανικό τμήμα και το σήμα στόχευσης. Η εισαγωγή της Mia40 στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα, που συμβαίνει μέσω του μονοπατιού διακοπής της μεταφοράς. Για τον λόγο αυτό, η ανθρώπινη πρωτεΐνη, σε αντίθεση με αυτή του σακχαρομύκητα, δεν είναι ενσωματωμένη στην εσωτερική μεμβράνη. Η αλληλουχία της πρωτεΐνης περιέχει ένα μοτίβο διπλού CX<sub>9</sub>C (μία κυστεΐνη που ακολουθείται από εννέα αμινοξέα και μία κυστεΐνη) (twin CX<sub>9</sub>C motif) (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004; Terziyska, Lutz et al. 2005). Όπως φαίνεται και από τη δομή της πρωτεΐνης στο διάλυμα που προσδιορίστηκε με μελέτη NMR (σχήμα 1.10), η πρώτη κυστεΐνη του μοτίβου σχηματίζει έναν δισουλφιδικό δεσμό με τη τέταρτη και η δεύτερη με την τρίτη. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα κεντρικό τμήμα, καλά αναδιπλωμένο, ενώ τα

Protein	Type	Protein	Type
γTim9	Cx3C	γCox23	Cx9C
γTim10	Cx3C	γMic14	Cx9C
γTim12	Cx3C	γMic17	Cx9C
γTim8	Cx3C	γMRP10	Cx9C
γTim13	Cx3C	γMDM35	Cx9C
γMia40	Cx9C	YBL059C-A	Cx9C
γCox17	Cx9C	YLR218c	Cx9C
γCox19	Cx9C	Erv1	Other

**Πίνακας 1.1.** Υποστρώματα της Mia40.

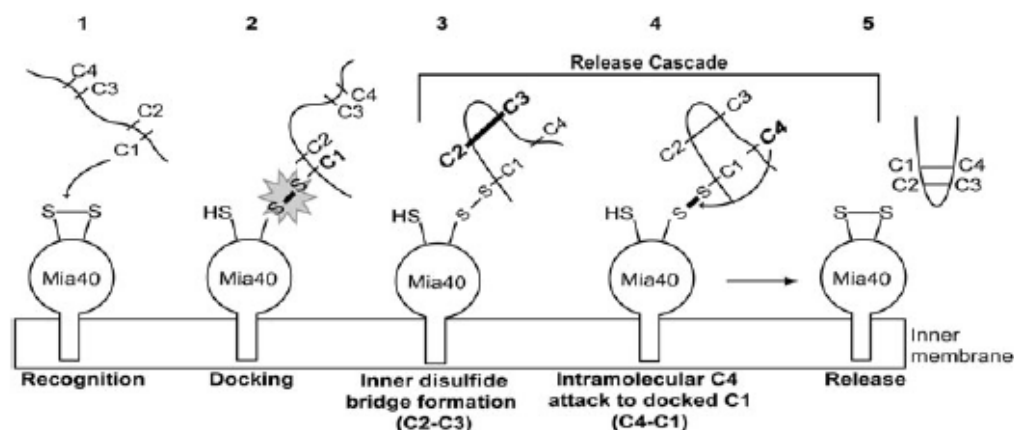
άμινο- και κάρβοξυ- τελικά τμήματα της πρωτεΐνης είναι ευέλικτα (Banci, Bertini et al. 2009).

Το ενεργό μέρος της πρωτεΐνης περιέχει ένα CPC (κυστεΐνη-προλίνη-κυστεΐνη) μοτίβο το οποίο βρίσκεται πάνω από μία υδρόφοβη κοιλότητα που πιθανότατα είναι και το σημείο αναγνώρισης των υποστρωμάτων από τη Mia40. Η Mia40 δρα ως υποδοχέας της εσωτερικής μεμβράνης και σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ της δεύτερης κυστεΐνης του ενεργού της κέντρου (CPC) και του υποστρώματος (Banci, Bertini et al. 2009). Τα περισσότερα υποστρώματα της Mia40 ανήκουν στη κατηγορία των πρωτεϊνών με διπλό CX<sub>n</sub>C μοτίβο. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζεται μία λίστα με υποστρώματα της Mia40 που έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά, καθώς και άλλα προτεινόμενα υποστρώματα (Gabriel, Milenkovic et al. 2007). Η Mia40 πρέπει να βρίσκεται στην οξειδωμένη της μορφή, ώστε να μπορεί να αντιδράσει με την ανηγμένη μορφή του υποστρώματος, δημιουργώντας έναν μεικτό δισουλφιδικό δεσμό. Έπειτα, μία δεύτερη κυστεΐνη από το υπόστρωμα αντιδρά με το ενεργό κέντρο της Mia40, δημιουργώντας τον ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό, αφήνοντας τη Mia40 ανηγμένη. Στη συνέχεια, η Mia40 αντιδρά με την Erv1, η οποία την επανοξειδώνει, μεταφέροντας έναν δισουλφιδικό δεσμό (Mesecke, Terziyska et al. 2005). Έχουμε δηλαδή έναν μηχανισμό ανταλλαγής δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ της Mia40 και της Erv1, κατά αναλογία με το σύστημα της Ero στο ενδοπλασματικό δίκτυο και της Dsb στο περίπλασμα των βακτηρίων (Herrmann, Kauff et al. 2009) (σχήμα 1.9).

Η Erv1 είναι μία σουλφυδρυλοξειδάση που περιέχει ένα φλαβινο αδένινο δινουκλεοτίδιο (FAD) στο ενεργό του κέντρο (Lee, Hofhaus et al. 2000). Ομόλογες

πρωτεΐνες του υπάρχουν και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ero1), όπου λαμβάνουν μέρος στη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών (Fass 2008). Η ομόλογη πρωτεΐνη στον άνθρωπο είναι η ALR, μία πρωτεΐνη που σχετίστηκε αρχικά με την αναγέννηση του συκωτιού, και συναντάται σε διάφορες μορφές (alternative splicing variants) τόσο στο μιτοχόνδριο όσο και στο κυτταρόπλασμα, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης της (Farrell and Thorpe 2005; Pawlowski and Jura 2006).

Ο ρόλος της Ern1 στο μονοπάτι της οξειδωτικής αναδίπλωσης είναι να επανοξειδώνει τη Mia40 μετά την αναγωγή της από το υπόστρωμα μεταφέροντας έναν δισουλφιδικό δεσμό (Rissler, Wiedemann et al. 2005; Mesecke, Bihlmaier et al. 2008). Τα ηλεκτρόνια από τον ανηγμένο δισουλφιδικό δεσμό περνούν στο FAD του ενεργού κέντρου, μεταφέροντας τέλος τα ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα c, το οποίο με τη σειρά του τα μεταφέρει στο σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COX), με αποτέλεσμα να καταλήγουν μοριακό οξυγόνο μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (Allen, Balabanidou et al. 2005) (σχήμα 1.9). Ο ακριβής μηχανισμός της διαδικασίας αυτής είναι ακόμα υπό συζήτηση και ο ρόλος της Ern1 και των ομόλογων πρωτεϊνών της σε μία σειρά από κυτταρικές λειτουργίες ερευνάται ακόμα.

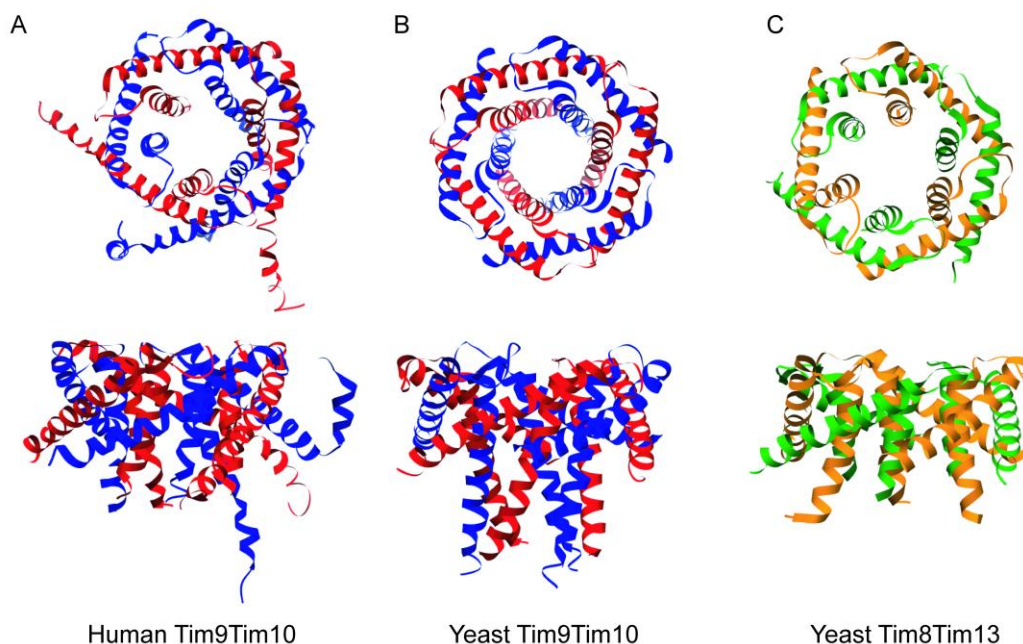


**Σχήμα 1.11.** Μηχανισμός δημιουργίας δισουλφιδικών στα μικρά Tim από τη Mia40. Η οξειδωμένη μορφή της Mia40 αναγνωρίζει το υπόστρωμα (1), και κατόπιν, το ενεργό κέντρο της Mia40 σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με τη πρώτη κυστεΐνη του υποστρώματος (2). Μετά, σχηματίζεται ο ενδομοριακός δεσμός μεταξύ κυστεΐνης 2 και 3 του υποστρώματος (3) και η κυστεΐνη 4 αντιδρά με τη κυστεΐνη 1 που παραμένει προσδεμένη στη Mia40, σχηματίζοντας την άλλη δισουλφιδική γέφυρα (4) και τέλος, το αναδιπλωμένο υπόστρωμα ελευθερώνεται από τη Mia40 (5) (Sideris and Tokatlidis 2007)

## 1.10 Βιογένεση των μικρών Tim πρωτεϊνών.

Οι μικρές Tim πρωτεΐνες είναι μία οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου που σχετίζονται με τη μεταφορά πρωτεϊνών από το κανάλι TOM στην εσωτερική ή την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Όλες τους έχουν ένα διπλό CX<sub>3</sub>C μοτίβο και είναι υποστρώματα της Mia40 (Gentle, Perry et al. 2007). Οι πρωτεΐνες αυτές, όπως οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα, όπου αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης και μεταφέρονται στο κανάλι TOM. Κατά τη παραμονή τους στο κυτταρόπλασμα έχει προταθεί ότι δεσμεύουν ιόντα ψευδαργύρου για τη παρεμπόδιση της αυθόρμητης οξειδωσής τους (Ivanova, Ball et al. 2008). Ο ρόλος των ιόντων ψευδαργύρου στη βιογένεση των μικρών Tim δεν έχει επιβεβαιωθεί. Μετά τη μεταφορά τους από το κανάλι TOM, η Mia40 αναγνωρίζει το σήμα στόχευσής τους (βλέπε κεφάλαιο 3) και καταλύει τον σχηματισμό των δισουλφιδικών γεφυρών. Πρώτα αντιδρά η πρώτη κυστεΐνη, η οποία σχηματίζει ένα μικτό δισουλφιδικό δεσμό με τη Mia40, και έπειτα αυτή αντιδρά με την τέταρτη κυστεΐνη, σχηματίζοντας μία ενδομοριακή δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ της κυστεΐνης 1 και 4. Η κυστεΐνη 4 απαιτείται για την απελευθέρωση της μικρής Tim πρωτεΐνης από τη Mia40 (Milenkovic, Gabriel et al. 2007; Sideris and Tokatlidis 2007) (σχήμα 1.11). Ο τρόπος σχηματισμού της δεύτερης δισουλφιδικής γέφυρας (μεταξύ της κυστεΐνης 2

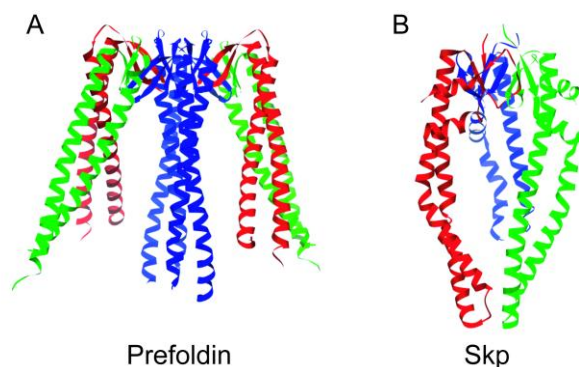
και 3) δεν είναι ακόμη γνωστός, όπως επίσης εάν καταλύεται ο σχηματισμός της από τη Mia40 ή αν γίνεται αυθόρμητα. Στη διαδικασία αυτή ενέχεται μία επιπλέον πρωτεΐνη, η Hot13, ο ρόλος της οποίας παραμένει ασαφής (Mesecke, Bihlmaier et al. 2008). Έπειτα, τα μικρά Tim συνδυάζονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας λειτουργικά ετεροεξαμερή σύμπλοκα (Vial, Lu et al. 2002). Για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου TIM9.10 έχει βρεθεί ότι είναι ότι σημαντικό ρόλο παίζει τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό τμήμα του Tim9 (Vergnolle, Baud et al. 2005), όπως και τα φορτία που βρίσκονται στις φουρκέτες του Tim10 και του Tim9 (Vergnolle, Alcock et al. 2007). Επίσης, για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένες υπομονάδες του Tim9 και του Tim10 (Webb, Gorman et al. 2006; Baker, Webb et al. 2009).



**Σχήμα 1.12.** Κρυσταλλικές δομές των μικρών Tim συμπλόκων. Η δομή του ανθρώπινου TIM9.10 (A) και των συμπλόκων από τον σακχαρομύκητα TIM9.10 (B) και TIM8.13 (C).

### 1.11 Δομή των μικρών Tim συμπλόκων

Η κρυσταλλική δομή για τα σύμπλοκα TIM9.10 του σακχαρομύκητα και του ανθρώπου και του συμπλόκου TIM8.13 του σακχαρομύκητα έχουν λυθεί (Webb, Gorman et al. 2006; Beverly, Sawaya et al. 2008; Baker, Webb et al. 2009). Οι δομές έδειξαν μία καινούργια δομή α-προπέλας με έξι ελάσματα (six-bladed α-propeller structure) (σχήμα 1.12). Τα σύμπλοκα είναι ετεροεξαμερή και αποτελούνται από τρία μόρια Tim9 και τρία μόρια Tim10 στη περίπτωση του TIM9.10 συμπλόκου και τρία μόρια Tim8 και τρία μόρια Tim13 στη περίπτωση του TIM8.13 συμπλόκου. Η συνολική δομή και στις τρεις περιπτώσεις είναι πολύ όμοια. Ένας καθορισμένος πυρήνας έχει σχηματιστεί από το κεντρικό μέρος της κάθε υπομονάδας και ένας κυκλικός πόρος έχει σχηματιστεί στο κέντρο. Οι υπομονάδες είναι αναδιπλωμένες σε μία διαμόρφωση έλικας-φουρκέτας-έλικας (helix-loop-helix conformation) και δισουλφιδικές γέφυρες είναι σχηματισμένες μεταξύ των κυστεϊνών του διπλού CX<sub>3</sub>C μοτίβου. Η δευτεροταγής δομή των ελίκων είναι κατά αποκλειστικότητα α-ελικωτή. Οι κεντρικές φουρκέτες έχουν συμπαγή πεπλατυσμένη διαμόρφωση, σχηματίζοντας



**Σχήμα 1.13.** Κρυσταλλικές δομές της κυτταροπλασματικής σαπερόνης prefoldin (A) και της περιπλασματικής σαπερόνης Skp (B).

μία δομή δακτυλίου. Κάτω από τις δισουλφιδικές γέφυρες, οι αντιπαράλληλες έλικες είναι στην αρχή σε επαφή, σχηματίζοντας σπειρωμένες έλικες (coiled coils) και έπειτα αποκλίνουν. Οι άκρες των ελίκων είναι σημαντικά αποδιαταγμένες. Και τα δύο σύμπλοκα TIM9.10, του ανθρώπου και του σακχαρομύκητα, έχουν τις ίδιες μοριακές επαφές που επηρεάζουν τις δομές τους. Η κύρια διαφορά των δύο δομών είναι τα διαφορετικά μήκη των ελίκων που προεξέχουν από τον κεντρικό πυρήνα.

Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων των μικρών Tim είναι παρόμοιες με τη δομή της κυτταροπλασματικής σαπερόνης prefoldin και της περιπλασματικής σαπερόνης Skp (Korndorfer, Dommel et al. 2004; Walton and Sousa 2004; Stirling, Bakhoun et al. 2006). Η prefoldin είναι ένα σύμπλοκο μεγέθους 90 kDa και αποτελείται από δύο α υπομονάδες και τέσσερις β υπομονάδες. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών οργανισμών και των αρχαίων (Vainberg, Lewis et al. 1998; Leroux, Fandrich et al. 1999). Δεσμεύει τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της μεταγραφής τους χωρίς να αλληλεπιδρά κατευθείαν με το ριβόσωμα. Η prefoldin διαμεσολαβεί στη μεταφορά των πρωτεϊνών στα σύμπλοκα σαπερινονών τύπου II (type II chaperonin complexes), τα οποία αναλαμβάνουν την αναδίπλωσή τους (Martin-Benito, Boskovic et al. 2002; Lundin, Stirling et al. 2004). Τα «πλοκάμια» της μπορούν να δεσμεύουν και να σταθεροποιούν αποδιαταγμένα υδρόφοβα υποστρώματα (Zako, Murase et al. 2006; Ohtaki, Kida et al. 2008). Η κρυσταλλική δομή της prefoldin από το αρχαίο *Methanobacterium thermoautotrophicum* φανέρωσε μία δομή μέδουσας με ένα διπλό πυρήνα δομής β-βαρελιού με έξι μακριά υπερελικωμένα «πλοκάμια» (σχήμα 1. 13). Η Skp είναι ένα τριμερές σύμπλοκο του περιπλάσματος με δράση σαπερόνης που ενέχεται στη βιογένεση πρωτεϊνών της

εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης (Schafer, Beck et al. 1999). Βρίσκεται σε δύο διαμορφώσεις: ελεύθερη στο περίπλασμα ή προσδεμένη στην εσωτερική μεμβράνη (Chen and Henning 1996). Μπορεί να δρα αποτρέποντας την αυθόρμητη εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη ή αποτρέποντας την αναδίπλωση και τη συσσωμάτωση στο περίπλασμα. Η Skp προσδένει τα μεμβρανικά τμήματα των υποστρωμάτων της στη κοιλότητα που σχηματίζουν τα πλοκάμια της, διατηρώντας τις πρωτεΐνες αποδιαταγμένες κατά τη μεταφορά τους διαμέσω του περιπλάσματος (Walton, Sandoval et al. 2009). Οι δομικές ομοιότητες μεταξύ των Skp, prefoldin και μικρών Tim υποδηλώνουν και ομοιότητες στη δράση τους (Alcock, Grossmann et al. 2008). Παρόλο που ο μηχανισμός πρόσδεσης των υποστρωμάτων στα μικρά Tim σύμπλοκα δεν είναι γνωστός, θα μπορούσαμε να προτείνουμε έναν μηχανισμό που θα προϋπόθετε δέσμευση του υποστρώματος από τα «πλοκάμια» των συμπλόκων αυτών μέσω υδρόφοβων ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Stirling, Bakhoun et al. 2006). Αυτό είναι σε συμφωνία με δομικές μελέτες του συμπλόκου TIM9.10 όπου το αμινοτελικό τμήμα της Tim10 ενέχεται στη δέσμευση του υποστρώματος (Vergnolle, Baud et al. 2005). (Για ανασκόπηση της δράσης των μικρών Tim στο μιτοχόνδριο και τη δομή τους δείτε: Petrakis, N. Alcock, F.H. and Tokatlidis, K. (2009), Mitochondrial ATP-independent chaperones (Review), IUBMB Life, accepted, παράρτημα).

### **1.12 Στόχευση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης.**

Εκτός από τα μονοπάτια στόχευσης στην εσωτερική μεμβράνη και τη μήτρα που έχουν μελετηθεί σε μεγάλη λεπτομέρεια, υπάρχουν κατηγορίες μιτοχονδριακών πρωτεϊνών για τη στόχευση των οποίων ελάχιστα είναι γνωστά. Μία κατηγορία τέτοιων πρωτεϊνών είναι οι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης. Υπάρχουν δύο μόνο μελέτες που αφορούν την εισαγωγή πρωτεϊνών αυτής της κατηγορίας στα μιτοχόνδρια. Η πρώτη, αφορά τη πρωτεΐνη Tim11 ή αλλιώς υπομονάδα e της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης (Su e) και της Prohibitin 1. Για την Su e, το μονοπάτι εισαγωγής της φαίνεται να επηρεάζεται από τις σαπερόνες του διαμεμβρανικού χώρου, χωρίς να επηρεάζεται από τη δυσλειτουργία των καναλιών TIM23 και TIM22 (Leuenberger, Bally et al. 1999), ενώ για τη Prohibitin 1, η εισαγωγή της φαίνεται να επηρεάζεται από τη δυσλειτουργία του καναλιού TIM23, ενώ βρίσκεται σε επαφή με



το σύμπλοκο TIM8.13 κατά τη διαδικασία εισαγωγής της στην εσωτερική μεμβράνη (Tatsuta, Model et al. 2005). Στο κεφάλαιο 2 ασχολούμαστε με τη μελέτη της στόχευσης της Tim11 στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

### **1.13 Σήματα στόχευσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών**

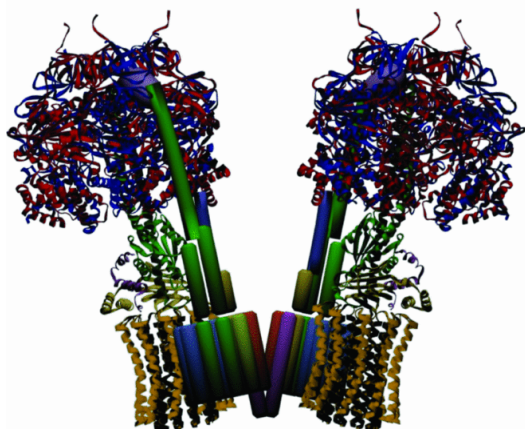
Περίπου οι μισές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες συντίθενται με τυπικό σήμα στόχευσης στο αμινοτελικό τους τμήμα. Τα σήματα στόχευσης αυτά έχουν μήκος από 10 ως 80 υπομονάδες και είναι πλούσια αμινοξέα με θετικά και αρνητικά φορτία (Hurt, Pesold-Hurt et al. 1984). Έχουν την τάση να σχηματίζουν αμφίφιλες  $\alpha$ -έλικες, με τη μία πλευρά υδρόφιλες και φορτισμένες υπομονάδες, ενώ στην άλλη υδρόφοβες (Roise, Horvath et al. 1986; von Heijne 1986). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι πρωτεΐνες που στοχεύονται στη μιτοχονδριακή μήτρα, καθώς και αυτές που στοχεύονται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού διακοπής της μεταφοράς. Υπάρχουν όμως πρωτεΐνες της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης και του διαμεμβρανικού χώρου χωρίς τυπικό σήμα στόχευσης στο αμινοτελικό τους τμήμα. Η πληροφορία στόχευσης για τις πρωτεΐνες αυτές βρίσκεται κάπου μέσα στην αλληλουχία της πρωτεΐνης, χωρίς να αποτελεί ξεχωριστό τμήμα της.

### **1.14 Πρόβλεψη της στόχευσης πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο**

Η μη ύπαρξη καθορισμένης αλληλουχίας που στοχεύει τις πρωτεΐνες μέσα στο μιτοχόνδριο, κάνει δύσκολη την ανάπτυξη αλγορίθμων που προβλέπουν αποτελεσματικά τη στόχευση μιας πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο. Οι υπάρχοντες αλγόριθμοι πρόβλεψης εντοπισμού πρωτεϊνών περιορίζονται στις πρωτεΐνες που περιέχουν κάποια αποκοπτόμενη αλληλουχία στόχευσης, ενώ είναι αναποτελεσματικές για πρωτεΐνες με μη αποκοπτόμενο σήμα στόχευσης (Emanuelsson, von Heijne et al. 2001). Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται τα εργαλεία πληροφορικής που είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο για τη πρόβλεψη της στόχευσης μιας πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο.

Όνομα	Περιγραφή	Διεύθυνση
TargetP	Εργαλείο βασισμένο σε νευρωνικό δίκτυο το οποίο χρησιμοποιεί τις αλληλουχίες του αμινοτελικού τμήματος για να καθορίσει τη στόχευση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες, στο εκκριτικό μονοπάτι ή αλλού. Προβλέπει επίσης το σημείο αποκοπής στη περίπτωση ύπαρξης αποκοπτόμενης αλληλουχίας στόχευσης (Emanuelsson, Nielsen et al. 2000)	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>
PSORT II	Χρησιμοποιεί όλη την αλληλουχία της πρωτεΐνης, καθώς επίσης και τη προέλευσή της (βακτηριακή, σακχαρομύκητα, ζώου ή φυτού) και υπολογίζει διάφορες παραμέτρους που σχετίζονται με την αλληλουχία της, προβλέποντας τη πιθανότητα να στοχευτεί στα διάφορα μέρη του κυττάρου. Για τη στόχευση στο μιτοχόνδριο, η αμινοτελική αλληλουχία χρησιμοποιείται για τη πρόβλεψη της στόχευσης και του σημείου αποκοπής της αλληλουχίας στόχευσης (Nakai and Horton 1999).	<a href="http://www.psort.org/">http://www.psort.org/</a>
MITOPRED	Προβλέπει μιτοχονδριακές πρωτεΐνες από όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η πρόβλεψη βασίζεται στη παρουσία κοινών διαρθρώσεων σε τμήματα πρωτεΐνης από τη βάση δεδομένων Pfam, με βάση τη διαφορετική στόχευση, την αλληλουχία και το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (Sonnhammer, Eddy et al. 1997).	<a href="http://bioinformatics.albany.edu/mitopred/">http://bioinformatics.albany.edu/mitopred/</a>
MioProtII	Προβλέπει αλληλουχίες στόχευσης στη μήτρα στο αμινοτελικό τμήμα της αλληλουχίας και το σημείο αποκοπής (Claros and Vincens 1996).	<a href="http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html">http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html</a>
Predotar	Βασισμένο σε νευρωνικά δίκτυα, αναγνωρίζει αμινοτελικές αλληλουχίες στόχευσης για μιτοχόνδρια, πλαστίδια ή το ενδοπλασματικό δίκτυο (Small, Peeters et al. 2004).	<a href="http://urgi.inbio.gen.fr/predotar/predotar.html">http://urgi.inbio.gen.fr/predotar/predotar.html</a>

**Πίνακας 1.2.** Κατάλογος των διαθέσιμων εργαλείων πρόβλεψης της στόχευσης στο μιτοχόνδριο.



**Σχήμα 1.14.** Η ATP συνθάση του μιτοχονδρίου στη διμερική της μορφή.

---

### **1.15 Υπομονάδα e της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης (Subunit e of the $F_0/F_1$ ATP – synthase)**

Η  $F_0/F_1$  ATP συνθάση είναι ένα ογκώδες ενζυμικό σύμπλοκο της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης που συνθέτει ATP χρησιμοποιώντας την ενέργεια από τη διαφορά δυναμικού ( $\Delta\Psi$ ) που προκαλείται από τη ροή ηλεκτρονίων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Η ATP συνθάση συνθέτει το μεγαλύτερο μέρος του ATP που χρησιμοποιεί ο οργανισμός. Το υδρόφιλο τμήμα, που βρίσκεται στη μήτρα ( $F_1$ ), αποτελείται από 5 υπομονάδες ενώ το υδρόφοβο ( $F_0$ ) αποτελείται από 12 υπομονάδες και διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη. Ακόμη, έχουν βρεθεί 4 επιπλέον υπομονάδες με ρυθμιστικό ρόλο (πίνακας 1.3) (Devenish, Prescott et al. 2000; Ackerman and Tzagoloff 2005).

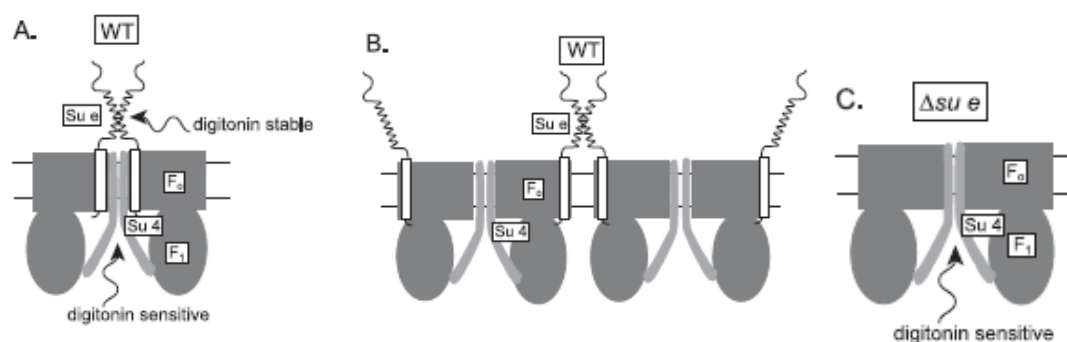
Η υπομονάδα e (Su e) της  $F_0/F_1$  ATP συνθάσης είναι μία πρωτεΐνη που βρίσκεται στο μεμβρανικό μέρος ( $F_0$ ) της ATP συνθάσης (Walker, Lutter et al. 1991). Είναι προσδεμένη στην εσωτερική μεμβράνη με το αμινοτελικό τμήμα της ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα της είναι εκτεθειμένο στο διαμεμβρανικό χώρο (Belogradon, Tomich et al. 1996). Είναι μία συντηρημένη πρωτεΐνη, αφού υπάρχει στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Higuti, Kuroiwa et al. 1992; Arnold, Bauer et al. 1997).

TABLE I  
YEAST ATP SYNTHASE GENES AND THEIR PRODUCTS

Role	Gene <sup>a</sup>	Subunit	Growth on YPEG <sup>b</sup> of deletion mutant	F <sub>1</sub> -ATPase activity in deletion mutant	
F <sub>1</sub> subunits	<i>ATP1</i>	$\alpha$	-	none	
	<i>ATP2</i>	$\beta$	-	none	
	<i>ATP3</i>	$\gamma$	-	none	
	<i>ATP16</i>	$\delta$	-	none	
F <sub>0</sub>	<i>ATP15</i>	<i>e</i>	leaky	reduced	
	<i>ATP5</i>	OSCP	-	O-f	
	<i>ATP4</i>	b	-	O-I	
	<i>ATP6/di2<sup>mtDNA</sup></i>	a	-	O-I	
	<i>ATP9/di1<sup>mtDNA</sup></i>	c	-	O-I	
	<i>ATP8/asp1<sup>mtDNA</sup></i>	s	-	O-I	
	<i>ATP7</i>	d	-	O-I	
	<i>ATP17</i>	f	-	O-I	
	<i>ATP14</i>	h/F6	-	O-I	
	<i>ATP18</i>	i/j	-	O-I	
	Associated proteins	Dimer-specific	<i>ATP21/TIM11</i>	e	+
<i>ATP20</i>			g	+	O-S
<i>ATP19</i>			k	+	O-S
Regulatory	<i>INH1</i>	Inh1p	+	O-S	
	<i>STF1</i>	Stf1p	+	O-S	
	<i>STF2</i>	Stf2p	+	O-S	
	<i>STF3</i>	Stf3p	+	O-S	

**Πίνακας 1.3.** Οι υπομονάδες που της F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP συνθάσης του μιτοχονδρίου που έχουν μέχρι στιγμής ανακαλυφθεί στον σακχαρομύκητα (Velours and Arselin 2000).

Η πρωτεΐνη από το σακχαρομύκητα έχει μήκος 96 αμινοξέα και δεν είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του οργανισμού. Αρχικά αναγνωρίστηκε ως μία πρωτεΐνη που ενέχεται στη στόχευση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη (Tim11) (Tokatlidis, Junne et al. 1996; Haucke, Ocana et al. 1997), αργότερα όμως αποδείχθηκε ότι πρόκειται για την υπομονάδα e της ATP συνθάσης (Arnold, Bauer et al. 1997). Η Su e βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη σε μία διμερή μορφή και είναι σε επαφή με την υπομονάδα g (Su g) (Arnold, Pfeiffer et al. 1998; Brunner, Everard-Gigot et al. 2002; Paumard, Vaillier et al. 2002). Το καρβοξυτελικό τμήμα της έχει προβλεφθεί ότι σχηματίζει σπειρωμένες έλικες (coiled coils) (Arnold, Bauer et al. 1997). Η Su e βρέθηκε κατά αποκλειστικότητα στη διμερή μορφή της ATP συνθάσης που απομονώθηκε μετά από διαλυτοποίηση των μιτοχονδρίων με το απορρυπαντικό digitonin, μαζί με τις υπομονάδες g και k (Arnold, Pfeiffer et al. 1998). Σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τη Su e, η Su g έχει επίσης ελαττωθεί, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών, μία αλληλεπίδραση που εξαρτάται από το μεμβρανικό τμήμα της Su e (Arnold, Pfeiffer et al. 1998; Brunner, Everard-Gigot et al. 2002). Η ύπαρξη διμερών της ATP συνθάσης απουσία της Su e, φανερώνει ότι η ATP συνθάση μπορεί να υπάρξει σε μία διμερή μορφή που είναι



**Σχήμα 1.15.** Η συμμετοχή της Su e στον σχηματισμό των ολιγομερών της ATP συνθάσης. A. και B. Δύο διαφορετικά μοντέλα για την αλληλεπίδραση της Su e για τον σχηματισμό διμερών. Στο A, η Su e σταθεροποιεί επιπλέον τα διμερή τα οποία έχουν σχηματιστεί μέσω αλληλεπίδρασης της Su 4. Στο B, η Su e αλληλεπιδρά με διαφορετικά διμερή που έχουν σχηματιστεί από την αλληλεπίδραση μέσω της Su 4. C. Στα στελέχη που απουσιάζει η Su e ( $\Delta su e$ ) σχηματίζονται διμερή ευαίσθητα στην digitonin μέσω του Su 4 (Everard-Gigot, Dunn et al. 2005)

ευαίσθητη στη παρουσία του απορρυπαντικού digitonin, μέσω αλληλεπίδρασης της υπομονάδας 4 (Su 4) (Gavin, Prescott et al. 2005; Fronzes, Weimann et al. 2006). Η Su e απαιτείται για την ύπαρξη ολιγομερών μορφών της ATP συνθάσης, μέσω coiled coil αλληλεπιδράσεων του καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης (Everard-Gigot, Dunn et al. 2005) (σχήμα 1.15). Μέσα στο μεμβρανικό της τμήμα η Su e έχει ένα μοτίβο GXXXG, το οποίο είναι εμπλεγμένο με το διμερισμό πρωτεϊνών (Arselin, Giraud et al. 2003; Bustos and Velours 2005). Παρόλο που η παρουσία του έχει σχετιστεί με τη δημιουργία σταθερών διμερών της ATP συνθάσης, η NMR δομή του μεμβρανικού τμήματος της Su e σε μικκύλια δωδεκυλοφωσφοχολίνης έδειξε ότι είναι μονομερές. Ακόμη, ο σχηματισμός Su e – Su e ομοδιμερών δε δείχθηκε να σχετίζεται με το μεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης, οπότε το μοτίβο αυτό πιθανότατα να μην είναι μοτίβο διμερισμού της Su e, αλλά να σχετίζεται με αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με άλλες υπομονάδες, όπως η Su g. Η μελέτη με NMR της αμινοτελικής περιοχής του Su e σε μικκύλια έδειξε πως το μεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης είναι α-ελικωτό μονομερές, με την αργινίνη στη θέση 21 να είναι στο πάνω μέρος της μεμβράνης και να αλληλεπιδρά με τις κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Η αργινίνη στη θέση 8 είναι βυθισμένη μέσα στη λιπιδική φάση, πράγμα ασυνήθιστο για φορτισμένο αμινοξύ (Yao, Stuart et al. 2008).

Η απουσία της Su e από τα μιτοχόνδρια επιφέρει μορφολογικές αλλαγές στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Οι πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης (κρίστα) απουσιάζουν σε στελέχη που δεν εκφράζουν τη Su e, αποκτώντας μία ξεδιπλωμένη μορφή (onion-like mitochondria) (Paumard, Vaillier et al. 2002; Arselin,

Vaillier et al. 2004). Η μορφολογική διαφορά αυτή έχει αποδοθεί στην απουσία των ολιγομερικών μορφών της ATP συνθάσης (Minauro-Sanmiguel, Wilkens et al. 2005). Μία άλλη πρωτεΐνη που σχετίζεται στη διαμόρφωση των πτυχώσεων της εσωτερικής μεμβράνης είναι η πρωτεΐνη Mgm1, που επιπλέον σχετίζεται με τη σύντηξη των μιτοχονδρίων (mitochondrial fusion). Η απενεργοποίηση του γονιδίου της Mgm1 στο σακχαρομύκητα αλλάζει τη μορφολογία της εσωτερικής μεμβράνης όπως στη περίπτωση των στελεχών που δεν εκφράζουν τη Su e. Η μορφολογική αυτή διαφορά οφείλεται πιθανότατα στην απουσία της Su e, αφού στα στελέχη που δεν εκφράζεται η Mgm1, έχει ελαττωθεί σημαντικά η Su e. Η απουσία του Su e και οι μορφολογικές ανακατατάξεις που επιφέρει στις πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης επηρεάζει τη ποσότητα του κυτοχρώματος c στο μιτοχόνδριο. Το κυτόχρωμα c, βασικό συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας, βρίσκεται συγκεντρωμένο στις εσωτερικές πτυχώσεις του μιτοχονδρίου. Η ελάττωση της ποσότητας του κυτοχρώματος c σε στελέχη που απουσιάζει το Su e, σχετίζεται πιθανότητα με τη διάνοιξη των πτυχώσεων της εσωτερικής μεμβράνης (Amutha, Gordon et al. 2004).

Στο κεφάλαιο 3 χρησιμοποιούμε τη Su e ως παράδειγμα μιτοχονδριακής πρωτεΐνης της εσωτερικής στιβάδας με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπικό σήμα στόχευσης, για τη μελέτη του μονοπατιού της στόχευσης στην εσωτερική μεμβράνη.

## Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

A. Μονοπάτι στόχευσης στο μιτοχόνδριο πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης

- Τι χρειάζεται η Su e για να ενσωματωθεί στην εσωτερική μεμβράνη
- Προσδιορισμός του σήματος στην αλληλουχία της Su e που στέλνει τη Su e στο μιτοχόνδριο
- Προσδιορισμός των πρωτεϊνών που στοχεύονται μέσω αυτού του μονοπατιού

B. Στόχευση στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω μονοπατιού της Mia40

- Αναγνώριση της αλληλουχίας που δεσμεύεται μη δεσμικά με τη Mia40
- Αναγνώριση του είδους της αλληλεπίδρασης μεταξύ Mia40 και αλληλουχίας στόχευσης
- Προσδιορισμός και ανάλυση των αλληλουχιών στόχευσης στη Mia40
- Εύρεση πιθανών σημάτων στόχευσης στα υποστρώματα της Mia40

# **Κεφάλαιο 2**

## **Υλικά και μέθοδοι.**



## 2.1 Κλωνοποίηση πλασμιδίων.

Η αγρίου τύπου Su e ενισχύθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές από γενομικό DNA του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* με έναν επίτοπο πέντε μεθειονινών στο καρβοξυτελικό της άκρο, και κλωνοποιήθηκε σε βακτηριακό φορέα (πλασμίδιο) pSP65 με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων EcoRI και BamHI. Το ΔN23 μετάλλαγμα ενισχύθηκε ως θραύσμα με EcoRI και BamHI άκρα από το πλασμίδιο pSP65Su e WT και κλωνοποιήθηκε επίσης σε βακτηριακό φορέα pSP65. Με τον ίδιο τρόπο η Su e και η ΔN23 Su e κλωνοποιήθηκαν σε βακτηριακό φορέα pQE60 χωρίς τον επίτοπο των πέντε μεθειονινών στο καρβοξυτελικό άκρο, που υπερεκφράζει τη πρωτεΐνη με επίτοπο έξι ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο.

Η Mia40 ενισχύθηκε μέσω αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές από το πλασμίδιο pGEXMia40 (Sideris and Tokatlidis 2007) χωρίς τα 244 (ΔN244Mia40) ή τα 290 (ΔN290Mia40) αμινοτελικά αμινοξέα της και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pET22 (Novagen) με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων BamHI και XhoI. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε το πλασμίδιο pET22ΔN244Mia40, που εκφράζει τη Mia40 χωρίς τα 244 αμινοτελικά αμινοξέα της και με έναν επίτοπο έξι ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της τμήμα και το pET22ΔN290Mia40, που εκφράζει τη Mia40 χωρίς τα 290 αμινοτελικά αμινοξέα της και με έναν επίτοπο έξι ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της τμήμα. Από αυτά τα πλασμίδια δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα SPS μεταλλάγματα, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Stratagene QuickChange site-directed mutagenesis kit), όπου οι κυστεΐνες του ενεργού κέντρου (CPC) έχουν μεταλλαχθεί σε σερίνες (SPS). Η Tim10 ενισχύθηκε μέσω αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές από το πλασμίδιο pGEXTim10 (Vergnolle, Baud et al. 2005) χωρίς τα 30 (ΔN30Tim10) ή τα 39 (ΔN39Tim10) αμινοτελικά αμινοξέα της και κλωνοποιήθηκε στα πλασμίδια pGEX-4T1 (Amersham) με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων BamHI και EcoRI και pSP64polyA (Promega) με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων BamHI και SacI. Οι εκδόσεις της Tim10 που εισήχθησαν στο πλασμίδιο pSP64polyA έφεραν τρεις επιπλέον μεθειονίνες στο καρβοξυτελικό τους τμήμα, ώστε να έχουμε ενισχυμένη ραδιοσήμανση από ραδιενεργό θείο. Η ITS-ΔN23-Su e δημιουργήθηκε με προσθήκη της αλληλουχίας αμινοξέων από τη θέση 30 ως 39 της Tim10 (ITS) στην ΔN23 Su e

C28S μέσω αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές από το πλασμίδιο pSP65ΔN23 Su e C28S και κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο pSP65 με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων BamHI και EcoRI. Το πλασμίδιο pSP65ΔN23 Su e C28S δημιουργήθηκε από το πλασμίδιο pSP65ΔN23 Su e (κεφάλαιο 2) μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Stratagene QuickChange site-directed mutagenesis kit), μεταλλάσσοντας τη κυστεΐνη 28 (θέση 5 στη ΔN23) σε σερίνη.

## 2.2 Μεταλλαξιγένεση της Su e

Τα μεταλλάγματα της Su e παρήχθησαν μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Stratagene QuickChange site-directed mutagenesis kit) από το πλασμίδιο pSP65Su e. Η αλληλουχία των πλασμιδίων πιστοποιήθηκε μέσω αντίδρασης προσδιορισμού της αλληλουχίας (sequencing).

## 2.3 Απομόνωση μιτοχονδρίων

Κύτταρα σακχαρομύκητα μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε γαλακτικό οξύ μέχρι να φτάσουν την οπτική πυκνότητα ( $OD_{600}$ ) 1 ως 1,5. Τα κύτταρα μαζεύτηκαν με φυγοκέντρηση και έπειτα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα DTT (100 mM Tris- $H_2SO_4$  pH 8.0, 10 mM DTT), σε συγκέντρωση 2 gr/ml και επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 30°C. Έπειτα τα κύτταρα μαζεύτηκαν με φυγοκέντρηση και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα πέψης (1,2 M σορβιτόλη, 20 mM KPi pH 7,4, 1 mM PMSF, 2,5 mg/g ζυμολύαση) σε συγκέντρωση 0,15 g/ml και επώαστηκαν ωσότου η απορρόφηση του διαλύματος στα 600 nm να μειωθεί στο 10-20% της αρχικής στους 30°C. Με αυτόν τον τρόπο γνωρίζουμε ότι η ζυμολύαση (Zymolyase 20T, 900 U/g, Seikagaku co.) έχει πέσει το κυτταρικό τοίχωμα του σακχαρομύκητα. Οι σφαιροπλάστες που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία απομονώνονται με φυγοκέντρηση και ξεπλύθηκαν με διάλυμα πλύσης (1,2 M σορβιτόλη, 20 mM HEPES pH 7,4, 1 mM PMSF). Η διαδικασία από το σημείο αυτό και μετά πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά στους 4°C. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε BB (breaking buffer, 0,6M σορβιτόλη, 20 mM HEPES pH 7.4) και τα κύτταρα έσπασαν με τη χρήση ομογενοποιητή προσεκτικά χωρίς να σπάσουν τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν από τα υπόλοιπα κυτταρικά μέρη μέσω διαδοχικών φυγοκεντρήσεων και η συγκέντρωση των ανεπεξέργαστων μιτοχονδρίων (crude

preparation) προσδιορίστηκε μετρώντας την απορρόφηση στα 280 nm. Περαιτέρω καθαρισμός των μιτοχονδρίων επιτεύχθηκε με φυγοκέντρηση βαθμιδώματος συγκέντρωσης (gradient) Nycodenz (Axis-shield Diagnostics). Τα ανεπεξέργαστα μιτοχόνδρια τοποθετήθηκαν στο πάνω μέρος βαθμιδώματος συγκέντρωσης (gradient) Nycodenz που αποτελούνταν από δύο φάσεις, 20% Nycodenz στη κάτω φάση και 14.5% Nycodenz στη πάνω φάση. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 45 λεπτά στα 25,000 g. Τα μιτοχόνδρια συγκεντρώνονται σε μία ευδιάκριτη ζώνη στη μεσοεπιφάνεια των δύο φάσεων. Από εκεί, τα καθαρά μιτοχόνδρια απομονώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα BB σε συγκέντρωση 20 mg/ml. Τα μιτοχόνδρια φυλάχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση (Glick, Wachter et al. 1991).

#### **2.4 Απομόνωση ανασυνδιασμένης Su e-His, ΔN23 Su e-His, HisTim9 και HisTim10 από βακτήρια.**

Η Su e-His και η ΔN23 Su e-His απομονώθηκαν από βακτήρια *E. coli* που έφεραν πλασμίδιο pQE60, ενώ η HisTim9 και η HisTim10 από βακτήρια *E. coli* που έφεραν τα πλασμίδια pET28Tim9 και pRSETTim10 αντίστοιχα, τα οποία επήχθησαν για τρεις ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$ . 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  $4^{\circ}\text{C}$ . Οι πρωτεΐνες σε αυτή τη διαδικασία κατακρημνίζονται στη πελέτα, εκτός από τη ΔN23 Su e που παραμένει στο υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση. Η Su e-His, η HisTim9 και η HisTim10 απομονώθηκαν μετά από επαναδιάλυση της πελέτας σε αποδιατακτικό διάλυμα, ενώ η ΔN23 Su e-His απομονώθηκε από το υπερκείμενο. Στη περίπτωση του ΔN23, 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. Η πρωτεΐνη εκλούστηκε από τα σφαιρίδια με διάλυμα A + 300 mM ιμιδαζόλιο. Διαφορετική διαδικασία ακολουθήθηκε για τις πρωτεΐνες που βρέθηκαν στη πελέτα. Οι πελέτες επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα B (8M ουρία, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0) και επώαστηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στα 21.000 g σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αραιώθηκε με διάλυμα A, ώστε η συγκέντρωση της ουρίας να μειωθεί στα 6 M και προσδέθηκε σε Ni-NTA σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν διαδοχικά με διαλύματα 6 M, 4 M ουρία, 2 M ουρία και 0 M ουρία σε διάλυμα A. Τέλος, η

προσδεμένη πρωτεΐνη εκλούστηκε από τα σφαιρίδια με 300 mM ιμιδαζόλιο σε διάλυμα A.

## 2.5 Απομόνωση Tim10 από βακτήρια

Η GST-Tim10 απομονώθηκε από βακτήρια *E. coli* που έφερε το πλασμίδιο pGEXTim10. Τα βακτήρια, μετά την επαγωγή τους, μεγάλωσαν στους 18°C για 12 τουλάχιστον ώρες. 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 (sonicator). Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο επώαστηκε με σφαιρίδια γλουταθειώνης (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 γλουταθειώνη, 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 πηκτικής (Gel filtration), χρησιμοποιώντας στήλη S75 superdex (GE Healthcare).

## 2.6 Καθαρισμός πρωτεϊνών ΔN244Mia40, ΔN244Mia40 SPS, ΔN290Mia40, ΔN290Mia40SPS, ΔN30Tim10 και ΔN39Tim10

Οι ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες εκφράστηκαν στο στέλεχος του *E. coli* BL21 (DE3) από τα pET22 ή τα pGEX πλασμίδια. Από τα pGEX πλασμίδια οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν συντηγμένες με τη GST στο αμινοτελικό τους τμήμα. Τα κύτταρα που έφεραν τα pET22 πλασμίδια συλλέχθηκαν μετά από τρίωρη επαγωγή με IPTG (0,4 mM) για τρεις ώρες στους 37°C. 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 ανιονανταλλαγής (anion exchange chromatography) με τη χρήση στήλης MonoQ HR 5/5 (Pharmacia Biotech). Τα κύτταρα που έφεραν τα pGEX πλασμίδια μετά την

επαγωγή τους, μεγάλωσαν στους 18°C για 12 τουλάχιστον ώρες. 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. Το υπερκείμενο επώαστηκε με σφαιρίδια γλουταθειώνης-αγαρόζης (GST-agarose beads, Sigma) για 6 ώρες ώστε να προσδεθούν οι πρωτεΐνες. Κατόπιν, τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A και οι προσδεμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διάλυμα έκλουσης (10 mM γλουταθειώνη, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4). Στο διάλυμα αυτό προστέθηκε θρομβίνη 5 U/ml. Η θρομβίνη παρέμεινε για να αποκόψει τον επίτοπο της GST από τη πρωτεΐνη για 6 ώρες. Μετά την αποκοπή, η θρομβίνη απενεργοποιήθηκε με 1 mM PMSF και οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το μείγμα με χρωματογραφία πηκτικής (Gel filtration), χρησιμοποιώντας στήλη S75 superdex (GE Healthcare).

## 2.7 Εισαγωγή ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης σε μιτοχόνδρια

Η ραδιοσημασμένη με <sup>35</sup>S πρόδρομη πρωτεΐνη συντέθηκε με τη χρήση του συστήματος *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης TNT της Promega. Η ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη εισήχθη σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (50 µg ανά αντίδραση) παρουσία 2 mM ATP και 2,5 mM NADH για 20 λεπτά στους 30°C. Τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 1,2 M σορβιτόλη, 20 mM HEPES pH 7,4 και έπειτα η μη εισαγμένη πρωτεΐνη αποικοδομήθηκε με πρωτεόλυση από τη πρωτεΐνάση K (PK). Τέλος, τα μιτοχόνδρια αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Οι μιτοπλάστες δημιουργήθηκαν με ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης μέσω ώσμωσης. Τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε υποτονικό διάλυμα (20 mM HEPES, pH 7,4). Οι μιτοπλάστες απομονώθηκαν με φυγοκέντρωση. Στο υπερκείμενο αυτής της διαδικασίας προστέθηκε 10% τριχλωροοξικό οξύ (TCA) για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες του. Το ίζημα που προέκυψε μετά τη καταβύθιση με TCA φορτώθηκε σε πηκτική ακρυλαμίδου και αναλύθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE. Οι μιτοπλάστες επίσης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE. Για τον διαχωρισμό των μεμβρανικών πρωτεϊνών από τις διαλυτές, τα μιτοχόνδρια επώαστηκαν σε διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM για 30 λεπτά. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν στα 25.000 g και το υπερκείμενο υπέστη καταβύθιση με TCA. Το υπερκείμενο και η πελέτα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE. Οι ραδιενεργές πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με αυτοραδιογραφία.

## 2.8 Ενσωμάτωση σε μιτοπλάστες

Οι μιτοπλάστες δημιουργήθηκαν από μιτοχόνδρια που υπέστησαν ωσμωτικό σοκ με υποτονικό διάλυμα (20 mM HEPES/KOH pH 7,4) με ή χωρίς τη προσθήκη πρωτεΐνης K (PK). Για κάθε αντίδραση 50 µg μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε. Η PK απενεργοποιήθηκε με προσθήκη PMSF (1 mM). Οι μιτοπλάστες φυγοκεντρήθηκαν και έπειτα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 1,2 M σορβιτόλη, 20 mM HEPES pH 7,4. Η ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη ενσωματώθηκε στους μιτοπλάστες με επώαση παρουσία 2 mM ATP και 2,5 mM NADH για 20 λεπτά στους 30°C. Οι μιτοπλάστες αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Για τον διαχωρισμό των μεμβρανικών πρωτεϊνών από τις διαλυτές, οι μιτοπλάστες επώαστηκαν σε διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM για 30 λεπτά. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν και υπερκείμενο υπέστη καταβύθιση με TCA. Το υπερκείμενο και η πελέτα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Οι ραδιενεργές πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με ραδιοαποτύπωση.

## 2.9 Παρασκευή λιποσωμάτων

12 mg φωσφατιδυλοχολίνη σε χλωροφόρμιο τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη. Το χλωροφόρμιο απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου για 30 λεπτά. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα που περιείχε 150 mM KCl, 50 mM Tris pH 7,4 και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Αλληπάλληλοι κύκλοι παγώματος/ξεπαγώματος (10 sec σε υγρό άζωτο, 50 sec σε υδατόλουτρο στους 50°C), δημιούργησαν τα λιποσώματα. Τα λιποσώματα ομογενοποιήθηκαν περνώντας από φίλτρο αποκλεισμού (extruder) με πόρους 100 nm για 10 φορές.

## 2.10 Πρόσδεση στα λιποσώματα

Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που προήλθε από καθίζηση μετά από επεξεργασία με κορεσμένο διάλυμα (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> επαναδιαλύθηκε σε αποδιατακτικό διάλυμα (8 M ουρία, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM DTT) και επώαστηκε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. 0,5 µg αποδιαταγμένη πρωτεΐνη επώαστηκε με 50 µl αιωρήματος λιποσωμάτων σε συγκέντρωση 5 mg/ml σε διάλυμα 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,4 (+ΔΨ) ή 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,4 (-ΔΨ) για 30 λεπτά στους 22°C. Το μίγμα της αντίδρασης αραιώθηκε με 50 µl διαλύματος σουκρόζης 2,4 M 150 mM NaCl (ή KCl), 20 mM HEPES pH 7,4 (τελική

συγκέντρωση σουκρόζης: 1,2 M). Το δυναμικό διάχυσης ( $\Delta\Psi$ ) δημιουργήθηκε με προσθήκη του ειδικού για κάλιο ιονοφόρου βαλινομυκίνη (0,4  $\mu\text{M}$ ), εξαιτίας αυθόρμητης διάχυσης των ιόντων καλίου από το εσωτερικό των λιποσωμάτων στη περίπτωση που είχαμε εξωτερικό διάλυμα NaCl. Το διάλυμα αυτό σκεπάστηκε από 100  $\mu\text{l}$  διαλύματος σουκρόζης 0,25 M, δημιουργώντας βαθμίδωμα συγκέντρωσης σουκρόζης (sucrose gradient). Τα δείγματα φυγοκντρήθηκαν στα 100,000 g για τρεις ώρες στους 22<sup>0</sup>C. Με αυτόν τον τρόπο τα λιποσώματα λόγω χαμηλότερης πυκνότητας ανέβηκαν στην επιφάνεια του βαθμιδώματος, παρασέρνοντας μαζί τη πρωτεΐνη που ήταν ενσωματωμένη σε αυτά.

### 2.11 In vitro πρόσδεση σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA Beads)

Ραδιοσημασμένη με <sup>35</sup>S Su e ή ΔN23 Su e συντέθηκε παρουσία καθαρισμένης πρωτεΐνης Tim9, Tim10 που έφεραν επίτοπο έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό τους άκρο ή TIM9.10 συμπλόκου που δημιουργήθηκε από Tim9 που έφερε επίτοπο έξι ιστιδινών και Tim10 που δεν έφερε κάποιον επίτοπο. Το μείγμα έπειτα επώαστηκε για 1 ώρα με σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads) για να προσδεθεί η πρωτεΐνη με τον επίτοπο των έξι ιστιδινών. Τα σφαιρίδια έπειτα ξεπλύθηκαν για να αποκολληθεί η μη προσδεμένη πρωτεΐνη και έπειτα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

Καθαρισμένη ΔN290Mia40 SPS επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads, Qiagen) για 20 λεπτά στους 4 <sup>0</sup>C. 1  $\mu\text{g}$  καθαρής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ανά  $\mu\text{l}$  σφαιριδίων. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με το ανάλογο διάλυμα πρόσδεσης (150 – 500 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 15 mM Ιμιδαζόλιο, 0,1% BSA, 0,01 – 0,5% Triton). Ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες παράχθηκαν με τη χρήση του συστήματος *in vitro* μεταγραφής/μετάφρασης TnT της Promega. Μετά την αντίδραση μετάφρασης της πρωτεΐνης, στο μείγμα της αντίδρασης προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> με αποτέλεσμα να καταβυθιστούν οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες, ενώ οι γλοβίνες που ήταν παρούσες στο μείγμα της αντίδρασης παρέμειναν διαλυτές. Οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες επαναδιαλύθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα (8 M ουρία, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM DTT) σε όγκο ίσο με τον όγκο της αντίδρασης πριν τη καταβύθιση με (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το μείγμα επώαστηκε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. 5  $\mu\text{l}$  αποδιαταγμένης πρωτεΐνης και 20  $\mu\text{l}$  σφαιριδίων νικελίου σε διάλυμα πρόσδεσης, με ή χωρίς

ΔN290Mia40 SPS προσδεμένη σε αυτά, χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Ο όγκος της κάθε αντίδρασης συμπληρώθηκε στα 200 μl με διάλυμα πρόσδεσης. Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 2 ώρες στη κατάλληλη θερμοκρασία. Μετά την επώαση, τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ξεπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα πρόσδεσης, 180 μl κάθε φορά. Τα σφαιρίδια φορτώθηκαν σε πηκτή ακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν με αυτοραδιογραφία.

## 2.12 Μέθοδος συστοιχίας πεπτιδίων

Χρησιμοποιήσαμε μεμβράνη με συστοιχία πεπτιδίων από τη Su e (30 δεκατριομερή που αλληλεπικαλύπτονται ανά 10 αμινοξέα – JPT Peptide Technologies). Η καθαρισμένη πρωτεΐνη (200 ng) επώαστηκε με τη μεμβράνη σε διάλυμα 100 mM KCl, 30 mM Tris pH 8,0, 5% sucrose, 0,1% Tween-20, 0,5% BSA) για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από ξεπλύματα, η προσδεμένη στη μεμβράνη πρωτεΐνη μεταφέρθηκε σε μεμβράνη PVDF και η προσδεμένη πρωτεΐνη ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση (Western blotting).

## 2.13 Υπολογιστικές μέθοδοι

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ραδιενεργών ζωνών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα της Molecular Dynamics Image Quant 5.2. Η τρισδιάστατη απεικόνιση των πρωτεϊνικών συμπλόκων έγινε με το πρόγραμμα UCSF Chimera 1.3 ([www.cgl.ucsf.edu/chimera/](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/)). Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των πρωτεϊνών από το μιτοχονδριακό πρωτόμοιο χρησιμοποιήθηκε η Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>). Ο προσδιορισμός των πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων έγινε με τα προγράμματα TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) και TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)). Ο προσδιορισμός συντηρημένων τμημάτων της Su e, και η ευθυγράμμιση (alignment) αλληλουχιών έγινε με τα εργαλεία του ExPASy Proteomic Server ([expasy.org](http://expasy.org)). Τα πλασμίδια σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Invitrogen Vector NTI advance 10.0. Ο σχεδιασμός και η απεικόνιση των πρωτεϊνών σε μορφή α-έλικας έγινε με τη χρήση του προγράμματος helical wheel viewer for alpha helices του University of Virginia in Charlottesville (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>).



## 2.14 Φασματοσκοπία φθορισμού

Καθαρισμένη ΔN244 Mia40 ή ΔN244 Mia40 SPS τοποθετήθηκε σε κυψελίδα φθορίμετρου σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M. Η κυψελίδα διεγέρθηκε στα 278 nm και καταγράφηκε το φάσμα εκπομπής από τα 300 ως τα 500 nm, με τη βοήθεια φθορίμετρου (Varion Cary Eclipse). Έπειτα, προστέθηκε DTT σε συγκέντρωση 1 mM ή το πεπτίδιο ITS (met-phe-asn-lys-leu-val-asn-asn-cys) σε διάφορες συγκεντρώσεις, διαλυμένο σε DMSO, και το φάσμα εκπομπής έπειτα από διέγερση στα 278 nm καταγράφηκε επίσης (300-500 nm).

## **Κεφάλαιο 3.**

**Μελέτη της στόχευσης και της εισαγωγής της υπομονάδας  $e$  της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ως ένα παράδειγμα πρωτεΐνης με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπικό σήμα στόχευσης.**

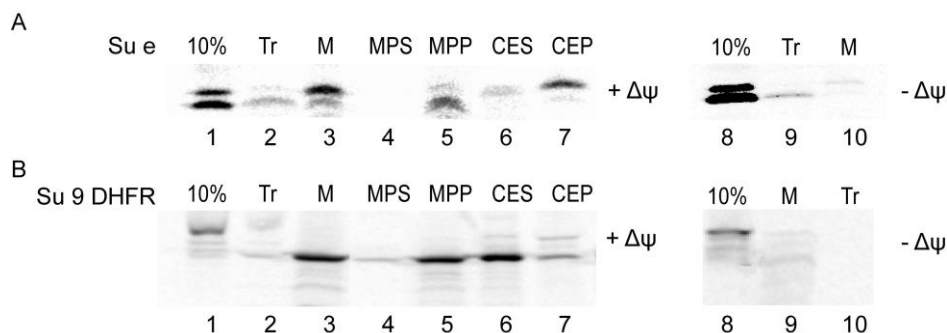
### 3.1 Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο μελετάμε την εισαγωγή της υπομονάδας  $e$  της ATP συνθάσης του μιτοχονδρίου στο μιτοχόνδριο και την εισαγωγή της στην εσωτερική μεμβράνη, ως παράδειγμα πρωτεΐνης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης.

### 3.2 Αποτελέσματα

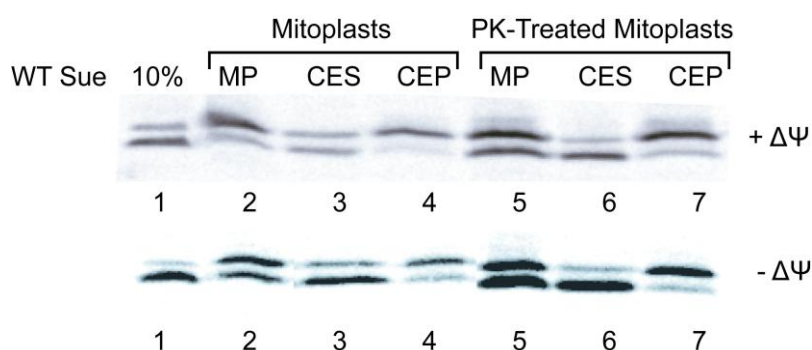
#### 3.2.1 Η $Su e$ εισάγεται στα μιτοχόνδρια και προσδένεται στην εσωτερική μεμβράνη παρουσία βαθμίδωσης δυναμικού ( $+\Delta\Psi$ ).

Ραδιοσημασμένη  $Su e$  που είχε συντεθεί *in vitro* εισήχθη σε ενεργοποιημένα μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από στέλεχος αγρίου τύπου (WT - wild type) σακχαρομύκητα. Περίπου το 20% της ολικής ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης εισήχθη σε ενεργοποιημένα μιτοχόνδρια ( $+\Delta\Psi$ ) (σχήμα 3.1A, δείγμα 3). Όταν το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης διαταράχθηκε με προσθήκη των ιονοφόρων βαλινομυκίνη και CCCP ( $-\Delta\Psi$ ), η εισαγωγή της πρωτεΐνης αποτράπηκε σε μεγάλο βαθμό (σχήμα 3.1A, δείγμα 10), δείχνοντας ότι η εισαγωγή της  $Su e$  στο μιτοχόνδριο εξαρτάται από το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης. Μιτοχόνδρια με εισαγμένη ραδιοσημασμένη  $Su e$  υπέστησαν ωσμωτικό σοκ μέσα σε υποτονικό διάλυμα, με αποτέλεσμα να διαρραγεί η εξωτερική τους μεμβράνη. Τα μιτοχόνδρια στα οποία η εξωτερική μεμβράνη έχει διαρραγεί ονομάζονται μιτοπλάστες. Οι μιτοπλάστες φυγοκεντρήθηκαν και οι πρωτεΐνες από το υπερκείμενο κατακρημνίστηκαν με τη χρήση TCA. Το κατακρημνισμένο υπερκείμενο και η πελέτα που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση, αναλύθηκαν με SDS-PAGE (σχήμα 3.1A, δείγματα 4 και 5). Η ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη βρέθηκε στη πελέτα, γεγονός που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη και τον διαμεμβρανικό χώρο και βρίσκεται στους μιτοπλάστες. Επιπλέον, μιτοχόνδρια με εισαγμένη ραδιοσημασμένη  $Su e$  διαλύθηκαν σε αλκαλικό διάλυμα  $Na_2CO_3$  (pH ~11). Μετά από επώαση για 30 λεπτά, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στα 25,000 g. Με αυτόν τον τρόπο, οι μη ενσωματωμένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες παρέμειναν διαλυτές, ενώ οι μεμβράνες με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες παρέμειναν στο ίζημα (σχήμα 3.1A δείγματα 6 και 7). Η  $Su e$  βρέθηκε κυρίως με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να καταλήξουμε ότι η  $Su e$  είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη της εσωτερικής



**Σχήμα 3.1: Εισαγωγή της Su e στα μιτοχόνδρια.** Εισαγωγή ραδιοσημασμένης Su e (A) και Su 9 DHFR (B) σε ενεργοποιημένα (+ΔΨ) ή απενεργοποιημένα (-ΔΨ) μιτοχόνδρια από στέλεχος αγρίου τύπου. Μετά την αντίδραση εισαγωγής, η μη εισαγμένη πρωτεΐνη απομακρύνθηκε με πρωτεόλυση από PK. M: Ολική εισαγωγή στα μιτοχόνδρια, MPS: Το υπερκείμενο μετά από ωσμωτικό σοκ, MPP: Η πελέτα μετά από το ωσμωτικό σοκ, CES: Το υπερκείμενο μετά από επώαση με Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CEP: Η πελέτα μετά από επώαση με Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 1% Triton X-100 χρησιμοποιήθηκε για να διαλυτοποιήσει τα μιτοχόνδρια για να ελέγξουμε την αποικοδόμηση της μη εισαγμένης πρωτεΐνης από τη PK (Tr). Το 10 % της ολικής ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση εισαγωγής φορτώθηκε στη πηκτική (δείγμα 1 - 10%).

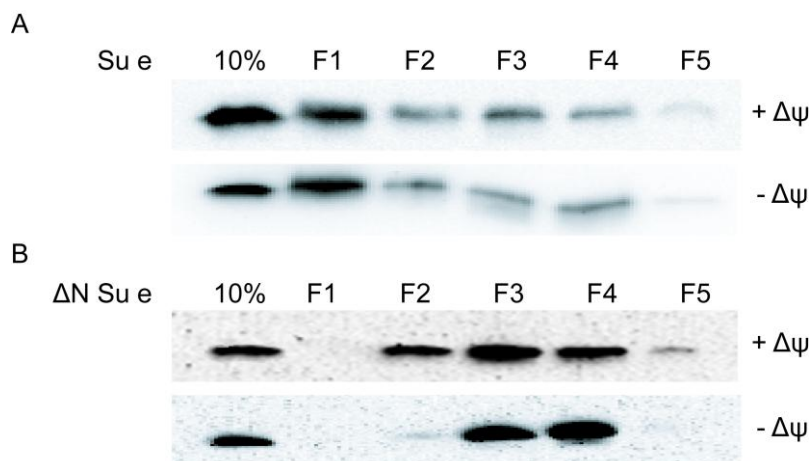
μεμβράνης. Ως μάρτυρα εισάγαμε τη Su9-DHFR, μία πρωτεΐνη που στοχεύεται στη μήτρα και της οποίας η εισαγωγή έχει μελετηθεί σε προηγούμενες μελέτες, και βλέπουμε ότι εισήχθη κανονικά στα μιτοχόνδρια παρουσία δυναμικού και στοχεύτηκε στη μήτρα, ενώ μετά από διατάραξη του δυναμικού η Su9-DHFR δεν εισήχθη στα μιτοχόνδρια (σχήμα 3.1B). Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι τα μιτοχόνδρια που χρησιμοποιήσαμε ήταν ικανά να εισάγουν πρωτεΐνες με κανονικό τρόπο και επίσης ότι η προσθήκη των ιονοφόρων διατάραξε το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης.



**Σχήμα 3.2:** Ενσωμάτωση της αγρίου τύπου Su e σε μιτοπλάστες και μιτοπλάστες μετά τη προσθήκη PK. Ενσωμάτωση ραδιοσημασμένης Su σε μιτοπλάστες (mitoplasts) και σε μιτοπλάστες που είχαν υποστεί πρωτεόλυση από PK (PK-Treated Mitoplasts) που προήλθαν από ενεργοποιημένα (+ΔΨ) ή απενεργοποιημένα (-ΔΨ) μιτοχόνδρια αγρίου τύπου μετά από ωσμωτικό σοκ. MP: Η ολική ενσωμάτωση στους μιτοπλάστες, CES: Το υπερκείμενο μετά από επώαση με Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CEP: Η πελέτα μετά από επώαση με Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 10 % της ολικής ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση εισαγωγής φορτώθηκε στη πηκτή (Δείγμα 1 - 10%).

### 3.2.2 Η Su e μπορεί να ενσωματωθεί απευθείας στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη

Για να μελετήσουμε την ενσωμάτωση της Su e στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, η εξωτερική μεμβράνη διερράγη μέσω ώσμωσης (παραγωγή μιτοπλαστών). Στους μισούς μιτοπλάστες που παρήχθησαν προστέθηκε πρωτεάση K (PK), ενώ οι άλλοι μισοί παρέμειναν ως είχαν. Η προσθήκη της PK στους μιτοπλάστες είχε ως αποτέλεσμα να αποικοδομηθούν τα εκτεθειμένα πρωτεϊνικά τμήματα, όπως για παράδειγμα οι υποδοχείς των καναλιών TIM22 και TIM23. Έπειτα, ραδιοσημασμένη Su e παρουσιάστηκε απευθείας στους μιτοπλάστες. Η Su e εισήχθη με αποτελεσματικότητα στους μιτοπλάστες (σχήμα 3.2). Η ενσωμάτωση με την εσωτερική μεμβράνη ελέγχθηκε μετά από επεξεργασία των μιτοπλαστών με αλακτικό διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Η Su e βρέθηκε να είναι κυρίως ενσωματωμένη στη μεμβράνη (σχήμα 3.2, δείγματα 4 και 7). Η πρωτεόλυση των μιτοπλαστών με PK, δεν έδειξε να παρεμποδίζει αλλά αντιθέτως να προάγει την εισαγωγή της Su e στη μεμβράνη (σχήμα 3.2, PK-treated mitoplasts). Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε ότι η ενσωμάτωση της Su e στην εσωτερική μεμβράνη όταν αυτή παρουσιάζεται απευθείας στους μιτοπλάστες, δεν απαιτούσε κάποια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης ή του διαμεμβρανικού χώρου ή κάποια από τα τμήματα των καναλιών TIM22 και TIM23 που είναι εκτεθειμένα στον διαμεμβρανικό χώρο, και τα οποία όπως είναι γνωστό από



**Σχήμα 3.3: Προσδεση της Su e και της ΔN23 Su e σε λιποσώματα ή σε λιποσώματα με δυναμικό που προκλήθηκε από διάχυση ιόντων καλίου μετά την προσθήκη βαλινομυκίνης.** Καθαρισμένη Su e ή ΔN23 Su e επώαστηκε με λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης και τοποθετήθηκε σε βαθμίδωμα συγκέντρωσης σουκρόζης (sucrose gradient). Προσθήκη 0.4 μM βαλινομυκίνης δημιούργησε δυναμικό διαμέσω της μεμβράνης, εξαιτίας της διάχυσης των ιόντων καλίου (+ ΔΨ). Τα δείγματα λήφθηκαν από τη κορυφή (F1) προς τον πυθμένα (F4) της βαθμίδωματος συγκέντρωσης σουκρόζης. Το δείγμα F5 αντιστοιχεί στη πρωτεΐνη που έχει καθιζάνει στο πυθμένα μετά την υπερφυγοκέντρωση. Η Su e ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση με αντι-Su e αντισώματα. Το 10% που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πρόσδεση φορτώθηκε στο δείγμα 1.

προηγούμενες μελέτες, απαιτούνται για την εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη μέσω των ήδη γνωστών μονοπατιών. Η αποικοδόμηση των εκτεθειμένων τμημάτων των Tim22 και Tim23 από τη PK στους μιτοπλάστες ελέγχθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης (western blotting). Μιτοπλάστες με ή χωρίς να έχουν υποστεί πρωτεόλυση με PK παρασκευάστηκαν από μιτοχόνδρια αγρίου τύπου στα οποία είχαν προστεθεί τα ιονοφόρα βαλινομυκίνη και CCCP για τη διατάραξη του δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης. Η ενσωμάτωση στην εσωτερική μεμβράνη δεν επηρεάστηκε από τη προσθήκη ιονοφόρου (σχήμα 3.2, - ΔΨ), αποκλείοντας το ενδεχόμενο ενσωμάτωσης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω ηλεκτροφορετικής δύναμης εξαιτίας της διαφοράς δυναμικού.

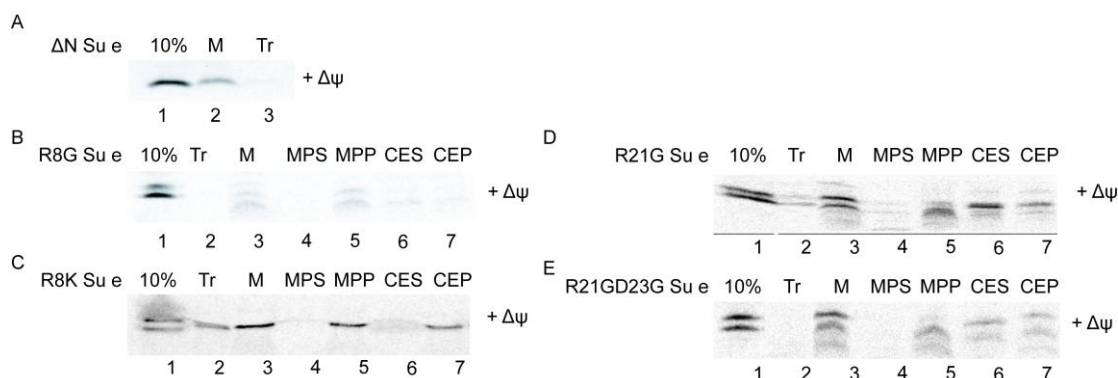
### 3.2.3 Η Su e μπορεί να εισαχθεί σε λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης

Για να ελέγξουμε την ικανότητα της Su e να ενσωματώνεται αυθόρμητα σε λιπιδικές διπλοστιβάδες, μία μέθοδος μέσω υπερφυγοκέντρωσης βαθμίδωματος συγκέντρωσης σουκρόζης (sucrose gradient) αναπτύχθηκε. Καθαρισμένη αποδιαταγμένη Su e ή ΔN23 Su e επώαστηκε με λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης που περιείχαν στο εσωτερικό τους ιόντα  $K^+$ , ενώ στο εξωτερικό διάλυμα περιέχονταν

ίοντα  $\text{Na}^+$ . Ένα δυναμικό λόγω διάχυσης των ιόντων  $\text{K}^+$  δημιουργήθηκε με προσθήκη του εκλεκτικού για τα ιόντα καλίου ιονοφόρου βαλινομυκίνη ( $0,4 \mu\text{M}$ ). Η παρουσία δυναμικού μετά τη προσθήκη της βαλινομυκίνης ελέγχθηκε μέσω μεθόδου φθορισμού (Sims, Waggoner et al. 1974; Haucke and Schatz 1997). Τα λιποσώματα με τη  $\text{Su e}$  ή τη  $\Delta\text{N}23 \text{ Su e}$  τοποθετήθηκαν στο πάτο του βαθμιδώματος συγκέντρωσης της σουκρόζης, και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα  $100.000 \text{ g}$ . Τα λιποσώματα, λόγω μικρότερης πυκνότητας, επέπλευσαν προς τη κορυφή της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης, παρασέρνοντας μαζί τους τις ενσωματωμένες σε αυτά πρωτεΐνες, ενώ οι μη ενσωματωμένες πρωτεΐνες παρέμειναν στο κάτω μέρος. Μετά από ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αντι-  $\text{Su e}$ , η  $\text{Su e}$  βρέθηκε κυρίως πάνω στο κορυφαίο τμήμα της βαθμίδωσης (σχήμα 3.3A, F1 και F2), ενώ η  $\Delta\text{N}23 \text{ Su e}$  βρέθηκε στα χαμηλότερα τμήματα της βαθμίδωσης (σχήμα 3.3B, F3 και F4). Το δείγμα F5 δεν αντιστοιχεί σε τμήμα του βαθμιδώματος αλλά στη πρωτεΐνη που έχει καθιζάνει κατά τη φυγοκέντρωση και έχει αποκωληθεί από το φυαλίδιο της φυγοκέντρωσης μετά από ξέπλυμα με απορρυπαντικό SDS. Η απουσία μεγάλου μέρους της πρωτεΐνης από το F5 σημαίνει ότι τόσο η  $\text{Su e}$  όσο και η  $\Delta\text{N}23 \text{ Su e}$  παραμένουν κατά κύριο λόγο διαλυτές καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η  $\text{Su e}$  εισήχθη το ίδιο αποτελεσματικά στα λιποσώματα με ή χωρίς τη παρουσία δυναμικού (σχήμα 3.3, +/-  $\Delta\Psi$ ). Επιπλέον η παρουσία της καρδιολιπίνης, λιπίδιο που υπάρχει σε αφθονία στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, στα λιποσώματα σε ποσοστό ως και 20% δεν επηρέασε την αποτελεσματικότητα με την οποία ενσωματώνεται η  $\text{Su e}$  στα λιποσώματα.

*3.2.4 Το αμινοτελικό τμήμα της υπομονάδας e περιέχει τη πληροφορία για τη στόχευσή της στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το φορτίο στη θέση 8 είναι σημαντικό.*

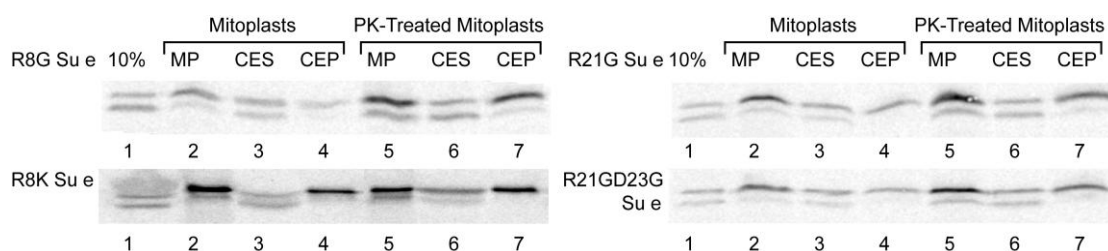
Με σκοπό τη ταυτοποίηση του τμήματος της  $\text{Su e}$  που περιέχει τη πληροφορία στόχευσης της  $\text{Su e}$  αφαιρέθηκαν τα 23 αμινοτελικά αμινοξέα από την αλληλουχία της  $\text{Su e}$ . Αυτή η περιοχή περιέχει και το προβλεπόμενο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης. Η εισαγωγή στα μιτοχόνδρια της  $\Delta\text{N}23 \text{ Su e}$  είναι σημαντικά μειωμένη (σχήμα 3.4A), προτείνοντας ότι στα 23 πρώτα αμινοξέα περιέχεται το σήμα στόχευσης.



**Σχήμα 3.4: Στόχευση μεταλλαγμάτων της Su e σε μιτοχόνδρια αγρίου τύπου.** A. Ραδιοσημασμένη ΔN23 Su e εισήχθη σε ενεργοποιημένα μιτοχόνδρια απομονωμένα από στέλεχος σακχαρομύκητα αγρίου τύπου. M: Ολική εισαγωγή στα μιτοχόνδρια. B. - E. Εισαγωγή ραδιοσημασμένων μεταλλαγμάτων της Su e σε ενεργοποιημένα (+ΔΨ) μιτοχόνδρια από στέλεχος αγρίου τύπου. Μετά την αντίδραση εισαγωγής, η μη εισαγμένη πρωτεΐνη απομακρύνθηκε με αποικοδόμηση από PK. M: Ολική εισαγωγή στα μιτοχόνδρια, MPS: Το υπερκείμενο μετά από ωσμωτικό σοκ, MPP: Η πελέτα μετά από το ωσμωτικό σοκ, CES: Το υπερκείμενο μετά από επώαση με Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CEP: Η πελέτα μετά από επώαση με Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 1% Triton X-100 χρησιμοποιήθηκε για να διαλυτοποιήσει τα μιτοχόνδρια για να ελέγξουμε την αποικοδόμηση της μη εισαγμένης πρωτεΐνης από τη PK (Tr). 10 % της ολικής ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση εισαγωγής φορτώθηκε στη πηκτή (10%).

Για περαιτέρω διερεύνηση των αμινοξέων που χρειάζονται για τη στόχευση της Su e στο μιτοχόνδριο, τα φορτισμένα αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής μεταλλάχθηκαν. Όπως είναι γνωστό, τα φορτισμένα αμινοξέα είναι σημαντικά για την αναγνώριση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών από τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης. Η Su e έχει τρία φορτισμένα αμινοξέα ανάμεσα στα 23 πρώτα αμινοξέα της όπου περιέχεται η αλληλουχία στόχευσης, μία αργινίνη στη θέση 8, μία αργινίνη στη θέση 21 και ένα ασπαρτικό στη θέση 23. Τρία μεταλλάγματα παρασκευάστηκαν, το R8G, όπου η αργινίνη 8 έχει μεταλλαχθεί σε γλυκίνη, το R21G, όπου η αργινίνη 21 μεταλλάχθηκε σε γλυκίνη και το R21GD23G, όπου η αργινίνη στη θέση 21 και το ασπαρτικό στη θέση 23 μεταλλάχθηκαν σε γλυκίνες. Η εισαγωγή στα μιτοχόνδρια των δύο τελευταίων μεταλλαγμάτων (σχήμα 3.4 D,E) δεν επηρεάστηκε σημαντικά, ενώ στη περίπτωση του μεταλλάγματος R8G δεν ανιχνεύτηκε σχεδόν καθόλου εισαγμένη πρωτεΐνη (σχήμα 3.4B). Αυτό μας δείχνει ότι η αργινίνη στη θέση 8 παίζει καθοριστικό ρόλο για την εισαγωγή της πρωτεΐνης μέσα στο μιτοχόνδριο. Η μεταλλαγή της αργινίνης στη θέση 8 σε λυσίνη (μετάλλαγμα R8K), όπου το θετικά φορτισμένο αμινοξύ αργινίνη μεταλλάχθηκε στο επίσης θετικά φορτισμένο αμινοξύ λυσίνη, δεν φαίνεται να επηρέασε την εισαγωγή της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο



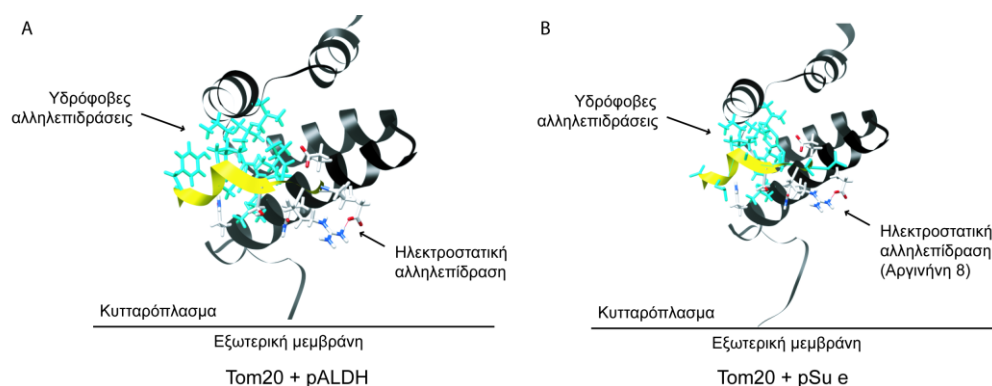


**Σχήμα 3.5: Ενσωμάτωση μεταλλαγμάτων της Su e σε μιτοπλάστες.** Ενσωμάτωση ραδιοσημασμένων μεταλλαγμάτων της Su e σε μιτοπλάστες (mitoplasts) και σε μιτοπλάστες που είχαν υποστεί πρωτεόλυση από PK (PK-Treated Mitoplasts) που προήλθαν από ενεργοποιημένα (+ΔΨ) μιτοχόνδρια αγρίου τύπου μετά από ωσμωτικό σοκ. MP: Η ολική ενσωμάτωση στους μιτοπλάστες, CES: Το υπερκείμενο μετά από επώαση με  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , CEP: Η πελέτα μετά από επώαση με  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Το 10 % της ολικής ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση εισαγωγής φορτώθηκε στη πηκτή (10%).

(σχήμα 3.4C). Αυτό μας δείχνει ότι το θετικό φορτίο στη θέση 8 της αλληλουχίας είναι καθοριστικό για την εισαγωγή της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο.

Το μετάλλαγμα R21G εισήχθη στα μιτοχόνδρια. Μετά από επεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα βρέθηκε κυρίως στο υπερκείμενο, σε αντίθεση με το μετάλλαγμα R8K και τη πρωτεΐνη αγρίου τύπου που βρέθηκαν κυρίως στη πελέτα (σχήμα 3.4D). Αυτό σημαίνει ότι μικρότερο ποσοστό από το μετάλλαγμα R21G εισήχθη στην εσωτερική μεμβράνη σε σχέση με τη πρωτεΐνη αγρίου τύπου και το μετάλλαγμα R8K. Αυτό δείχνει παρεμπόδιση της ενσωμάτωσης στην εσωτερική μεμβράνη του μεταλλάγματος R21G κατά τη διαδικασία της εισαγωγής της στο μιτοχόνδριο. Ανάλογη παρεμπόδιση, αλλά σε μικρότερο βαθμό, παρατηρήθηκε και στη περίπτωση του μεταλλάγματος R21GD23G (σχήμα 3.4E). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η αργινίνη στη θέση 21 και το συνολικό φορτίο αμέσως μετά το διαμεμβρανικό τμήμα παίζει σημαντικό ρόλο για τη σταθεροποίηση της Su e στην εσωτερική μιτοχονδρική μεμβράνη.

Για τη περαιτέρω διερεύνηση της εισαγωγής των μεταλλαγμάτων της Su e στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες παρουσιάστηκαν απευθείας σε μιτοπλάστες και σε μιτοπλάστες μετά τη επεξεργασία τους με PK. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα μεταλλάγματα εισήχθησαν στην εσωτερική μεμβράνη με ανάλογο τρόπο όπως η πρωτεΐνη του αγρίου τύπου (σχήμα 3.5). Το μετάλλαγμα R8G, παρόλο που δεν εισήχθη σε ακέραια μιτοχόνδρια, μπορεί και ενσωματώνεται σε μιτοπλάστες με την ίδια αποτελεσματικότητα με τη πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Αυτό



**Σχήμα 3.6:** Δομή του κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα Tom20 με αλληλουχίες στόχευσης. Η δομή του κυτταροπλασματικού μέρους του υποδοχέα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης Tom20 (μαύρο) με προσδεμένη την αλληλουχία στόχευσης της πρωτεΐνης της μήτρας ALDH (A) και της Su e (B) (κίτρινο). Τα αμινοξέα που εμπλέκονται σε σταθεροποίηση μέσω υδρόφobων αλληλεπιδράσεων είναι κυανά, ενώ η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα και της αλληλουχίας στόχευσης συμβολίζεται με κόκκινη γραμμή.

μας δείχνει ότι το φορτίο στη θέση 8 απαιτείται μόνο για τη διαπέραση της εξωτερικής μεμβράνης και δεν απαιτείται για την εισαγωγή της πρωτεΐνης στην εξωτερική. Ακόμα και στη περίπτωση των μεταλλαγμάτων R21G και R21GD23G δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στην ενσωμάτωση στην εσωτερική μεμβράνη σε σχέση με τη πρωτεΐνη του αγρίου τύπου (WT). Η εισαγωγή των μεταλλαγμάτων αυτών στην εσωτερική μεμβράνη επηρεάστηκε μόνο στη περίπτωση που η πρωτεΐνη εισάγεται σε ακέραια μιτοχόνδρια.

### 3.2.5 Αναγνώριση της Su e από τον υποδοχέα της εξωτερικής μεμβράνης Tom20 με βάση τη δομή του.

Με βάση τη δομή του κυτταροπλασματικού μέρους του υποδοχέα της εξωτερικής μεμβράνης Tom20 (Muto, Obita et al. 2001) έγινε μοντελοποίηση για να δούμε εάν υπάρχουν σημαντικές στερικές παρεμποδίσεις στη πρόσδεση του αμινοτελικού-μεμβρανικού τμήματος της Su e στο σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος του Tom20. Το μεμβρανικό τμήμα του Su e ταιριάζει στο σημείο πρόσδεσης του Tom20 που αναγνωρίζει το υδρόφοβο τμήμα της αλληλουχίας στόχευσης, όταν αντικαταστήσουμε τα αμινοξέα του σήματος στόχευσης της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ALDH) που υπήρχαν στη δομή του Tom20 σε διάλυμα με τα αντίστοιχα του Su e (σχήμα 3.6), άρα πιθανότατα ο Tom20 έχει την ικανότητα να αναγνωρίσει την Su e στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου και να την οδηγήσει στο κανάλι TOM. Στο σχήμα βλέπουμε ότι η αργινίνη στη θέση 8 σταθεροποιεί την

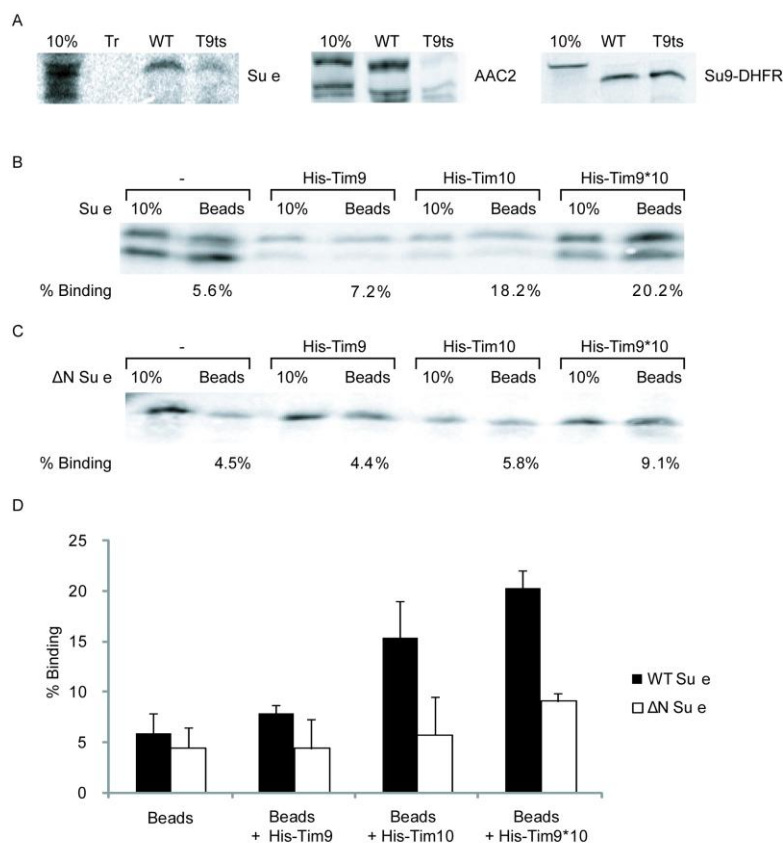
αλληλεπίδραση με ένα γλουταμινικό οξύ που βρίσκεται κοντά στο σημείο πρόσδεσης του σήματος στόχευσης. Η αντικατάσταση της αργινίνης με ένα μη φορτισμένο αμινοξύ, διαταράζει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση σε αυτό το σημείο, με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία στην αναγνώριση της Su e από τον Tom20.

### 3.2.6 Το αμινοτελικό τμήμα της Su e προσδέεται στη πρωτεΐνη Tim10 και στο σύμπλοκο TIM9.10

Σε αντίθεση με πρωτεΐνες που προορίζονται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και στοχεύονται μέσω του μονοπατιού διακοπής της μεταφοράς, η εισαγωγή της Su e επηρεάζεται από τα σύμπλοκα σαπερονών του διαμεμβρανικού χώρου των μικρών Tim. Η εισαγωγή ραδιοσημασμένης Su e σε μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από ένα στέλεχος του σακχαρομύκητα με θερμοευαίσθητο Tim9 (T9-ts strain) (Koehler, Merchant et al. 1998) είναι αισθητά μειωμένη (σχήμα 3.7A). Σε αυτό το στέλεχος, οι ποσότητες των Tim9 και Tim10 είναι κατά μεγάλο ποσοστό μειωμένες, όταν αυτό μεγαλώνει στους 37°C για λίγες ώρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η εισαγωγή του Su9DHFR, η οποία γίνεται μέσω του TIM23 μονοπατιού και παραμένει ανεπηρέαστη απουσία των μικρών Tim, και η εισαγωγή του μεταφορέα των αδενονουκλεοτιδίων (ADP/ATP carrier protein – AAC), η οποία εισάγεται μέσω του μονοπατιού TIM22 και επηρεάζεται από τα μικρά Tim του διαμεμβρανικού χώρου. Η εισαγωγή της Su9DHFR ήταν στα ίδια επίπεδα στα T9-ts μιτοχόνδρια και στα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια (WT) ενώ η εισαγωγή της AAC ήταν αισθητά μειωμένη στα T9-ts μιτοχόνδρια (σχήμα 7A). Το γεγονός ότι η εισαγωγή της Su e μειώνεται στα T9-ts μιτοχόνδρια μας δείχνει ότι τα μικρά Tim με κάποιο τρόπο επηρεάζουν την εισαγωγή της Su e.

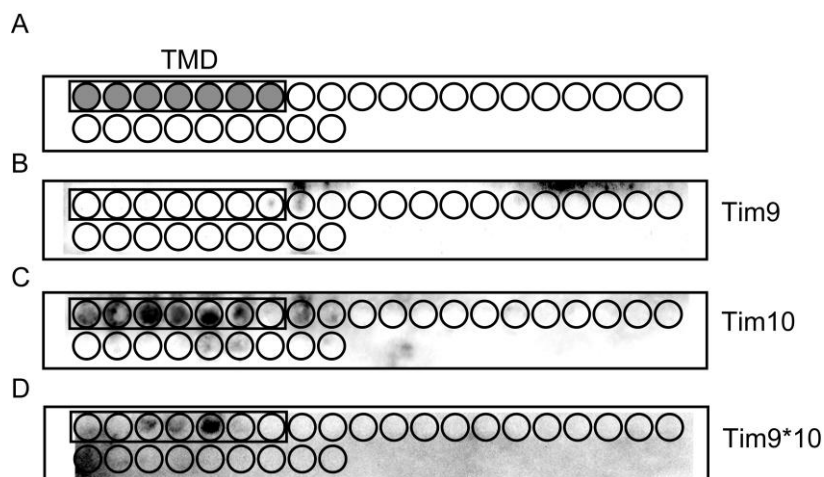
Μία μέθοδος *in vitro* πρόσδεσης αναπτύχθηκε με σκοπό τη μελέτη της πρόσδεσης της Su e με τις μικρές Tim πρωτεΐνες Tim9 και Tim10, όπως επίσης και με το σύμπλοκο TIM9.10. Ραδιοσημασμένες Su e και ΔN23 Su e συντέθηκαν *in vitro* παρουσία καθαρισμένων Tim9, Tim10 ή TIM9.10 που έφεραν έναν επίτοπο έξι ιστιδινών. Το σύμπλοκο TIM9.10 έφερε τον επίτοπο των έξι ιστιδινών μόνο στο μόριο του Tim9.

Η απομόνωση του συμπλόκου έγινε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (gel filtration), συνδυάζοντας καθαρισμένες πρωτεΐνες. 5.6% της ραδιοσημασμένης Su e



**Σχήμα 3.7: Αλληλεπίδραση της Su e με τις μικρές Tim πρωτεΐνες.** A. Ραδιοσημασμένη Su e, AAC2 ή Su9-DHFR εισήχθησαν σε ενεργοποιημένα μιτοχόνδρια που είχαν απομονωθεί από στέλεχος αγρίου τύπου (W.T.) ή από στέλεχος με θερμοευαίσθητο Tim9 (T9-ts). Το 10% της ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση φορτώθηκε (10%). Ραδιοσημασμένη Su e (B) ή ΔN23 Su e (C) συντέθηκαν *in vitro* παρουσία καθαρισμένων Tim9 (HisTim9), Tim10 (HisTim10) ή TIM9.10 (HisTim9Tim10) συμπλόκου που έφεραν επίτοπο έξι ιστιδινών ή χωρίς τη παρουσία κάποιας καθαρισμένης πρωτεΐνης (-). Οι πρωτεΐνες με τον επίτοπο των ιστιδινών προσδέθηκαν σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads) συμπαρασύροντας και τη προσδεμένη σε αυτές ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη. Οι αριθμοί στο κάτω μέρος δείχνουν τη ποσοτικοποίηση της ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που προσδέεται με βάση το 10%. D. Διάγραμμα που απεικονίζει τη ποσότητα της ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που προσδέεται κάθε φορά στα σφαιρίδια. Οι γραμμές σφάλματος (error-bars) πάνω στο διάγραμμα δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation) από τρία διαφορετικά πειράματα.

προσδέθηκε στα σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads) χωρίς τη παρουσία κάποιας πρωτεΐνης που έφερε επίτοπο ιστιδινών. Με την παρουσία του Tim9 δεν αυξήθηκε η ποσότητα της προσδεμένης πρωτεΐνης σημαντικά (7.2%), ενώ παρουσία Tim10 ή TIM9.10 συμπλόκου το ποσοστό της προσδεμένης πρωτεΐνης αυξήθηκε στο 18.2% και στο 20.2% αντίστοιχα (σχήμα 3.7, B και C). Τα αποτελέσματα αυτά μας δείχνουν ότι η Su e προσδέεται τόσο στο Tim10, όσο και στο TIM9.10, αλλά όχι στο Tim9 *in vitro*. Η ίδια μέθοδος επαναλήφθηκε, χρησιμοποιώντας τη ΔN23 Su e. Σε αυτή την περίπτωση, δεν είχαμε σημαντικό ποσοστό ραδιενεργής πρωτεΐνης



**Σχήμα 3.8: Μέθοδος συστοιχίας πεπτιδίων.** Α. Γραφική απεικόνιση της μεμβράνης με τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκε (Δεκατριαμερή πεπτίδια, αλληλεπικαλυπτόμενα ανά δέκα). Κάθε κύκλος αντιστοιχεί στη θέση κάθε πεπτιδίου στη μεμβράνη. Με γκριζο, τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στο διαμεμβρανικό τμήμα (TMD) της Su e. Β, C, D. Ανοσοαποτύπωση με τη χρήση αντί-Tim9 (B) ή αντί-Tim10 (C, D) αντισώματα της πρωτεΐνης που είχε προσδεθεί στη μεμβράνη έπειτα από επώαση με καθαρισμένη Tim9 (B), Tim10 (C) ή TIM9.10 σύμπλοκο (D).

προσδεμένη στα σφαιρίδια σε καμία από τις περιπτώσεις. Αυτό μας δείχνει ότι το αμινοτελικό τμήμα της Su e ενέχεται στη πρόσδεσή της με το σύμπλοκο TIM9.10. Για τη περαιτέρω διερεύνηση των τμημάτων της Su e που αλληλεπιδρούν με τις μικρές Tim πρωτεΐνες, μελετήθηκε η πρόσδεση σε μία μεμβράνη που έφερε δεκατριομερή πεπτίδια από την αλληλουχία της Su e (συστοιχία πεπτιδίων – peptide spot array) (σχήμα 3.8A). HisTim9, HisTim10 και TIM9.10 σύμπλοκο επώαστηκαν με τη μεμβράνη. Στη περίπτωση της Tim9, δεν είχαμε ανίχνευσή της μετά από ανοσοαποτύπωση σε κανένα τμήμα της μεμβράνης, ενώ η Tim10 και το σύμπλοκο TIM9.10 προσδέθηκε σε πεπτίδια που αντιστοιχούσαν στο μεμβρανικό/αμινοτελικό τμήμα της Su e (σχήμα 3.8).

Systematic Name	Standard Name	Length	Description
YBR262c	FMP51	106	Protein of unknown function
YDL067c	COX9	59	Subunit VIIa of cytochrome c oxidase
YDR079w	PET100	111	Chaperone that specifically facilitates the assembly of cytochrome c oxidase
YDR322c-a	ATP21	96	Subunit e of mitochondrial F1F0-ATPase
YER038w-a	FMP49	126	Protein of unknown function
YER058w	PET117	107	Protein required for assembly of cytochrome c oxidase
YGR132c	PHB1	287	Subunit of the prohibitin complex (Phb1p-Phb2p)
YGR174c	CBP4	170	Mitochondrial protein required for assembly of cytochrome bc1 complex
YGR236c	SPG1	95	Protein required for survival at high temperature during stationary phase
YJL003w	COX16	118	Required for assembly of cytochrome c oxidase
YLR395c	COX8	78	Subunit VIII of cytochrome c oxidase
YML081c-a	ATP18	59	Subunit j of the mitochondrial F1F0 ATP synthase
YMR150c	IMP1	190	Catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane peptidase complex
YMR256c	COX7	60	Subunit VII of cytochrome c oxidase
YOL077w-a	ATP19	68	Subunit k of the mitochondrial F1F0 ATP synthase
YPR020w	ATP20	115	Subunit g of the mitochondrial F1F0 ATP synthase

**Πίνακας 3.1.** Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν στο πρωτόμα του μιτοχονδρίου με τα χαρακτηριστικά της Su e και πιθανότατα στοχεύονται με τον ίδιο μηχανισμό όπως η Su e.

### 3.2.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου με τα χαρακτηριστικά της Su e

Αναζητήθηκαν πρωτεΐνες στο δημοσιευμένο μιτοχονδριακό πρωτόμα (Reinders, Zahedi et al. 2006) οι οποίες έχουν ένα διαμεμβρανικό τμήμα κοντά στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυτελικό τμήμα τους και δεν φέρουν τυπική αλληλουχία στόχευσης. Συνολικά 16 πρωτεΐνες βρέθηκαν που έφεραν τις συγκεκριμένες προϋποθέσεις και παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Οι μισές από αυτές είναι μικρές υπομονάδες της ATP συνθάσης (ATP synthase) (υπομονάδες e, g, k και j) και της κυττοχρωμικής οξειδάσης (COX) (Cox7, Cox8, Cox9 και Cox16).

### 3.3 Συζήτηση

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η εισαγωγή στο μιτοχόνδριο και η εισαγωγή στις μεμβράνες της υπομονάδας e της F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP συνθάσης του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα ως παράδειγμα πρωτεΐνης που στοχεύεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και δε φέρει τυπική αλληλουχία στόχευσης.

Η ενσωμάτωση της Su e στους μιτοπλάστες και σε μιτοπλάστες που έχουν υποστεί πρωτεόλυση από PK δείχνει ότι η Su e μπορεί να εισαχθεί στην εσωτερική μεμβράνη χωρίς τα συστατικά που απαιτούνται για την εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη μέσω των γνωστών μηχανισμών TIM23 και TIM22.

Το σύμπλοκο TIM23 έχει τέσσερις υπομονάδες εκτεθειμένες στο διαμεμβρανικό χώρο, τις Tim23, Tim17, Tim21 και Tim50. Τα 50 αμινοτελικά αμινοξέα της Tim23, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των αλληλουχιών στόχευσης κόβονται μετά από πρωτεόλυση των μιτοπλαστών (Bauer, Sirrenberg et al. 1996). Επιπλέον, η Tim50, η οποία είναι αναμειγμένη με τη μεταφορά της πρόδρομης πρωτεΐνης από το κανάλι TOM (Mokranjac, Sichtung et al. 2009; Tamura, Harada et al. 2009) και η Tim17, η οποία είναι μία απαραίτητη για τη διαβίωση υπομονάδα της TIM23 (Martinez-Caballero, Grigoriev et al. 2007) είναι ευαίσθητες στη πρωτεόλυση από τη PK (Yamamoto, Esaki et al. 2002; Meier, Neupert et al. 2005). Η Tim21 έχει σφικτά αναδιπλωμένα τμήματα εκτεθειμένα στο διαμεμβρανικό χώρο (Albrecht, Rehling et al. 2006) και είναι ανθεκτική κατά μεγάλο μέρος έναντι στη πρωτεόλυση (Chacinska, Lind et al. 2005). Παρόλο που τα τμήματα της TIM23 που σχηματίζουν το κανάλι εισόδου είναι προστατευμένα από τη πρωτεόλυση επειδή βρίσκονται μέσα στην εσωτερική μεμβράνη, οπότε δεν είναι προσβάσιμα από τη PK, η TIM23 δεν θα μπορούσε να δουλεύει κανονικά μετά από πρωτεόλυση με PK.

Το σύμπλοκο TIM22 πρέπει επίσης να αποκλειστεί για την ενσωμάτωση της  $Su e$  στους μιτοπλάστες που έχουν υποστεί πρωτεόλυση. Το σύμπλοκο TIM22, με βάση αυτά που είναι ως τώρα γνωστά, ενσωματώνει στην εσωτερική μεμβράνη πρωτεΐνες με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα, όπως οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς μεταβολιτών (Curran, Leuenberger et al. 2002). Επιπλέον, οι υπομονάδες της TIM22, η Tim22, η Tim54 και η Tim18, είναι ευαίσθητα στη πρωτεόλυση με PK στους μιτοπλάστες (Koehler, Murphy et al. 2000). Οπότε, το σύμπλοκο TIM22 είναι μάλλον απίθανο να σχετίζεται με την ενσωμάτωση της  $Su e$  στην εσωτερική μεμβράνη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ικανότητα της  $Su e$  να ενσωματώνεται στην εσωτερική μεμβράνη όταν παρουσιάζεται απευθείας σε μιτοπλάστες που έχουν υποστεί πρωτεόλυση δεν μπορεί να έχει πραγματοποιηθεί με βάση τους γνωστούς μηχανισμούς εισαγωγής στην εσωτερική μεμβράνη.

Για την εισαγωγή της  $Su e$  στο μιτοχόνδριο απαιτείται διαφορά δυναμικού στην εσωτερική μεμβράνη ( $\Delta\Psi$ ). Σε αντίθεση, για την εισαγωγή στους μιτοπλάστες δεν απαιτείται η ύπαρξη δυναμικού. Επιπλέον, η εισαγωγή της  $Su e$  στα λιποσώματα δεν απαιτεί την ύπαρξη δυναμικού διάχυσης. Αυτό σημαίνει ότι η ενσωμάτωση της  $Su e$

στις μεμβράνες δεν συμβαίνει λόγω ηλεκτροφορετικής δύναμης εξαιτίας της διαφοράς δυναμικού, αλλά η διαφορά δυναμικού στην εσωτερική μεμβράνη χρειάζεται πιθανότατα για να μπορέσει η  $Su e$  να περάσει την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και τη λειτουργία του TOM καναλιού. Συγκρίνοντας την ενσωμάτωση της πρωτεΐνης σε μιτοπλάστες και σε μιτοπλάστες που έχουν υποστεί πρωτεόλυση, έχουμε αυξημένη ενσωμάτωση στη περίπτωση των μιτοπλαστών που έχουν υποστεί πρωτεόλυση. Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι μία μεμβράνη πλούσια σε πρωτεΐνες, με πολλές από αυτές να είναι εκτεθειμένες στο διαμεμβρανικό χώρο. Η πρωτεόλυση με PK των μιτοπλαστών αποικοδομεί μεγάλο μέρος των πρωτεϊνών αυτών, με αποτέλεσμα τα λιπίδια της εσωτερικής μεμβράνης να είναι πιο προσβάσιμα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την αυθόρμητη ενσωμάτωση της  $Su e$  σε λιποσώματα, μας δείχνει ότι η  $Su e$  είναι πιθανόν να εισάγεται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης με τα λιπίδια, όταν έρχεται σε απευθείας επαφή με αυτά.

Η αποκοπή των 23<sup>ov</sup> αμινοελικών αμινοξέων της  $Su e$  αναστέλει την εισαγωγή της στα μιτοχόνδρια. Αυτό μας δείχνει ότι σε αυτά τα αμινοξέα περιέχεται πληροφορία σημαντική για τη στόχευσή της. Για την εισαγωγή στα μιτοχόνδρια, είναι σημαντικά τα φορτισμένα και τα υδρόφοβα αμινοξέα (von Heijne 1986). Για το λόγο αυτό επιλέξαμε να μεταλλάξουμε τα φορτισμένα αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής της  $Su e$ . Μεταλλαγή της αργινίνης στη θέση 8 σε γλυκίνη αναστέλει την εισαγωγή στα μιτοχόνδρια, αλλά δεν αναστέλει την ενσωμάτωση στην εσωτερική μεμβράνη στους μιτοπλάστες. Επίσης μεταλλαγή της αργινίνης σε λυσίνη, όπου το θετικό φορτίο στη θέση 8 παραμένει, επιτρέπει την εισαγωγή της  $Su e$  στο μιτοχόνδριο. Επίσης, μοντελοποίηση της αλληλουχίας που είναι υπεύθυνη για τη στόχευση της  $Su e$  στη δομή του υποδοχέα Tom20 (Muto, Obita et al. 2001), μας δείχνει ότι το φορτίο στη θέση 8 θα μπορούσε να σταθεροποιεί τη πρόσδεσή του στον υποδοχέα. Τα δεδομένα αυτά μας υποδεικνύουν ότι το φορτίο στη θέση 8 είναι σημαντικό για τη στόχευση στο μιτοχόνδριο, πιθανότατα για την αναγνώρισή της από τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης.

Ο δομικός χαρακτηρισμός με NMR της περιοχής 1-21 της αμινοτελικής περιοχής της  $Su e$  σε μικκύλια δωδεκυλοφωσφοχολίνης έδειξε μία μονομερή ελικωτή δομή (Yao, Stuart et al. 2008). Η αργινίνη στη θέση 21 είναι κοντά στην επιφάνεια των λιπιδίων, γεγονός που υποδεικνύει ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του θετικού



φορτίου της αργινίνης και τις αρνητικά φορτισμένες κεφαλές των φωσφορικών ομάδων. Μία τέτοια αλληλεπίδραση θα σταθεροποιούσε το ενσωματωμένο στη μεμβράνη πεπτίδιο και θα μπορούσε να εξηγήσει τη παρατήρησή μας ότι το μετάλλαγμα R21G, όπου η συγκεκριμένη αργινίνη έχει μεταλλαχθεί σε γλυκίνη και το φορτίο έχει χαθεί, δεν εισάγεται το ίδιο αποτελεσματικά στην εσωτερική μεμβράνη με τη πρωτεΐνη του αγρίου τύπου.

Οι σαπερόνες του διαμεμβρανικού χώρου που αποτελούνται από τις μικρές Tim είναι γνωστό ότι παραλαμβάνουν πρωτεΐνες από το κανάλι TOM και τις παραδίδουν σε άλλα συστήματα εισαγωγής όπως το σύμπλοκο SAM και το σύμπλοκο TIM22 (Curran, Leuenberger et al. 2002; Habib, Waizenegger et al. 2005). Η ικανότητα της Su e να προδένεται στη σαπερόνη TIM9.10 και η μείωση της εισαγωγής της σε μιτοχόνδρια όπου απουσιάζει το TIM9.10 σύμπλοκο υποδηλώνει ότι η Su e είναι υπόστρωμα για τις σαπερόνες των μικρών Tim. Αυτό διευρύνει τα υποστρώματα που μπορούν να προσδεθούν στις σαπερόνες των μικρών Tim, και δείχνει ότι οι σαπερόνες του διαμεμβρανικού χώρου έχουν πιο ευρύ ρόλο από ότι είναι ως τώρα γνωστό.

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο παρόν κεφάλαιο δείχνουν ότι η Su e εισάγεται στο μιτοχόνδριο και ενσωματώνεται στην εσωτερική μεμβράνη με έναν μηχανισμό διαφορετικό από αυτούς που είναι ήδη γνωστοί. Η εύρεση 16 πρωτεϊνών με τα χαρακτηριστικά της Su e στο πρωτόμα του μιτοχονδρίου μας υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός αυτός πιθανότατα δεν είναι αποκλειστικός για τη στόχευση της Su e. Από τις πρωτεΐνες που βρέθηκαν, μόνο για τη prohibitin 1 (Phb1) κάποια στοιχεία είναι γνωστά για τη στόχευσή της και την ενσωμάτωσή της στη εσωτερική μεμβράνη (Tatsuta, Model et al. 2005). Στη μελέτη αυτή, η ενσωμάτωση της Phb1 στην εσωτερική μεμβράνη ενέπλεκε επίσης σαπερόνη του διαμεμβρανικού χώρου, το σύμπλοκο TIM8.13, ενώ η εισαγωγή της στα μιτοχόνδρια εξαρτιόνταν από το κανάλι TIM23 και τη παρουσία δυναμικού. Τα παραπάνω στοιχεία φωτογραφίζουν έναν μηχανισμό στόχευσης της Phb1 ανάλογο με αυτόν της Su e, υποδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός αυτός δεν είναι αποκλειστικός για τη Su e, αλλά επεκτείνεται και σε άλλες πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης.

## **Κεφάλαιο 4**

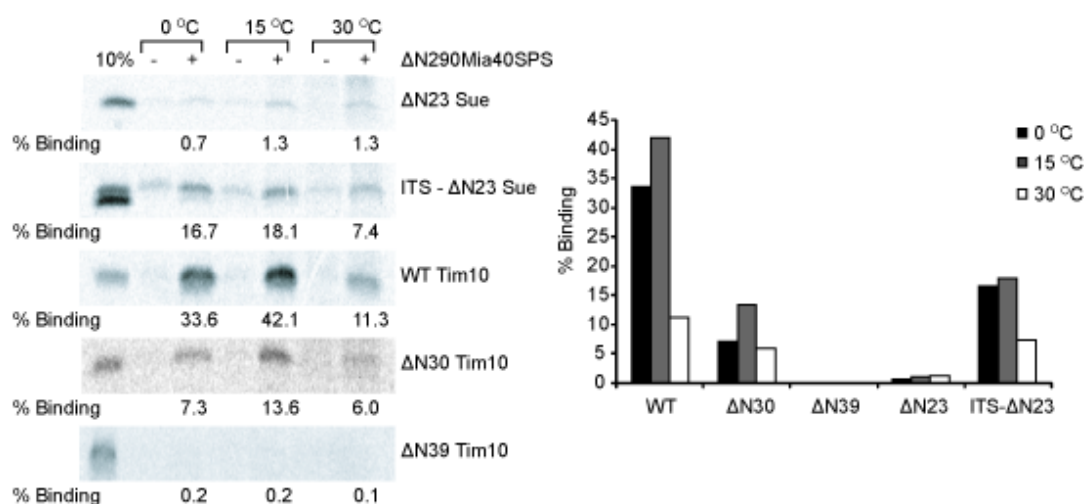
**Προσδιορισμός του σήματος εντοπισμού στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού της Mia40**



**Σχήμα 4.1:** Αλληλουχίες αμινοξέων των Mia40 και Tim10. Α. Αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης Mia40 του σακχαρομύκητα. Με σκούρο μπλε φαίνεται η αλληλουχία 1-244, ενώ με ανοικτό μπλε η αλληλουχία 245-290. Το ενεργό κέντρο CPC απεικονίζεται με κόκκινο, ενώ το διπλό CX<sub>9</sub>C μοτίβο απεικονίζεται με πράσινο. Β. Αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης Tim10 του σακχαρομύκητα. Με σκούρο μπλε φαίνεται η αλληλουχία 1-30, ενώ με κόκκινο η αλληλουχία 31-39 (ITS). Το διπλό CX<sub>3</sub>C μοτίβο φαίνεται με πράσινο χρώμα.

#### 4.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφουμε τη διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας που στοχεύει τις πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου στη Mia40, την πρωτεΐνη που τις αναδιπλώνει μέσω οξείδωσης, δημιουργώντας ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας στόχευσης στη Mia40, πήραμε ένα από τα υποστρώματά της, τη Tim10, και είδαμε πώς αλληλεπιδρά με τη Mia40 η περιοχή κοντά στη πρώτη κυστεΐνη της, η οποία είναι αυτή που αναγνωρίζεται πρώτη από τη Mia40. Με αυτόν τον τρόπο, προσδιορίσαμε το τμήμα της αλληλουχίας της Tim10 που αναγνωρίζεται από τη Mia40 (αλληλουχία ITS – Intermembrane space Targeting Signal), καθώς και το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Έτσι, καταλήξαμε σε ένα γενικότερο μοτίβο το οποίο αναγνωρίζεται από τη Mia40, το οποίο δρα ως το σήμα στόχευσης στη πρωτεΐνη αυτή, το οποίο βρίσκεται στα περισσότερα από τα υποστρώματα της Mia40.



**Σχήμα 4.2:** Πρόσδεση διάφορων ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών στη ΔN290Mia40SPS σε διάφορες θερμοκρασίες. Ραδιοσημασμένες ΔN23 Sue, ITS – ΔN23 Sue, αγρίου τύπου (WT) Tim10, ΔN30 Tim10 και ΔN39 Tim10 επώαστηκαν στους 0°C, στους 15°C ή στους 30°C για 2 ώρες με σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads) (-) ή με σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης στα οποία είχε προσδεθεί καθαρισμένη ΔN290Mia40SPS που έφερε επίτοπο έξι ιστιδινών (+). Τα σφαιρίδια μετά τη πρόσδεση αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. Το 10% της ραδιενεργής πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση φορτώθηκε επίσης στη πηκτή. Οι αριθμοί κάτω από τα σχήματα αντιστοιχούν στη ποσότητα της ραδιενεργής πρωτεΐνης που προσδέθηκε σε σχέση με τη συνολική ραδιενεργή πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε. Στο διάγραμμα δεξιά φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα του πειράματος. Η ποσοτικοποίηση μετά την αυτοραδιογραφία έγινε με το πρόγραμμα Molecular Dynamics ImageQuant 5.2.

## 4.2 Αποτελέσματα

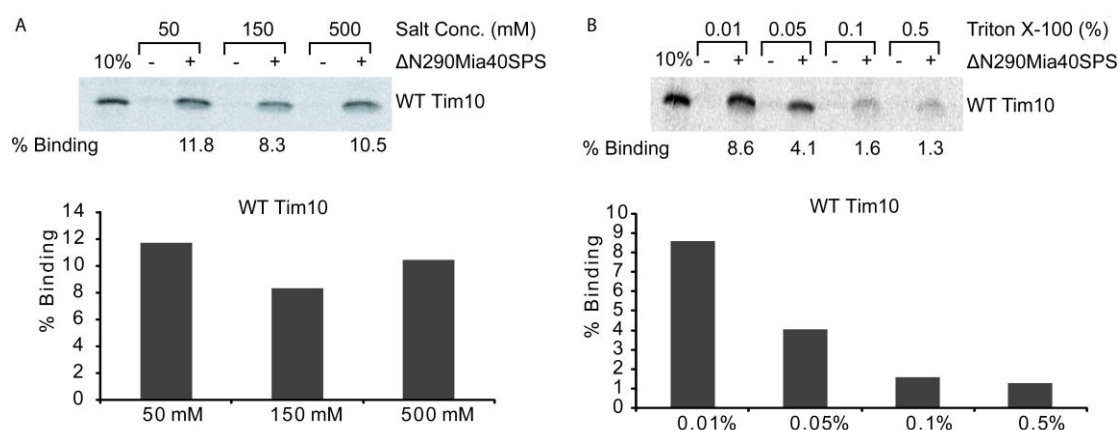
4.2.1 Το εννιαπεπτίδιο που βρίσκεται πριν από τη πρώτη κυστεΐνη της Tim10 είναι σημαντικό για τη πρόσδεση της Tim10 στη Mia40.

Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας της Tim10 που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή της με τη Mia40 μελετήθηκε η πρόσδεση της Tim10, της ΔN30 Tim10 και της ΔN39 Tim10 στη ΔN290Mia40 SPS (σχήμα 4.1). Επιλέχθηκε η ΔN290Mia40 SPS επειδή η έκδοση αυτή της Mia40 είναι πιο σταθερή από τη πρωτεΐνη του αγρίου τύπου. Η πρωτεΐνη αυτή φέρει επίσης μεταλλάξεις στις κυστεΐνες του ενεργού της κέντρου, ώστε οι αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύθηκαν να είναι λόγω της αναγνώρισης της Tim10 από τη Mia40 και όχι λόγω σχηματισμού δισουλφιδικών γεφυρών μεταξύ Mia40 και Tim10. Όπως είναι γνωστό, η πρώτη κυστεΐνη, που βρίσκεται στη θέση 40 της αλληλουχίας της Tim10, είναι η πρώτη που αντιδρά με τη Mia40 σχηματίζοντας μεικτούς δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ Tim10 και Mia40 (Milenkovic, Gabriel et al. 2007; Sideris and Tokatlidis 2007). Για να

δούμε την αλληλεπίδραση, ραδιοσημασμένη Tim10 επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης για δύο ώρες σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η πρωτεΐνη του αγρίου τύπου (WT Tim10) προσδένεται στους 0°C, στους 15°C και στους 30°C σε ποσοστό 16,7%, 18,1% και 7,4% αντίστοιχα (σχήμα 1, WT Tim10). Αφαιρώντας τα 30 αμινοτελικά αμινοξέα από την αλληλουχία του Tim10, ( $\Delta$ N30 Tim10), εξακολουθούμε να έχουμε πρόσδεση της Tim10 στη Mia40, αν και μειωμένη (σχήμα 4.2,  $\Delta$ N30Tim10). Αφαιρώντας εννέα αμινοξέα επιπλέον από την αλληλουχία της Tim10 ( $\Delta$ N39 Tim10), η πρόσδεση της Tim10 στη Mia40 πέφτει κοντά στο 0 (σχήμα 4.2,  $\Delta$ N39Tim10). Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι η αλληλουχία της Tim10 από τη θέση 30 ως 39, που βρίσκεται αμέσως πριν τη πρώτη κυστεΐνη της Tim10, είναι σημαντική για την αναγνώρισή της από τη Mia40. Η πρόσδεση της Tim10 στη Mia40 εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η πρόσδεση φαίνεται να αυξάνεται, πηγαίνοντας από τους 0°C στους 15°C, ενώ μειώνεται καθώς πηγαίνουμε από τους 15°C στους 30°C (σχήμα 4.2).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι το εννιαπεπτίδιο πριν από τη πρώτη κυστεΐνη προσθέσαμε την αλληλουχία αυτή σε μία πρωτεΐνη που δεν αποτελεί κανονικά υποστρώμα για τη Mia40. Επιλέξαμε τη  $\Delta$ N23 Su e, που προκύπτει από την υπομονάδα e της  $F_0/F_1$  ATP συνθάσης (Su e) αφαιρώντας την αλληλουχία στόχευσής της στο μιτοχόνδριο (κεφάλαιο 3). Η  $\Delta$ N23 Su e προσδένεται σε πολύ μικρό ποσοστό στη Mia40, επειδή δεν αναγνωρίζεται από αυτή (σχήμα 4.2,  $\Delta$ N23Sue). Όταν προστέθηκε η αλληλουχία 30-39 της Tim10 στο αμινοτελικό άκρο της  $\Delta$ N23 Su e (ITS –  $\Delta$ N23 Su e), η πρωτεΐνη μπορούσε πλέον να προσδένεται ικανοποιητικά στη Mia40 (σχήμα 4.2, ITS- $\Delta$ N23Sue). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η αλληλουχία που προσθέσαμε από μόνη της είναι αρκετή για την αναγνώριση του υποστρώματος από τη Mia40 και ότι χωρίς αυτή δεν έχουμε πρόσδεση του υποστρώματος στη Mia40.

Για την ταυτοποίηση του είδους της αλληλεπίδρασης που προσδένει την Tim10 στη Mia40, επαναλήφθηκε το πείραμα πρόσδεσης αυξάνοντας τη συγκέντρωση του NaCl ή αυξάνοντας τη συγκέντρωση του απορρυπαντικού Triton X-100. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης, οι ετεροπολικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μειώνονται, ενώ η παρουσία του απορρυπαντικού συναγωνίζεται τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η μεταβολή της συγκέντρωσης του NaCl στο διάλυμα πρόσδεσης δεν άλλαξε σημαντικά τη ποσότητα της Tim10 που προσδένεται στη Mia40 (σχήμα 4.3A), γεγονός που μας υποδεικνύει ότι η Tim10 δεν

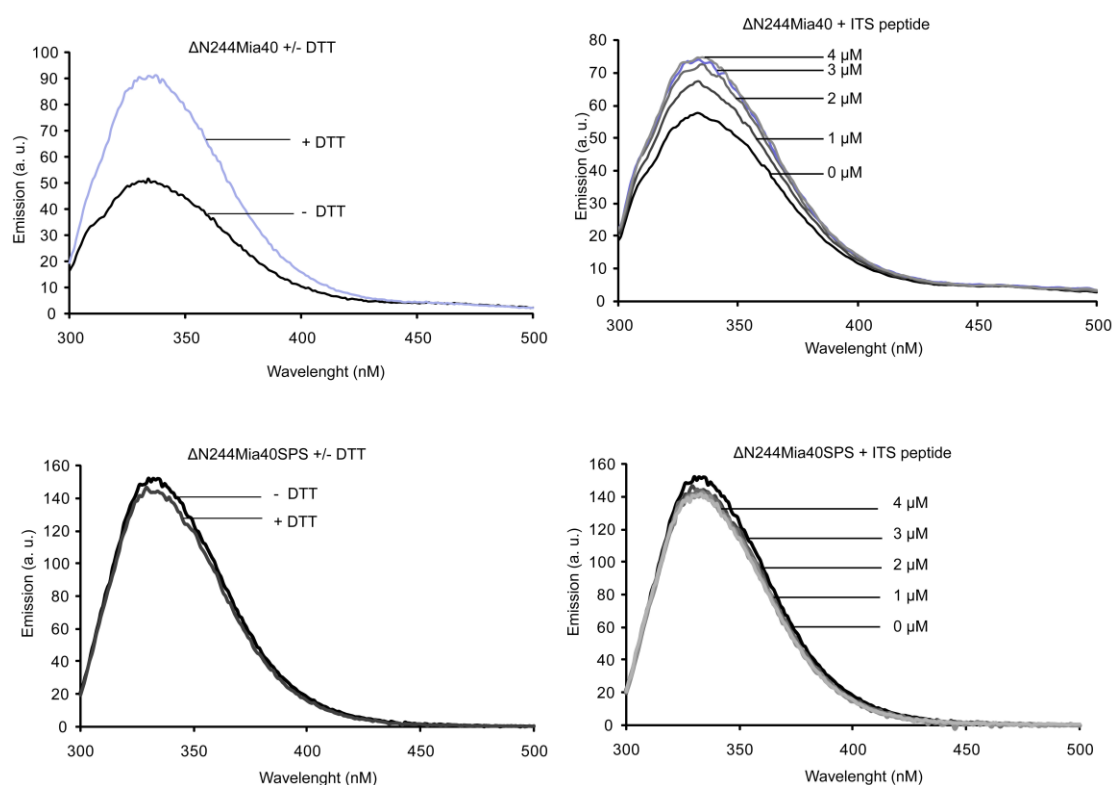


**Σχήμα 4.3: Εξάρτηση της πρόσδεσης της Tim10 στη Mia40 από τη συγκέντρωση NaCl και τη συγκέντρωση απορρυπαντικού.** Ραδιοσημασμένη αγρίου τύπου (WT) Tim10 επώαστηκε στους 30°C για 2 ώρες με σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads) (-) ή με σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης στα οποία είχε προσδεθεί καθαρισμένη ΔN290Mia40SPS που έφερε επίτοπο έξι ιστιδινών (+). A. Πρόσδεση σε διαλύματα με συγκέντρωση NaCl 50 mM, 150 mM και 500 mM, 0,01% Triton, pH 7,4. B. Πρόσδεση σε διάλυμα που περιείχε 150 mM NaCl, pH 7,4, και συγκεντρώσεις Triton 0,01%, 0,05%, 0,1% και 0,5%. Τα σφαιρίδια μετά τη πρόσδεση αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. Το 10% της ραδιενεργής πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση φορτώθηκε επίσης στη πηκτή. Οι αριθμοί κάτω από τα σχήματα αντιστοιχούν στη ποσότητα της ραδιενεργής πρωτεΐνης που προσδέθηκε σε σχέση με τη συνολική ραδιενεργή πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε. Στα διαγράμματα κάτω φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα του πειράματος. Η ποσοτικοποίηση μετά την αυτοραδιογραφία έγινε με το πρόγραμμα Molecular Dynamics ImageQuant 5.2.

προσδένεται στη Mia40 μέσω ετεροπολικών αλληλεπιδράσεων. Αντιθέτως, η αύξηση της συγκέντρωσης του απορρυπαντικού Triton X-100 μετέβαλλε σημαντικά τη ποσότητα της Tim10 που προσδέθηκε στη Mia40 (σχήμα 4.3B). Τα αποτελέσματα αυτά μας υποδεικνύουν ότι η Tim10 προσδένεται στη Mia40 κυρίως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

#### 4.2.2 Το εννιαπεπτίδιο που βρίσκεται πριν από τη πρώτη κυστεΐνη της Tim10 αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή της Mia40 και την ανάγει

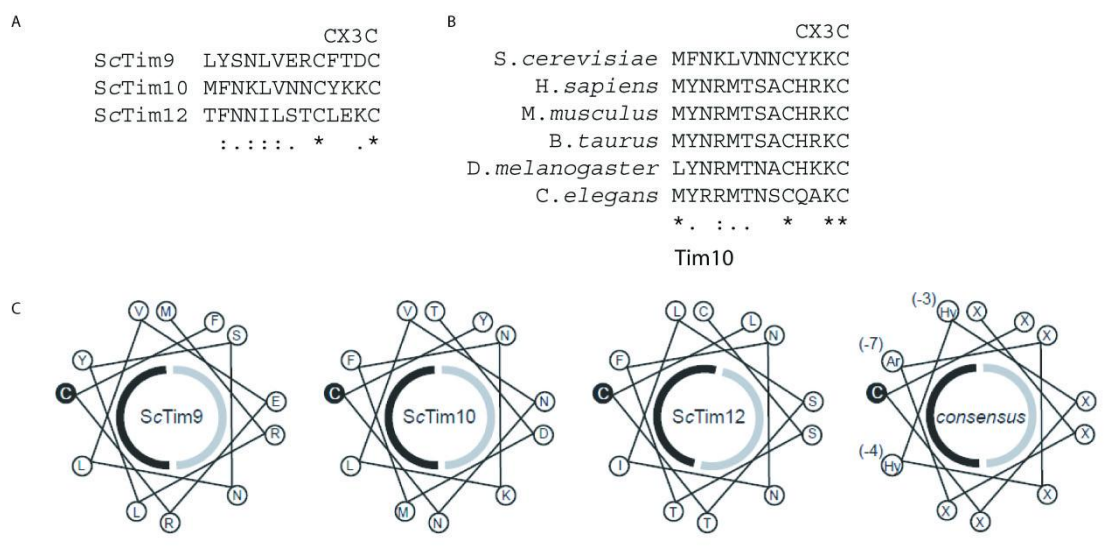
Η Mia40 έχει μία θρυπτοφάνη κοντά στο ενεργό κέντρο CPC (σχήμα 4.1). Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να δούμε διαφορές στη δομή του ενεργού κέντρου μέσω φθορισμού της θρυπτοφάνης αυτής, γιατί το μοριακό περιβάλλον της θρυπτοφάνης επηρεάζει το φθορισμό της. Η θρυπτοφάνη έχει μέγιστο απορρόφησης στα 278 nm, ενώ εκπέμπει με μέγιστο στο 330-350 nm. Στη περίπτωση της Mia40 το μέγιστο εκπομπής μετά από διέγερση στα 278 nm είναι τα 334 nm (σχήμα 4.4). Η καθαρισμένη Mia40 βρίσκεται στην οξειδωμένη της μορφή, ενώ το ενεργό της



**Σχήμα 4.4: Φάσματα φθορισμού της ΔN244Mia40.** Διάλυμα καθαρισμένης ΔN244Mia40 (πάνω) και ΔN244Mia40SPS (κάτω) συγκέντρωσης 1 μM διεγέρθηκε στα 278 nm και καταγράφηκε το φάσμα εκπομπής από τα 300 ως τα 500 nm. 10 μM DTT προστέθηκαν (+DTT) (αριστερά) ή πεπτίδιο ITS σε συγκεντρώσεις από 0 ως 4 μM (δεξιά).

κέντρο μπορεί να αναχθεί με προσθήκη του αναγωγικού DTT (Banci, Bertini et al. 2009). Μετά από προσθήκη 1 mM DTT βλέπουμε αύξηση της εκπομπής της θρυπτοφάνης (σχήμα 4.4, πάνω αριστερά), γεγονός που μας υποδεικνύει αλλαγές στο περιβάλλον της, που οφείλεται στην αναγωγή του ενεργού κέντρου CPC. Οπότε, με τη μέθοδο του φθορισμού μπορούμε να ξεχωρίσουμε την ανηγμένη από την οξειδωμένη μορφή της Mia40. Προσθήκη DTT στην ανενεργή μορφή της Mia40 (Mia40 SPS), όπου το ενεργό κέντρο δεν περιέχει κυστεΐνες, οπότε δεν υπόκειται σε οξείδωση ή αναγωγή από το DTT, δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στο φάσμα εκπομπής (σχήμα 4.4, κάτω αριστερά).

Το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην αλληλουχία της Tim10 από το αμινοξύ 31 ως 39 (met-phe-asn-lys-leu-val-asn-asn-cys - MFNKLVNNC) συντέθηκε. Το πεπτίδιο αυτό προστέθηκε σε συγκεντρώσεις από 1 μM ως 4 μM σε διάλυμα ΔN244Mia40 και το



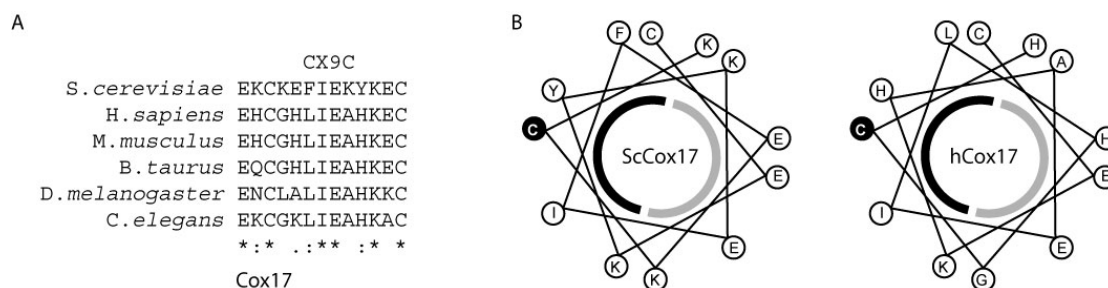
**Σχήμα 4.5: Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών και απεικονίσεις α-έλικας.** Ευθυγράμμιση (alignment) των αλληλουχιών τριών μικρών Tim πρωτεϊνών από τον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (A) και των αλληλουχιών από την Tim10 διάφορων ευκαρυωτικών οργανισμών (B). (C) Σχηματική απεικόνιση δομών α-έλικας για τις αλληλουχίες των μικρών Tim από τον σακχαρομύκητα και των κοινών χαρακτηριστικών που προκύπτουν από τις ευθυγραμμίσεις των αλληλουχιών (consensus). Το μαύρο ημικύκλιο δείχνει την υδρόφοβη επιφάνεια της α-έλικας, ενώ το γκριζό δείχνει την υδρόφιλη.

φάσμα φθορισμού καταγράφηκε. Καθώς προσθέταμε το πεπτίδιο, αυξανόταν η ένταση του φάσματος εκπομπής, γεγονός που μας υποδεικνύει ότι το πεπτίδιο αντιδρά με το ενεργό κέντρο της Mia40 προκαλώντας αναγωγή (σχήμα 4.4, πάνω δεξιά). Αυτό σημαίνει ότι το εννιαπεπτίδιο μπορεί και αντιδρά *in vivo* με τη Mia40. Προσθήκη πεπτιδίου στην ανενεργή μορφή της Mia40 δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο φάσμα εκπομπής (σχήμα 4.4, κάτω δεξιά).

**4.2.3 Οι μικρές Tim πρωτεΐνες έχουν κοινά χαρακτηριστικά στην αλληλουχία τους πριν τη πρώτη κυστεΐνη της αλληλουχίας τους που δρουν ως σήμα για την αναγνώρισή τους από τη Mia40.**

Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των μικρών Tim πριν από την πρώτη κυστεΐνη της αλληλουχίας (σχήμα 4.5A) τους φανερώνει ότι υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά σε όλες τις αλληλουχίες. Σε απόσταση τρία (-3) και τέσσερα (-4) αμινοξέα πριν από τη κυστεΐνη, έχουμε σε όλες τις περιπτώσεις υδρόφοβα αμινοξέα, ενώ σε απόσταση επτά αμινοξέων (-7) έχουμε αρωματικό αμινοξύ (σχήμα 4.5A). Οι περιοχές αυτές των





**Σχήμα 4.6: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών από πρωτεΐνες Cox17 από διάφορους οργανισμούς και απεικόνιση α-έλικας.** (A) Ευθυγράμμιση αλληλουχιών της Cox17 από διάφορους οργανισμούς. (B) Σχηματική απεικόνιση δομών α-έλικας για τις αλληλουχίες της Cox17 από τον σακχαρομύκητα (ScCox17) και από τον άνθρωπο (hCox17). Το μαύρο ημικύκλιο δείχνει την υδρόφοβη επιφάνεια της α-έλικας, ενώ το γκριζό δείχνει την υδρόφιλη.

μικρών Tim, σύμφωνα και με τις κρυσταλλικές τους δομές (Webb, Gorman et al. 2006; Baker, Webb et al. 2009) έχουν δομή α-έλικας. Όπως βλέπουμε από τις απεικονίσεις α-έλικας (σχήμα 4.5C), τα αμινοξέα αυτά βρίσκονται από την ίδια πλευρά της έλικας και σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους. Κάνοντας ευθυγράμμιση των αλληλουχιών από πρωτεΐνες Tim10 που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς βλέπουμε ότι το υδρόφοβο αμινοξύ στη θέση -4 και το αρωματικό αμινοξύ στη θέση -7 είναι συντηρημένα. Τα αποτελέσματα αυτά, μας υποδεικνύουν ότι τα αμινοξέα αυτά είναι σημαντικά για την αναγνώριση των υποστρωμάτων από τη Mia40.

#### 4.2.4 Το σήμα στόχευσης της Cox17 βρίσκεται στο τμήμα που βρίσκεται μετά την τρίτη κυστεΐνη

Η Cox17 είναι μία πρωτεΐνη με διπλό μοτίβο CX<sub>9</sub>C και είναι υπόστρωμα για τη Mia40. Βιοχημικά πειράματα που έχουν γίνει στο εργαστήριό μας (Sideris, DP) έχουν δείξει ότι αλληλεπιδρά με τη Mia40 σχηματίζοντας μεικτό δισουλφιδικό δεσμό με τη τρίτη κυστεΐνη της αλληλουχίας της. Η Cox17 δεν έχει τα χαρακτηριστικά στην αλληλουχία της πριν από την τρίτη κυστεΐνη που θα μπορούσαν να είναι σήμα στόχευσης (σχήμα 4.6A). Αν όμως παρατηρήσουμε την αλληλουχία μετά από τη τρίτη κυστεΐνη, βλέπουμε ότι η αλληλουχία της Cox17 από τον σακχαρομύκητα έχει ένα υδρόφοβο αμινοξύ στη θέση +4 (ισολευκίνη, I) και ένα αρωματικό στη θέση +7 (τυροσίνη, Y) (σχήμα 4.6A). Η περιοχή αυτή της Cox17 έχει δομή α-έλικας, όπως

φαίνεται από τη NMR δομή της σε διάλυμα (Banci, Bertini et al. 2008). Η απεικόνιση της Cox17 σε μορφή  $\alpha$ -έλικας (σχήμα 4.6B) μας δείχνει ότι τα αμινοξέα αυτά βρίσκονται από την ίδια πλευρά της ενεργής κυστεΐνης και σε κοντινή απόσταση από αυτή. Οπότε, το σήμα που στοχεύει την Cox17 στη Mia40 βρίσκεται μετά την τρίτη κυστεΐνη και έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με το σήμα που στοχεύει τις μικρές Tim πρωτεΐνες.

Κοιτώντας τις αλληλουχίες της Cox17 από διαφορετικούς οργανισμούς (σχήμα 4.6A) βλέπουμε ότι η ισολευκίνη στη θέση +4 είναι συντηρημένη. Αντιθέτως, η τυροσίνη στη θέση +7 δεν είναι, αλλά έχει αντικατασταθεί στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με ιστιδίνη, η οποία δεν είναι αρωματικό αμινοξύ, φέρει όμως δακτύλιο ο οποίος θα μπορούσε να αναγνωριστεί με ανάλογο τρόπο από τη Mia40.

#### *4.2.5 Πρόβλεψη των πιθανών σημάτων στόχευσης στη Mia40 των γνωστών υποστρωμάτων της*

Με βάση τα παραπάνω αναζητήσαμε πιθανές αλληλουχίες που θα μπορούσαν να αναγνωριστούν από τη Mia40 στα γνωστά υποστρώματά της (Gabriel, Milenkovic et al. 2007). Αναζητήσαμε αλληλουχίες που περιέχουν σε απόσταση τεσσάρων και επτά αμινοξέων από οποιαδήποτε κυστεΐνη του διπλού CX<sub>n</sub>C μοτίβου ένα υδρόφοβο ή αρωματικό αμινοξύ, έχοντας όμως τουλάχιστον ένα αρωματικό αμινοξύ στις θέσεις αυτές. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης αυτής φαίνονται στον πίνακα 4.1. Οι αλληλουχίες αυτές θα μπορούσαν να δράσουν ως σήμα στόχευσης των πρωτεϊνών αυτών στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού της Mia40.

**Πίνακας 4.1: Πρόβλεψη αλληλουχιών στόχευσης.** Όλα τα προβλεπόμενα υποστρώματα της Mia40 με διπλό CX3C ή CX9C μοτίβο motif παρουσιάζονται. C1,C2,C3 και C4 είναι η πρώτη, η δεύτερη, η τρίτη και η τέταρτη κυστεΐνη των CXnC μοτίβων. Η αλληλουχία 10 αμινοξέων πριν ή μετά από κάθε κυστεΐνη παρουσιάζεται. Τα πιθανά σήματα στόχευσης φαίνονται σκιασμένα. Τα αμινοξέα που προσδένονται με τη Mia40 παρουσιάζονται έντονα.

Πρωτεΐνη		C1		C2	
		Πριν τη κυστεΐνη	Μετά τη κυστεΐνη	Πριν τη κυστεΐνη	Μετά τη κυστεΐνη
CX3C	yTim9	MRL <b>Y</b> SNL <b>V</b> ERC	CFTDNCNDFTT	SNLVERCFTD <b>C</b>	CVNDFRRSKLT
	yTim10	TDM <b>F</b> NKLVN <b>N</b> C	CYK <b>K</b> CINTSYS	NKLVN <b>N</b> CYK <b>K</b> C	CINTSYSEGEL
	yTim12	CST <b>F</b> NNIL <b>S</b> T <b>C</b>	CLEK <b>C</b> IPHEGF	NNIL <b>S</b> T <b>C</b> LEK <b>C</b>	CIPHEGFGE <b>P</b> D
	yTim8	QMS <b>I</b> HQ <b>F</b> T <b>N</b> I <b>C</b>	CFK <b>K</b> CVESVND	HQ <b>F</b> T <b>N</b> I <b>C</b> FK <b>K</b> C	CVESVND <b>S</b> NLS
	yTim13	TELVNKISE <b>N</b> C	CFEK <b>C</b> L <b>T</b> SPYA	NKISE <b>N</b> CFEK <b>C</b>	CL <b>T</b> SPYA <b>T</b> RND
CX9C	yMia40	PCLGGMAHG <b>P</b> C	CGEE <b>F</b> KSA <b>F</b> SC	CGEE <b>F</b> KSA <b>F</b> SC	CFYVYSEAE <b>P</b> K
	yCox17	CEDKPKPCC <b>V</b> C	CKPEKEER <b>D</b> T <b>C</b>	CKPEKEER <b>D</b> T <b>C</b>	CILFNGQDSE <b>K</b>
	yCox19	GSFPLDHDG <b>E</b> C	CTKY <b>M</b> QE <b>Y</b> L <b>K</b> C	CTKY <b>M</b> QE <b>Y</b> L <b>K</b> C	CMQLVQ <b>N</b> ENAM
	yCox23	LKADSQYYD <b>P</b> C	CEESSKLS <b>F</b> Q <b>C</b>	CEESSKLS <b>F</b> Q <b>C</b>	CLERN <b>S</b> YDR <b>S</b> K
	yMic14	EIVIEDVVAN <b>C</b>	CPQE <b>F</b> LQ <b>Y</b> H <b>K</b> C	CPQE <b>F</b> LQ <b>Y</b> H <b>K</b> C	CIRDNEEN <b>P</b> G <b>K</b>
	yMic17	TQTDQQLG <b>R</b> T <b>C</b>	CEID <b>A</b> R <b>N</b> F <b>T</b> R <b>C</b>	CEID <b>A</b> R <b>N</b> F <b>T</b> R <b>C</b>	CLDENNG <b>N</b> F <b>Q</b> I
	yMRP10	KPIIRQEANK <b>C</b>	CLV <b>L</b> MS <b>N</b> LL <b>Q</b> C	CLV <b>L</b> MS <b>N</b> LL <b>Q</b> C	CWSS <b>Y</b> GH <b>M</b> SP <b>K</b>
	yMDM35	NIMSASFA <b>P</b> E <b>C</b>	CTDLKYKY <b>D</b> S <b>C</b>	CTDLKYKY <b>D</b> S <b>C</b>	CFNEWYSE <b>K</b> FL
	YBL059C-A	PQLEAER <b>F</b> H <b>S</b> C	CLD <b>F</b> INAL <b>D</b> K <b>C</b>	CLD <b>F</b> INAL <b>D</b> K <b>C</b>	CHQKEY <b>Y</b> K <b>R</b> IF
	YLR218c	VWDTRISK <b>T</b> G <b>C</b>	CYVENL <b>A</b> LL <b>Q</b> C	CYVENL <b>A</b> LL <b>Q</b> C	CHAETGD <b>W</b> R <b>Q</b> C

Protein		C3		C4	
		Πριν τη κυστεΐνη	Μετά τη κυστεΐνη	Πριν τη κυστεΐνη	Μετά τη κυστεΐνη
CX3C	yTim9	TSKLTNKEQT <b>C</b>	CIMKCSEKFLK	TNKEQTCIMK <b>C</b>	CSEKFLKHSER
	yTim10	EGELNKNESS <b>C</b>	CLDRCVAKYFE	NKNESSCLDR <b>C</b>	CVAKYFETNVQ
	yTim12	EPDLTKGEQC <b>C</b>	CIDRCVAKMHY	TKGEQCCIDR <b>C</b>	CVAKMHYSNRL
	yTim8	DSNLSSQEEQ <b>C</b>	CLSNCVNRFLD	SSQEEQCLSN <b>C</b>	CVNRFLDTNIR
	yTim13	TSPYATRNDAC <b>C</b>	CIDQCLAKYMR	ATRNDACIDQ <b>C</b>	CLAKYMRSWNV
CX9C	yMia40	YSEAEPKGID <b>C</b>	CVEKFQHMQDC	CVEKFQHMQD <b>C</b>	CFRKYPEHYAE
	yCox17	ILFNGQDSEK <b>C</b>	CKEFIEKYKEC	CKEFIEKYKE <b>C</b>	CMKGYGFVPS
	yCox19	QLVQENAMNC <b>C</b>	CRLAKDYLR <b>C</b>	CRLAKDYLR <b>C</b>	CRMDHQLMDYD
	yCox23	LERNDYDRSK <b>C</b>	CQEYFDA <b>Y</b> REC	CQEYFDA <b>Y</b> REC	CKKQWLTARRK
	yMic14	IRDNEENPGK <b>C</b>	CKDGRMILSTC	CKDGRMILST <b>C</b>	CIREKVPSVKS
	yMic17	LDENNGNFQIC <b>C</b>	CDYYLQQLKAC	CDYYLQQLKAC	CQEAARQY*
	yMRP10	WSSYGHMSPK <b>C</b>	CAGLVTELKSC	CAGLVTELK <b>C</b>	CATSESALGKR
	yMDM35	FLKGKSVENEC <b>C</b>	CSKQWYA <b>Y</b> TTC	CSKQWYA <b>Y</b> TTC	CVNAALVKQGI
	YBL059C-A	KEYYKRIFGL <b>C</b>	CNNEKDALNKC	CNNEKDALN <b>C</b>	CLKEALNNKKR
YLR218c	CHAETGDWRQ <b>C</b>	CFNEMALFRKC	CFNEMALFR <b>C</b>	CWEKNGNRERV	

### 4.3 Συζήτηση

Σύμφωνα με τα παραπάνω η αλληλουχία που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της Tim10 στη Mia40 και στοχεύει την Tim10 στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω μονοπατιού Mia40 βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία της Tim10 και πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνει τα αμινοξέα από τη θέση 30 ως 39 (αλληλουχία ITS – Intermembrane space Targeting Signal). Μελέτη της στόχευσης στο μιτοχόνδριο της Tim10 (Sideris, DP, Petrakis, N et al., J. Cell Biol. submitted, βλ. παράρτημα) έδειξε ότι το ΔN30Tim10 εισέρχεται στο μιτοχόνδριο και σχηματίζει μεικτό δισουλφιδικό δεσμό με την Mia40, ενώ το ΔN39Tim10 δεν σχηματίζει ενδιάμεσο δισουλφιδικό δεσμό με την Mia40, επειδή δεν εισέρχεται μέσα σε αυτό. Οπότε, το σήμα στόχευσης στη Mia40 και το σήμα που αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης βρίσκεται στην ίδια περιοχή της αλληλουχίας της Tim10. Αυτό σημαίνει ότι για τις πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου που στοχεύονται μέσω του μονοπατιού της Mia40 το σήμα στόχευσης δε βρίσκεται στο αμινοτελικό τμήμα της όπως συμβαίνει στις πρωτεΐνες με τυπικό σήμα στόχευσης που στοχεύονται στη μήτρα. Από την άλλη, αν αλλάξουμε το σήμα στόχευσης στο μιτοχόνδριο με κάποιο άλλο σήμα στόχευσης στο διαμεμβρανικό χώρο, η Tim10 εισέρχεται στον διαμεμβρανικό χώρο, χωρίς να σχηματίζει ενδιάμεσο δισουλφιδικό δεσμό με τη Mia40. Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι η αλληλουχία ITS χρειάζεται για να αλληλεπιδράσει η Mia40 με την Tim10 στο μιτοχόνδριο (Sideris, DP, Petrakis, N et al., J. Cell Biol. submitted).

Η αλληλουχία ITS από μόνη της μπορεί να αποτελέσει σήμα στόχευσης στο μονοπάτι της Mia40. Προσθήκη της αλληλουχίας ITS στο αμινοτελικό τμήμα της ΔN23 Su e, μιας πρωτεΐνης που δεν στοχεύεται στο μιτοχόνδριο (κεφάλαιο 3), στοχεύει τη πρωτεΐνη στο μιτοχόνδριο, και αλληλεπιδρά με Mia40. Επίσης, η προσθήκη της αλληλουχίας ITS στη μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη DHFR προκαλεί στόχευσή της στο μιτοχόνδριο, παρόλο που δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση με τη Mia40. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι η ITS-DHFR πρωτεΐνη δεν περνάει από το διαμεμβρανικό χώρο, οπότε δεν έρχεται σε επαφή με τη Mia40, και για τον λόγο αυτό δεν βλέπουμε κάποιο ενδιάμεσο (Sideris, DP, Petrakis, N et al., J. Cell Biol. submitted). Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν την αλληλουχία ITS ως αλληλουχία στόχευσης στο μιτοχόνδριο και ως αλληλουχία στόχευσης στη Mia40.

Η ύπαρξη ανάλογων αλληλουχιών σε άλλες μικρές Tim πρωτεΐνες επιβεβαιώθηκε πειραματικά. Έτσι, βρέθηκε ότι η αλληλουχία από το αμινοξύ 23 ως το αμινοξύ 34 της Tim9 και η αλληλουχία από το αμινοξύ 28 ως το αμινοξύ 39 της Tim12 είναι σημαντικά για την αλληλεπίδρασή τους με τη Mia40 (Sideris, DP, Petrakis, N et al., J. Cell Biol. submitted). Ένα παρόμοιο σήμα για την Tim9 βρέθηκε και από ανεξάρτητη έρευνα για το σήμα στόχευσης της Tim9 στη Mia40 (Milenkovic, Ramming et al. 2009).

Η σημαντικότητα των αμινοξέων στις θέσεις -4 και -7 πριν από τη πρώτη κυστεΐνη της Tim10 επιβεβαιώθηκε επιπλέον μέσω υπολογιστικής προσομοίωσης της αλληλεπίδρασης. Η αλληλεπίδραση της αλληλουχίας ITS ( $\alpha$ -ελικωτή δομή) με τη Mia40 προσομοιώθηκε μέσω του προγράμματος HADDOCK (Dominguez, Boelens et al. 2003). Μέσω αυτής της προσομοίωσης βρέθηκε ότι η αλληλουχία ITS ταιριάζει σε μία υδρόφοβη κοιλότητα στη δομή της Mia40 και ότι τα αμινοξέα στις θέσεις -4 και -7 αλληλεπιδρούν με τη Mia40. Επιπλέον, πειράματα μεταλλαξιγένεσης στο αμινοξύ στη θέση -7 συμφωνούν με τα παραπάνω. Μεταλλαγή της φαινυλαλανίνης στη θέση -7 σε αλανίνη έχει ως αποτέλεσμα να μη σχηματίζεται ενδιάμεσο μεταξύ της Mia40 και της Tim10 (Sideris, DP, Petrakis, N et al., J. Cell Biol. submitted).

Η αναζήτηση αλληλουχιών με τα χαρακτηριστικά της ITS στα γνωστά υποστρώματα της Tim10 μας έδειξε ότι όλες σχεδόν έχουν τουλάχιστον μία αλληλουχία που θα μπορούσε να αναγνωριστεί από τη Mia40. Εφαρμόζοντας τα παραπάνω έχουμε ένα τρόπο πρόβλεψης της στόχευσης μιας πρωτεΐνης στο μονοπάτι της Mia40 όπως επίσης μπορούμε να προβλέψουμε ποια από τις κυστεΐνες του υποστρώματος θα αλληλεπιδράσει πρώτη με τη Mia40. Αυτό είναι ένα σημαντικό εργαλείο, γιατί μας βοηθάει στο να κοιτάξουμε στοχευμένα σε μελλοντικά πειράματα εκείνες τις κυστεΐνες που προσδιορίζονται από ένα προβλεπόμενο ITS πριν ή μετά την αλληλουχία.

# **Κεφάλαιο 5**

## **Γενικά συμπεράσματα**

Στα παραπάνω κεφάλαια μελετήθηκαν δύο διαφορετικά μονοπάτια στόχευσης πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο. Στο κεφάλαιο 2 μελετήθηκε το άγνωστο μέχρι στιγμής μονοπάτι στόχευσης στην εσωτερική μεμβράνη πρωτεϊνών με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς κάποια τυπική αλληλουχία στόχευσης. Μελετήθηκε η στόχευση της υπομονάδας  $e$  της  $F_0/F_1$  ATP συνθάσης ( $Su e$ ). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν στοχεύεται μέσω των ήδη γνωστών μονοπατιών εισόδου στο μιτοχόνδριο, αλλά ακολουθεί ένα ξεχωριστό μονοπάτι που περιλαμβάνει αναγνώριση από τους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης, εισαγωγή μέσω του καναλιού TOM που εξαρτάται από το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης, αναγνώριση και αλληλεπίδραση με τις μικρές Tim πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου και εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη. Η εισαγωγή στην εσωτερική μεμβράνη της πρωτεΐνης αυτής μπορεί να συμβεί χωρίς τη δράση κάποιου από τα σύμπλοκα της εσωτερικής μεμβράνης που ενσωματώνουν πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη. Αντιθέτως, η ενσωμάτωση της  $Su e$  σε διπλοστιβάδες λιπιδίων (λιπιδώματα) μπορεί να γίνει αυθόρμητα.

Τα αποτελέσματα αυτά μας δείχνουν την ύπαρξη ενός νέου, ανεξερεύνητου μονοπατιού στόχευσης στο μιτοχόνδριο, μέσω του οποίου πιθανότατα στοχεύονται αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες που ενσωματώνονται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Οι λεπτομέρειες του μονοπατιού αυτού παραμένουν ανεξερεύνητες και θα πρέπει να μελετηθούν σε μελλοντικές εργασίες.

Μελλοντικές εργασίες μπορούν να επιβεβαιώσουν την αυθόρμητη εισαγωγή της  $Su e$  στην εσωτερική μεμβράνη ή να βρουν τα συστατικά που βοηθούν την εισαγωγή της  $Su e$  στην εσωτερική μεμβράνη. Επίσης, η στόχευση των υπόλοιπων πρωτεϊνών με ένα διαμεμβρανικό τμήμα και χωρίς τυπική αλληλουχία στόχευσης θα μπορούσε να μελετηθεί για να επιβεβαιώσει τη γενικότητα του μονοπατιού αυτού. Ακόμη, επιβεβαίωση της ύπαρξης ανάλογου μονοπατιού σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς πέρα του σακχαρομύκητα θα μπορούσε να γίνει, όπως για παράδειγμα σε πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα θυλαστικά.

Στο κεφάλαιο 3 βρήκαμε τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας στόχευσης των πρωτεϊνών που είναι υποστρώματα για τη Mia40. Βρέθηκε η αλληλουχία των μικρών Tim που αλληλεπιδρά με τη Mia40, όπως επίσης μελετήθηκε η φύση της αλληλεπίδρασης αυτής. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να προβλέψουμε πιθανά



υποστρώματα της Mia40 όπως επίσης και τον τρόπο με τον οποίο θα αλληλεπιδράσουν τα υποστρώματα αυτά με τη Mia40.

Το μονοπάτι της Mia40 είναι ένα σχετικά καινούργιο μονοπάτι στόχευσης στο μιτοχόνδριο, αφού ανακαλύφθηκε μόλις τα τελευταία χρόνια. Η αναγνώριση της αλληλουχίας στόχευσης στο μονοπάτι αυτό και του τρόπου αλληλεπίδρασης της Mia40 με τα υποστρώματά της βοηθάει στη καλύτερη κατανόηση του μονοπατιού αυτού, όπως επίσης μας βοηθάει στη καλύτερη κατανόηση της βιογένεσης των υποστρωμάτων του μονοπατιού της Mia40, όπως είναι για παράδειγμα οι μικρές Tim πρωτεΐνες.

Το σύστημα της Mia40 είναι το μοναδικό γνωστό σύστημα που σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς στο ευκαρυωτικό κύτταρο εκτός ενδοπλασματικού δικτύου και υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη μελέτη της οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς του μιτοχονδρίου. Η αναγνώριση του σήματος στόχευσης στο μονοπάτι αυτό, έχει πολλές εφαρμογές, αφού μέσω του σήματος αυτού μπορούμε να κατευθύνουμε μη-φυσιολογικές πρωτεΐνες στο σύστημα αυτό. Αυτό θα μπορούσε να βοηθήσει στη καταπολέμηση δυσλειτουργιών που σχετίζονται με το μιτοχόνδριο, όπως επίσης μας βοηθάει στη καλύτερη κατανόηση των κυτταρικών λειτουργιών.

Μελλοντικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί σε μεγαλύτερο βάθος η αλληλεπίδραση της Mia40 με τα υποστρώματά της. Σε αυτό θα βοηθούσε η ύπαρξη μοριακής δομής της Mia40 με κάποιο υπόστρωμα προσδεμένο πάνω σε αυτή. Επίσης, σημαντική είναι και η μελέτη των βημάτων που ακολουθούν την οξείδωση των υποστρωμάτων της Mia40, όπως για παράδειγμα πως οι μικρές Tim πρωτεΐνες συνδυάζονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν τα σύμπλοκα των μικρών Tim.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα παραπάνω κεφάλαια βοηθούν στη καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας βιογένεσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Η βιογένεση των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο έχει αποδειχτεί ότι είναι μία ιδιαίτερα περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει αρκετά διαφορετικά μονοπάτια και σήματα στόχευσης. Η πολυπλοκότητα του συστήματος αυτού καθιστά επίπονη και χρονοβόρα τη μελέτη του. Η καλύτερη, όμως κατανόηση της βιογένεσης του μιτοχονδρίου θα μας βοηθήσει να καταπολεμήσουμε ασθένειες που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια, όπως επίσης στη καλύτερη κατανόηση του μυστηρίου της ζωής.

# **Κεφάλαιο 6**

## **Βιβλιογραφία**

- Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo and D. Kohda (2000). "Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20." Cell **100**(5): 551-60.
- Ackerman, S. H. and A. Tzagoloff (2005). "Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **80**: 95-133.
- Ahting, U., M. Thieffry, H. Engelhardt, R. Hegerl, W. Neupert and S. Nussberger (2001). "Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria." J Cell Biol **153**(6): 1151-60.
- Ahting, U., T. Waizenegger, W. Neupert and D. Rapaport (2005). "Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria." J Biol Chem **280**(1): 48-53.
- Albrecht, R., P. Rehling, A. Chacinska, J. Brix, S. A. Cadamuro, R. Volkmer, B. Guiard, N. Pfanner and K. Zeth (2006). "The Tim21 binding domain connects the preprotein translocases of both mitochondrial membranes." EMBO Rep **7**(12): 1233-8.
- Alcock, F. H., J. G. Grossmann, I. E. Gentle, V. A. Likic, T. Lithgow and K. Tokatlidis (2008). "Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space." Biochem J **409**(2): 377-87.
- Allen, S., V. Balabanidou, D. P. Sideris, T. Lisowsky and K. Tokatlidis (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**(5): 937-44.
- Amutha, B., D. M. Gordon, Y. Gu and D. Pain (2004). "A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance." Biochem J **381**(Pt 1): 19-23.
- Arnold, I., M. F. Bauer, M. Brunner, W. Neupert and R. A. Stuart (1997). "Yeast mitochondrial F1F0-ATPase: the novel subunit e is identical to Tim11." FEBS Lett **411**(2-3): 195-200.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart and H. Schagger (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." Embo J **17**(24): 7170-8.
- Arselin, G., M. F. Giraud, A. Dautant, J. Vaillier, D. Brethes, B. Couлары-Salin, J. Schaeffer and J. Velours (2003). "The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane." Eur J Biochem **270**(8): 1875-84.
- Arselin, G., J. Vaillier, B. Salin, J. Schaeffer, M. F. Giraud, A. Dautant, D. Brethes and J. Velours (2004). "The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology." J Biol Chem **279**(39): 40392-9.
- Baker, M. J., C. T. Webb, D. A. Stroud, C. S. Palmer, A. E. Frazier, B. Guiard, A. Chacinska, J. M. Gulbis and M. T. Ryan (2009). "Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import." Mol Biol Cell **20**(3): 769-79.
- Banci, L., I. Bertini, C. Cefaro, S. Ciofi-Baffoni, A. Gallo, M. Martinelli, D. P. Sideris, N. Katrakili and K. Tokatlidis (2009). "MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 198-206.

- Banci, L., I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, A. Janicka, M. Martinelli, H. Kozlowski and P. Palumaa (2008). "A structural-dynamical characterization of human Cox17." J Biol Chem **283**(12): 7912-20.
- Bauer, M. F., C. Sirrenberg, W. Neupert and M. Brunner (1996). "Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria." Cell **87**(1): 33-41.
- Becker, T., S. Pfannschmidt, B. Guiard, D. Stojanovski, D. Milenkovic, S. Kutik, N. Pfanner, C. Meisinger and N. Wiedemann (2008). "Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors." J Biol Chem **283**(1): 120-7.
- Belogradov, G. I., J. M. Tomich and Y. Hatefi (1996). "Membrane topography and near-neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f, and g." J Biol Chem **271**(34): 20340-5.
- Beverly, K. N., M. R. Sawaya, E. Schmid and C. M. Koehler (2008). "The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23." J Mol Biol **382**(5): 1144-56.
- Bomer, U., A. C. Maarse, F. Martin, A. Geissler, A. Merlin, B. Schonfisch, M. Meijer, N. Pfanner and J. Rassow (1998). "Separation of structural and dynamic functions of the mitochondrial translocase: Tim44 is crucial for the inner membrane import sites in translocation of tightly folded domains, but not of loosely folded preproteins." Embo J **17**(15): 4226-37.
- Bomer, U., J. Rassow, N. Zufall, N. Pfanner, M. Meijer and A. C. Maarse (1996). "The preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane: evolutionary conservation of targeting and assembly of Tim17." J Mol Biol **262**(4): 389-95.
- Brunner, S., V. Everard-Gigot and R. A. Stuart (2002). "Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase forms homodimers." J Biol Chem **277**(50): 48484-9.
- Burri, L., Y. Strahm, C. J. Hawkins, I. E. Gentle, M. A. Puryer, A. Verhagen, B. Callus, D. Vaux and T. Lithgow (2005). "Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane." Mol Biol Cell **16**(6): 2926-33.
- Bustos, D. M. and J. Velours (2005). "The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase." J Biol Chem **280**(32): 29004-10.
- Chacinska, A., B. Guiard, J. M. Muller, A. Schulze-Specking, K. Gabriel, S. Kutik and N. Pfanner (2008). "Mitochondrial biogenesis, switching the sorting pathway of the intermembrane space receptor Mia40." J Biol Chem **283**(44): 29723-9.
- Chacinska, A., M. Lind, A. E. Frazier, J. Dudek, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H. E. Meyer, K. N. Truscott, B. Guiard, N. Pfanner and P. Rehling (2005). "Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17." Cell **120**(6): 817-29.
- Chacinska, A., S. Pfannschmidt, N. Wiedemann, V. Kozjak, L. K. Sanjuan Szklarz, A. Schulze-Specking, K. N. Truscott, B. Guiard, C. Meisinger and N. Pfanner (2004). "Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins." Embo J **23**(19): 3735-46.

- Chen, R. and U. Henning (1996). "A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins." Mol Microbiol **19**(6): 1287-94.
- Claros, M. G. and P. Vincens (1996). "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences." Eur J Biochem **241**(3): 779-86.
- Curran, S. P., D. Leuenberger, W. Oppliger and C. M. Koehler (2002). "The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier." Embo J **21**(5): 942-53.
- Deloche, O. and C. Georgopoulos (1996). "Purification and biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae*'s Mge1p, the mitochondrial cochaperone of Ssc1p." J Biol Chem **271**(39): 23960-6.
- Dembowski, M., K. P. Kunkele, F. E. Nargang, W. Neupert and D. Rapaport (2001). "Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*." J Biol Chem **276**(21): 17679-85.
- Devenish, R. J., M. Prescott, X. Roucou and P. Nagley (2000). "Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex." Biochim Biophys Acta **1458**(2-3): 428-42.
- Dietmeier, K., A. Honlinger, U. Bomer, P. J. Dekker, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, M. Kubrich and N. Pfanner (1997). "Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore." Nature **388**(6638): 195-200.
- Dominguez, C., R. Boelens and A. M. Bonvin (2003). "HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information." J Am Chem Soc **125**(7): 1731-7.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak and G. von Heijne (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." J Mol Biol **300**(4): 1005-16.
- Emanuelsson, O., G. von Heijne and G. Schneider (2001). "Analysis and prediction of mitochondrial targeting peptides." Methods Cell Biol **65**: 175-87.
- Endo, T. and D. Kohda (2002). "Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 3-14.
- Esaki, M., T. Kanamori, S. Nishikawa, I. Shin, P. G. Schultz and T. Endo (2003). "Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation." Nat Struct Biol **10**(12): 988-94.
- Esser, K., B. Tursun, M. Ingenhoven, G. Michaelis and E. Pratje (2002). "A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1." J Mol Biol **323**(5): 835-43.
- Everard-Gigot, V., C. D. Dunn, B. M. Dolan, S. Brunner, R. E. Jensen and R. A. Stuart (2005). "Functional analysis of subunit e of the F1Fo-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region." Eukaryot Cell **4**(2): 346-55.
- Farrell, S. R. and C. Thorpe (2005). "Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity." Biochemistry **44**(5): 1532-41.
- Fass, D. (2008). "The Erv family of sulfhydryl oxidases." Biochim Biophys Acta **1783**(4): 557-66.

- Fronzes, R., T. Weimann, J. Vaillier, J. Velours and D. Brethes (2006). "The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits." *Biochemistry* **45**(21): 6715-23.
- Gabriel, K., D. Milenkovic, A. Chacinska, J. Muller, B. Guiard, N. Pfanner and C. Meisinger (2007). "Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway." *J Mol Biol* **365**(3): 612-20.
- Gakh, O., P. Cavadini and G. Isaya (2002). "Mitochondrial processing peptidases." *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 63-77.
- Gartner, F., W. Voos, A. Querol, B. R. Miller, E. A. Craig, M. G. Cumsky and N. Pfanner (1995). "Mitochondrial import of subunit Va of cytochrome c oxidase characterized with yeast mutants." *J Biol Chem* **270**(8): 3788-95.
- Gavin, P. D., M. Prescott and R. J. Devenish (2005). "F1F0-ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e." *J Bioenerg Biomembr* **37**(2): 55-66.
- Gentle, I., K. Gabriel, P. Beech, R. Waller and T. Lithgow (2004). "The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria." *J Cell Biol* **164**(1): 19-24.
- Gentle, I. E., L. Burri and T. Lithgow (2005). "Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins." *Mol Microbiol* **58**(5): 1216-25.
- Gentle, I. E., A. J. Perry, F. H. Alcock, V. A. Likic, P. Dolezal, E. T. Ng, A. W. Purcell, M. McConville, T. Naderer, A. L. Chanez, F. Charriere, C. Aschinger, A. Schneider, K. Tokatlidis and T. Lithgow (2007). "Conserved motifs reveal details of ancestry and structure in the small TIM chaperones of the mitochondrial intermembrane space." *Mol Biol Evol* **24**(5): 1149-60.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." *Nature* **355**(6355): 33-45.
- Glick, B., C. Wachter and G. Schatz (1991). "Protein import into mitochondria: two systems acting in tandem?" *Trends Cell Biol* **1**(4): 99-103.
- Gray, M. W., G. Burger and B. F. Lang (1999). "Mitochondrial evolution." *Science* **283**(5407): 1476-81.
- Habib, S. J., T. Waizenegger, M. Lech, W. Neupert and D. Rapaport (2005). "Assembly of the TOB complex of mitochondria." *J Biol Chem* **280**(8): 6434-40.
- Habib, S. J., T. Waizenegger, A. Niewienda, S. A. Paschen, W. Neupert and D. Rapaport (2007). "The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins." *J Cell Biol* **176**(1): 77-88.
- Hase, T., H. Riezman, K. Suda and G. Schatz (1983). "Import of proteins into mitochondria: nucleotide sequence of the gene for a 70-kd protein of the yeast mitochondrial outer membrane." *Embo J* **2**(12): 2169-72.
- Haucke, V., C. S. Ocana, A. Honlinger, K. Tokatlidis, N. Pfanner and G. Schatz (1997). "Analysis of the sorting signals directing NADH-cytochrome b5 reductase to two locations within yeast mitochondria." *Mol Cell Biol* **17**(7): 4024-32.
- Haucke, V. and G. Schatz (1997). "Reconstitution of the protein insertion machinery of the mitochondrial inner membrane." *Embo J* **16**(15): 4560-7.
- He, S. and T. D. Fox (1997). "Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p." *Mol Biol Cell* **8**(8): 1449-60.

- Hell, K. (2008). "The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria." Biochim Biophys Acta **1783**(4): 601-9.
- Hell, K., J. M. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert and R. A. Stuart (1998). "Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2250-5.
- Herrmann, J. M. and N. Bonnefoy (2004). "Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase." J Biol Chem **279**(4): 2507-12.
- Herrmann, J. M., F. Kauff and H. E. Neuhaus (2009). "Thiol oxidation in bacteria, mitochondria and chloroplasts: common principles but three unrelated machineries?" Biochim Biophys Acta **1793**(1): 71-7.
- Higuti, T., K. Kuroiwa, Y. Kawamura and Y. Yoshihara (1992). "Complete amino acid sequence of subunit e of rat liver mitochondrial H(+)-ATP synthase." Biochemistry **31**(49): 12451-4.
- Hill, K., K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner and N. Pfanner (1998). "Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]." Nature **395**(6701): 516-21.
- Hines, V., A. Brandt, G. Griffiths, H. Horstmann, H. Brutsch and G. Schatz (1990). "Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70." Embo J **9**(10): 3191-200.
- Hoppins, S. C. and F. E. Nargang (2004). "The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes." J Biol Chem **279**(13): 12396-405.
- Horst, M., W. Oppliger, B. Feifel, G. Schatz and B. S. Glick (1996). "The mitochondrial protein import motor: dissociation of mitochondrial hsp70 from its membrane anchor requires ATP binding rather than ATP hydrolysis." Protein Sci **5**(4): 759-67.
- Hulett, J. M., F. Lueder, N. C. Chan, A. J. Perry, P. Wolyne, V. A. Likic, P. R. Gooley and T. Lithgow (2008). "The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex." J Mol Biol **376**(3): 694-704.
- Humphries, A. D., I. C. Streimann, D. Stojanovski, A. J. Johnston, M. Yano, N. J. Hoogenraad and M. T. Ryan (2005). "Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40." J Biol Chem **280**(12): 11535-43.
- Hurt, E. C., B. Pesold-Hurt and G. Schatz (1984). "The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix." Embo J **3**(13): 3149-56.
- Iosefson, O., R. Levy, M. Marom, O. Slutsky-Leiderman and A. Azem (2007). "The Pam18/Tim14-Pam16/Tim16 complex of the mitochondrial translocation motor: the formation of a stable complex from marginally stable proteins." Protein Sci **16**(2): 316-22.
- Ivanova, E., M. Ball and H. Lu (2008). "Zinc binding of Tim10: evidence for existence of an unstructured binding intermediate for a zinc finger protein." Proteins **71**(1): 467-75.
- Kerscher, O., J. Holder, M. Srinivasan, R. S. Leung and R. E. Jensen (1997). "The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane." J Cell Biol **139**(7): 1663-75.

- Kerscher, O., N. B. Sepuri and R. E. Jensen (2000). "Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane." Mol Biol Cell **11**(1): 103-16.
- Koehler, C. M., S. Merchant, W. Oppliger, K. Schmid, E. Jarosch, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz and K. Tokatlidis (1998). "Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins." Embo J **17**(22): 6477-86.
- Koehler, C. M., M. P. Murphy, N. A. Bally, D. Leuenberger, W. Oppliger, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz and E. Or (2000). "Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane." Mol Cell Biol **20**(4): 1187-93.
- Korndorfer, I. P., M. K. Dommel and A. Skerra (2004). "Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 1015-20.
- Kovermann, P., K. N. Truscott, B. Guiard, P. Rehling, N. B. Sepuri, H. Muller, R. E. Jensen, R. Wagner and N. Pfanner (2002). "Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel." Mol Cell **9**(2): 363-73.
- Kozjak, V., N. Wiedemann, D. Milenkovic, C. Lohaus, H. E. Meyer, B. Guiard, C. Meisinger and N. Pfanner (2003). "An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane." J Biol Chem **278**(49): 48520-3.
- Kubrich, M., P. Keil, J. Rassow, P. J. Dekker, J. Blom, M. Meijer and N. Pfanner (1994). "The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site." FEBS Lett **349**(2): 222-8.
- Kuhn, A., R. Stuart, R. Henry and R. E. Dalbey (2003). "The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion?" Trends Cell Biol **13**(10): 510-6.
- Laloraya, S., B. D. Gambill and E. A. Craig (1994). "A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6481-5.
- Lee, J., G. Hofhaus and T. Lisowsky (2000). "Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase." FEBS Lett **477**(1-2): 62-6.
- Leroux, M. R., M. Fandrich, D. Klunker, K. Siegers, A. N. Lupas, J. R. Brown, E. Schiebel, C. M. Dobson and F. U. Hartl (1999). "MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin." Embo J **18**(23): 6730-43.
- Leuenberger, D., N. A. Bally, G. Schatz and C. M. Koehler (1999). "Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins." Embo J **18**(17): 4816-22.
- Lithgow, T., J. M. Cuezva and P. A. Silver (1997). "Highways for protein delivery to the mitochondria." Trends Biochem Sci **22**(4): 110-3.
- Luciano, P., K. Tokatlidis, I. Chambre, J. C. Germanique and V. Geli (1998). "The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase." J Mol Biol **280**(2): 193-9.
- Lundin, V. F., P. C. Stirling, J. Gomez-Reino, J. C. Mwenifumbo, J. M. Obst, J. M. Valpuesta and M. R. Leroux (2004). "Molecular clamp mechanism of substrate binding by hydrophobic coiled-coil residues of the archaeal chaperone prefoldin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4367-72.



- Martin-Benito, J., J. Boskovic, P. Gomez-Puertas, J. L. Carrascosa, C. T. Simons, S. A. Lewis, F. Bartolini, N. J. Cowan and J. M. Valpuesta (2002). "Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT." *Embo J* **21**(23): 6377-86.
- Martinez-Caballero, S., S. M. Grigoriev, J. M. Herrmann, M. L. Campo and K. W. Kinnally (2007). "Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23." *J Biol Chem* **282**(6): 3584-93.
- Meier, S., W. Neupert and J. M. Herrmann (2005). "Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria." *J Biol Chem* **280**(9): 7777-85.
- Meier, S., W. Neupert and J. M. Herrmann (2005). "Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria." *J Cell Biol* **170**(6): 881-8.
- Meinecke, M., R. Wagner, P. Kovermann, B. Guiard, D. U. Mick, D. P. Hutu, W. Voos, K. N. Truscott, A. Chacinska, N. Pfanner and P. Rehling (2006). "Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane." *Science* **312**(5779): 1523-6.
- Mesecke, N., K. Bihlmaier, B. Grumbt, S. Longen, N. Terziyska, K. Hell and J. M. Herrmann (2008). "The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40." *EMBO Rep* **9**(11): 1107-13.
- Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell and J. M. Herrmann (2005). "A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import." *Cell* **121**(7): 1059-69.
- Milenkovic, D., K. Gabriel, B. Guiard, A. Schulze-Specking, N. Pfanner and A. Chacinska (2007). "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**(31): 22472-80.
- Milenkovic, D., T. Ramming, J. M. Muller, L. S. Wenz, N. Gebert, A. Schulze-Specking, D. Stojanovski, S. Rospert and A. Chacinska (2009). "Identification of the Signal Directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane Space of Mitochondria." *Mol Biol Cell*.
- Miller, B. R. and M. G. Cumsy (1993). "Intramitochondrial sorting of the precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit Va." *J Cell Biol* **121**(5): 1021-9.
- Minauro-Sanmiguel, F., S. Wilkens and J. J. Garcia (2005). "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12356-8.
- Model, K., T. Prinz, T. Ruiz, M. Radermacher, T. Krimmer, W. Kuhlbrandt, N. Pfanner and C. Meisinger (2002). "Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex." *J Mol Biol* **316**(3): 657-66.
- Mokranjac, D., A. Berg, A. Adam, W. Neupert and K. Hell (2007). "Association of the Tim14.Tim16 subcomplex with the TIM23 translocase is crucial for function of the mitochondrial protein import motor." *J Biol Chem* **282**(25): 18037-45.
- Mokranjac, D., G. Bourenkov, K. Hell, W. Neupert and M. Groll (2006). "Structure and function of Tim14 and Tim16, the J and J-like components of the mitochondrial protein import motor." *Embo J* **25**(19): 4675-85.

- Mokranjac, D., D. Popov-Celeketic, K. Hell and W. Neupert (2005). "Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites." J Biol Chem **280**(25): 23437-40.
- Mokranjac, D., M. Sichting, D. Popov-Celeketic, K. Mapa, L. Gevorkyan-Airapetov, K. Zohary, K. Hell, A. Azem and W. Neupert (2009). "Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria." Mol Biol Cell **20**(5): 1400-7.
- Moro, F., K. Okamoto, M. Donzeau, W. Neupert and M. Brunner (2002). "Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44." J Biol Chem **277**(9): 6874-80.
- Moro, F., C. Sirrenberg, H. C. Schneider, W. Neupert and M. Brunner (1999). "The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix." Embo J **18**(13): 3667-75.
- Muto, T., T. Obita, Y. Abe, T. Shodai, T. Endo and D. Kohda (2001). "NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences." J Mol Biol **306**(2): 137-43.
- Nakai, K. and P. Horton (1999). "PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization." Trends Biochem Sci **24**(1): 34-6.
- Neupert, W. and J. M. Herrmann (2007). "Translocation of proteins into mitochondria." Annu Rev Biochem **76**: 723-49.
- Nunnari, J., T. D. Fox and P. Walter (1993). "A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities." Science **262**(5142): 1997-2004.
- Obita, T., T. Muto, T. Endo and D. Kohda (2003). "Peptide library approach with a disulfide tether to refine the Tom20 recognition motif in mitochondrial presequences." J Mol Biol **328**(2): 495-504.
- Ohtaki, A., H. Kida, Y. Miyata, N. Ide, A. Yonezawa, T. Arakawa, R. Iizuka, K. Noguchi, A. Kita, M. Odaka, K. Miki and M. Yohda (2008). "Structure and molecular dynamics simulation of archaeal prefoldin: the molecular mechanism for binding and recognition of nonnative substrate proteins." J Mol Biol **376**(4): 1130-41.
- Paschen, S. A., T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport and W. Neupert (2003). "Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins." Nature **426**(6968): 862-6.
- Paumard, P., J. Vaillier, B. Couly, J. Schaeffer, V. Soubannier, D. M. Mueller, D. Brethes, J. P. di Rago and J. Velours (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." Embo J **21**(3): 221-30.
- Pawlowski, R. and J. Jura (2006). "ALR and liver regeneration." Mol Cell Biochem **288**(1-2): 159-69.
- Popov-Celeketic, J., T. Waizenegger and D. Rapaport (2008). "Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane." J Mol Biol **376**(3): 671-80.
- Reif, S., O. Randelj, G. Domanska, E. A. Dian, T. Krimmer, C. Motz and J. Rassow (2005). "Conserved mechanism of Oxa1 insertion into the mitochondrial inner membrane." J Mol Biol **354**(3): 520-8.
- Reinders, J., R. P. Zahedi, N. Pfanner, C. Meisinger and A. Sickmann (2006). "Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics." J Proteome Res **5**(7): 1543-54.

- Rissler, M., N. Wiedemann, S. Pfannschmidt, K. Gabriel, B. Guiard, N. Pfanner and A. Chacinska (2005). "The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins." J Mol Biol **353**(3): 485-92.
- Roise, D., S. J. Horvath, J. M. Tomich, J. H. Richards and G. Schatz (1986). "A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers." Embo J **5**(6): 1327-34.
- Schafer, U., K. Beck and M. Muller (1999). "Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins." J Biol Chem **274**(35): 24567-74.
- Schiller, D., Y. C. Cheng, Q. Liu, W. Walter and E. A. Craig (2008). "Residues of Tim44 involved in both association with the translocon of the inner mitochondrial membrane and regulation of mitochondrial Hsp70 tethering." Mol Cell Biol **28**(13): 4424-33.
- Schlossmann, J., K. Dietmeier, N. Pfanner and W. Neupert (1994). "Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72." J Biol Chem **269**(16): 11893-901.
- Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H. E. Meyer, B. Schonfish, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner and C. Meisinger (2003). "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13207-12.
- Sideris, D. P. and K. Tokatlidis (2007). "Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space." Mol Microbiol **65**(5): 1360-73.
- Sims, P. J., A. S. Waggoner, C. H. Wang and J. F. Hoffman (1974). "Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles." Biochemistry **13**(16): 3315-30.
- Sirrenberg, C., M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert and M. Brunner (1996). "Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22." Nature **384**(6609): 582-5.
- Small, I., N. Peeters, F. Legeai and C. Lurin (2004). "Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences." Proteomics **4**(6): 1581-90.
- Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy and R. Durbin (1997). "Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments." Proteins **28**(3): 405-20.
- Stirling, P. C., S. F. Bakhoun, A. B. Feigl and M. R. Leroux (2006). "Convergent evolution of clamp-like binding sites in diverse chaperones." Nat Struct Mol Biol **13**(10): 865-70.
- Strub, A., K. Rottgers and W. Voos (2002). "The Hsp70 peptide-binding domain determines the interaction of the ATPase domain with Tim44 in mitochondria." Embo J **21**(11): 2626-35.
- Tamura, Y., Y. Harada, T. Shiota, K. Yamano, K. Watanabe, M. Yokota, H. Yamamoto, H. Sesaki and T. Endo (2009). "Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import." J Cell Biol **184**(1): 129-41.
- Tatsuta, T., K. Model and T. Langer (2005). "Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria." Mol Biol Cell **16**(1): 248-59.

- Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J. M. Herrmann and K. Hell (2005). "Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions." FEBS Lett **579**(1): 179-84.
- Tokatlidis, K., T. Junne, S. Moes, G. Schatz, B. S. Glick and N. Kronidou (1996). "Translocation arrest of an intramitochondrial sorting signal next to Tim11 at the inner-membrane import site." Nature **384**(6609): 585-8.
- Truscott, K. N., P. Kovermann, A. Geissler, A. Merlin, M. Meijer, A. J. Driessen, J. Rassow, N. Pfanner and R. Wagner (2001). "A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23." Nat Struct Biol **8**(12): 1074-82.
- Vainberg, I. E., S. A. Lewis, H. Rommelaere, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. L. Klein and N. J. Cowan (1998). "Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin." Cell **93**(5): 863-73.
- van der Laan, M., M. Meinecke, J. Dudek, D. P. Hutu, M. Lind, I. Perschil, B. Guiard, R. Wagner, N. Pfanner and P. Rehling (2007). "Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins." Nat Cell Biol **9**(10): 1152-9.
- van Wilpe, S., M. T. Ryan, K. Hill, A. C. Maarse, C. Meisinger, J. Brix, P. J. Dekker, M. Moczko, R. Wagner, M. Meijer, B. Guiard, A. Honlinger and N. Pfanner (1999). "Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase." Nature **401**(6752): 485-9.
- Velours, J. and G. Arselin (2000). "The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase." J Bioenerg Biomembr **32**(4): 383-90.
- Vergnolle, M. A., F. H. Alcock, N. Petrakis and K. Tokatlidis (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**(5): 1315-24.
- Vergnolle, M. A., C. Baud, A. P. Golovanov, F. Alcock, P. Luciano, L. Y. Lian and K. Tokatlidis (2005). "Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition." J Mol Biol **351**(4): 839-49.
- Vial, S., H. Lu, S. Allen, P. Savory, D. Thornton, J. Sheehan and K. Tokatlidis (2002). "Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone." J Biol Chem **277**(39): 36100-8.
- von Heijne, G. (1986). "Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices." Embo J **5**(6): 1335-42.
- Waizenegger, T., S. J. Habib, M. Lech, D. Mokranjac, S. A. Paschen, K. Hell, W. Neupert and D. Rapaport (2004). "Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria." EMBO Rep **5**(7): 704-9.
- Walker, J. E., R. Lutter, A. Dupuis and M. J. Runswick (1991). "Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria." Biochemistry **30**(22): 5369-78.
- Walton, T. A., C. M. Sandoval, C. A. Fowler, A. Pardi and M. C. Sousa (2009). "The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1772-7.
- Walton, T. A. and M. C. Sousa (2004). "Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation." Mol Cell **15**(3): 367-74.

- Webb, C. T., M. A. Gorman, M. Lazarou, M. T. Ryan and J. M. Gulbis (2006). "Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller." Mol Cell **21**(1): 123-33.
- Westermann, B., C. Prip-Buus, W. Neupert and E. Schwarz (1995). "The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria." Embo J **14**(14): 3452-60.
- Wimley, W. C. (2003). "The versatile beta-barrel membrane protein." Curr Opin Struct Biol **13**(4): 404-11.
- Wu, Y. and B. Sha (2006). "Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p." Nat Struct Mol Biol **13**(7): 589-93.
- Yamamoto, H., M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa and T. Endo (2002). "Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes." Cell **111**(4): 519-28.
- Yano, M., N. Hoogenraad, K. Terada and M. Mori (2000). "Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria." Mol Cell Biol **20**(19): 7205-13.
- Yao, H., R. A. Stuart, S. Cai and D. S. Sem (2008). "Structural characterization of the transmembrane domain from subunit e of yeast F1Fo-ATP synthase: a helical GXXXG motif located just under the micelle surface." Biochemistry **47**(7): 1910-7.
- Zako, T., Y. Murase, R. Iizuka, T. Yoshida, T. Kanzaki, N. Ide, M. Maeda, T. Funatsu and M. Yohda (2006). "Localization of prefoldin interaction sites in the hyperthermophilic group II chaperonin and correlations between binding rate and protein transfer rate." J Mol Biol **364**(1): 110-20.

# Mutation of Conserved Charged Residues in Mitochondrial TIM10 Subunits Precludes TIM10 Complex Assembly, but Does not Abolish Growth of Yeast Cells

Mailys A. S. Vergnolle<sup>1</sup>†, Felicity H. Alcock<sup>2</sup>†, Nikos Petrakis<sup>2,3</sup> and Kostas Tokatlidis<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Life Sciences  
University of Manchester  
Manchester M13 9PT, UK

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology  
& Biotechnology, Foundation  
for Research & Technology  
Hellas, PO Box 1385, Heraklion  
71110, Crete, Greece

<sup>3</sup>Department of Chemistry  
University of Crete  
PO Box 2207, 71303  
Heraklion, Crete, Greece

<sup>4</sup>Department of Materials  
Science and Technology  
University of Crete  
PO Box 2208, 710 03  
Heraklion, Crete, Greece

The *Saccharomyces cerevisiae* TIM10 complex (TIM10c) is an ATP-independent chaperone of the mitochondrial intermembrane space, involved in transport of polytopic membrane proteins. The complex is an  $\alpha_3\beta_3$  hexamer of Tim9 and Tim10 subunits. We have generated specific mutations in charged residues in the central core domain of each subunit delineated by the characteristic twin CX<sub>3</sub>C motif, and investigated the effect of these mutations on subunit folding, complex assembly and TIM10 function *in vitro* and *in vivo*. Any combination of mutations that included a specific glutamate residue, conserved in all known Tim9 and Tim10 sequences, abolished assembly of the TIM10 complex. *In vivo* complementation analyses using a MET3-TIM10 strain that is selectively inactivated for the expression of wild-type Tim10 showed that (i) an N-terminal deleted version of Tim10 that was previously shown to be defective in substrate binding is lethal under all conditions, but (ii) the charged residues mutant of Tim10 that is defective in assembly with Tim9 can restore growth in glucose, but not in non-fermentable carbon sources. These data suggest that formation of the hexamer is beneficial but not vital for TIM10 function, whilst the N-terminal substrate-binding region of Tim10 is essential *in vivo*.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** mitochondria; small Tims; protein translocation; chaperones; protein assembly

\*Corresponding author

## Introduction

The intermembrane space of yeast mitochondria contains small, soluble chaperone complexes, which function in the import pathway of large, hydrophobic membrane proteins. The constituent proteins of these chaperone complexes are all members of the small Tim family. The essential proteins Tim9 and Tim10 make up the hexameric TIM10 complex,<sup>1–3</sup> and the non-essential Tim8 and Tim13 make the TIM13 complex.<sup>4</sup> All members of the small Tim family are ~10 kDa in size, and contain two CX<sub>3</sub>C motifs, which are separated by 11–16 residues.<sup>5</sup> The

TIM10 and TIM13 complexes are found in the aqueous intermembrane space, although small amounts of Tim9 and Tim10 are also found associated with the inner membrane, along with the fifth small Tim, Tim12. Tim9, Tim10 and Tim12 at the inner membrane are associated with the TIM22 complex, which is responsible for insertion of small Tims' substrates into the inner membrane. One well-characterised substrate of the TIM10 complex is the inner membrane metabolite carrier, AAC (the ADP/ATP carrier). The small TIM complexes also play a minor role in the transfer of outer membrane proteins to the SAM complex, which is required for their insertion into the outer membrane.<sup>6–8</sup>

Tim9 and Tim10 are predominantly  $\alpha$ -helical. Disulphide bonds between juxtaposed CX<sub>3</sub>C motifs are largely responsible for the proteins' tertiary structure. They create a three-domain structure with a flexible, helical domain at each end, and a central

† M.V. and F.A. contributed equally to this work.

E-mail address of the corresponding author:  
tokatlid@imbb.forth.gr

domain locked in place by the disulphide bonds.<sup>9,10</sup> Oxidation of the cysteine residues is obligatory for formation of the hexameric complex.<sup>11</sup> Studies with truncated Tim9 and Tim10 mutants have indicated that the N-terminal domain of Tim10 is important for substrate binding, and its C-terminal domain is important for interaction with Tim9. Both N and C-terminal domains of Tim9 were shown to be involved to a lesser extent in interaction with Tim10.<sup>12</sup> For their import into mitochondria, both Tim9 and Tim10 must be in a reduced, unfolded conformation, and are oxidised after import to their assembly-competent forms.<sup>11</sup> A disulphide relay system in the intermembrane space, including Mia40 and Erv1, is responsible for this oxidation, and a cysteine-dependent mixed disulphide intermediate with Mia40 is required for import of the small Tims across the outer membrane.<sup>13–15</sup>

In a systematic mutational analysis of the small Tims we had previously mutated either the conserved cysteine residues by point mutagenesis,<sup>15</sup> or the N and C-terminal segments by deletion mutagenesis.<sup>12</sup> The function of the conserved central core residues remained unknown so we decided to generate versions of Tim9 and Tim10 mutated in some or all of the conserved charged residues in the central domain of each protein. These mutants were then tested for defects in structure, import, assembly and function. The Tim10 mutants were also assayed for growth complementation in yeast cells lacking Tim10, to see how specific defects impinge on the essential function of Tim10.

## Results

### Mutagenesis of small Tims and structural analysis of mutants

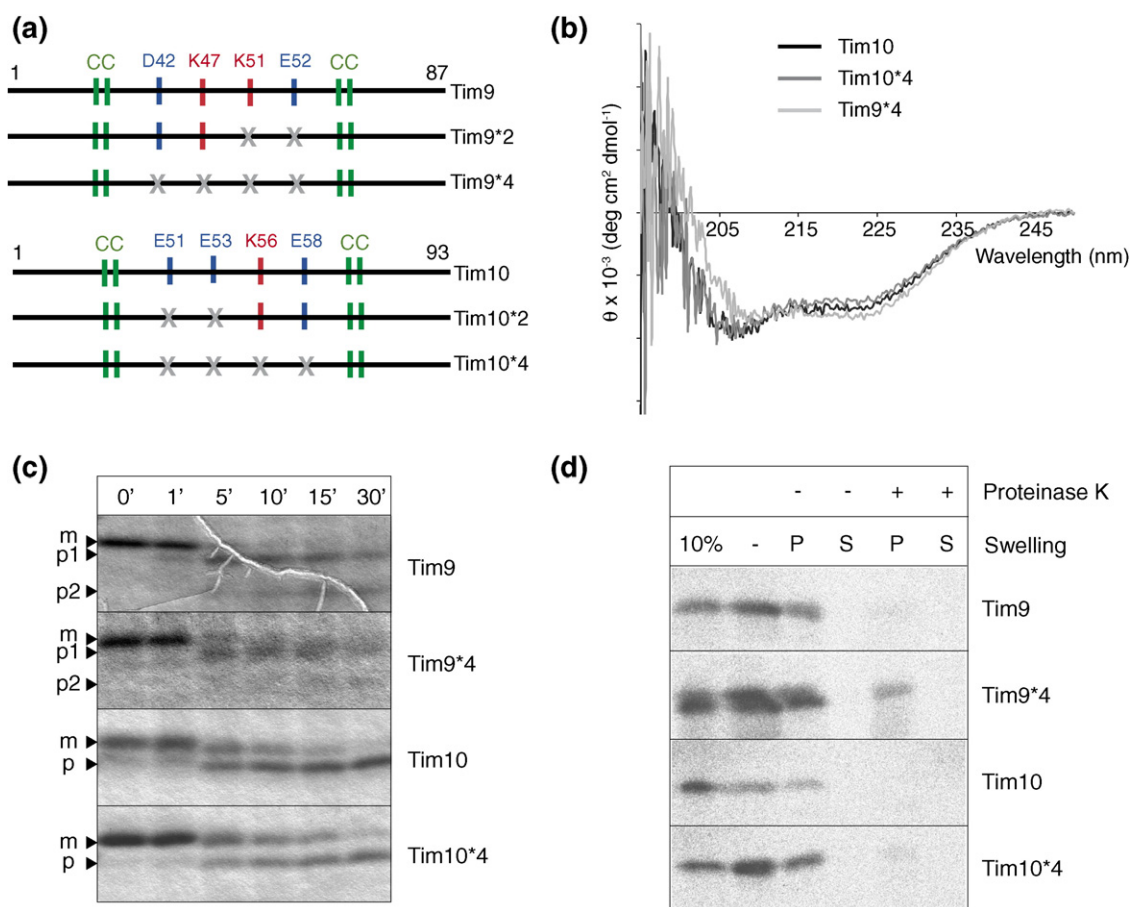
Tim9 and Tim10 of *Saccharomyces cerevisiae* each have four charged residues, lying in the central domain in between the two CX<sub>3</sub>C motifs. Two or four of these residues were mutated to alanine (Figure 1). Prior to any functional analyses, the quadruple charge mutants were tested for their structural integrity by CD and by limited proteolysis (Figure 1(b) and (c)). CD spectroscopy showed the secondary structures of both Tim9\*4 and Tim10\*4 to be predominantly  $\alpha$ -helical, as were the wild-type proteins. In addition to CD analysis, limited proteolysis is an appropriate means of detecting structural changes in proteins. We therefore purified the different proteins, incubated with trypsin for different time points and analysed by SDS-PAGE the resulting tryptic patterns. Figure 1(c) shows that the time-dependent generation of specific proteolytic fragments was not affected by quadruple mutation of either Tim9 or Tim10, which was indicative of an absence of significant structural changes due to the mutations and in line with the CD data. Furthermore, import and localisation of these mutants in purified mitochondria was compared with that of the wild-type proteins (Figure 1(d)) and showed no

significant differences (i.e. all proteins were efficiently imported, localized mainly in the pellet after swelling of the mitochondria, and were largely accessible to externally added protease K during the swelling). The charged residues in Tim9 and Tim10 core domains therefore do not interfere with their import, or, presumably, with their interaction with Mia40.

### *In vitro* assembly defects of the charge mutants

Having established that mutation of the charged residues did not induce any structural or localisation defects, we sought to determine whether oligomerisation was affected by the mutations. First, homo-oligomerisation was tested by cross-linking of purified proteins with glutaraldehyde (Figure 2(a)). Like the wild-type proteins, after 20 minutes cross-linking of both double and quadruple charge mutants, the predominant species were dimers and monomers, with a minor fraction of higher oligomers also present. To further assess any putative differences in the shape and size of the mutants that would result in a difference of their hydrodynamic characteristics (and hence their Stokes radius), size-exclusion chromatography was used. In all cases a very similar profile to the wild-type proteins was obtained, indicating that size and shape were largely unaffected by the mutations (Figure 2(b)).

*In vivo*, Tim9 and Tim10 operate as a complex, co-associating in a (Tim9)<sub>3</sub>(Tim10)<sub>3</sub> heterohexamer. We therefore investigated the effect of the mutations on the interaction of Tim9 and Tim10 with each other. Glutaraldehyde cross-linking showed that while Tim10\*2 retained a capacity to form a hexamer with Tim9 similar to the wild-type Tim10, the other three mutants all exhibited severe assembly defects (Figure 3(a)). Both Tim9 mutants exhibited identical behaviour, forming homo- and hetero-oligomers, but no higher molecular weight species. For Tim10\*4, the most obvious difference compared to both wild-type Tim10 and Tim10\*2 was the absence of a band the size of the hexamer. To further investigate these differences, the interactions between partner proteins were analysed by isothermal titration calorimetry (ITC) (Figure 3(b) and (c)). These data demonstrate clearly that a measurable interaction between Tim9 and Tim10 is abolished by even double mutation of Tim9's charged residues. Tim9\*4 was not tested, but since (a) it contains the same mutations as those in Tim9\*2, plus additional mutations, and (b) the two mutants behaved similarly in the cross-linking assay, we assume that Tim9\*4 would generate no binding curve by ITC. In agreement with the cross-linking data, Tim10\*2 showed a strong, measurable affinity for Tim9 ( $K_a = 1.76 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ). The binding curve generated by Tim10\*4, however, indicates a more complicated situation.  $\Delta H$  is large, but a vast excess of Tim9 was required for the first binding event (since several injections of Tim9 were required to generate the first binding peak). Subsequent to this first binding



**Figure 1.** Generation and characterisation of the charge mutants. (a) Schematic representation of the charge mutants, generated by site-directed mutagenesis. Blue bars represent negatively charged residues, red bars represent positively charged residues, and grey crosses represent mutation to alanine. (b) Far-UV CD spectra of purified Tim9\*4 (light grey line) and Tim10\*4 (dark grey line) compared with wild-type Tim10 (black line). (c) 2 µg of each protein was incubated for the indicated times with 0.1 µg trypsin. Reactions were stopped by addition of 1 µg of SBTI. Samples were separated on a 16.5% Tris-Tricine gel and visualised by staining with Coomassie brilliant blue. m, mature form of the protein; p1, p2, different proteolytic fragments obtained after trypsinolysis. (d) *In vitro* synthesised radiolabelled proteins were imported into wt mitochondria for 10 min at 30 °C. After import samples were treated with proteinase K then PMSF. Samples were then either loaded as intact mitochondria (- swelling), or subject to osmotic swelling in the presence or absence of proteinase K. After swelling, the mitoplast pellet (P) and supernatant (S) (corresponding to the IMS) were loaded onto SDS-PAGE and visualised by autoradiography. 10% = 10% of the radiolabelled material used per import.

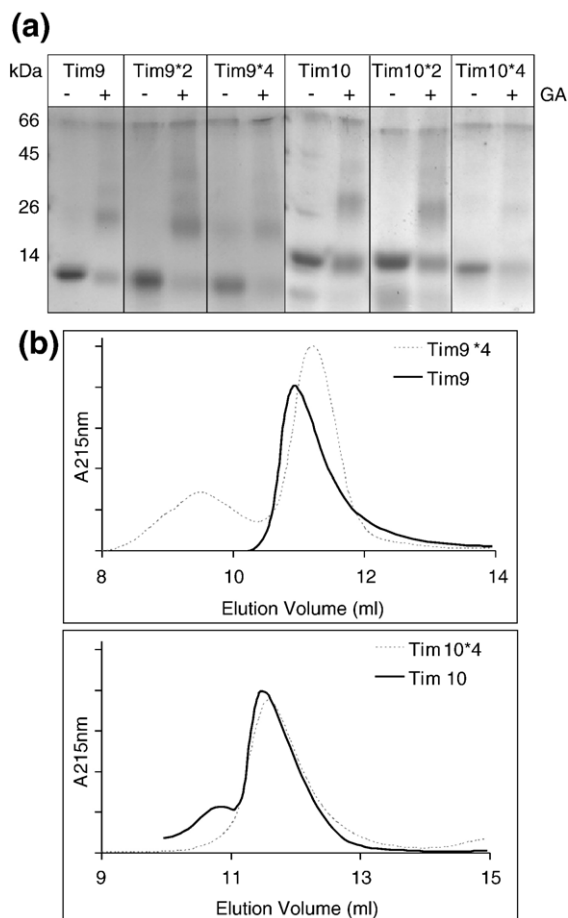
event, the reaction did not reach saturation, and the very low gradient of the binding curve is caused by the low affinity of the two proteins ( $K_a = 499 \text{ M}^{-1}$ ). It therefore seems that while both Tim9 mutations essentially abolish the interaction with Tim10, Tim10\*4 does still interact with Tim9. However, ITC showed the kinetics and thermodynamics of this interaction to be aberrant, and the cross-linking demonstrated that this aberrant interaction produces no hexameric complex.

#### ***In organello* assembly defects of the charge mutants**

How are these *in vitro* assembly results relevant for the *in vivo* association of the two proteins? The assembly of Tim9 and Tim10 mutants into a hexamer in intact mitochondria was analysed by import of radiolabelled proteins, followed by BN-PAGE (Figure 3(d)). In agreement with the *in vitro*

data, Tim10\*2 retains the capacity to form a hexamer (band just above the 67 kDa marker in lane 5, also present in lanes 1 and 4) while the capacity of the other three mutants to form a hexamer is strongly diminished. Interestingly, a significant fraction of imported Tim10\*4 was present in a complex of ~400 kDa. The identity of this complex is unknown, but its size is consistent with that of the TOM complex. This band may represent a trapped import/assembly intermediate, or a non-physiological artefact. The fact that the same band is visible in trace amounts for all of the proteins imported suggests that its formation is not dependent on the Tim10 mutations, but its dissociation is. This might therefore represent a “delayed” import intermediate of Tim10 that is still attached to the TOM channel, and which may require a specific interaction with Tim9 for its dissociation with TOM. The precise nature of this “intermediate” requires further investigation.





**Figure 2.** Homo-oligomerisation of the charge mutants. (a) Purified proteins were incubated with (+) or without (-) 0.1% glutaraldehyde for 20 min at room temperature. Cross-linking products were visualised by Tris-tricine SDS-PAGE and Coomassie staining. (b) Purified proteins were loaded on a Superdex75 size-exclusion column. Elution profiles of the charge mutants were essentially the same as for the wild-type proteins.

### Effect of the charge mutations on translocation of the substrate AAC

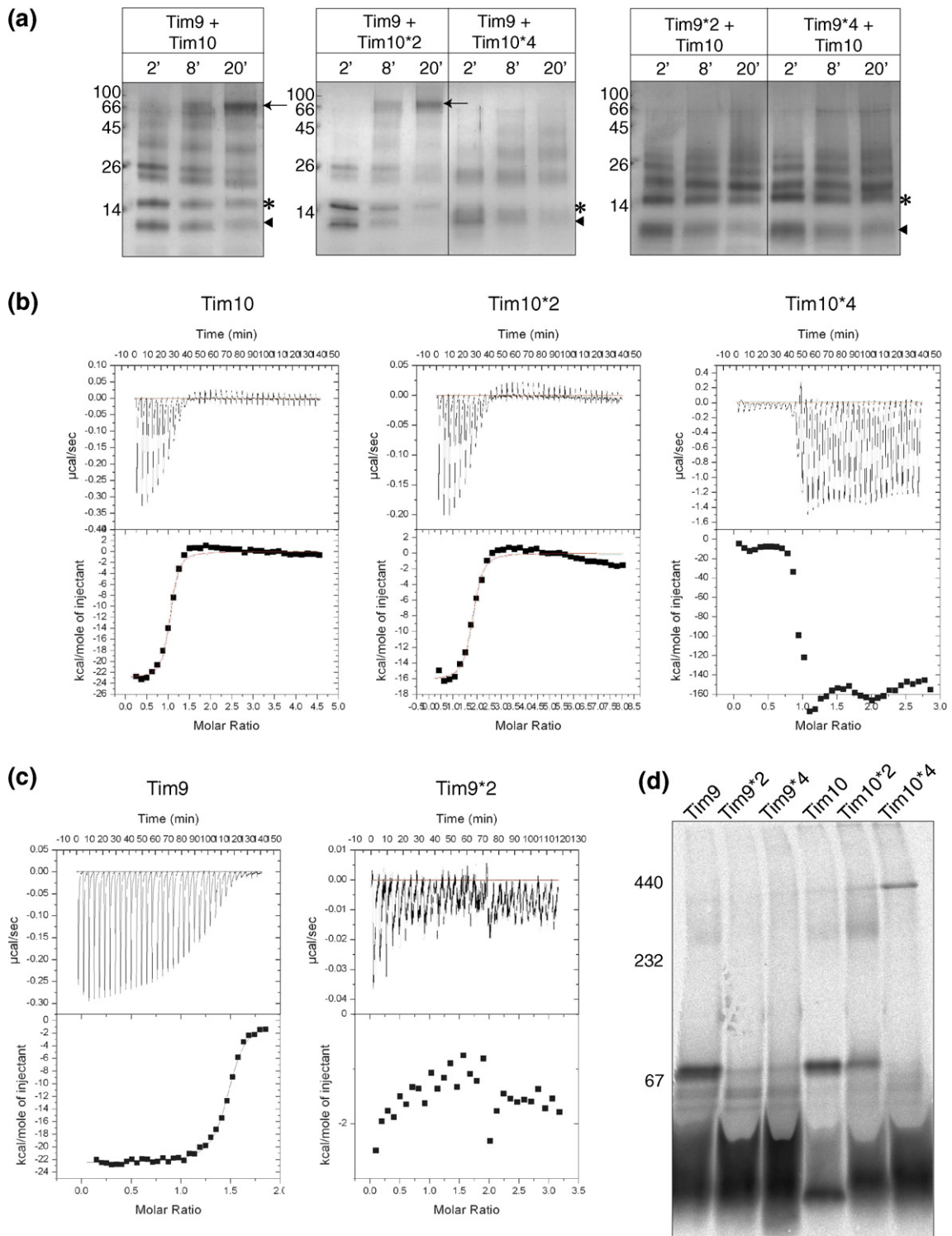
An import restoration assay was used to test Tim9\*4 and Tim10\*4 function. Import of AAC into mitochondria that lack the TIM10 complex is severely restricted, and pre-import of wild-type recombinant Tim9 and Tim10 into these mitochondria has previously been shown to restore the import of AAC.<sup>16</sup> Purified proteins were pre-imported into Tim9-ts mitochondria (which contain no TIM10 complex),<sup>17</sup> and then radiolabelled AAC was imported (Figure 4(a)). Mitochondria were subsequently treated with proteinase K to remove any AAC that had not crossed the outer membrane. Each of Tim9\*4 and Tim10\*4 in the presence of the non-mutated pre-imported partner could restore import across the outer membrane of ~10% of the AAC input in the assay. We have previously shown that, in the same assay, wild-type Tim9 and Tim10 are capable of a similar level of complementation.<sup>12</sup>

In the same study,  $\Delta$ NTim10, a mutant that lacks the first 31 residues of Tim10, and was previously shown to be impaired in its interaction with AAC, was not able to increase the import of AAC, providing evidence that import of AAC across the outer membrane correlates with its interaction with Tim10. We therefore suppose from this result that the charge mutants' interaction with AAC is not compromised.

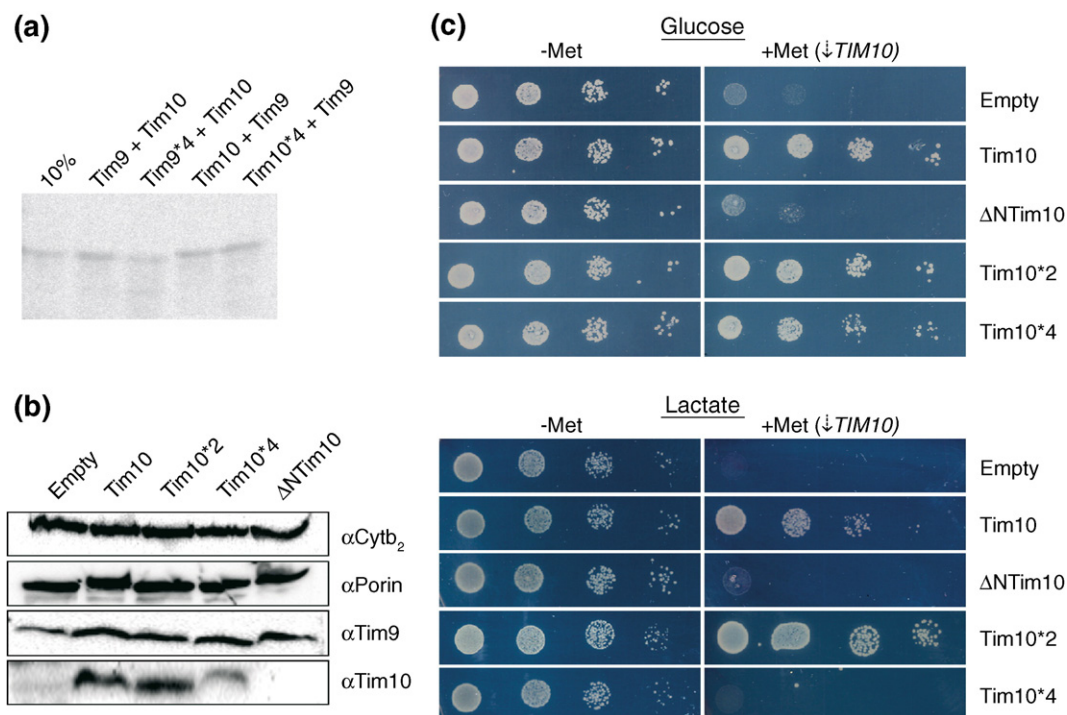
### Growth complementation of $\downarrow$ TIM10 yeast cells

A yeast strain was engineered where the MET3 promoter, which is repressed when methionine is present in the growth medium,<sup>18</sup> was inserted immediately upstream of the genomic TIM10 gene ( $P_{MET3}TIM10$ ). Since Tim10 is essential, this strain carrying no plasmid (or an empty plasmid) cannot grow in the presence of methionine, but when a second vectorial copy of TIM10 is present, controlled by the endogenous TIM10 promoter, growth is restored. This strain was transformed with a series of plasmids containing wild-type Tim10, the Tim10 charge mutants described in this work, no Tim10, or  $\Delta$ NTim10. Mitochondria were isolated from each strain after growth in the presence of methionine, and assayed by Western blot for their levels of Tim9, Tim10 and control proteins (Figure 4(b)). The presence of methionine in the growth medium effectively shuts off expression of Tim10 (lane 1), while both Tim10 and Tim10\*2 were efficiently expressed (lanes 2 and 3). Tim10\*4 is also expressed well, but to a lower level than wild-type Tim10 (lane 4). The level of Tim9 is also reduced in cells lacking Tim10, but not in cells expressing either charge mutant. No Tim10 was detected in the strain carrying pRSUP $\Delta$ NTim10. Western blots against recombinant Tim10/  $\Delta$ NTim10 were carried out to exclude the possibility that this result was due to decreased cross-reactivity of the  $\alpha$ Tim10 antibody with  $\Delta$ NTim10 (data not shown). Temperature-sensitive mutations in Tim9 and Tim10 have previously been shown to cause a decrease in the level of the mutated protein, and in levels of other translocon components.<sup>3,17</sup> This result therefore indicates that the deletion of the N-terminal tentacle of Tim10 is functionally more debilitating than abrogation of TIM10 complex assembly by mutation of charged residues. Importantly, the low resolution structure of the complex between Tim9 and  $\Delta$ NTim10 has been solved by small angle X-ray scattering (SAXS), and shows no significant changes in overall shape compared to the wild-type complex (our unpublished results). The low expression and/or proteolytic disposal of this mutant is therefore due to specific loss of function, and is not accountable to secondary structural effects of the truncation.

$P_{MET3}TIM10$  cells, each carrying one of the five Tim10 plasmids, were grown on medium plus or minus methionine, with either glucose or lactate as the principle carbon source (Figure 4(c)). Cells lacking the essential Tim10 cannot grow on either glucose or lactate medium, while cells with milder



**Figure 3.** Hetero-oligomerisation of the charge mutants. (a) Tim9 variants (10 kDa) and His-tagged Tim10 variants (14 kDa) were incubated together with 0.1% glutaraldehyde. Aliquots were removed at the indicated time points, and analysed by SDS-PAGE and Coomassie staining. Molecular weight markers (in kDa) are indicated to the left of each gel. Arrows denote the position of the hexamer, arrowheads Tim9 and asterisks His-Tim10. (b) and (c) ITC measurements of the binding reaction of wild-type Tim9 with Tim10 and mutants (b) and wild-Tim10 with Tim9 and Tim9\*2 (c). Traces of the titration of excess wild-type protein into wild-type or mutant proteins in the cell are shown (top panels). The integrated and normalized heats of injections for the binding were fitted to a model for a single binding site (bottom panels). (d) *In vitro* synthesised radiolabelled precursors were imported into wild-type mitochondria for 10 min at 30 °C. After import, samples were treated with proteinase K and then PMSF. Mitochondria were then solubilised in 0.16% DDM, cleared by ultracentrifugation, and the soluble fraction was loaded on a 6–16% blue native gel and analysed by autoradiography.



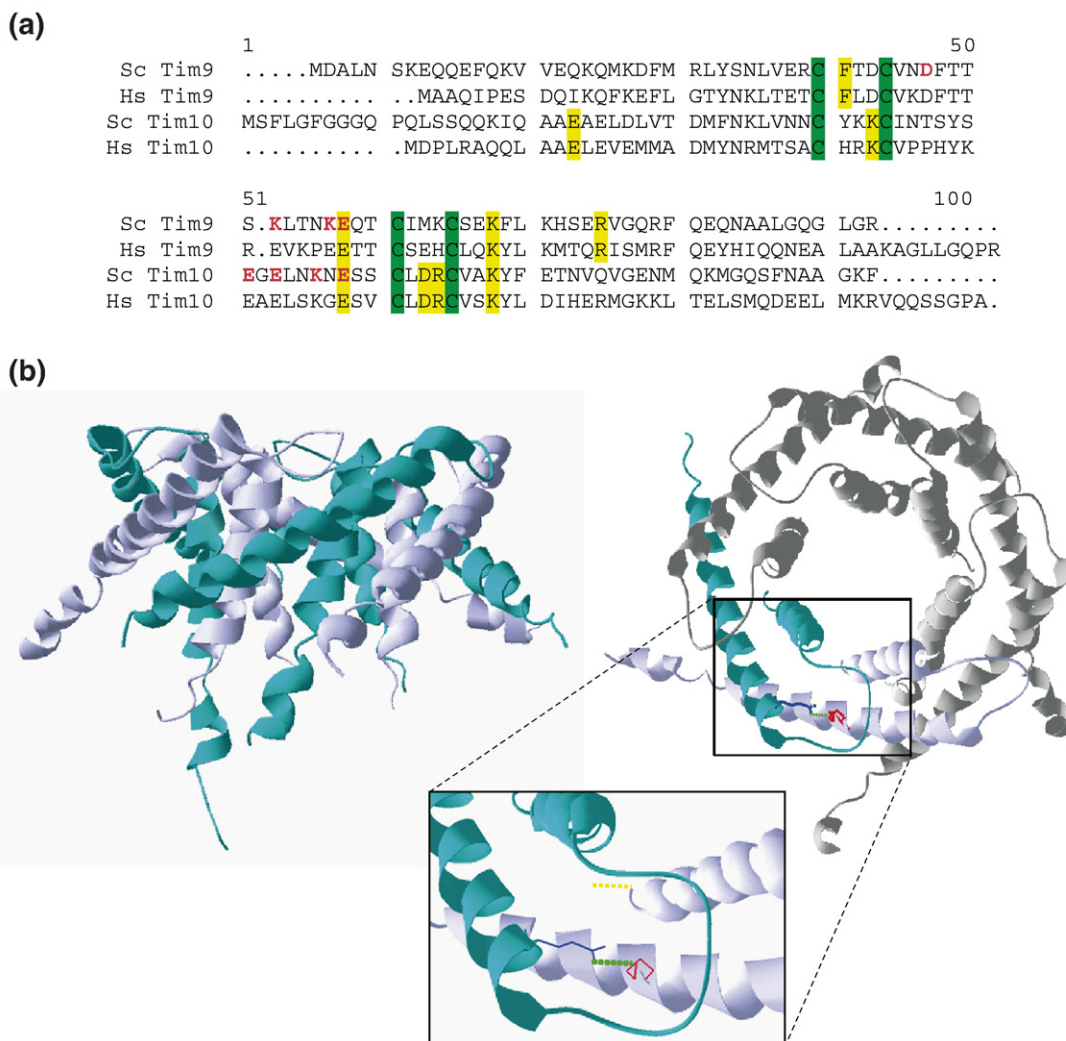
**Figure 4.** Function of the charge mutants. (a) 2  $\mu$ g each of the indicated small Tim proteins were imported sequentially (in the order in which they are written) into Tim9-ts mitochondria for 15 min at 30 °C, and unimported material was removed by trypsin proteolysis. *In vitro* synthesised radiolabelled AAC was then imported for 10 min at 30 °C, and unimported material was removed by proteolysis with proteinase K. Samples were separated by SDS-PAGE and visualised by autoradiography. (b) Mitochondria were isolated from *S. cerevisiae* strain  $P_{MET3}TIM10$ , supplemented with vector pRSUP carrying TIM10 variants, grown in media containing methionine. 400  $\mu$ g of crude mitochondria were loaded per lane and analysed by Western blot with the indicated antibodies. (c) *S. cerevisiae* strain  $P_{MET3}TIM10$ , supplemented with vector pRSUP carrying TIM10 variants (listed on the right-hand side) were grown in medium lacking methionine, and containing glucose (top) or lactate (bottom) as the principle carbon source. Serial tenfold dilutions of these cultures were dropped onto glucose or lactate plates with and without methionine, and grown for three days at 30 °C.

defects in mitochondrial function have retarded growth on lactate medium only. The first set of growth tests on glucose revealed a strong growth defect for cells carrying empty plasmid or  $\Delta NTim10$ , but no growth defect for the charge mutants. The second set of growth tests on lactate showed that Tim10\*2 was able to fully restore growth to wild-type levels, but Tim10\*4 or  $\Delta NTim10$  did not restore growth above the level of the empty vector. These data show a clear distinction between the N-terminal deletion and the charge mutations, in their effect on Tim10 function *in vivo*. Tim10\*2 does not seem to impact any serious defect on Tim10 *in vivo*. On the other hand, Tim10\*4 is defective in Tim10 function when cells absolutely need mitochondria for their metabolic energy (grown in non-fermentable carbon sources). However, Tim10\*4 does not impair the essential function of Tim10 when cells can survive on cytosolic glycolysis for their energetic needs. Since we have demonstrated that Tim10\*4 can still bind AAC, but cannot form a hexameric TIM10 complex, we suggest that the essential function of Tim10 (as judged by growth on glucose) does not rely on formation of the hexamer. Rather, the ability of Tim10 to interact with, and “chaperone” its substrates, is vital for its essential

function, as shown by the inability of the  $\Delta NTim10$  mutant to restore growth to  $\downarrow TIM10$  cells growing on glucose.

## Discussion

In previous work we had shown that the N and C-terminal segments of Tim9 and Tim10 have distinct functions in complex assembly and binding to the substrate.<sup>12</sup> Here we aimed to extend this work and probe for putative functions of the central core domain of the small Tims that is delineated by the twin CX<sub>3</sub>C motif. As this segment is internal in the polypeptide, deletion of it would probably dramatically affect the integrity and properties of the subunits. We therefore used point mutagenesis instead, thus identifying specific conserved charged residues in the core domain of the small Tims that are involved in assembly of the hexameric TIM10 complex. The recent publication of the crystal structure of the human TIM10 complex<sup>19</sup> allowed us to construct a model for the *S. cerevisiae* TIM10 complex, to map exactly where these mutations lie and to consider our biochemical and genetic analysis in the context of the structure (Figure 5). Three of the



**Figure 5.** A model for the *S. cerevisiae* TIM10c structure. (a) Sequence alignment of *S. cerevisiae* (Sc) and *Homo sapiens* (Hs) Tim9 and Tim10. The residues mutated in this study are coloured red. Cysteine residues are highlighted in green, other highly conserved residues are highlighted in red. (b) Side and top view of the homology model of the *S. cerevisiae* TIM10 complex, based on the crystal structure of the human complex (PDB identifier 2BSK).<sup>19</sup> Tim9 molecules are coloured lilac, and Tim10 green. The box magnifies the hydrogen bond (green dotted line) between Tim9 K62 (chain A, lilac) and Tim10 E58 (chain B, green). The C-terminal helices of the subunits lie around the outside of the complex, and the N-terminal helices extend down from the center of the ring.

four charge mutants tested were found to be defective in formation of a hexameric complex, but the fourth, Tim10\*2, showed no defect in any of our assays. There is a conserved glutamate residue just before the third cysteine of both Tim9 (E52) and Tim10 (E58), which is proposed to form a salt-bridge and/or H-bond with a conserved lysine on the neighbouring subunit. This Glu is mutated in both Tim9 charge mutants, and in Tim10\*4 only. This could, therefore, be the cause of the observed assembly defects for these mutants. Indeed, a temperature-sensitive Tim9 allele containing the single point mutation E52G was previously reported as unable to assemble into TIM10c, both *in vivo* and when expressed in *Escherichia coli*.<sup>17</sup> Furthermore, the modelled structure shows the side-chains of Tim9 K51 (the second residue mutated in Tim9\*2) and Tim10 K56 (mutated in Tim10\*4, but not in

Tim10\*2); both point upwards from the top of the complex, so are unlikely to be involved in inter-subunit interactions.

While we found that neither Tim9\*2 nor Tim10\*4 was able to form a hexamer *in vitro*, ITC demonstrated that Tim10\*4 retains a measurable but very weak affinity for Tim9, while Tim9\*2 displays no measurable interaction with Tim10. In our previous analysis of the deletion mutants of Tim9 and Tim10, the C terminus of both proteins was involved in stability of the hexamer, and deletion of Tim10 C terminus had a greater effect than deletion of Tim9 C terminus.<sup>12</sup> The binding curve for ITC with Tim10\*4 and Tim9 may therefore be due to weak, non-productive interactions between Tim9 and the C-terminal domain of Tim10.

Further inter-subunit contacts have been hypothesized based on the crystal structure, but the results

presented here demonstrate that mutation of just two amino acid residues is sufficient to prevent hexamer assembly. The interaction of a single Glu on each subunit with a Lys residue on its anticlockwise neighbour (when viewed from the top, as in Figure 5(b)) would form a network of six H-bonds around the top ring of the complex. This glutamate residue (E52 in Tim9, E58 in Tim10) and the lysine with which it interacts (K62 in Tim9, K68 in Tim10) are absolutely conserved across species.<sup>20</sup> The situation for the homologous TIM13 complex, composed of Tim8 and Tim13 subunits, is less clear. Tim8 and Tim13 are homologous members of the small Tim family, and like Tim9 and Tim10 they interact with each other to form a hexameric complex. Conservation of these Glu and Lys residues in Tim8 and Tim13 is less strict, but for each species, wherever the Tim13 Lys residue is present, the counterpart Tim8 Glu is also conserved. For both Tim8 and Tim13, the Glu residue is often replaced by Gln or Asn. These substitutions maintain H-bonding capabilities, even when the charge of the residues is not conserved. Lower conservation of these residues suggests that the same TIM10-style system for complex assembly is also employed by some TIM13 complexes, but others may rely on different interactions. Certainly a system for more specific subunit-subunit interactions must be in place to ensure that Tim9 always partners Tim10, and Tim8 partners Tim13. This system for specific pairing may involve accessory proteins in the intermembrane space and formation of the hexamer *in vivo* may be assisted by other factors; this might explain the very small amounts of hexamer detected for both Tim9 mutants when imported into mitochondria (Figure 3(d)). Possible candidates for this helper protein function are Mia40, which is required for Tim9 and Tim10 import<sup>13,21</sup> and Hot13, which appears to be involved in small Tims' oxidoreduction.<sup>22</sup>

The *in vivo* tests for growth complementation provide insight into the physiological importance of the various functions of TIM10. A strain carrying Tim10\*4, which was shown to be defective only in complex formation, does not cause any growth defect on glucose medium. The restricted growth of this strain only becomes apparent on lactate medium, where mitochondrial function is vital. Since Tim9 and Tim10 are essential for growth on all media, this result indicates that formation of a hexameric complex is not requisite for the essential function of Tim10. This result is in line with another study, where a yeast mutant lacking the soluble TIM10 complex (but still containing some Tim9 and Tim10) was able to insert precursors into the inner membrane of mitochondria.<sup>23</sup> The authors suggested that the essential function of the small Tims was in transfer of precursors to the TIM22 insertion complex. We showed here that, *in vivo*,  $\Delta$ Tim10 cannot complement Tim10 function under any conditions. The chaperone activity of Tim10's N-terminal tentacles is therefore required for the essential function of Tim10. At this point, another function for the N-terminal part of Tim10, in

addition to its substrate-sensor role, cannot be excluded but is yet unknown. Since no  $\Delta$ Tim10 was detected by immunoblot analysis in mitochondria that were supposedly expressing this strain (Figure 4(b)), one might argue that no conclusion can be drawn from these experiments regarding this mutant. However, it has been previously demonstrated that cells carrying non-functional versions of various Tim proteins not only have much lower steady state levels of the mutant protein, but other components of the translocon are also depleted.<sup>3,24,25</sup> These results therefore suggest that a cellular mechanism might exist to dispose of non-functional mitochondrial proteins, in which case the decreased level of Tim10\*4 may be due to its sub-optimal functionality.

Two further lines of evidence support the hypothesis that Tim10 is able to function as a chaperone for AAC, independent of Tim9. Firstly, in an assay for restoration of AAC import like that used in Figure 4(a), Tim10 alone was able to restore import of AAC across the outer membrane of TIM10-deficient mitochondria.<sup>16</sup> Secondly, the Tim10 subunit has been shown to bind to substrate peptides with a specificity similar to that of the complex.<sup>12,20</sup> Tim9, on the other hand, does not bind to AAC and does not aid AAC import across the outer membrane. The essential function of Tim9 may therefore be downstream of Tim10, in transfer of substrates to TIM22 in the inner membrane. Indeed, a mutation in yeast Tim9, which impaired the function of the TIM22 complex, was shown to strongly inhibit import of substrates to the inner membrane.<sup>17</sup> According to this hypothesis, formation of the TIM10 complex would coordinate the sequential action of Tim10 and Tim9, making the system more efficient overall.

## Materials and Methods

### Cloning and mutagenesis

Point mutations were introduced in Tim9 and Tim10 genes using the QuickChange Site Directed mutagenesis kit (Stratagene) according to manufacturer's instructions. Tim9 VNDFTTSKLTNKEQT was mutated to VNDFTTSKLTNAAQT in Tim9\*2 and to VNAFTTSALTNAAQT in Tim9\*4. Tim10 INTSYSEGLNKN $\bar{E}$ SS was mutated to INTSYSAGALNKN $\bar{E}$ SS in Tim10\*2 and to INTSYSAGALNANASS in Tim10\*4. For expression of His-tagged proteins in *E. coli*, Tim9 and mutants were amplified by PCR using primers GGGAATTCATATGGACGCATTGAAGCTCC and GGAATTCCTATCGGCCCAAGCCTTG, then cloned into pET28a (Novagen) after digestion with NdeI and EcoRI. Tim10 and mutants were amplified by PCR using primers Tim10F (CGGATCCATGTCTTTCTTAGGTTTC) and Tim10R (GGAATTCCTAAAACCTACCGGCTGC), then cloned into pRSETa (Promega) after digestion with BamHI and EcoRI. Vector pRSUP10 for expression in yeast controlled by the TIM10 promoter was constructed as follows: 300 bp of DNA upstream of TIM10 was amplified from yeast genomic DNA, cloned into pRS316 after digestion with XbaI and BamHI. Tim10 and mutants were then cloned in pRSUP10, downstream

of the Tim10 promoter, using primers Tim10F and Tim10R.

### Protein purification

Recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells from pET or pRSET constructs. After induction with 0.4 mM IPTG for 3 h at 37 °C cells were harvested and washed with buffer A (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4)). Cells were then resuspended in buffer A + 0.1 mg/ml lysozyme, incubated 15 min on ice, then sonicated for 3 min at 50% amplification. Samples were centrifuged 30 min, 4 °C, 21,000g to pellet inclusion bodies, which contained essentially all expressed protein. Inclusion bodies were homogenised in buffer B (buffer A + 8 M urea) and incubated 1 h at RT before centrifugation 30 min, 20 °C, 21,000g. The supernatant was diluted to 6 M urea with buffer A and 20 mM imidazole added, then loaded onto Ni-NTA resin (Qiagen) using 2.5 ml resin per 1 l culture. Ni-NTA was washed with decreasing urea concentrations, then at 0 M urea recombinant proteins were eluted with buffer A + 150 mM imidazole. Eluted protein was further purified by gel filtration on a Tricorn Superdex75 column (GE healthcare). Recombinant TIM10 complex was made by short incubation of equal moles of Tim9 and Tim10, followed by gel filtration.

### Yeast strains

WT yeast strain W303 and Tim9-19 were used.<sup>17</sup> Yeast strain  $P_{MET3}TIM10$  was constructed as follows: KanMX-Met3p cassette was amplified from vector pPR33.<sup>26</sup> WT yeast strain W303 was transformed with pRSUPTim10 to maintain viability on methionine-containing media. Transformants were then transformed with KanMX-Met3P cassette, which was integrated into the genome directly upstream of TIM10 by homologous recombination. Transformants were selected on YPD-G418 and correct insertion of the cassette was confirmed by PCR. pRSUPTim10 was lost by growing cells in SC medium containing 5× extra Ura then plating onto SC + 5xUra + 5-FOA. Colonies were tested for TIM10 repression in the presence of methionine, then transformed with pRSUP plasmids carrying Tim10 and mutants.

### Isothermal titration calorimetry (ITC)

All experiments were performed in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) at 30 °C with a Microcal™ VP-ITC microcalorimeter. The two partner proteins to be assayed were dialysed at 4 °C for 12 h in 1000× volume 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), then overnight in fresh buffer of the same composition. For injection of Tim9 into Tim10 and mutants, concentrations were: 160 μM Tim9, 4.6 μM Tim10, 2.6 μM Tim10\*2, 7.3 μM Tim10\*4. For injection of Tim10 into Tim9 and mutants, concentrations were: 109 μM Tim10, 8 μM Tim9, 7.7 μM Tim9\*2. 5 μl syringe protein was injected into the cell every 4 min, and temperature change in the cell was measured. Data were analysed using Microcal™ Origin™ version V programme using a best fit model for one site binding.

### Growth complementation and methionine-repression

$PMET3TIM10$  *S. cerevisiae* carrying pRSUPTim10 and mutants (or empty vector) was grown for two days at

30 °C.  $A_{600\text{ nm}}$  was measured and the cell density calculated (assuming  $A_{600\text{ nm}} = 0.1 \sim 2.5 \times 10^7$  cells/ml). A volume containing  $10^7$  cells was taken from each strain and diluted to 1 ml with H<sub>2</sub>O, and serial tenfold dilutions were made from this stock. An equal volume from each dilution was dropped onto one plate containing and one lacking methionine. Plates were incubated for three to four days at 30 °C. To isolate mitochondria after shut-off of the TIM10 gene, cells were grown in SC lactate medium without methionine until  $A_{600\text{ nm}} = 0.2$ . 0.2 mM methionine was then added, and growth continued for 10 h at 30 °C. Cultures were then diluted five times with SC lactate + 0.2 mM methionine, and grown for two days at 30 °C. Harvested cells were converted to spheroplasts by digestion with zymolyase for 30 min at 30 °C. Spheroplasts were broken by douncing and separated from unbroken cells by low speed centrifugation. Crude mitochondria were isolated by centrifugation at 12,500g, and analysed by Western blot.

### TIM10 complex modelling

To model yeast TIM10 complex, Tim9 (YEL020W-A) and Tim10 (YHR005C-A) were modelled onto the structure for the human TIM10 complex (2BSK) using DeepView v3.7 (GlaxoSmithKline), and submitted to the SwissModel server for refinement.

### Limited proteolysis

2 μg of protein in 50 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl was mixed with 0.1 μg of trypsin (Sigma). After incubation on ice, 1 μg of SBTI was added at time points, and sample buffer was added. Samples were boiled 5 min at 95 °C, analysed by Tris-Tricine SDS-PAGE and visualised by Coomassie staining.

### Gluteraldehyde cross-linking

0.1% gluteraldehyde (Sigma) was added to proteins in 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2), 150 mM NaCl, and incubated at room temperature (RT). At time points, aliquots were removed and quenched by addition of 100 mM Tris, vortexing, and 5 min incubation at RT. Sample buffer was added, and samples were analysed by Tris-Tricine SDS-PAGE and visualised by Coomassie staining.

### Miscellaneous

Purification of mitochondria, *in vitro* imports, subfractionation of mitochondria, purification of GST fusion proteins, gel filtration, BN-PAGE and CD spectroscopy were performed according to published methods.<sup>2,10,16</sup>

---

## Acknowledgements

This work was supported by funds from IMBB-FORTH, the University of Crete and the European Social Fund and national resources (to K.T.). F.H.A. was supported by a BBSRC-UK studentship. We are grateful to members of our laboratory for comments.

## References

- Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. & Koehler, C. M. (2002). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* **21**, 942–953.
- Vial, S., Lu, H., Allen, S., Savory, P., Thornton, D., Sheehan, J. & Tokatlidis, K. (2002). Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone. *J. Biol. Chem.* **277**, 36100–36108.
- Koehler, C. M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L. *et al.* (1998). Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.* **17**, 6477–6486.
- Curran, S. P., Leuenberger, D., Schmidt, E. & Koehler, C. M. (2002). The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J. Cell Biol.* **158**, 1017–1027.
- Koehler, C. M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 309–335.
- Wiedemann, N., Truscott, K. N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C. & 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.
- Hoppins, S. C. & Nargang, F. E. (2004). The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* **279**, 12396–12405.
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W. & Rapaport, D. (2005). Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 6434–6440.
- Allen, S., Lu, H., Thornton, D. & 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.
- Lu, H., Golovanov, A. P., Alcock, F., Grossmann, G. J., Allen, S., Lian, L.-Y. & Tokatlidis, K. (2004). The structural basis of the TIM10 chaperone assembly. *J. Biol. Chem.* **279**, 18959–18966.
- Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P. & Tokatlidis, K. (2004). Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 18952–18958.
- Vergnolle, M. A., Baud, C., Golovanov, A. P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L. Y. & Tokatlidis, K. (2005). Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition. *J. Mol. Biol.* **351**, 839–849.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuan Szklarz, L. K., Schulze-Specking, A. *et al.* (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* **23**, 3735–3746.
- Rissler, M., Wiedemann, N., Pfannschmidt, S., Gabriel, K., Guiard, B., Pfanner, N. & Chacinska, A. (2005). The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J. Mol. Biol.* **353**, 485–492.
- Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D. P., Lisowsky, T. & 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.
- Luciano, P., Vial, S., Vergnolle, M. A., Dyal, S. D., Robinson, D. R. & Tokatlidis, K. (2001). Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex. *EMBO J.* **20**, 4099–4106.
- Leuenberger, D., Curran, S. P., Wong, D. & Koehler, C. M. (2003). The role of Tim9p in the assembly of the TIM22 import complexes. *Traffic*, **4**, 144–152.
- Cherest, H., Nguyen, N. T. & Surdin-Kerjan, Y. (1985). Transcriptional regulation of the MET3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **34**, 269–281.
- Webb, C. T., Gorman, M. A., Lazarou, M., Ryan, M. T. & Gulbis, J. M. (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol. Cell*, **21**, 123–133.
- Gentle, I., Perry, A., Alcock, F., Likić, V., Dolezal, P., Ng, E. T. *et al.* (2007). Conserved motifs reveal details of ancestry and structure in the small TIM chaperones of the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1149–1160.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. & Herrmann, J. M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, **121**, 1059–1069.
- Curran, S. P., Leuenberger, D., Leverich, E. P., Hwang, D. K., Beverly, K. N. & Koehler, C. M. (2004). The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 43744–43751.
- Murphy, M. P., Leuenberger, D., Curran, S. P., Oppliger, W. & 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.
- Leuenberger, D., Bally, N. A., Schatz, G. & Koehler, C. M. (1999). Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *EMBO J.* **18**, 4816–4822.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R. A., Neupert, W. & Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912–915.
- Young, B. P., Craven, R. A., Reid, P. J., Willer, M. & Stirling, C. J. (2001). Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum *in vivo*. *EMBO J.* **20**, 262–271.

Edited by I. B. Holland

(Received 15 February 2007; received in revised form 25 May 2007; accepted 11 June 2007)  
Available online 15 June 2007

## Critical Review

# Mitochondrial ATP-independent Chaperones

Nikos Petrakis<sup>1,2</sup>, Felicity Alcock<sup>1\*</sup> and Kostas Tokatlidis<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas (IMBB-FORTH), Heraklion, Crete, Greece*

<sup>2</sup>*Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece*

<sup>3</sup>*Department of Materials Science and Technology, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece*

---

### Summary

Mitochondria possess a dedicated-chaperone system in the intermembrane space, the small Tims that are ubiquitous in all eukaryotes from yeast to man. They escort membrane proteins to the outer or the inner membrane for proper insertion. These mitochondrial chaperones do not require external energy to perform their function and have structural similarities to other ATP-independent chaperones. Here, we discuss their structural properties and how these relate to their chaperoning function in the mitochondrial intermembrane space. © 2009 IUBMB

IUBMB *Life*, 61(9): 909–914, 2009

---

**Keywords** mitochondria; chaperones; yeast; ATP; small Tims; membranes.

### INTRODUCTION

Proteins are synthesized in a linear manner where the N-terminus of the nascent polypeptide leaves the ribosomal tunnel before the C-terminal part has been synthesized. Thus, the sequence available for folding is incomplete, and premature folding often has to be prevented, until the whole protein domain sequence is available. Furthermore, the high concentration of other macromolecules in the cytosol may disfavor the folding process, favoring instead unproductive interactions between the unfolded polypeptide and other macromolecules (1, 2). Such incorrect inter- and intramolecular interactions pro-

mote aggregation and premature degradation of the proteins (3–5). For this reason, cells have developed a system of helper proteins, the molecular chaperones, which assist the folding of newly synthesized proteins and prevent their aggregation while their hydrophobic segments are transported through aqueous compartments (6).

Chaperone functions are varied: they can act as a foldase, assisting protein folding; as a holdase, preventing aggregation of unfolded protein; as a translocase, escorting newly made proteins to the correct cellular location, maintaining their largely unfolded, translocation-competent state (7–10). Some chaperones have additional catalytic activity, for example, as an isomerase, oxidase, or reductase, to rapidly reverse incorrect folding steps and to further enhance the rate of folding (11, 12). In addition to acting on newly synthesized proteins, chaperones can rescue cellular proteins from denaturation, and many are upregulated in response to cellular stress (13, 14). Chaperone activity is not constrained in the cytosol. Compartment-specific chaperones are present in the endoplasmic reticulum, in the mitochondrial intermembrane space and matrix, and also in the bacterial periplasm. Such chaperones help proteins to be folded as they reach their destination or prevent their aggregation as they are transported through a cellular compartment.

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and post-translationally targeted to the correct location within the mitochondrion. Cytosolic chaperones assist protein transport from ribosomes to import receptors in the mitochondrial outer membrane, which then direct the translocating polypeptide through the TOM channel in the outer membrane, otherwise known as the general import pore. Upon exit from the TOM channel, further targeting is mediated by one of the various translocation machines, in the inner and outer membranes, and in the intermembrane space (15). For membrane proteins, which contain long stretches of hydrophobic residues, a chaperone system has evolved to escort them across the intermembrane space and to deliver them to the correct downstream translocat-

---

Received 9 April 2009; accepted 17 May 2009

Address correspondence to: K. Tokatlidis, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas (IMBB-FORTH), Nikolaou Plastira 100, Heraklion 70013, Crete, Greece. E-mail: tokatlid@imbb.forth.gr

\*Present address of Felicity Alcock: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Victoria 3800, Australia.



tion machinery for integration into the right membrane (10). This system consists of a family of small, homologous proteins, called the small Tims.

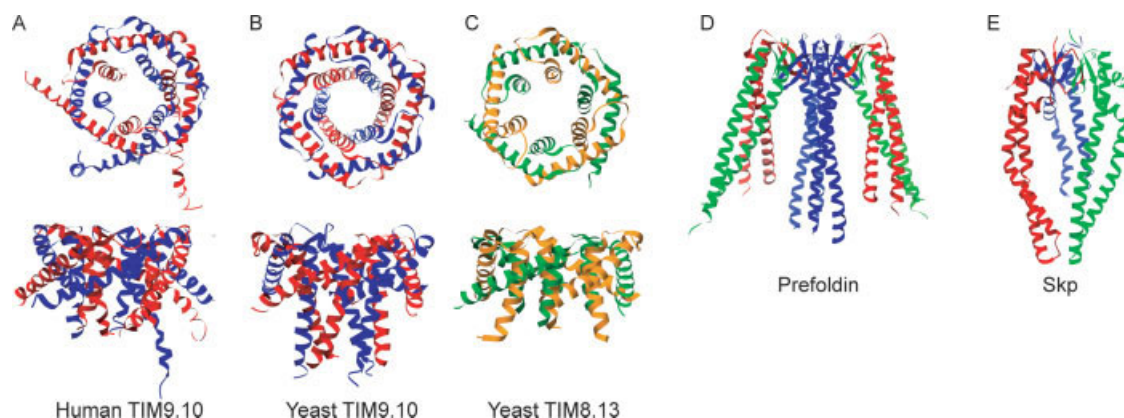
### SMALL TIM PROTEINS

In *Saccharomyces cerevisiae*, the small Tims form two distinct hexameric chaperone complexes in the IMS: The TIM9.10 complex (containing three Tim9 and three Tim10 subunits), and the TIM8.13 complex (containing three molecules of each Tim8 and Tim13) (16, 17). The distinction in function between the two complexes is not clear: both are involved in translocation of both inner and outer membrane proteins (discussed below). However, Tim9 and Tim10 are both essential for yeast viability, whereas Tim8 and Tim13 are not. Furthermore, although Tim8 and Tim13 function exclusively as the TIM8.13 complex, a small fraction of both Tim9 and Tim10 are found associated with the inner membrane-bound TIM22 complex. Tim12 is also essential for viability and is found exclusively in the TIM22 complex (18). Bioinformatics analysis of the small Tims from a wide range of eukaryotes indicates that the Tim12 proteins are not a distinct lineage, rather having arisen independently in different organisms by duplication of one of the other four small Tims (19). Although it is nonessential in yeast, mutations in the gene encoding the human homologue of Tim8, DDP1 (deafness/dystonia peptide 1), can cause Mohr-Tranebjaerg syndrome, an X-linked neurodegenerative disorder, characterized by deafness, dystonia, mental retardation, and blindness (20–22). The small Tim family shares a characteristic conserved twin CX<sub>3</sub>C motif (where X is any amino acid), the two motifs themselves being separated by 11–16 amino acids (23). Initially, it was proposed that the twin CX<sub>3</sub>C motif was a zinc finger that coordinates zinc, inducing folding of the monomer into a helix-loop-helix conformation (18). While the small Tims are able to coordinate

zinc, various lines of enquiry have concluded that the tertiary structure of each subunit is maintained by disulphide bonds between the two juxtaposed CX<sub>3</sub>C motifs (24, 25).

### STRUCTURE OF THE SMALL TIM CHAPERONES

Initial structural analyses included small X-ray scattering of the soluble TIM9.10 complex and NMR of the individual unassembled monomers. The main features of the complex included a structured core and six extended protuberances emanating from the core toward the solvent and mapped to be the N- and C- termini of the subunits of the complex. Binding fluorescence ANS experiments showed that the complex has increased capacity to bind hydrophobic molecules like ANS, reminiscent of its physiological function *in vivo*. A combination of NMR and CD analysis showed that the cysteine-reduced states are unfolded, although the cysteine-oxidized state is partially folded to a molten globule (26). However, atomic resolution structures for the individual small Tims are still missing. By contrast, the crystal structures of both the TIM9.10 and the TIM8.13 complexes have been solved (16, 27, 28) (Figs. 1A–1C). In both complexes, each subunit folds into a helix-loop-helix conformation, in agreement with the proposed “press-stud” folding mechanism based on the formation of two intramolecular disulfides (25), and six subunits form a ring in a six-bladed a-propeller structure. The central part of each subunit forms a doughnut-shaped core around a central pore, and the antiparallel N- and C-terminal helices or “tentacles” all extend downward from this core, forming coiled-coil type contacts close to the core, then veering apart further away. The tips of the helices are significantly disordered, in agreement with biochemical limited proteolysis analysis (29) so were not resolved in the crystal structures. The folding of individual subunits is stabilized by two intramolecular disulphide bonds (16, 25, 30),



**Figure 1.** Crystal structures of ATP-independent chaperones. *Homo sapiens* (A) and *Saccharomyces cerevisiae* (B) Tim9.10 heterohexamers. (C) *Saccharomyces cerevisiae* Tim8.13 heterohexamer. Tim9 is pictured red, Tim10 blue, Tim8 orange, and Tim13 green. Up, a top view is presented, and down, a side view is presented. (D) Prefoldin from *Methanobacterium thermoautotrophicum* heterohexameric complex. (E) Skp from *Escherichia coli* trimeric complex.

and intersubunit contacts include key salt bridges between adjacent monomers (16, 31). The main structural difference between TIM9.10 and TIM8.13 is the variable length of the helical tentacles.

Little is known for the ability of these chaperones to bind their substrates. Based on their structure, different models were proposed. For the binding of AAC to the TIM9.10 complex, two different models were proposed (16). In the first model, two connected transmembrane helices of AAC associate with the tentacles of Tim9 and/or Tim10, forming a “bisecting U” dimer. In the second model, two connected transmembrane helices of AAC interact with TIM9.10 complex, displacing one molecule of Tim9 from the complex. This is getting repeated as AAC is getting imported by TOM complex and has as a result three, molecules of Tim9 to be displaced by the six transmembrane helices of AAC, forming a complex consisted by three molecules of Tim10 and one molecule of AAC. For those models, no experimental evidence is available. For the binding of TIM8.13 to Tim23 a different model was proposed, based on the TIM8.13 crystal structure (28). Tim23 was proposed to bind into the cavity formed by the tentacles of TIM8.13, in a procedure that does not involve any complex dissociation. Computational modeling of this binding show that Tim23 fits well within helical tentacles of the complex and regions of Tim23 that interact with the TIM8.13 complex were found in contact with it (28).

Crystal structures are also available for the cytosolic chaperone prefoldin and the bacterial periplasmic chaperone Skp, and these reveal a strikingly similar overall architecture given that the proteins have no evolutionary relationship (32–35). Prefoldin is a ~90 kDa complex of two  $\alpha$  and four  $\beta$  subunits present in the cytosol of eukaryotes and archaea (36, 37) (Fig. 1C). It captures nascent proteins cotranslationally and mediates their transfer to type II chaperonin complexes, which utilize ATP for protein folding (38, 39). The crystal structure of prefoldin has been described as a jellyfish—it has a double  $\beta$ -barrel core assembly and six long tentacles (Fig. 1D). Skp (17 kDa Protein) is a trimeric periplasmic chaperone involved in translocation and assembly of outer membrane proteins in the bacterial periplasm (40). It is found in two conformational states: free in the periplasm or associated with the inner membrane (41, 42). It may function to prevent spontaneous insertion of substrates into the inner membrane and/or to prevent folding and aggregation in the periplasm. The trimeric complex binds to its substrates with 1/1 stoichiometry, and the interaction is stabilized by hydrophobic and electrostatic interactions (43). Skp binds  $\beta$ -barrel domains of its substrates in the cavity formed by its tentacles, maintaining their unfolded conformation before they are transferred to the outer membrane insertion machinery (44).

The structural similarities between Skp, Prefoldin, and the small Tim chaperones suggest there might also be similarities in their mode of function. Although the mechanism by which the small Tims bind substrates is not well studied, a mechanism involving binding of the substrate to the cavity formed by its

“tentacles” has been proposed (35), in agreement with functional data implicating the N-terminal portion of Tim10 in substrate binding (45).

## ROLE OF SMALL TIM CHAPERONES IN THE TIM22 PATHWAY

### *Role of Small Tims in Import of AAC and Metabolite Carriers*

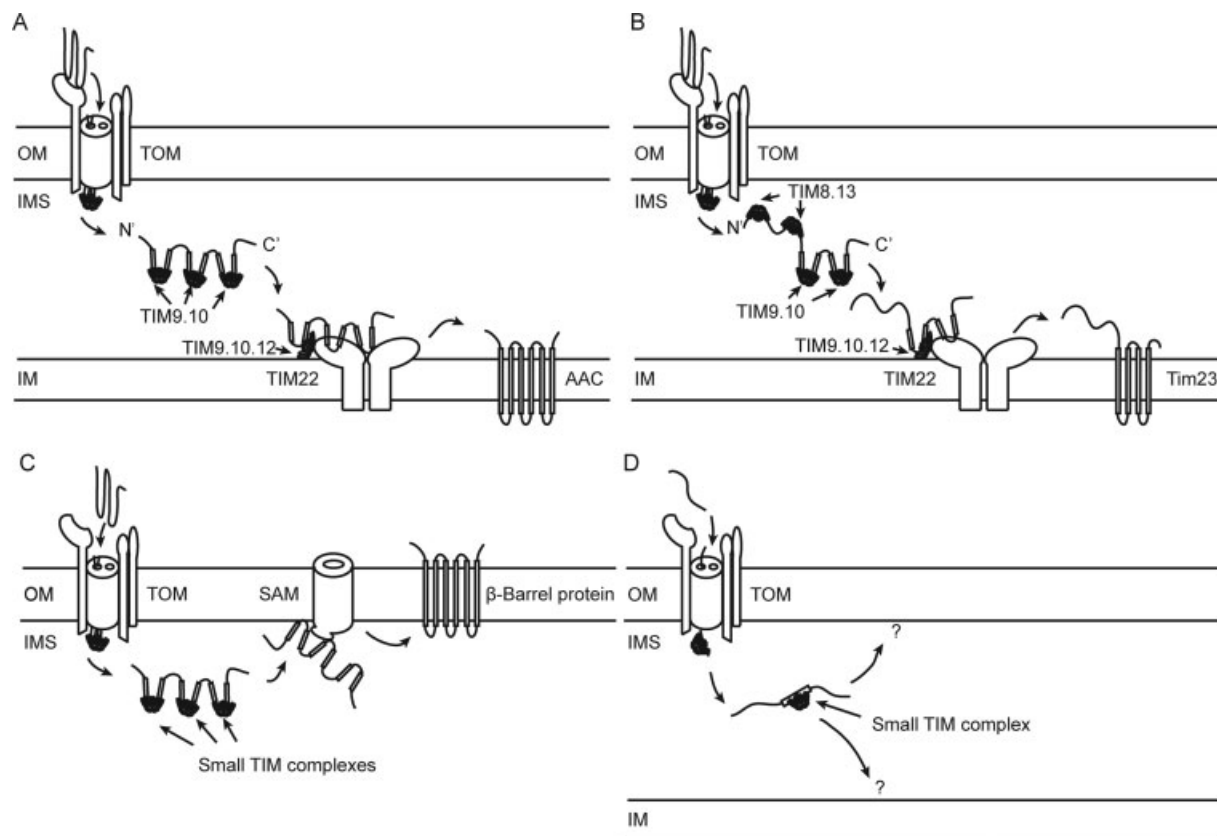
Mitochondrial metabolite carriers are proteins of the inner mitochondrial membrane with six transmembrane domains. The most abundant member of this family is AAC (the ADP/ATP Carrier). Its import into mitochondria is well studied. It is imported via the TIM22 import pathway, with the aid of Tim9, Tim10, and Tim12 (but not Tim8 or Tim13) (17, 23, 46). TIM9.10 interacts with AAC during its translocation across the outer membrane. It is required for the release of AAC from the TOM channel (47). TIM9.10 appears to bind hydrophobic regions on AAC, shielding it from the aqueous environment of the IMS and thus preventing its aggregation (24, 48). The TIM9.10-AAC complex transfers its cargo to the membrane-embedded TIM22 complex via Tim12, a peripherally attached subunit (49, 50) (Fig. 2A).

### *Role of Small Tims in the Import of Tim17 and Tim23*

Like AAC, Tim17 and Tim23, two integral subunits of the inner membrane TIM23 complex, are polytopic membrane proteins, which are themselves inserted into the inner membrane via the TIM22 complex. They appear to utilize both TIM9.10 and TIM8.13 complexes for their translocation (51, 52). In the case of Tim23, the two chaperones are bound to different parts of the precursor during import, showing a difference in substrate specificity between the two chaperones. TIM9.10 binds mainly to the hydrophobic C-terminal part, whereas TIM8.13 binds to the more hydrophilic N-terminal part (28, 53, 54) (Fig. 2B).

## ROLE OF SMALL TIM CHAPERONES IN OUTER MEMBRANE PROTEIN BIOGENESIS

$\beta$ -barrel proteins of the outer mitochondrial membrane are inserted into the membrane via the SAM machinery. The main component of the SAM complex, Sam50, is a member of the Omp85 family. Omp85 (also called BamA) is a protein found in the outer membrane of Gram-negative bacteria, where it has a fundamental role in the assembly of bacterial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins (55). There are two main bacterial periplasmic chaperones required for the biogenesis of the outer membrane  $\beta$ -barrels, SurA, and Skp (56, 57). Although the crystal structures revealed structural similarities between Skp and the small Tim complexes, as discussed earlier, the finding that TIM9.10 and TIM8.13 also function in  $\beta$ -barrel translocation, also transferring substrates to an Omp85 protein, demonstrated an analogous functional role for the two chaperones (58, 59) (Fig. 2C).



**Figure 2.** Different protein biogenesis pathways involving the small Tim chaperones of the intermembrane space. (A) Biogenesis of AAC requires binding by the TIM9.10 complex to transfer it from TOM complex to the TIM22 complex. (B) Biogenesis of Tim23 via TIM22 pathway involves binding of the TIM8.13 complex to the N-terminal part and TIM9.10 complex to the C-terminal part to transfer it from the TOM complex to the TIM22 complex. (C) Small Tim complexes are transferring  $\beta$ -barrel protein precursors from TOM complex to SAM machinery. (D) Small Tim complexes may also act as chaperones transferring different type of hydrophobic proteins either to the inner or the outer membrane via unknown pathways.

### OTHER PATHWAYS INVOLVING SMALL TIM CHAPERONES

In addition to the small Tims' role in the TIM22 and SAM pathways, inner membrane proteins with single transmembrane domains also utilize the small Tim chaperones to traverse the intermembrane space. The mitochondrial prohibitin Phb1 is targeted to the inner membrane TIM23 complex by TIM8.13 (60), whereas Tim11/Subunit e of the  $F_0/F_1$  ATP synthase requires both TIM9.10 and TIM8.13 for its translocation (51) (Fig. 2D). Recently, the protein OM14 that spans the outer membrane with the unusual arrangement of three alpha-helical transmembrane segments has been described (61), and it remains open whether the small Tims may also have a role in facilitating the insertion of proteins like OM14 as well (Fig. 2D).

### BIOGENESIS OF SMALL TIMS

Like most mitochondrial proteins, the small Tims are synthesized in the cytosol and then imported in the intermembrane

space through the TOM channel. After translocation through the TOM complex, small Tims are captured in a disulphide bond-linked intermediate with the intermembrane space oxidase Mia40. A ternary complex is formed between the substrate, Mia40 and the sulphhydryl oxidase Erv1, which is required for reoxidation of Mia40 (62–64). Although the small Tims contain no typical cleavable N-terminal signal sequence, a linear targeting signal within Tim9 and Tim10 has recently been shown to direct proteins across the outer membrane to the Mia40 translocase (65).

### ACKNOWLEDGEMENTS

NP was supported by a PENED grant from the GSRT and FA by a BBSRC studentship. Work in their lab was supported by funds from IMBB-FORTH, the University of Crete and the European Social Fund and national resources (to KT). The authors thank all members of their group for helpful discussions and comments.

## REFERENCES

1. Anfinsen, C. B. (1972) The formation and stabilization of protein structure. *Biochem. J.* **128**, 737–749.
2. van den Berg, B., Wain, R., Dobson, C. M., and Ellis, R. J. (2000) Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. *EMBO J.* **19**, 3870–3875.
3. Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884–890.
4. Kopito, R. R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**, 524–530.
5. Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**, 443–451.
6. Lee, S. and Tsai, F. T. (2005) Molecular chaperones in protein quality control. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 259–265.
7. Dierks, T., Klappa, P., Wiech, H., and Zimmermann, R. (1993) The role of molecular chaperones in protein transport into the endoplasmic reticulum. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **339**, 335–341.
8. Slepnev, S. V. and Witt, S. N. (2002) The unfolding story of the *Escherichia coli* Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? *Mol. Microbiol.* **45**, 1197–1206.
9. Driessen, A. J., Fekkes, P., and van der Wolk, J. P. (1998) The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 216–222.
10. Wiedemann, N., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2006) Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Cell* **21**, 145–148.
11. Gthel, S. F. and Marahiel, M. A. (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423–436.
12. Berndt, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 641–650.
13. Morano, K. A., Liu, P. C., and Thiele, D. J. (1998) Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 197–203.
14. Arsene, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 3–9.
15. Neupert, W. and Herrmann, J. M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723–749.
16. 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.
17. Koehler, C. M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., and Tokatlidis, K. (1998) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.* **17**, 6477–6486.
18. Sirenberg, 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.
19. Gentle, I. E., Perry, A. J., Alcock, F. H., Likic, V. A., Dolezal, P., Ng, E. T., Purcell, A. W., McConville, M., Naderer, T., Chanez, A. L., Charriere, F., Aschinger, C., Schneider, A., Tokatlidis, K., and Lithgow, T. (2007) Conserved motifs reveal details of ancestry and structure in the small TIM chaperones of the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1149–1160.
20. 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.
21. Rothbauer, U., Hofmann, S., Muhlenbein, N., Paschen, S. A., Gerbitz, K. D., Neupert, W., Brunner, M., and Bauer, M. F. (2001) Role of the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) in import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 37327–37334.
22. 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.
23. Koehler, C. M. (2004) The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 1–4.
24. Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W., and Koehler, C. M. (2002) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* **21**, 942–953.
25. 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.
26. Lu, H., Golovanov, A. P., Alcock, F., Grossmann, J. G., Allen, S., Lian, L. Y., and Tokatlidis, K. (2004) The structural basis of the TIM10 chaperone assembly. *J. Biol. Chem.* **279**, 18959–18966.
27. 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.
28. Beverly, K. N., Sawaya, M. R., Schmid, E., and Koehler, C. M. (2008) The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23. *J. Mol. Biol.* **382**, 1144–1156.
29. Vial, S., Lu, H., Allen, S., Savory, P., Thornton, D., Sheehan, J., and Tokatlidis, K. (2002) Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone. *J. Biol. Chem.* **277**, 36100–36108.
30. Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P., and Tokatlidis, K. (2004) Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 18952–18958.
31. Alcock, F. H., Grossmann, J. G., Gentle, I. E., Likic, V. A., Lithgow, T., and Tokatlidis, K. (2008) Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space. *Biochem. J.* **409**, 377–387.
32. Korndorfer, I. P., Dommel, M. K., and Skerra, A. (2004) Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1015–1020.
33. Walton, T. A. and Sousa, M. C. (2004) Crystal structure of Skp, a pre-foldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol. Cell* **15**, 367–374.
34. Siegart, R., Leroux, M. R., Scheuffler, C., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2000) Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell* **103**, 621–632.
35. Stirling, P. C., Bakhom, S. F., Feigl, A. B., and Leroux, M. R. (2006) Convergent evolution of clamp-like binding sites in diverse chaperones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 865–870.
36. Leroux, M. R., Fandrich, M., Klunker, D., Siegers, K., Lupas, A. N., Brown, J. R., Schiebel, E., Dobson, C. M., and Hartl, F. U. (1999) MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. *EMBO J.* **18**, 6730–6743.
37. Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998) Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* **93**, 863–873.
38. Lundin, V. F., Stirling, P. C., Gomez-Reino, J., Mwenifumbo, J. C., Obst, J. M., Valpuesta, J. M., and Leroux, M. R. (2004) Molecular clamp mechanism of substrate binding by hydrophobic coiled-coil residues of the archaeal chaperone prefoldin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4367–4372.
39. Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J. L., Simons, C. T., Lewis, S. A., Bartolini, F., Cowan, N. J., and Valpuesta, J. M. (2002) Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J.* **21**, 6377–6386.

40. Schafer, U., Beck, K., and Muller, M. (1999) Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 24567–24574.
41. Chen, R. and Henning, U. (1996) A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **19**, 1287–1294.
42. De Cock, H., Schafer, U., Potgeter, M., Demel, R., Muller, M., and Tommassen, J. (1999) Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein. *Eur. J. Biochem.* **259**, 96–103.
43. Qu, J., Mayer, C., Behrens, S., Holst, O., and Kleinschmidt, J. H. (2007) The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J. Mol. Biol.* **374**, 91–105.
44. Walton, T. A., Sandoval, C. M., Fowler, C. A., Pardi, A., and Sousa, M. C. (2009) The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1772–1777.
45. 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.
46. 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.
47. Truscott, K. N., Wiedemann, N., Rehling, P., Muller, H., Meisinger, C., Pfanner, N., and Guiard, B. (2002) Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7780–7789.
48. 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.
49. Endres, M., Neupert, W., and Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.* **18**, 3214–3221.
50. 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.
51. Leuenberger, D., Bally, N. A., Schatz, G., and Koehler, C. M. (1999) Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *EMBO J.* **18**, 4816–4822.
52. 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.
53. Davis, A. J., Alder, N. N., Jensen, R. E., and Johnson, A. E. (2007) The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import. *Mol. Biol. Cell* **18**, 475–486.
54. Davis, A. J., Sepuri, N. B., Holder, J., Johnson, A. E., and Jensen, R. E. (2000) Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J. Cell Biol.* **150**, 1271–1282.
55. Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., and Lithgow, T. (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J. Cell Biol.* **164**, 19–24.
56. Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**, 262–265.
57. Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T. J., and Kahne, D. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**, 235–245.
58. Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W., and Rapaport, D. (2005) Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 6434–6440.
59. 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.
60. Tatsuta, T., Model, K., and Langer, T. (2005) Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **16**, 248–259.
61. Burri, L., Vascotto, K., Gentle, I. E., Chan, N. C., Beilharz, T., Stapleton, D. I., Ramage, L., and Lithgow, T. (2006) Integral membrane proteins in the mitochondrial outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* **273**, 1507–1515.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. Milenkovic, D., Ramming, T., Muller, J. M., Wenz, L. S., Gebert, N., Schulze-Specking, A., Stojanovski, D., Rospert, S., and Chacinska, A. (2005) Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2530–2539.

**A NOVEL PATHWAY FOR IMPORT OF SINGLE-SPANNING PROTEINS  
INTO THE MITOCHONDRIAL INNER MEMBRANE**

**Nikos Petrakis<sup>1,2</sup> and Kostas Tokatlidis<sup>1,3,\*</sup>**

From the <sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas (IMBB-FORTH), Nikolaou Plastira 100, Heraklion 71013, Crete, Greece, <sup>2</sup>Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion 71003, Crete, Greece, <sup>3</sup>Department of Materials Science and Technology, University of Crete, Heraklion 71003, Crete, Greece

Running head: Single-spanning protein insertion in mitochondria

\*Address correspondence to: Kostas Tokatlidis, IMBB-FORTH, Nikolaou Plastira 100, Heraklion 71013, Crete, Greece, FAX: 30 2810 391136, Email: tokatlid@imbb.forth.gr

## **ABSTRACT**

**Insertion of proteins at the mitochondrial inner membrane has been studied in detail for polytopic proteins that undergo the carrier-import pathway mediated by the TIM22 inner membrane translocase. However, the import of single-spanning proteins without a presequence is not understood. Subunit e of ATPase (Subunit e, also called Tim11) was used to study this process, which turns out to have unique features. The electrochemical potential of the inner membrane is required not for insertion in the inner membrane but rather for translocation across the outer membrane. Direct import in mitoplasts is unaffected by the potential and enhanced upon protease treatment of the mitoplasts. Additionally, Subunit e can insert efficiently in synthetic liposomes, independent of a diffusion potential or cardiolipin, arguing for an important role of the association between Subunit e and the lipid bilayer in the insertion process. Subunit e interacts with the small Tim chaperone, expanding thus the role of this complex as a generic chaperone of the intermembrane space. Import requires the N-terminal 23 amino acids of Subunit e that function as a targeting and membrane-anchoring signal. Arginine 8 is crucial for the import process at the level of the outer membrane. Import and, in particular, integration at the inner membrane of Subunit e therefore seems to be characterized by unique and distinguishing features that may be shared by other, as yet uncharacterized, single spanning**

**proteins of the inner membrane that are devoid of a presequence.**

## **INTRODUCTION**

The mitochondrial import machinery is versatile and complex. Its complexity is due to the multiple sub-compartments that a mitochondrion is made of. A mitochondrial precursor is synthesized in the cytosol and afterwards it is targeted to the mitochondrion. After crossing the outer mitochondrial membrane via the TOM translocase, the various import machineries will sort each precursor to its correct sub-mitochondrial compartment where it is destined to function (1).

Different types of mitochondrial proteins use different sorting machineries for their targeting. Outer membrane  $\beta$ -barrel proteins, after initial passage through the TOM channel, they are transiently recognized by the intermembrane space small Tim chaperones and are then delivered to the SAM machinery, which integrates them in the outer mitochondrial membrane (2). The mitochondrial matrix proteins are directly delivered to the TIM23 inner membrane translocase, which imports them to the matrix, where their presequence is cleaved-off by the MPP protease (3). In a variation of the matrix import pathway, the TIM23 translocase also inserts proteins with a cleavable presequence and one transmembrane domain to the inner membrane. In this case, the precursor protein is inserted at the inner membrane following a stop-transfer mechanism whilst its presequence, which is exposed to the matrix, is cleaved by MPP(4). Other proteins inserted at the inner membrane follow two distinct import pathways described to date. One class of proteins are inserted via the OXA1 pathway that operates after passage of the precursor through the TIM23 translocon and cleavage of the presequence in the matrix(5). A second class of inner membrane proteins (all of which are

polytopic, like the metabolite carrier family) follow the TIM22 import pathway (6). In this pathway, the small Tim chaperones receive the precursors from the TOM channel and deliver them to the TIM22 translocon (7) that inserts them with the right topology. Finally, the TIM23 translocase also targets proteins to the intermembrane space. This category of proteins is inserted to the inner membrane by the stop-transfer mechanism where the final step of maturation involves the intermembrane space protease IMP1 that cleaves the stop-transfer sorting signal and releases the precursor in a mature, soluble form (8). Finally, intermembrane space proteins that are cysteine-rich and are organized with twin CX<sub>n</sub>C motifs specifically follow the MIA pathway that facilitates their oxidative folding and retention in the intermembrane space (9, 10).

Despite a wealth of knowledge about the targeting signals and sorting of various precursors for the various mitochondrial compartments, still little is known on the import of small proteins of the inner membrane that are membrane associated via a single transmembrane domain and do not have a defined, cleavable presequence. In this category belongs the subunit *e* of the F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase (Su *e*), originally identified as Tim11 (11, 12). *Saccharomyces cerevisiae* Su *e* is a small (96 a.a.) non-essential inner membrane protein exposed to the intermembrane space (11). It is a subunit of the F<sub>0</sub> part of the F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATP synthase (12) and it is important for the oligomerisation of the ATP synthase, although its mechanism of action is still unclear (13, 14). It is a dimer-specific subunit (only isolated with the dimeric form of the ATP synthase) (15). Strains without Su *e* are viable (11) but presented altered cristae morphology (onion-like mitochondria) (16) and still little is known about its import pathway (17). Here, we present data on various novel features of the import of Su *e* to mitochondria, which seems to follow a distinct pathway that could exemplify a

route of insertion for other inner membrane proteins with a single transmembrane domain without a cleavable presequence.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Cloning of Su e Variants (In Vitro Transcription/Translation pSP65 Vectors)* – Wild-type Su *e* was PCR-amplified with Su *e* (forward EcoRI) and Su *e* (reverse BamHI) primers from a yeast genomic DNA with a 5 methionine C-terminal extension and cloned into pSP65 with EcoRI-BamHI. The ΔN23 mutant was then PCR-amplified as EcoRI-BamHI with a 5 methionine C-terminal extension and cloned into pSP65 (Promega).

*Bacterial Expression pQE60 Vectors* – Wild-type Su *e* and ΔN23 Su *e* were extracted from pSP64 and cloned into as an EcoRI-BamHI fragment into pQE60 (Qiagen) expression vector.

*Mutagenesis of Su e* – Mutants of Su *e* were generated by polymerase chain reaction (PCR)-based site-directed mutagenesis (Stratagene QuickChange site-directed mutagenesis kit) from the pSP65-WT Su *e* plasmid. Primer design and the PCR conditions were performed according to the manufacturer's guidelines. The mutations were verified by sequencing reactions.

*Import in yeast mitochondria* - <sup>35</sup>S-labelled precursor proteins were synthesized using the TNT SP6-coupled transcription/translation kit (Promega). The radioactive material was imported in wt mitochondria (50 μg) in the presence of 2 mM ATP and 2.5 mM NADH 20 min at 30°C. Mitochondria were then resuspended in 1.2 M sorbitol and 20 mM HEPES pH 7.4, followed by a treatment with proteinase K (0.1 mg/ml) to remove unimported material. Finally, they were resuspended in SDS-sample buffer, analysed by SDS-PAGE and visualized by digital autoradiography (Molecular Dynamics). Mitoplasts were generated by hypo-osmotic swelling in 20 mM HEPES/KOH pH 7.4 after import and proteinase K treatment. The supernatant was precipitated with 10% TCA for 20 min on



ice. The precipitated material was isolated by centrifugation for 20 min at 14 000 g at 4°C before resuspending in SDS-sample buffer and loading on SDS-PAGE. The carbonate extraction was performed with treatment of the mitochondria with ice-cold 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for 30 min on ice. Then, the samples were centrifuged at 25,000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was precipitated with 10% TCA for 20 min on ice. The precipitated material was isolated by centrifugation for 20 min at 14 000 g at 4°C before resuspending in SDS-sample buffer and loading on SDS-PAGE.

*Import in mitoplasts and into protease K treated mitoplasts* - Mitoplasts were generated by hypo-osmotic swelling of isolated yeast mitochondria in 20 mM HEPES/KOH pH 7.4 with (PK-treated mitoplasts) or without (mitoplasts) of 0.1 mg/ml proteinase K. For each import 50 µg of mitochondria were used. After mitoplasting, the proteinase K was deactivated by PMSF treatment (1 mM PMSF for 10 min on ice). The mitoplasts were re-isolated by centrifugation and then <sup>35</sup>S-labelled precursor proteins were added. The radioactive material was imported in mitoplasts in the presence of 2 mM ATP and 2.5 mM NADH 20 min at 30°C. Mitochondria were then resuspended in 1.2 M sorbitol and 20 mM HEPES pH 7.4. Finally, they were resuspended in SDS-sample buffer, analysed by SDS-PAGE and visualized by digital autoradiography (Molecular Dynamics). The carbonate extraction was performed with treatment of the mitoplasts with 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for 30 min in ice. Then, the samples were centrifuged at 25,000 g. The supernatant was precipitated with 10% TCA for 20 min on ice. The precipitated material was isolated by centrifugation for 20 min at 14 000 g at 4°C before resuspending in SDS-sample buffer and loading on SDS-PAGE.

*Liposome Preparation* - Phosphatidylcholine was purchased from Avanti Polar Lipids. 12 mg of lipids in chloroform were dried with nitrogen for 30 min; resuspended in 1 ml of

150 mM KCl and 50 mM Tris, pH 7.4; and incubated at room temperature for 1 h to obtain multilayer vesicles. Subsequent cycles of freezing/thawing (10 s in liquid nitrogen and 50 s in a 50 °C water bath) created single layer vesicles that were then homogenized by 10 cycles of extrusion through 100-nm filters.

*Flotation of Liposomes* - 0.5 µg of recombinant protein was incubated with liposomes (lipid concentration of 5 mg/ml) in 50 µl flotation buffer (150mM NaCl and 20mM Hepes, pH 7.4 for the liposomes +Δψ or 150mM KCl and 20mM Hepes, pH 7.4 for the liposomes -Δψ), (30 min, 22 °C). The reaction mixture was diluted with 50 µl of 2.4 M sucrose, 150 mM NaCl (or KCl), and 20 mM Hepes, pH 7.4 (final sucrose concentration of 1.2 M). The K<sup>+</sup> diffusion potential (+Δψ) was generated with addition of valinomycin (0.4 µM). The reaction was overlaid with 100 µl of 0.25 M sucrose. The samples were centrifuged (100,000 g, 3 h, 22 °C), and 50-µl fractions from the top were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (the “pellet” is material left in the tube and solubilized with SDS sample buffer).

*Peptide Spot Arrays* - Peptide spot membranes of ScTim11/Su e (103 13-mers overlapping by 10 residues) were purchased from JPT Peptide Technologies. Screening of peptide spots was performed according to (18).

*Protein Purification* - Recombinant proteins were expressed in the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain from pET28a (HisTim9), pRSETa (HisTim10), pGEX (Tim10 untagged from a GST fusion) or pQE60 (Su e and ΔN Su e) constructs. Purification of His6-tagged fusion proteins was performed according to published methods (19).

*TIM9\*10 complex formation* - Purified HisTim9 and untagged Tim10 were combined to 1/1 ratio. The proteins were incubated for 2h in ice and then concentrated using an Amicon Ultra concentrator (5 kDa cutoff, Millipore), to a final volume 0.5 ml.

Then, the sample was gel filtrated and the fractions that corresponded to the heterohexameric complex were isolated.

*In vitro binding on Ni-NTA beads* - Radiolabelled Su e or  $\Delta N23$  Su e was *in vitro* synthesized in the presence of His-tagged Tim9 or Tim10 or TIM9\*10 complex which was created by combining His-Ttagged Tim9 and untagged Tim10. 1  $\mu$ g of purified protein was used per  $\mu$ l of reaction. Reaction mixture was then incubated for one hour with Ni-NTA beads in order to the His-Tagged protein in buffer A (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4. Beads were then washed to remove the unbound protein with buffer A three times.

*Miscellaneous* - Purification of mitochondria, gel filtration, SDS-PAGE and western blotting were performed as described previously (18,19). Quantification of radioactive bands was made using Molecular Dynamics software, ImageQuant 5.2.

## RESULTS

*Subunit e is imported in mitochondria and is inserted at the inner mitochondrial membrane in the presence of inner membrane potential* - *In vitro* synthesized radiolabeled Su e was imported in energized and de-energized isolated wild-type yeast mitochondria. Approximately 20 % of the total radioactive protein was imported in energized mitochondria (+  $\Delta\psi$ ) (Fig. 1A, lane 3). When the inner membrane potential is disrupted by the ionophores valinomycin and CCCP (- $\Delta\psi$ ), the import in mitochondria is almost totally abolished (Fig. 1A, lane 10), indicating that the import of Su e in mitochondria is dependent on the potential of the inner membrane. Mitochondria with imported radiolabeled Su e were treated with a hypotonic solution (mitoplasting) and then centrifuged. The proteins of the supernatant (figure 1A, lane 4) and the pellet (figure 1A,

lane 5) were loaded on a SDS gel. The radioactive protein was found to the pellet fraction. Furthermore, after extraction with carbonate, the radioactive protein was found in the membrane fraction (carbonate extraction pellet – Fig. 1A, lane 7). This data shows that Su e is localized at the inner mitochondrial membrane, as reported before (11). As a control for the import assay, import of the well-studied radiolabeled matrix-targeted precursor Su9-DHFR was performed (Fig. 1B). Su9-DHFR was imported to energized mitochondria (+  $\Delta\Psi$ ), while it does not in de-energized mitochondria (- $\Delta\Psi$ ). The imported mature protein was found to the mitoplast pellet fraction (Fig. 1B, lane 5). After treatment with carbonate, the radiolabelled Su9 – DHFR was found in the soluble fraction (Fig. 1B, lane 6). This shows that Su9-DHFR is imported into the mitochondria matrix, as expected.

*Su e can be directly inserted to the inner mitochondrial membrane* - To check the insertion of Su e at the inner mitochondrial membrane, the outer mitochondrial membrane was disrupted by treatment with a hypotonic solution (mitoplasting). Half of the mitochondria with the outer membrane disrupted (mitoplasts) were treated with PK to digest all the exposed proteins (PK treated mitoplasts), while the other half remained untreated. The radiolabeled precursor was then presented directly to mitoplasts or to PK-treated mitoplasts. The insertion to the inner membrane was then checked by carbonate extraction of the mitoplasts. Su e was efficiently inserted in the inner membrane in mitoplasts (Fig. 2, lane 2) as well as in PK-treated mitoplasts (Fig. 2, lane 5). After carbonate extraction, the radiolabelled precursor was mostly found in the membrane fraction (carbonate extraction pellet – Fig. 2 lanes 4 and 7). PK-treatment of the mitoplasts did not inhibit but rather seemed to enhance the insertion of the precursor into the inner membrane (Fig. 2). This unexpected result shows that the insertion of Su e to the inner mitochondrial membrane when directly presented to the

inner membrane (by-passing the outer membrane translocon) does not require any outer membrane or intermembrane space protein cleavable by PK, or any PK-sensitive protein domain exposed to the intermembrane space like the intermembrane space domains of TIM23 and TIM22 translocases that are known to be needed for the insertion of proteins to the inner membrane via the well established TIM23 and TIM22 pathways. Cleavage of the intermembrane space exposed parts of Tim23 and Tim22 by PK in mitoplasts was checked by western blotting, where only the membrane protected parts of those proteins were detected after PK treatment (not shown). Mitoplasts and PK-treated mitoplasts were treated with valinomycin and CCCP in order to deplete the inner membrane potential before the interaction with the radiolabelled precursor. The insertion of the radiolabelled *Su e* is surprisingly not affected by this treatment, excluding thus the possibility that insertion of *Su e* to the inner mitochondrial membrane is driven in this case solely or primarily by the electrophoretic force of the inner membrane alone (Fig. 2B,  $-\Delta\psi$ ). *Subunit e is inserted into phosphatidylcholine liposomes* - To test the ability of *Su e* to be spontaneously inserted into a protein-free lipid bilayer, a sucrose gradient ultracentrifugation assay was developed. Purified denatured recombinant *Su e* or  $\Delta N23$  *Su e* (lacking the first 23 amino acids including the membrane anchor segment) was incubated with  $K^+$ -loaded phosphatidylcholine (PC) liposomes in a  $Na^+$ -containing buffer. A  $K^+$  diffusion potential ( $+\Delta\psi$ ) was generated by addition of valinomycin (0.4  $\mu M$ ). The liposomes with *Su e* or  $\Delta N23$  *Su e* were then placed at the bottom of a sucrose gradient and then the mixture was ultracentrifuged at 100,000 g. In this way, the liposomes floated to the top of the gradient together with any inserted protein into the liposomes. After western blotting analysis with anti-*Su e* antibodies, *Su e* was mostly found at the top fraction (Fig. 3 A and B, F1), while  $\Delta N23$  *Su e* was mostly found at lower fractions (Fig. 3 C and D, F3 and F4).

This indicates that only the full length version with the predicted transmembrane domain of the protein intact has the capacity to float with PC liposomes. Fraction 5 (Fig. 3, F5) corresponded to precipitated protein material after ultracentrifugation. The absence of *Su e* or  $\Delta N$  *Su e* in this fraction suggests that most of the protein did not precipitate as an aggregate during flotation. The insertion of the protein did not depend on the presence of a  $\Delta\Psi$  (Fig. 3 A and C) as *Su e* was inserted into PC liposomes with the same efficacy plus or minus  $\Delta\Psi$  (Fig. 3). The creation of a diffusion potential in the liposomes was confirmed by the accumulation of the fluorescent, potential-sensitive dye DiSC5 (data not shown). Furthermore, the presence of cardiolipin into the liposomes (20% cardiolipin – 80% PC ratio) had no effect on the flotation of the protein (data not shown).

*Charges at the N-terminal part of Su e affect targeting into the inner mitochondrial membrane* - In order to identify the region that contains the targeting information of *Su e*, the 23 N-terminal amino acids of the protein were deleted. This region includes also the predicted transmembrane region part of the protein. Import of the radiolabelled version of  $\Delta N23$  *Su e* is strongly impaired (Fig. 4A), suggesting that the 23 first amino acids of *Su e* contain the mitochondrial targeting signal.

To further investigate which amino acids are important for the recognition of *Su e* during import in mitochondria, the charged amino acids of the N-terminal domain were mutated since charged amino acids are generally thought to be important for the import of precursors into mitochondria. *Su e* has three charged amino acids in its 23 N-terminal segment, an arginine in position 8, an arginine in position 21 and an aspartate in position 23. Three mutants were constructed, R8G, where the arginine in position 8 was mutated to glycine, R21G, where arginine in position 21 was mutated to glycine and R21G/D23G where both arginine in position 21 and aspartate in

position 23 were mutated to glycines. The import in intact mitochondria of the R21G mutant and the R21G/D23G mutant was not significantly affected, whilst the import of the R8G mutant was strongly inhibited (Fig. 4 B, D and E, lane 3). This shows that arginine in position 8 is important for the import of *Su e* in mitochondria. Furthermore, arginine in position 8 was mutated to lysine (R8K mutant), where the positive charge in position 8 remains. The import of the R8K mutant in mitochondria was not affected compared to the wt, indicating that the positive charge in position 8 is needed for the import of *Su e* in mitochondria (Fig. 4, C).

The R21G mutant is imported in mitochondria and localized in the mitoplast pellet (Fig. 4 D, lane 5), like the wt *Su e*. However, the R21G mutant is found in both the supernatant and the pellet fraction after carbonate extraction (Fig. 4 D, lanes 6 and 7), whilst wt and R8K mutant are mainly found in the pellet fraction (Fig 1 A, Fig 4 C, lanes 6 and 7). This suggests that, in contrast to the wt that is inserted at the inner membrane, the R21G mutant is not inserted as efficiently at the inner membrane, after its import to intact mitochondria. A similar effect but not as striking is observed for the R21G/D23G double mutant, which is also inserted at the inner membrane less efficiently than the wt (Fig. 4 E, lanes 6 and 7). This data indicates that arginine in position 21 may play a role in the insertion of *Su e* in the inner membrane after translocation of the precursor in intact mitochondria.

To further investigate the insertion of the mutants to the inner mitochondrial membrane, radiolabelled precursors were presented to mitoplasts and to PK-treated mitoplasts. In all versions of *Su e* insertion at the inner mitochondrial membrane was similar to the wt protein (Fig. 5). This suggests that when *Su e* is directly presented to the inner membrane (bypassing the outer membrane TOM channel as in the case of import into mitoplasts), the charges are not important for its insertion to the inner membrane. The charge at position 8 that is

required for the import of *Su e* through the outer mitochondrial membrane does not seem to be required for the insertion to the inner membrane. Furthermore, no significant difference for the insertion of the R21G at the inner membrane was observed, compared with that of the wt. This suggests that insertion at the inner membrane is affected by the arginine in position 21 only in the case when the precursor is presented to intact mitochondria.

*The N-terminal part of Su e binds to Tim10p and TIM9\*10 complex* - Unlike inner membrane proteins with one transmembrane domain and a cleavable N-terminal presequence, the import of *Su e* is dependent on the intermembrane space chaperone small Tims. Import of radiolabelled *Su e* is strongly inhibited in mitochondria isolated by a *Tim9-ts* strain (Fig 6A and ref 17). In this strain, the amount of small Tim proteins Tim9 and Tim10 is strongly reduced, after shifting the growing yeast cells at 37°C for 6-8 hours. As a control, radiolabelled *Su9-DHFR* and the yeast ADP/ATP carrier AAC2 were also imported in *Tim9-ts* mitochondria. The import of *Su9-DHFR* (a substrate for the TIM23-pathway), which does not depend on small Tim proteins, was unaffected in comparison to the import in mitochondria isolated from a wt strain and the import of AAC2, which is imported via the small Tim-dependent TIM22 import pathway and was almost totally abolished (Fig. 6 B, C). This indicates that the import of *Su e* is somehow affected by the small Tim proteins of the intermembrane space.

An *in vitro* binding assay was developed in order to check the binding of *Su e* with the small Tim proteins Tim9 and Tim10 and the Tim9\*10 complex (Fig. 6D). Radiolabelled *Su e* and  $\Delta N$  *Su e* were synthesized *in vitro* in the presence of pre-purified N-terminally His-tagged Tim9, His-tagged Tim10 or Tim9\*10 heterohexameric complex produced with the N-terminally His-tagged version of Tim9 and the untagged version of Tim10. The integrity of the complex was confirmed by gel filtration (not shown). 5.6 % of the radiolabelled *Su e* was co-

precipitated with the Ni-NTA beads without the presence of any His-tagged protein. The amount of the co-precipitated Subunit e in the presence of His-Tim9 was not significantly increased (7.2%) whilst in the presence of His-Tim10 or His-Tim9\*10 complex was increased to 18.2% and 20.2%. This indicates that Subunit e can be bound to Tim9\*10 complex and to Tim10 alone to substantial levels *in vitro*. The same assay was repeated using the  $\Delta N23$ Subunit e. In this case, no significant binding to any of His-Tim9, His-Tim10 nor His-Tim9\*10 was observed, showing that the N-terminal part of the protein is involved to the binding with Tim10 and Tim9\*10 complex.

To further investigate the interacting domain of Subunit e with the small Tims a peptide spot assay was performed (Fig. 7) using a peptide library of Subunit e immobilized on a membrane and incubated with Tim9 (Fig. 7B), Tim10 (Fig. 7C) or the Tim9\*10 complex (Fig. 7D). In the case of Tim9, essentially no binding to the peptide spot membrane was detected, whilst in Tim10 alone and the Tim9\*10 complex bound to an array of peptides that correspond mainly to the transmembrane region as detected. This result is in good agreement with the findings of the *in vitro* binding assay in Fig. 6.

## DISCUSSION

In this study we investigated the import of Subunit e of the  $F_0/F_1$  ATP synthase and its insertion into the mitochondrial inner membrane. Several features of this import pathway were unexpected and constitute an apparently novel pathway of insertion into the membrane.

The insertion of Subunit e to the inner membrane of the PK-treated mitoplasts indicates that Subunit e can be inserted at the inner membrane without proteinaceous components that are otherwise absolutely needed for the insertion of precursors via the well characterized TIM23 and TIM22 translocases. The TIM23 translocase has four subunits exposed to the intermembrane space, namely Tim23p, Tim17p, Tim21p and Tim50p. The amino-

terminal 50 amino acids of Tim23p which are responsible for the recognition of the presequence are cleaved by PK-treatment of the mitoplasts (20). Furthermore, Tim50p, which is involved in the transfer of the precursor from TOM (21, 22) and Tim17p, which is an essential subunit of the TIM23 translocase (23) are also PK-sensitive in mitoplasts (24,25). Tim21p which has extensively folded domains in the intermembrane space (26) has a 20 kDa PK-protected part after the treatment of mitoplasts with PK (27). Although the channel-forming domains of Tim23p are not accessible to PK in mitoplasts, the TIM23 translocase will not be able to work normally in the absence of its intermembrane space domain in PK-treated mitoplasts. On the other hand, the TIM22 translocase components are also expected to have serious functional defects and hence could be reasonably excluded as major players in the insertion of Subunit e to the inner mitochondrial membrane upon PK-treatment of mitoplasts. The TIM22 translocase is known so far to only insert proteins with multiple transmembrane segments (for example the metabolite carrier proteins into the inner membrane). Furthermore, TIM22 subunits Tim22p, Tim18p and Tim54 get degraded in PK-treated mitoplasts (28). So, the ability of Subunit e to be inserted to the inner mitochondrial membrane when presented directly to mitoplasts is most likely not performed via the known mechanisms for the insertion of proteins to the inner membrane.

For the import of Subunit e to the mitochondria  $\Delta\psi$  is required. In contrast, for the insertion to the mitoplasts,  $\Delta\psi$  is surprisingly not required. To the best of our knowledge this is the only case of insertion into the inner membrane in mitoplasts in the absence of a potential. Also, insertion of Subunit e in PC liposomes is not enhanced by the presence of the  $K^+$ -driven  $\Delta\psi$ . This corroborates the notion that inner membrane potential in the case of Subunit e is not required for the insertion into the inner membrane but more likely it helps for crossing the outer membrane

barrier. Comparing the insertion of the protein in mitoplasts with its insertion in PK-treated mitoplasts shows enhanced insertion in the case of PK-treated mitoplasts. Why is this so? The inner mitochondrial membrane is a protein-rich membrane with many proteinaceous domains protruding into the intermembrane space, 'hiding' thus the lipids of the inner membrane. PK-treatment of the mitoplasts results in degradation of the vast majority of these intermembrane space exposed proteinaceous domains thereby allowing readily a better accessibility of the inner membrane lipids. This fact, in combination with the capacity for spontaneous insertion of *Su e* into synthetic liposomes, suggests that *Su e* can directly interact with lipids.

Deletion of the N-terminal 23 amino acids of the protein strongly impairs the import of the protein. This shows that this N-terminal segment contains important targeting information. Since it is well established that charged amino acids are important for the recognition of the outer membrane receptors we looked for the specific role of charged residues within this N-terminal segment. Mutation of the arginine in position 8 to glycine strongly impairs import of *Su e*, but it does not affect the insertion at the inner membrane when the mutant is directly presented to mitoplasts. Mutation of arginine 8 to the positively charged lysine does not affect its import or the insertion to the mitoplasts, which indicates that the positive charge in position 8 more likely constitutes an important determinant for the recognition of the protein by the outer translocase system (receptors and translocon).

The structural characterization by NMR of the region 1-21 of *Su e* in dodecylphosphocholine micelles revealed a monomer in a helical structure (29). Arginine in position 21 is near the surface of the lipids, suggesting electrostatic interaction between the positive charge of arginine and the negatively charged phosphate head groups. This interaction

would stabilize the inserted peptide and it may explain the defect of the insertion of *Su e* to the inner membrane in the case of the R21G mutant. Arginine 8 on the other hand is found buried to the lipid layer and the suggestion was (29) that it has a role in the interaction with another subunit of the ATPase, *Su g*, while forming the  $F_0$  sector of ATP synthase. Our data reveal an additional role for arginine in position 8 in early stages of import into the organelle.

The small Tim chaperone system of the intermembrane space is known to receive protein from the TOM and to deliver them to other translocases. Their action as chaperones for the delivery of proteins to the SAM complex during biogenesis of  $\beta$ -barrel proteins and to the TIM22 inner membrane translocase in biogenesis of proteins with multiple transmembrane domains it is already well established (30). The property of *Su e* to be recognized and bound by the Tim9\*10 chaperone complex and the impairment of import into mitochondria with dysfunctional Tim9\*10 complex indicates that *Su e* can be a substrate for the small Tim chaperones. This expands the range of substrates of the small Tim chaperones, indicating that small Tim chaperones have a more general chaperone activity in the intermembrane space.

The findings presented here indicate that *Su e* is imported via a different pathway from these already known for other precursors. Does this represent an oddity for *Su e*, or are there other proteins with similar import properties? The availability of the yeast mitochondrial proteome (31) gave us a unique opportunity to search for proteins with similar characteristics as *Su e*. Specifically, we searched for proteins of the inner mitochondrial membrane or with unknown localization with one predicted transmembrane domain near the N- or C-terminus and without any predicted cleavable presequence. In Table 1 we list the proteins that were found to fulfil these criteria. 16 such proteins were identified and the majority of those are small proteins.

### *Single-spanning protein insertion in mitochondria*

Four of those are subunits of the  $F_0/F_1$  ATP synthase (subunits e, g, i and k), and four are subunits of the cytochrome c oxidase (COX7, COX8, COX9 and COX16). Prohibitin 1 (Phb1) is another protein found in this search, for which the import mechanism has been studied to an extent (32). Interestingly, an unconventional import pathway was also observed, involving the Tim8\*13 complex (a functional homologue of the Tim9\*10 complex) and the TIM23 complex for import into mitochondria. Although a

general requirement for the small Tim chaperones might be the case for such single-spanning, presequence-less precursors, proper insertion at the inner membrane might follow different routes. Some exemplifies a unique import and insertion pathway for such precursors. Further studies will allow dissection of all the molecular details and crucial interactions underpinning an efficient integration process in the inner membrane. This vital cellular process may apparently be accomplished by a surprising variability of mechanisms.

**FOOTNOTES**

NP was supported by a PENED grant from the GSRT. We thank Sylvaine Clemence for some preliminary work on this project, Carla Koehler for the *tim9-ts* yeast strain, M. van der Laan for helpful discussions on the diffusion potential/liposomes and E. Lionaki and E. Gizeli for help with preparation of liposomes. Work in our lab was supported by funds from IMBB-FORTH, the University of Crete and the European Social Fund and national resources (to KT). We thank all members of our group for helpful discussions and comments.



**Table 1: Proteins from the yeast mitochondrial proteome (31) with similar characteristics to Subunit e of ATPase.**

<b>Systematic Name</b>	<b>Standard Name</b>	<b>Length</b>	<b>Description</b>
YDR322c-a	TIM11/ATP21	96	Subunit e of mitochondrial F1F0-ATPase
YPR020w	ATP20	115	Subunit g of the mitochondrial F1F0 ATP synthase
YML081c-a	ATP18	59	Subunit j of the mitochondrial F1F0 ATP synthase
YOL077w-a	ATP19	68	Subunit k of the mitochondrial F1F0 ATP synthase
YMR256c	COX7	60	Subunit VII of cytochrome c oxidase
YLR395c	COX8	78	Subunit VIII of cytochrome c oxidase
YDL067c	COX9	59	Subunit VIIa of cytochrome c oxidase
YJL003w	COX16	118	Required for assembly of cytochrome c oxidase
YDR079w	PET100	111	Chaperone that specifically facilitates the assembly of cytochrome c oxidase
YER058w	PET117	107	Protein required for assembly of cytochrome c oxidase
YGR174c	CBP4	170	Mitochondrial protein required for assembly of cytochrome bc1 complex
YGR132c	PHB1	287	Subunit of the prohibitin complex (Phb1p-Phb2p)
YMR150c	IMP1	190	Catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane peptidase complex
YGR236c	SPG1	95	Protein required for survival at high temperature during stationary phase
YER038w-a	FMP49	126	Protein of unknown function
YBR262c	FMP51	106	Protein of unknown function

**REFERENCES**

1. Neupert, W. and Herrmann, J. M. (2007) *Ann. Rev. Biochem.* **76**, 723-749
2. 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) *Cell* **132**, 1011-1024
3. Berthold, J., Bauer, M. F., Schneider, H. C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. and Brunner, M. (1995). *Cell* **81**, 1085-1093
4. van der Laan, M., Meinecke, M., Dudek, J., Hutu, D. P., Lind, M., Perschil, I., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N. and Rehling, P. (2007) *Nature Cell Biol.* **9**, 1152-1159
5. Reif, S., Randelj, O., Domanska, G., Dian, E. A., Krimmer, T., Motz, C. and Rassow, J. (2005) *J. Cell Biol.* **354**, 520-528
6. Peixoto, P. M., Grana, F., Roy, T. J., Dunn, C. D., Flores, M., Jensen, R. E. and Campo, M. L. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 18694-18701
7. Truscott, K. N., Wiedemann, N., Rehling, P., Muller, H., Meisinger, C., Pfanner, N. and Guiard, B. (2002) *Mol Cell Biol.* **22**, 7780-7789
8. Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G. and Pratje, E. (2002) *J. Mol. Biol.* **323**, 835-843
9. Sideris, D. P. and Tokatlidis, K. (2007) *Mol. Microbiol.* **65**, 1360-1373
10. Milenkovic, D., Gabriel, K., Guiard, B., Schulze-Specking, A., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 22472-22480
11. Tokatlidis, K., Junne, T., Moes, S., Schatz, G., Glick, B. S. and Kronidou, N. (1996) *Nature* **384**, 585-588
12. Arnold, I., Bauer, M. F., Brunner, M., Neupert, W. and Stuart, R. A. (1997) *FEBS Lett.* **411**, 195-200
13. Bisetto, E., Picotti, P., Giorgio, V., Alverdi, V., Mavelli, I. and Lippe, G. (2008) *J. bioenergetics biomemb.* **40**, 257-267
14. Everard-Gigot, V., Dunn, C. D., Dolan, B. M., Brunner, S., Jensen, R. E. and Stuart, R. A. (2005) *Euk. cell.* **4**, 346-355
15. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. and Schagger, H. (1998) *EMBO J.* **17**, 7170-7178
16. Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M. F., Dautant, A., Brethes, D. and Velours, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 40392-40399
17. Leuenberger, D., Bally, N. A., Schatz, G. and Koehler, C. M. (1999) *EMBO J.* **18**, 4816-4822
18. Vergnolle, M. A., Baud, C., Golovanov, A. P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L. Y. and Tokatlidis, K. (2005) *J. Mol. Biol.* **351**, 839-849
19. Vial, S., Lu, H., Allen, S., Savory, P., Thornton, D., Sheehan, J. and Tokatlidis, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 36100-36108
20. Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) *Cell* **87**, 33-41
21. Mokranjac, D., Sichting, M., Popov-Celeketic, D., Mapa, K., Gevorkyan-Airapetov, L., Zohary, K., Hell, K., Azem, A. and Neupert, W. (2009) *Mol. Biol. Cell* **20**, 1400-1407
22. Tamura, Y., Harada, Y., Shiota, T., Yamano, K., Watanabe, K., Yokota, M., Yamamoto, H., Sesaki, H. and Endo, T. (2009) *J. Cell Biol.* **184**, 129-141
23. Martinez-Caballero, S., Grigoriev, S. M., Herrmann, J. M., Campo, M. L. and Kinnally, K. W. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3584-3593
24. Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. and Endo, T. (2002) *Cell* **111**, 519-528
25. Meier, S., Neupert, W. and Herrmann, J. M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 7777-7785
26. Albrecht, R., Rehling, P., Chacinska, A., Brix, J., Cadamuro, S. A., Volkmer, R., Guiard, B., Pfanner, N. and Zeth, K. (2006) *EMBO Rep.* **7**, 1233-1238

*Single-spanning protein insertion in mitochondria*

27. Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A. E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Truscott, K. N., Guiard, B., Pfanner, N. and Rehling, P. (2005) *Cell* **120**, 817-829
28. Koehler, C. M., Murphy, M. P., Bally, N. A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Or, E. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 1187-1193
29. Yao, H., Stuart, R. A., Cai, S. and Sem, D. S. (2008) *Biochemistry* **47**, 1910-1917
30. Petrakis, N. Alcock, and Tokatlidis, K. (2009) *IUBMB Life* in press
31. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 13207-13012
32. Tatsuta, T., Model, K. and Langer, T. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 248-259

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1. Import and localization of wt and  $\Delta N$  Su e in wt mitochondria.**  $^{35}\text{S}$ -labelled WT Su e or Su9-DHFR was imported in energized ( $+\Delta\psi$ ) or de-energized ( $-\Delta\psi$ ) mitochondria isolated from a WT yeast strain. After import, the unimported protein was removed by PK-treatment. M: total mitochondrial import, MPS: the supernatant fraction, after swelling by treatment with a hypotonic solution, MPP: the pellet fraction, after swelling by treatment with a hypotonic solution, CES: the supernatant fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitochondria, CEP: the pellet fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitochondria. Triton 1% to solubilize the mitochondria was used to check the PK degradation of the unimported protein (Tr). 10 % of the total  $^{35}\text{S}$ -labelled precursor which was added for each import was loaded on lane 1 (10%)

**FIGURE 2. Import of wt Su e in mitoplasts or PK-treated mitoplast.**  $^{35}\text{S}$ -labelled WT Su e was presented in wt energized ( $+\Delta\Psi$ ) or de-energized ( $-\Delta\Psi$ ) mitochondria after hypotonic swelling (Mitoplasts) or after hypotonic swelling and PK treatment (PK-Treated Mitoplasts). MP: The import in the mitoplasts, CES: the supernatant fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitoplasts, CEP: the pellet fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitoplasts. 10 % of the total  $^{35}\text{S}$ -labelled precursor which was added for each import was loaded on lane 1 (10%)

**FIGURE 3. Flotation of Su e and  $\Delta N23$  Su e with liposomes or liposomes with a valinomycin-generated  $\text{K}^+$  diffusion potential.** Purified recombinant Su e or  $\Delta N23$  Su e was incubated with phosphatidyl-choline liposomes and floated into a sucrose gradient. A  $\text{K}^+$  diffusion potential was generated by treatment with 0.4  $\mu\text{M}$  valinomycin ( $+\Delta\psi$ ), or no diffusion potential was present ( $-\Delta\psi$ ). Fractions F1- F4 were taken from the top (F1) to the bottom (F4) of the sucrose gradient. F5 represents the precipitated fraction after ultracentrifugation. Su e present in each fraction was detected by immunoblotting with anti-Su e antibodies. 10 % of the total pure protein which was added for each flotation was loaded on lane 1 (10%).

**FIGURE 4. Import and localization of Sue mutants in wt mitochondria.** A.  $^{35}\text{S}$ -labelled  $\Delta N23$  Su e was imported in energized mitochondria isolated from a WT yeast strain. M: total mitochondrial import. B.  $^{35}\text{S}$ -labelled Su e mutants were imported in energized mitochondria. After import, the unimported protein was removed by PK-treatment. M: total mitochondrial import, MPS: the supernatant fraction, after swelling by treatment with a hypotonic solution, MPP: the pellet fraction, after swelling by treatment with a hypotonic solution, CES: the supernatant fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitochondria, CEP: the pellet fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitochondria. Triton 1% to solubilize the mitochondria was used to check the PK degradation of the unimported protein (Tr). 10 % of the total  $^{35}\text{S}$ -labelled precursor which was added for each import was loaded on lane 1 (10%)

**FIGURE 5. Import of Su e mutants in mitoplasts or protease-treated mitoplast.**  $^{35}\text{S}$ -labelled Su e mutants were presented in WT energized mitochondria after hypotonic swelling (Mitoplasts) or after hypotonic swelling and PK treatment (PK-Treated Mitoplasts). MP: The import in the mitoplasts, CES: the supernatant fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitoplasts, CEP: the pellet fraction, after  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  treatment of the mitoplasts. 10% of the total  $^{35}\text{S}$ -labelled precursor which was added for each import was loaded on lane 1 (10%)

**FIGURE 6. Interaction with the small Tim proteins.** A.  $^{35}\text{S}$ -labelled Su e, AAC2 or Su9-DHFR were imported in crude energized mitochondria isolated from a wild-type (WT) or a Tim9-ts (T9ts) strain. 10% of the total  $^{35}\text{S}$ -labelled protein (10%) was also loaded. Triton 1% to solubilize the mitochondria was used to check the PK degradation of the unimported protein (Tr) B,C.  $^{35}\text{S}$ -labelled WT Su e (B) or  $\Delta N23$  Sue (C) were in-vitro synthesized in the presence of pre-purified N-terminal His-tagged Tim9 (His-Tim9), N-terminal His-tagged Tim10 (His-Tim10) or

### *Single-spanning protein insertion in mitochondria*

Tim9Tim10 complex produced by N-terminus His-tagged Tim9 and untagged Tim10 (His-Tim9\*10) or without the presence of any purified protein (-). The His-tagged proteins were pulled down by Ni-NTA beads and the radiolabelled proteins which were co-precipitated with the beads were quantified. 10% from the <sup>35</sup>S-labelled protein used in each assay were also loaded on the gel (10%). Numbers below shows the percentage of the radiolabelled protein which were co-precipitated with the beads. D. Quantification of the radiolabelled protein bound to Ni-NTA beads, compared with the total radioactive protein used in each binding. Error bars shows the standard deviation from three independent experiments.

**FIGURE 7. Peptide spot Assay.** A. Graphic presentation of the peptide membrane used for the experiment (13-mer peptides overlapping by ten residues). Each circle corresponds to the position of each spot in the membrane. In grey, the spots that corresponds to the predicted trans membrane domain (TMD) of the protein. B,C,D. Western blot using Tim9 (B) or Tim10 (C,D) antibodies of the protein bound to the membrane, after incubation with purified recombinant Tim9 (B), Tim10 (C) or Tim9\*10 complex (D).

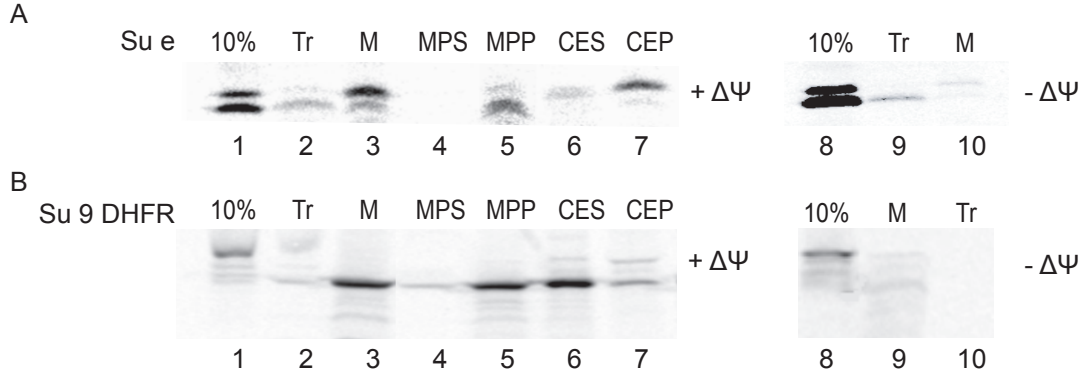


Figure 1, Petrakis and Tokatlidis

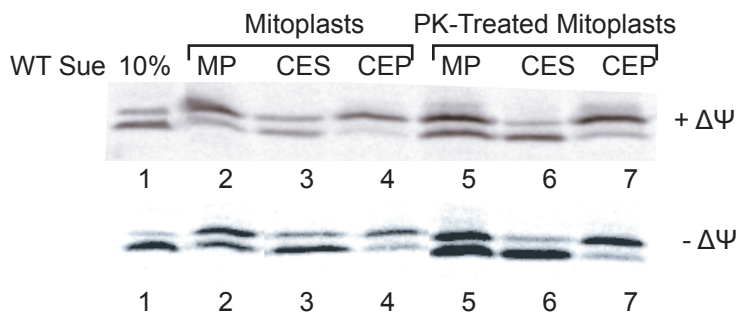


Figure 2, Petrakis and Tokatlidis

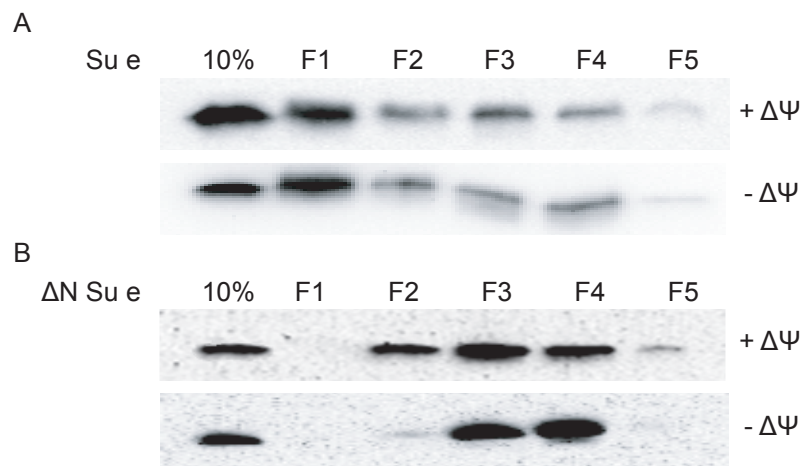


Figure 3, Petrakis and Tokatlidis



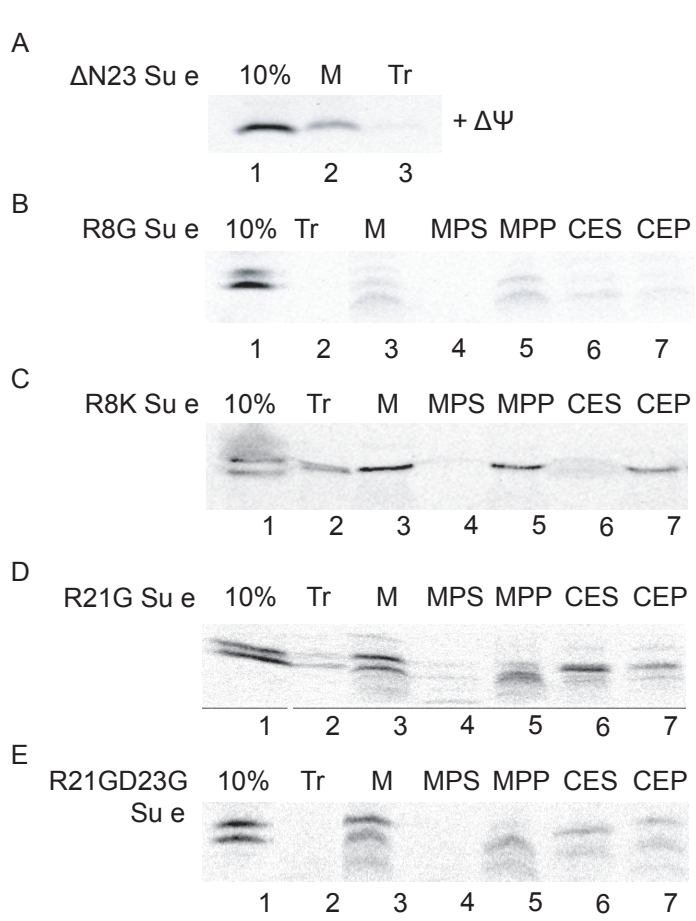


Figure 4, Petrakis and Tokatlidis

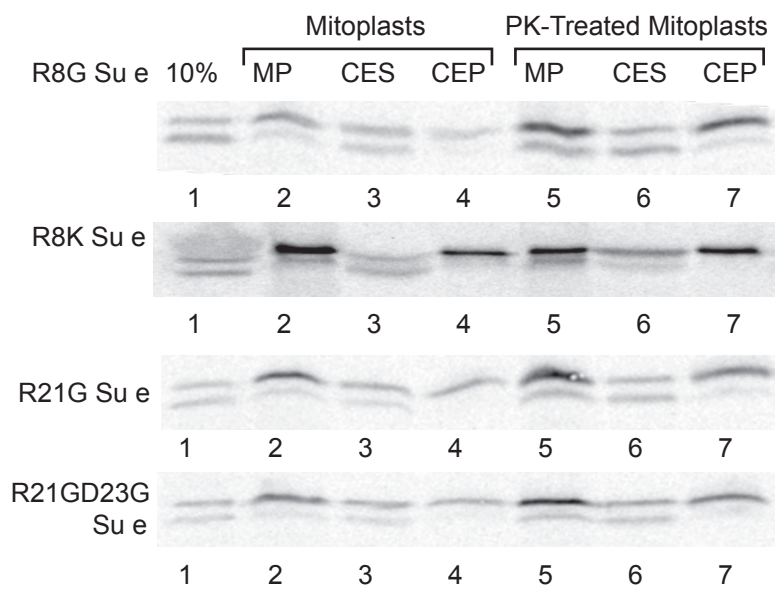


Figure 5, Petrakis and Tokatlidis

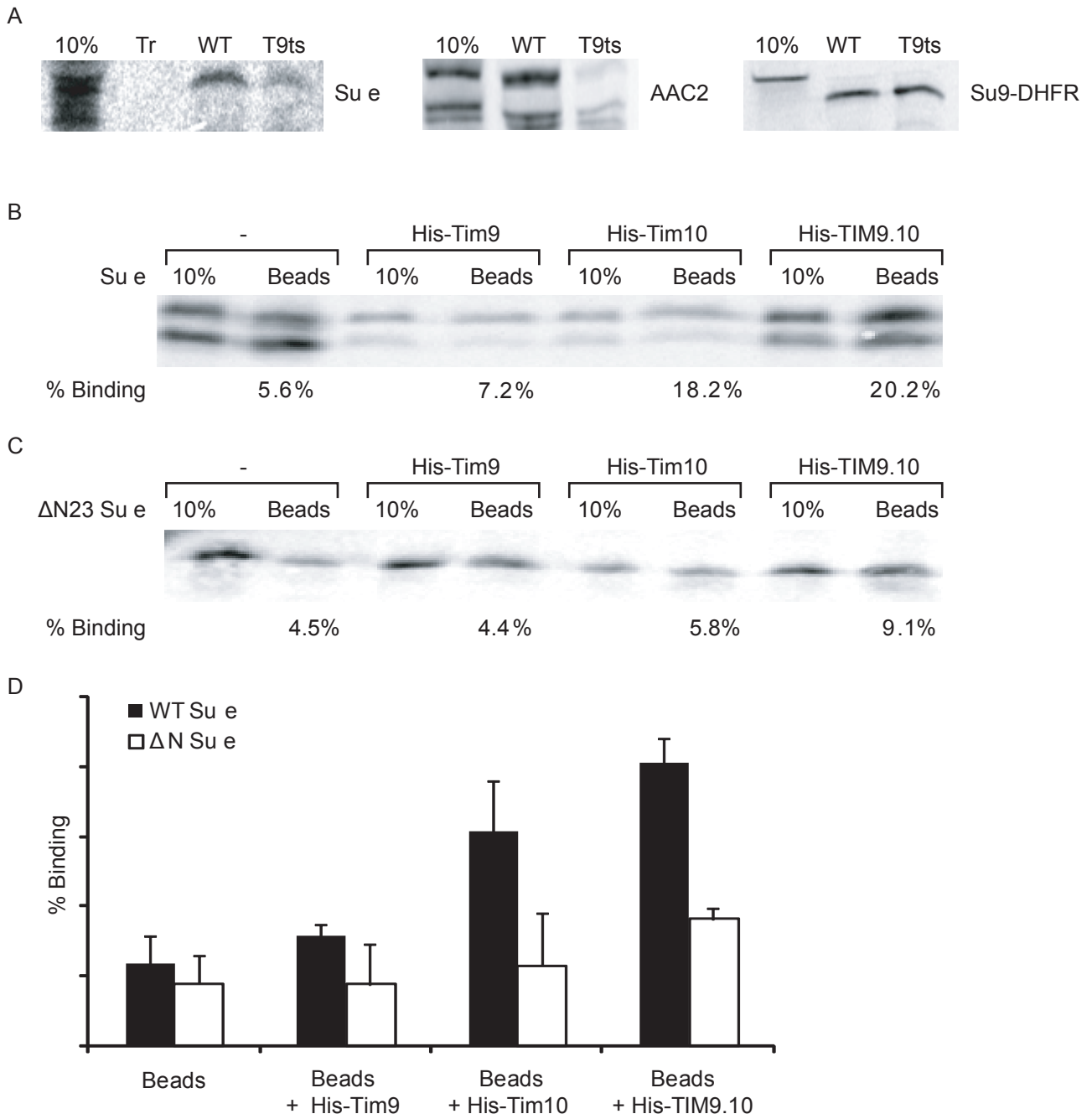


Figure 6, Petrakis and Tokatlidis

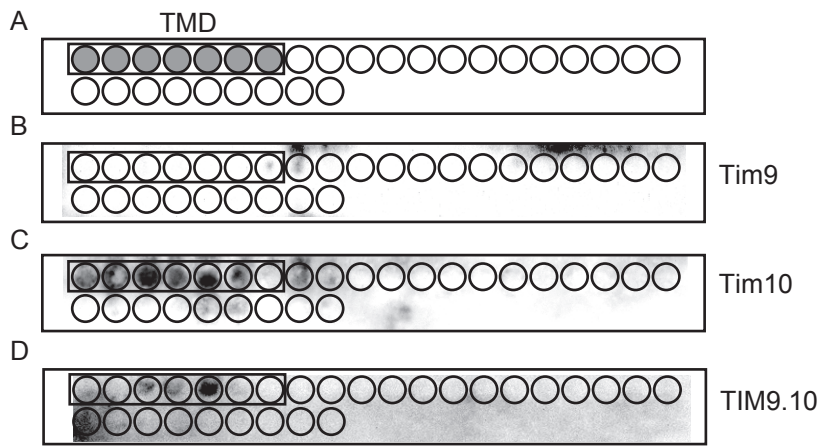


Figure 7, Petrakis and Tokatlidis

# A novel intermembrane space–targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding

Dionisia P. Sideris,<sup>1,2</sup> Nikos Petrakis,<sup>1,3</sup> Nitsa Katrakili,<sup>1</sup> Despina Mikropoulou,<sup>1,2</sup> Angelo Gallo,<sup>5,6</sup> Simone Ciofi-Baffoni,<sup>5,6</sup> Lucia Banci,<sup>5,6</sup> Ivano Bertini,<sup>5,6</sup> and Kostas Tokatlidis<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, 70013 Heraklion, Crete, Greece

<sup>2</sup>Department of Biology, <sup>3</sup>Department of Chemistry, and <sup>4</sup>Department of Materials Science and Technology, University of Crete, 71003 Heraklion, Crete, Greece

<sup>5</sup>Magnetic Resonance Center and <sup>6</sup>Department of Chemistry, University of Florence, 50019 Sesto Fiorentino, Florence, Italy

**M**ia40 imports Cys-containing proteins into the mitochondrial intermembrane space (IMS) by ensuring their Cys-dependent oxidative folding. In this study, we show that the specific Cys of the substrate involved in docking with Mia40 is substrate dependent, the process being guided by an IMS-targeting signal (ITS) present in Mia40 substrates. The ITS is a 9-aa internal peptide that (a) is upstream or downstream of the docking Cys, (b) is sufficient for crossing the outer membrane and for targeting nonmitochondrial proteins,

(c) forms an amphipathic helix with crucial hydrophobic residues on the side of the docking Cys and dispensable charged residues on the other side, and (d) fits complementary to the substrate cleft of Mia40 via hydrophobic interactions of micromolar affinity. We rationalize the dual function of Mia40 as a receptor and an oxidase in a two step-specific mechanism: an ITS-guided sliding step orients the substrate noncovalently, followed by docking of the substrate Cys now juxtaposed to pair with the Mia40 active Cys.

## Introduction

Cys-containing proteins of the mitochondrial intermembrane space (IMS) are oxidatively folded by Mia40 through the formation of transient mixed disulfides (Chacinska et al., 2004; Naoé et al., 2004; Mesecke et al., 2005; Rissler et al., 2005; Terziyska et al., 2005, 2007; Gabriel et al., 2007; Hell, 2008; Müller et al., 2008; Reddehase et al., 2009). Mia40 also functions as a receptor recognizing these substrates by an unknown mechanism. Current evidence supports a site-specific recognition of the substrate-docking Cys. For example, small Tims dock to Mia40 via their N-terminal end Cys, which pairs with the C-terminal end Cys in an outer disulfide bridge in the folded state (Milenkovic et al., 2007; Sideris and Tokatlidis, 2007). In contrast, Mia40 oxidizes the inner disulfide pair of COX17, surprisingly and unlike the small Tims (Banci et al., 2009). The exact Cox17 Cys used for docking is still unknown. The recent Mia40 solution structure uncovered a hydrophobic

cleft that sits adjacent to the active site CPC motif and was proposed to be the substrate-binding domain. Evidence for this proposal relied on mutagenesis of Mia40 residues in this cleft found to be lethal *in vivo* and decreased substrate binding *in vitro* (Banci et al., 2009). However, it is still unknown which segments target the substrate to Mia40 to allow correct covalent pairing.

In this study, we describe the signal for targeting different classes of substrates to Mia40 (IMS-targeting signal [ITS]). A similar signal to the ITS was reported by Milenkovic et al. (2009) only for the small Tims and termed mitochondria IMS-sorting signal (MISS). Our data suggest a partial overlap between the ITS and MISS sequences and reveal additional roles for the ITS not reported before. To avoid confusion, we refer to this signal as MISS/ITS.

The MISS/ITS is a peptide of nine residues found in essentially all Mia40 substrates and primes one Cys for docking

Correspondence to Kostas Tokatlidis: tokatlid@imbb.forth.gr

Abbreviations used in this paper:  $\beta$ -Me,  $\beta$ -mercaptoethanol; BN, blue native; cyb2, cytochrome *b*<sub>2</sub>; DHFR, dihydrofolate reductase; GAL, galactose; IMS, intermembrane space; ITC, isothermal titration calorimetry; ITS, IMS-targeting signal; MISS, mitochondria IMS-sorting signal; NTA, nitrilotriacetic acid; OM, outer membrane.

© 2009 Sideris et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date [see <http://www.rupress.org/terms>]. After six months it is available under a Creative Commons License [Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>].

with the Mia40 active site CPC motif (Banci et al., 2009; Terziyska et al., 2009). The MISS/ITS is necessary and sufficient for IMS targeting to Mia40. Deleting it results in complete loss of import, whereas fusing it to a nonmitochondrial protein targets it to the organelle. The ITS contains enough information for translocation across the outer membrane (OM) independently of Mia40, thus experimentally uncoupling these two processes. One crucial feature of MISS/ITS is that it forms a helix with vital aromatic and hydrophobic residues to the same side of the docking Cys. Hydrophobic noncovalent interactions of this side of the MISS/ITS helix with aliphatic side chains of the Mia40-binding cleft orient the substrate onto Mia40 (sliding step), thus committing the crucial Cys for subsequent covalent disulfide bonding with Mia40 (docking step). This two-step mechanism solves the conundrum of how substrates with no sequence similarity are recognized by Mia40 and explains how they are positioned structurally so that specific cysteines in each substrate bond with the Mia40 active site Cys. Finally, we measured by calorimetry, for the first time, the affinity involved in the crucial noncovalent interactions that guide the substrate onto Mia40 via MISS/ITS.

## Results

### Cox17 docks onto Mia40 with a different Cys specificity from the small Tims

Mia40 binding to the small Tims strictly depends on their N-terminal end Cys of the twin CX3C motif (Milenkovic et al., 2007; Sideris and Tokatlidis, 2007), but it is unknown whether this is true for Tim-unrelated proteins like Cox17, which contains twin CX9C motifs (Arnesano et al., 2005; Banci et al., 2008) How does docking of Cox17 onto Mia40 work?

To address this, we generated single Cys to Ser mutants for each Cys of the CX9C motifs of human COX17, the substrate studied before in the interaction with MIA40 (Banci et al., 2009). Wild-type COX17 was imported efficiently in isolated yeast mitochondria (Fig. 1 A, lanes 3–7), and the oxidized and reduced species were resolved, with the oxidized form increasing with a concomitant decrease of the reduced form. Additionally, a  $\gamma$ Mia40–COX17 mixed disulfide intermediate was observed, was coimmunoprecipitated with anti-Mia40 antibodies (Fig. 1 A, lanes 8–10), and was  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -Me) sensitive, as expected. This intermediate was resolved also under native conditions in blue native (BN)–PAGE (Fig. 1 B, 140-kD band; similar to small Tims; Milenkovic et al., 2007; Sideris and Tokatlidis, 2007). This was DTT sensitive and Mia40 specific, as clearing detergent-solubilized mitochondria with anti-Mia40 antiserum (but not preimmune serum) and protein A–Sepharose beads removed the 140-kD band specifically but not the unassembled Cox17 imported monomer (Fig. 1 B, lanes 4 and 5).

These assays were performed for each single Cys mutant of the CX9C motifs (Fig. 1 D). Only the mutant in the third Cys (C45S), which pairs with the second one (C36–C45; Fig. 1 C), was substantially affected (Fig. 1 D). Moreover, mutants of the Cys involved in copper(I) binding (C23 and C24);

Banci et al., 2008) were unaffected in forming the Mia40 intermediate (Fig. 1 D, first panel; also confirmed by BN-PAGE in Fig. S1). The severe defect of the C45S mutant was also clear in BN-PAGE (Fig. S1, lanes 9–11), whereas all other mutants were unaffected.

In multiple Cys mutants of COX17, the Mia40 intermediate was essentially abolished only when the third Cys was mutated (mutants C36/45S, C26/45/55S, and C36/45/55S; Fig. 1 E). Furthermore, when all other cysteines except C45 were mutated (C26/36/55S), covalent binding to Mia40 was unaffected, confirming the crucial and specific role of C45 in docking to Mia40 (Fig. 1 E).

Previously, Heaton et al. (2000) showed that for yeast Cox17, the fourth Cys of the twin CX9C motifs (i.e., C57, which is equivalent to C55 of hCOX17) was essential in vivo. Therefore, we addressed whether yCox17 differed from hCOX17 in the Cys docking to Mia40. The results (for single and multiple mutants of yCox17) are shown in Fig. S2. We find that interaction of yCox17 with Mia40, in fact, depends on the fourth Cys (C57), which is in agreement with its essential role in vivo (Heaton et al., 2000).

The data on human and yeast Cox17 show that Cox17 docks to Mia40 differently from the small Tims. This is a conundrum. How can different substrates be recognized by Mia40 in a strict site-specific manner yet involving different cysteines in each case?

### Deletion analysis of Tim10 reveals an internal targeting signal for the Mia40 pathway

We thought that there must be a specific targeting signal in the substrate that guides its precise positioning to Mia40. In this way, a defined substrate Cys could be juxtaposed to the Mia40 active site Cys to make the crucial intermolecular disulfide. To identify such a putative targeting signal, we applied N- or C-terminal end deletion analysis on Tim10 (Fig. 2 A),  $^{35}$ S labeled the Tim10 variants, and imported them into wild-type mitochondria (the lysate input controls are in Fig. S3). Mia40 interaction was monitored by the presence of a  $\beta$ -Me-sensitive intermediate (Fig. 2 B). Increasingly longer deletions of the N-terminal end showed a defect in making the Mia40 intermediate, which was completely abolished when residues 30–39 were deleted. In contrast, all C-terminal end deletions (lacking 21, 33, or 43 residues) were unaffected. Detecting the substrate released after interaction with Mia40, we saw that  $\Delta$ N14 and  $\Delta$ N30 were released in oxidized form. In contrast,  $\Delta$ C33 and  $\Delta$ C43 still bound to Mia40, but they were stalled in this interaction and could not be released. Presumably, this is because they lack the crucial third and fourth Cys (C61 and C65) that partner with C44 and C41 to make the folded oxidized species thus released from Mia40 (Sideris and Tokatlidis, 2007). This analysis suggested that (a) the N-terminal end segment 30–39 is crucial for targeting to Mia40 and (b) the region 14–30 facilitates targeting but is not crucial on its own. The loss of import capacity of the  $\Delta$ N39 construct could be explained in two ways: (1) either it cannot cross the OM, or (2) it can cross the OM but can no longer bind to Mia40. To investigate the latter,

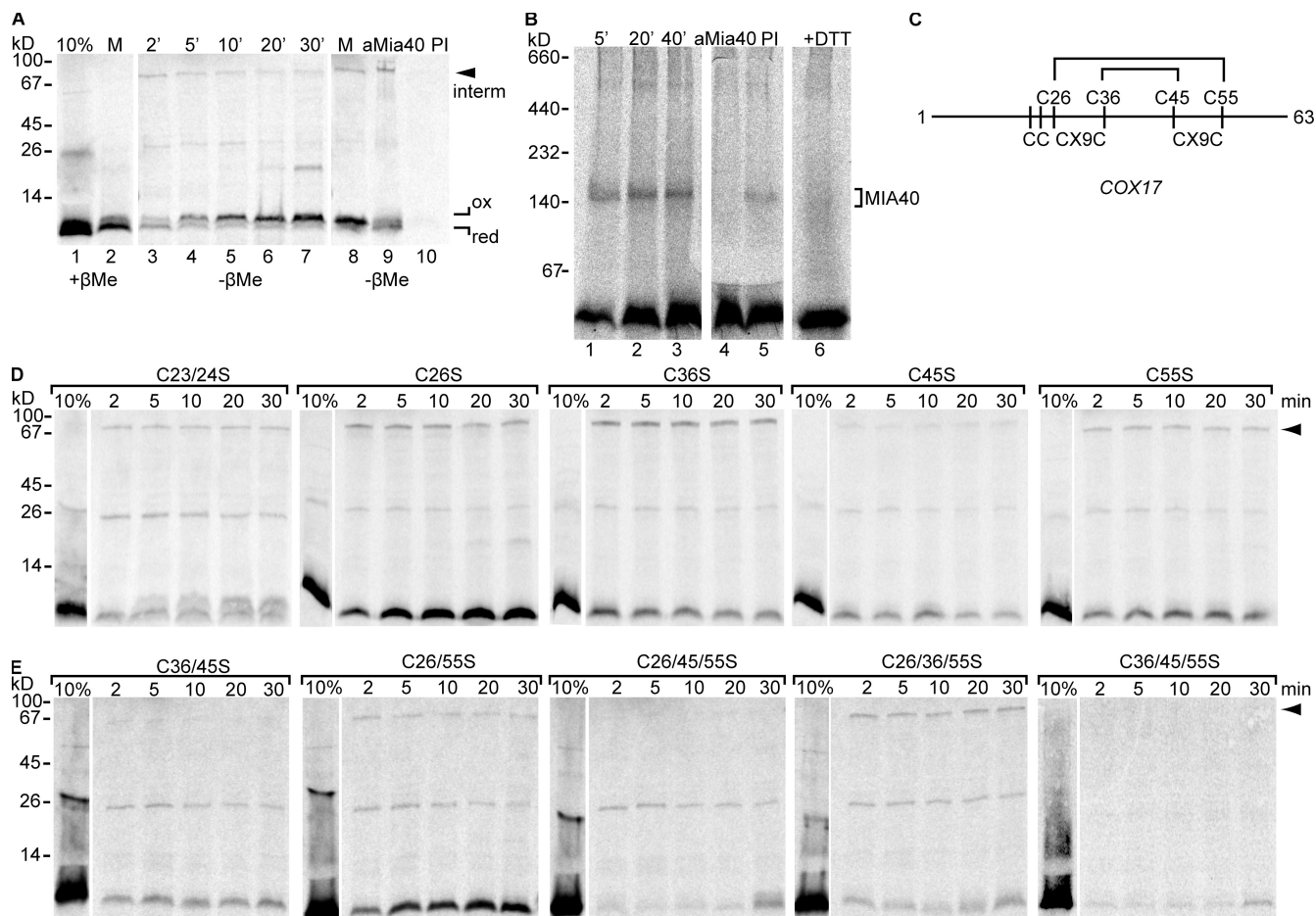


Figure 1. **Differential requirement of COX17 Cys residues for interaction with Mia40.** (A)  $^{35}\text{S}$ -labeled COX17 import and immunoprecipitation as indicated, followed by SDS-PAGE. (B) As in A but using BN-PAGE. (C) Cys organization of COX17. (D) As in A for single Cys mutants. (E) As in D for multiply mutated Cys. (A, D, and E) Arrowheads indicate the Mia40 mixed intermediate (interm).

we tested in vitro binding of the Tim10 constructs (in radioactive form) to pure Mia40 (bead immobilized; Fig. 2 C). The results are identical to the import results showing decreased binding when the first 30 residues are missing ( $\Delta\text{N}30$ ) and complete loss of binding when a further nine residues are missing ( $\Delta\text{N}39$ ).

To verify that the observed defect for  $\Delta\text{N}39$  is relevant in vivo, we directed this construct to the IMS by fusion to the presequence of cytochrome  $b_2$  (*cyb2*; residues 1–85), which targets precursors to the IMS independently of Mia40. In this way, any putative defects of  $\Delta\text{N}39$  in crossing the OM are bypassed, and this domain now targeted to the IMS can interact with Mia40 in its physiological environment. The fusion *cyb2*(1–85) $\Delta\text{N}39$ Tim10 could be efficiently imported into both wild-type- and Mia40-depleted mitochondria (Fig. 2 D) but did not give a Mia40 intermediate. This strongly argues that the  $\Delta\text{N}39$  deletion affects the interaction with Mia40 in organello, which is in agreement with the in vitro data.

Therefore, the segment 30–39 of Tim10 directly mediates binding to Mia40 and functions as a Mia40-specific ITS. By comparison, the MISS signal reported by Milenkovic et al. (2009) was defined by residues 35–43.

### The MISS/ITS is conserved among the small Tims

To test whether the ITS is conserved in other small Tims, corresponding deletions in Tim9 and -12 were made. In Tim9, deleting 23 residues from the N terminus affected the interaction with Mia40 upon import to an extent, but deleting the putative MISS/ITS ( $\Delta\text{N}34$ ) completely abolished the interaction (Fig. 3, A and B). For Tim12, the deletion  $\Delta\text{N}28$  was reported previously to be import deficient (Fig. 3 C; Lionaki et al., 2008), which could be caused by a defective import through the OM or defective interaction with Mia40. As in this construct the putative Tim12 MISS/ITS is intact (residues 29–39; Fig. 3 A), we expected it to still bind to Mia40 if directed to the IMS as a *cyb2* fusion. In fact, a time-dependent Mia40 intermediate was seen for such a construct (Fig. 3 D, arrowheads), which was abolished in Mia40-depleted mitochondria (prepared from a galactose (GAL)-Mia40 strain; Banci et al., 2009), confirming that the  $\Delta\text{N}28$  can indeed interact with Mia40. When the putative MISS/ITS segment between residues 29 and 39 was deleted in  $\Delta\text{N}39$ Tim12 fused to the *cyb2*(1–85) presequence, the interaction with Mia40 was completely abolished (Fig. 3 E), proving that the MISS/ITS of Tim12 segment 29–39 is necessary for Mia40 binding. The two *cyb2* fusion constructs

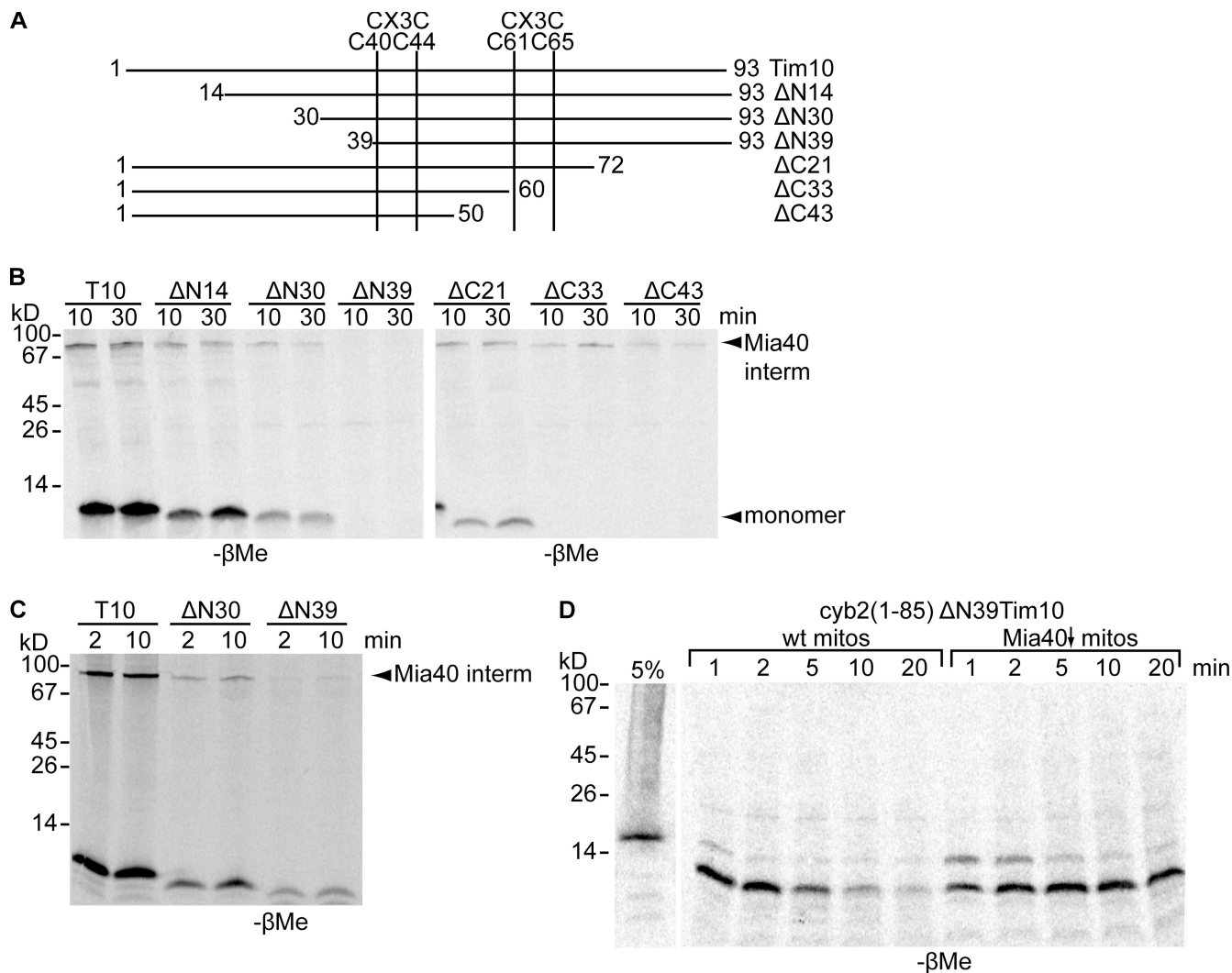


Figure 2. **Deletion analysis of Tim10 reveals an internal targeting signal for the Mia40 pathway.** (A) Tim10 truncations. (B) Import and analysis of Tim10 versions as in Fig. 1 A. (C) GST-Mia40 pull-downs of different Tim10 versions (as in Sideris and Tokatlidis, 2007). (D) Import of *cyb2(1-85)ΔN39Tim10* in wild-type (wt) and Mia40-depleted (*Mia40*<sup>↓</sup>; Banci et al., 2009) mitochondria (mitos). interm, intermediate.

to  $\Delta N28Tim12$  and  $\Delta N39Tim12$  allowed us to uncouple the import to the IMS from the Mia40 interaction and to test whether this interaction is essential *in vivo* by complementation assays in yeast cells (Fig. 3 F). *cyb2(1-85)ΔN28*, which bears the MISS/ITS and interacts with Mia40, could restore viability substantially, arguing that the interaction with Mia40 is a functional one. In contrast, the *cyb2(1-85)ΔN39* lacking the MISS/ITS and not interacting with Mia40 could not restore growth despite proper targeting to the IMS.

Collectively, these data suggest that the presence of MISS/ITS upstream of the N-terminal end Cys is conserved for Tim9 and -12. Furthermore, they show that the MISS/ITS-mediated interaction with Mia40 is essential *in vivo*.

#### Critical residues and consensus motif of the MISS/ITS

To identify the critical residues for the functionality of the MISS/ITS, Ala-scanning mutagenesis was performed (Fig. 4),

in which residues of the MISS/ITS peptide 32–39 of Tim10 were exchanged to Ala (Fig. 4 A) and tested for Mia40 interaction (Fig. 4 B). Replacing M32 and N34 in the double Ala mutant (2Ala) only partially decreased the interaction with Mia40, which was completely abolished when four, six, or seven residues were exchanged for Ala. Because the 2 aa that were mutated in the 4Ala mutant additionally to the 2Ala mutant were F33 and K35, we tested these as single amino acid substitutions (Fig. 4, C and D). Exchanging F33 to Ala completely abolished the Mia40 intermediate, whereas K35A had only a minor effect. L36A was affected to a substantial degree compared with the wild-type but was clearly not as critical as F33. The complete loss of intermediate in the F33A/L36A double mutant can be attributed to the effect of F33A mutation alone. Identical results were obtained when the MISS/ITS mutants were used in Mia40-binding experiments in mitoplasts (bypassing translocation across the OM), which thus reflects a specific interaction with Mia40 (Fig. 4 E). Collectively, the Ala mutagenesis



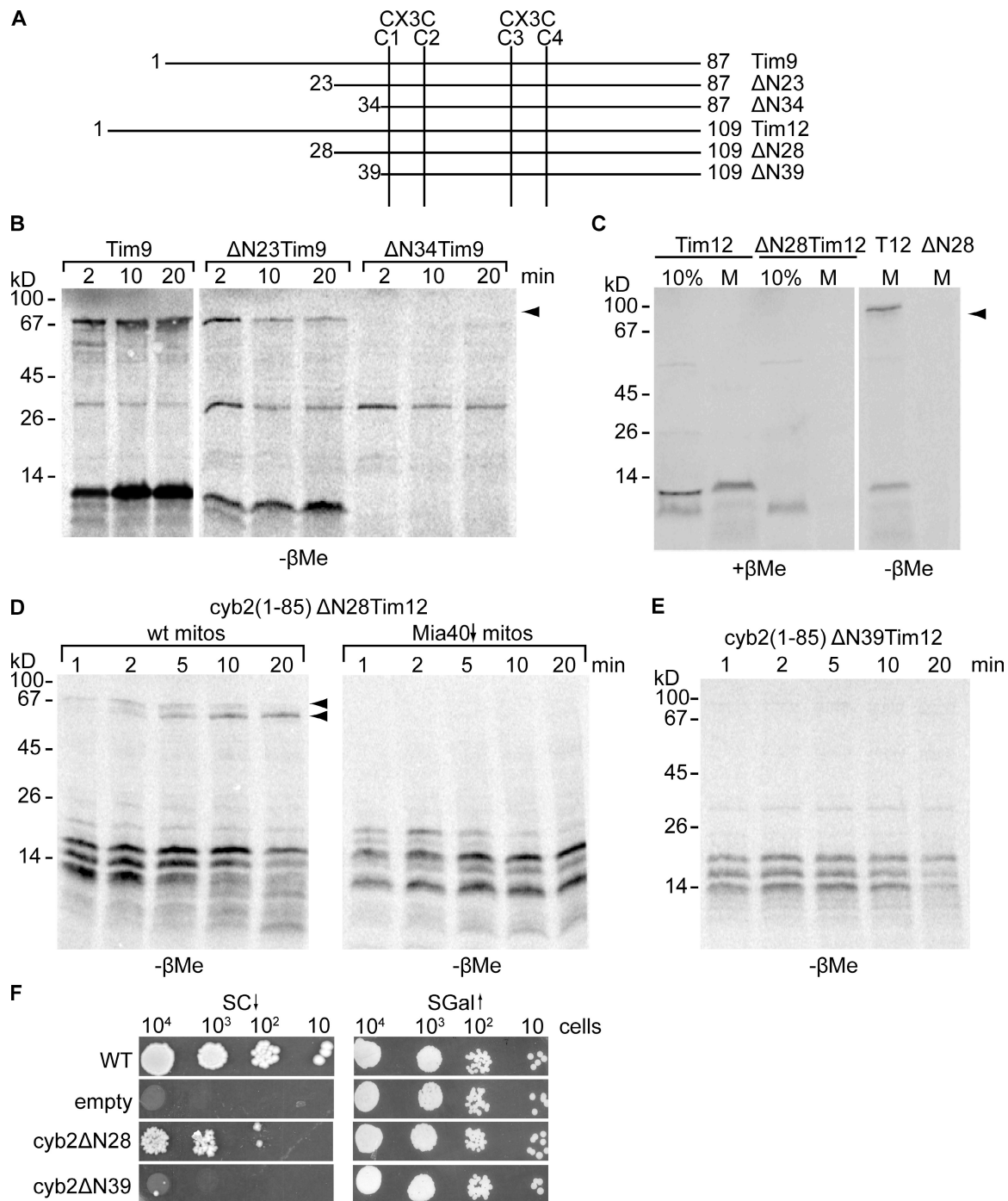


Figure 3. **The Tim10 ITS is conserved among small Tims.** (A) Tim9 and -12 truncations. (B) The intermediate with Mia40 is shown by an arrowhead. (C) As in B for Tim12 variants. 10% of in vitro translation mix was loaded as a standard. M, total mitochondria reisolated after import and protease treatment. (D) Import of cyb2(1-85)ΔN28 Tim12 fusion as in B. (C and D) Arrowheads indicate the Mia40 mixed intermediate. mitos, mitochondria; wt, wild type. (E) As in B but for the ΔN39Tim12 fragment. (F) In vivo complementation of Tim12 fusion variants using a GAL-Tim12 strain as described previously (Lionaki et al., 2008). SGal, GAL media; SC, glucose media; WT, wild type.

identified F33 (at position -7 relative to the docking Cys) and L36 (at position -4) as the two important residues in the MISS/ITS, with F33 being absolutely critical. Both of these residues are conserved (there are either identical or chemically similar residues in these positions) in the consensus MISS/ITS sequence X[Ar]XX[Hy][Hy]XXC described in this study (Fig. 4 F and Fig. S3).

### Structural basis of the MISS/ITS interaction with Mia40

How is the targeting function of the MISS/ITS linked to the requirement for Cys-specific docking onto Mia40? Because Mia40 recognizes substrates in a Cys-dependent manner, precise positioning of the substrate Cys must be guided by a folded MISS/ITS in a conformation-dependent manner to control

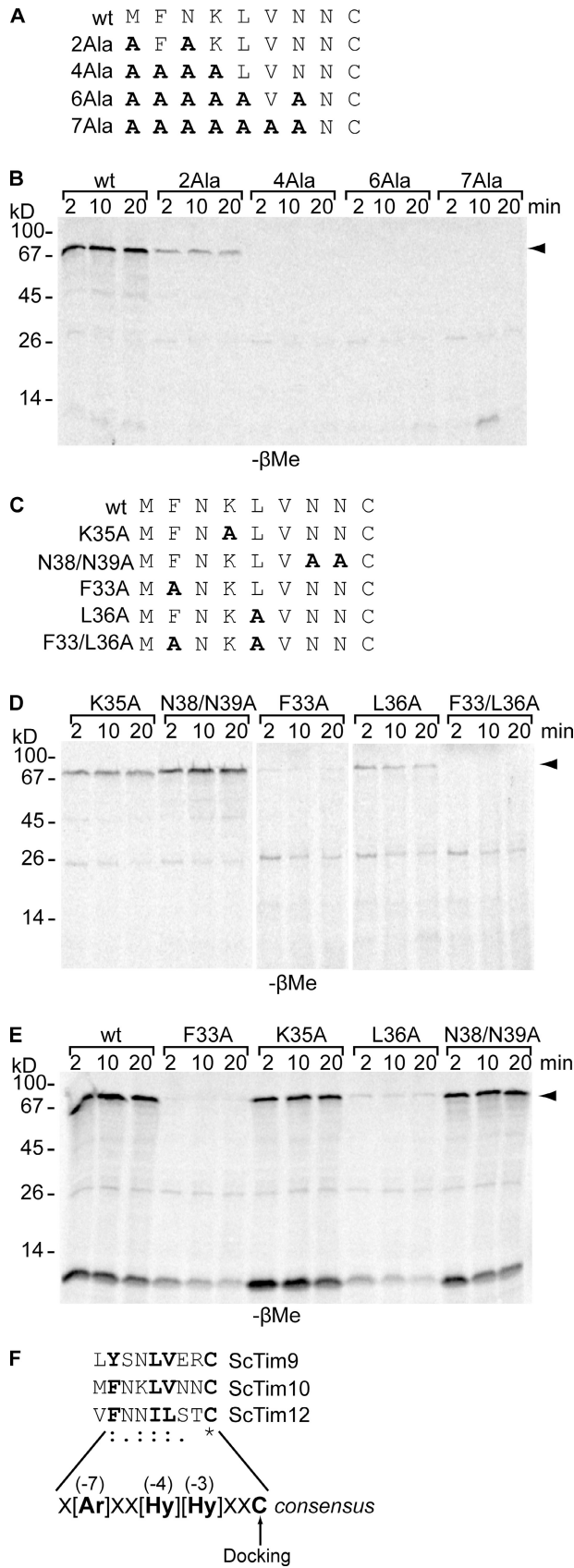
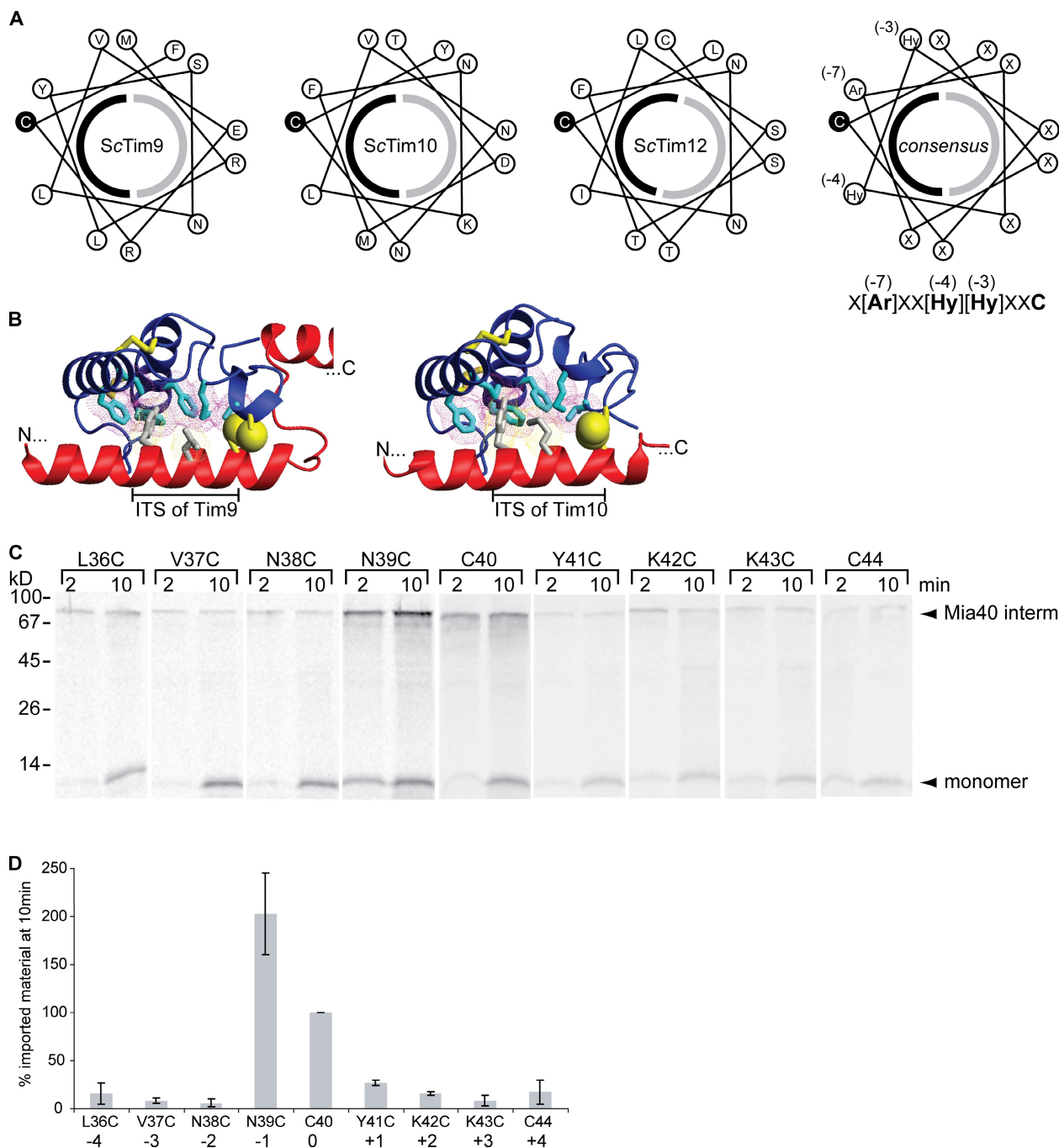


Figure 4. **Ala mutagenesis identifies critical residues of the ITS.** (A) The ITS of Tim10 with Ala substitutions (bold). (B) Imports of Tim10 Ala mutants performed as in Fig. 1. (C) Targeted Ala substitutions (bold) in the ITS of Tim10. (D) Import assays of the mutants of C. (E) As in D, but precursors

optimal attachment to Mia40. When projected in a helical wheel (Fig. 5 A), the MISS/ITS forms an amphipathic  $\alpha$  helix with the docking Cys sitting adjacent to the critical aromatic residue of position  $-7$  on the same hydrophobic face that is made by the functionally important residues at positions  $-7$ ,  $-4$ , and  $-3$ , whereas the hydrophilic side contains charged residues that are dispensable for function. The MISS/ITS is indeed helical in the crystal structure of the human and yeast Tim9–Tim10 complexes (Webb et al., 2006; Baker et al., 2009). Although the structure of Tim9 and -10 as they interact with Mia40 is unavailable, the helical conformation of MISS/ITS and the nature of its residues could explain in structural terms its specific interaction with the hydrophobic substrate-binding domain cleft of MIA40 (Banci et al., 2009). To test this concept, we produced a theoretical modeling of the Tim9 and -10 docking to the Mia40 cleft using the HADDOCK program (Dominguez et al., 2003). Only one cluster of structures was obtained for both TIM9–MIA40 and TIM10–MIA40 calculations containing 195 and 182 over 200 structures with a backbone root mean square difference to the mean structure for the structured region of the proteins of 1.5 Å and 1.3 Å, respectively. The buried surface area obtained is  $2,090 \pm 60 \text{ \AA}^2$  for the TIM9–MIA40 complex and  $1,471 \pm 36 \text{ \AA}^2$  for the TIM10–MIA40, which are indicative of a very good surface complementarity between the ITS and the binding cleft of Mia40 (Fig. 5 B, cloud of pink dots). The orientation of the hydrophobic face of the MISS/ITS amphipathic helix is underpinned by aromatic–aromatic and aliphatic–aliphatic interactions between the functionally important Tim residues (Fig. 5 B, gray) and hydrophobic residues of Mia40 (cyan). Additionally, the length of the substrate-binding cleft of Mia40 accommodates precisely the 9-aa long MISS/ITS helix, at the end of which the docking Cys of the substrate engages in the disulfide bond with the Mia40 Cys (Fig. 5 B, yellow spheres). The modeling presented in this study supports the recognition of the MISS/ITS as a folded helix by Mia40.

To scrutinize this concept experimentally, we used Cys-scanning mutagenesis of the docking Cys of Tim10 (C40). The underlying idea is that if the crucial docking Cys lies within an unfolded segment, moving it by up to four residues upstream or downstream would not substantially affect binding to Mia40. In contrast, if the docking works in the context of a folded MISS/ITS helix, moving the Cys away from the wild-type position would put it in a completely opposite side of the helix, strongly affecting its interaction with the facing Cys of Mia40. Thus, variants of Tim10 with a unique Cys in each of four positions upstream or downstream of the wild-type position 40 to span a full helix turn were produced, starting from a Tim10 in which

were presented to mitoplasts. (B, D, and E) Arrowheads indicate the Mia40 mixed intermediate. (F) Alignment of the ITS sequence (residues 30–40 upstream of the N-terminal C40 in Tim10) in *S. cerevisiae* Tim9, -10, and -12. The consensus ITS sequence and the Cys docking to Mia40 are shown. The critical residues for the functionality of ITS are bolded, with their position relative to the docking Cys in parentheses. Colons indicate that conserved substitutions are observed, periods indicate that semiconserved substitutions are observed, and the asterisk indicates that the residues or nucleotides in the column are identical in all sequences in the alignment. wt, wild type.



**Figure 5. Cys-scanning mutagenesis and conformational properties of the ITS.** (A) Helical wheel representation of ITS in *S. cerevisiae* Tim9, -10, and -12. The hydrophobic (black) and hydrophilic (gray) faces of the helix are indicated as half circles. (B) Theoretical modeling of hTIM9 and hTIM10 docking to the hMIA40 substrate-binding cleft using HADDOCK. TIMS and MIA40 are shown as red and blue ribbons, respectively. Hydrophobic residues of MIA40 interacting with TIMS are in cyan. Conserved aromatic and hydrophobic residues in the first helix of the TIMS interacting with the MIA40 hydrophobic cleft are in gray. Cysteines are in yellow, and the docking cysteines of the TIMS and MIA40 are shown as yellow spheres. (C) Cys substitutions in Tim10 and import and Mia40 intermediate (interm) analysis. (D) Quantification of the Mia40 intermediate after 10-min import (three independent experiments). Error bars represent standard error of the mean.

all cysteines were exchanged to Ser. Previously, a mutant carrying only the wild-type docking Cys (C40) was shown to maintain the interaction with Mia40, as C40 is necessary and sufficient (Milenkovic et al., 2007; Sideris and Tokatlidis, 2007). The mutants with the unique Cys in positions 36, 37, 38, and 39 or 41, 42, 43, and 44 were tested for the formation of the Mia40 intermediate after import (Fig. 5 C). All of the mutants completely

lost the ability to form a disulphide intermediate with Mia40, with the exception of C39, which showed an increased amount of the intermediate. Therefore, changes in the positioning of the docking C40 are generally not tolerated for the interaction with Mia40. Overall, the Cys-scanning mutagenesis suggests that Cys docking depends on the folding of MISS/ITS into a helix that appropriately positions it opposite the partner Cys of Mia40.

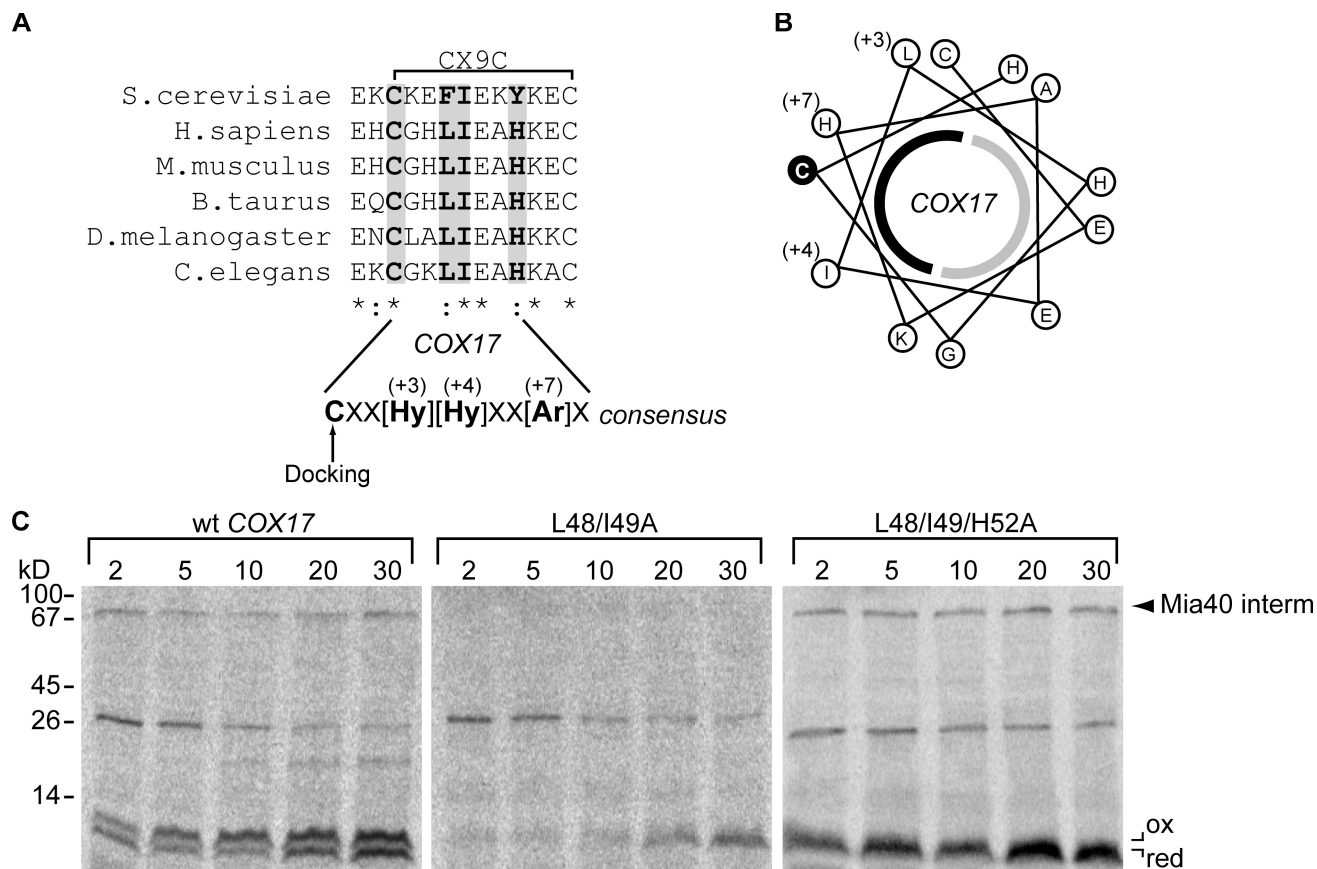


Figure 6. **An ITS is present in the C-terminal end of Cox17.** (A) Alignment of Cox17 ITS sequences from different eukaryotes. Strictly conserved residues in the ITS consensus are shaded gray and bolded. Colons indicate that conserved substitutions are observed, and asterisks indicate that the residues or nucleotides in the column are identical in all sequences in the alignment. (B) Helical wheel projection for the ITS of COX17 as in Fig. 5 A. (C) COX17 mutants were imported and analyzed for mixed disulfide intermediate (interm) with Mia40 (arrowhead). wt, wild type.

### A MISS/ITS is present at the C-terminal end of Cox17

Is there a MISS/ITS present in Cox17 as well? Sequence alignment of Cox17 and small Tims does not reveal a MISS/ITS upstream of the COX17 docking C45, as would be expected by analogy to the Tims. However, such a motif became apparent downstream of the COX17 docking C45 (Fig. 6 A). Strictly conserved residues in this segment were at equal distances from the docking C45 as in the MISS/ITS of small Tims but downstream (positions 3, 4, and 7) and were thus aligned in the same face of the helical wheel projection with the docking Cys (Fig. 6 B). Therefore, this important structural feature of the MISS/ITS is maintained. To test whether the COX17 MISS/ITS is indeed functional, the Leu and Ile at positions 3 and 4 in COX17 (and conserved among Cox17 sequences) were mutagenized. This double mutant could not form a Mia40 intermediate (Fig. 6 C). At position 7, there is a Tyr in *Saccharomyces cerevisiae* Cox17 (also maintained as a Phe/Tyr in the small Tims at position -7), but this is a His in all higher eukaryotic Cox17 sequences. Mutating this His to Ala in COX17 in a triple L48/I49/H52A mutant showed a striking gain of function effect producing more intermediate with Mia40, arguing for the importance of a hydrophobic/aromatic residue in position 7. We should note two things concerning

COX17: (1) the reduced COX17 shown to interact with MIA40 by nuclear magnetic resonance (Banci et al., 2009) maintains a secondary structure content similar to the folded COX17 as measured by circular dichroism (Banci et al., 2008), and (2) a theoretical docking between COX17 and MIA40 similar to that performed in this study for the small Tims and Mia40 supports a good surface complementarity between the MISS/ITS segment of COX17 and MIA40 (Banci et al., 2009).

How can the MISS/ITS work in the case of yeast Cox17 in which the docking Cys is the fourth one? In the MISS/ITS sequence between Cys3 and -4 for the yeast protein (Fig. 6 A, first line), there is a Phe, Ile, and Tyr at positions 3, 4, and 7 after the third Cys, rendering this region similar to the consensus MISS/ITS of the small Tims (that has no His in position 7). Intriguingly, the other residues in this region of the yeast Cox17 all form pairs of opposite charges (four pairs of Lys and Glu), which could interact through salt bridges and allow the Phe, Ile, and Tyr to properly position the MISS/ITS in the cleft of Mia40. In this case, the yCox17 MISS/ITS functions upstream of the docking C57. Therefore, it appears that although there is a MISS/ITS in Cox17 that maintains the general structural features of the MISS/ITS, it functions downstream of the docking Cys for hCOX17 or upstream of the docking Cys for yCox17.

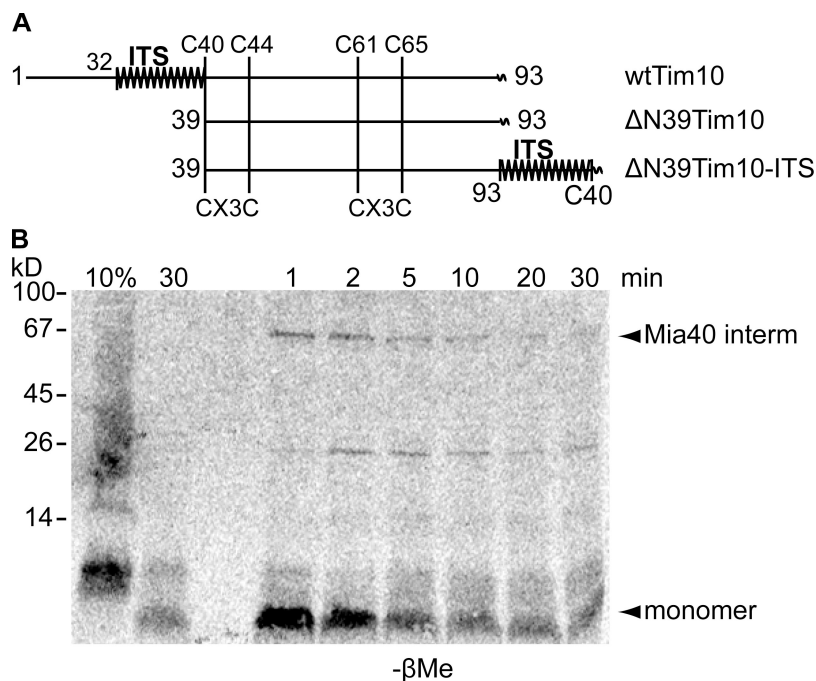


Figure 7. **Swapping the ITS from the N- to the C-terminal end of Tim10 does not affect targeting.** (A) Schematic representation of the Tim10 ITS (zigzag line) and C-terminal end fusion to  $\Delta$ N39Tim10. wt, wild type. (B)  $\Delta$ N39Tim10-ITS was imported and analyzed for mixed disulfide intermediate (interm) formation with Mia40.

Docking calculations using the data-driven docking program HADDOCK were performed to investigate the basis for selecting a different Cys in the Cox17–Mia40 complex formation in yeast with respect to human. Calculations were performed on both the yeast and human Mia40–Cox17 complexes in which the second Cys of the CPC motif of Mia40 was bound through a disulfide to either the C3 (Cys47 in COX17 or Cys45 in yCox17) or C4 (Cys57 in COX17 or Cys55 in yCox17) of Cox17, thus resulting in two types of complexes for each organism. From the analysis of the data (Table S1), it emerges that the yMia40–yCox17 complex involving C4 of yCox17 (HADDOCK score  $-152.7$ ) has, by far, a much better score than that involving C3 (cluster 1, HADDOCK score  $-127.4$ ; cluster 2, HADDOCK score  $-121.3$ ). On the contrary, the hMia40–hCox17 complex involving C3 of hCox17 (HADDOCK score  $-88.7$ ) has a better score than that involving C4 (cluster 1, HADDOCK score  $-66.6$ ; cluster 2, HADDOCK score  $-56.0$ ). Therefore, the docking data completely match the experimental results. From the comparison of the structural models of the best complexes for the two systems (i.e., yMia40–yCox17 complex involving C4 of yCox17 vs. hMia40–hCox17 complex involving C3 of hCOX17), it appears that their different interaction mode is dictated by the nature and steric hindrance of the residues of the MISS/ITS stretch involved in the interaction with the hydrophobic cleft of Mia40. Indeed, a Phe in yCox17 is changed to a Leu in hCOX17, and a Tyr in yCox17 is changed to a His in hCOX17. In particular, the Tyr in yCox17 is positioned close to two Phe residues of the Mia40 cleft, possibly engaging in strong stacking interaction, thus favoring the C4 interaction mode in yeast (Fig. S4). These results support the generality of the function of a MISS/ITS-dependent targeting mechanism for other substrates of the Mia40 pathway unrelated to the small Tims.

#### Swapping the MISS/ITS from the N- to the C-terminal end of Tim10 does not affect targeting

The presence of the MISS/ITS at the C-terminal end of Cox17 rather than at the N-terminal end, as for the small Tims, suggested that its targeting function is independent of localization within the protein. Indeed, fusion of the ITS to the C terminus of the import-incompetent  $\Delta$ N39Tim10 (Fig. 7 A) restored import as well as its capacity to make a Mia40 intermediate (Fig. 7 B). Thus, the MISS/ITS can exert its targeting function independently of its localization within the targeted polypeptide. However, despite efficient import and interaction with Mia40, the  $\Delta$ N39Tim10-ITS fusion was rapidly degraded after import (in contrast to wild-type Tim10), presumably because of incomplete or improper folding. This behavior is reminiscent of the cyb2(1–85) $\Delta$ N39Tim10 (Fig. 2 D). Therefore, the MISS/ITS in  $\Delta$ N39Tim10-ITS is sufficient for translocation across the OM and for docking to Mia40, but it cannot lead to productive folding. The latter can apparently only occur when the MISS/ITS is properly positioned N-terminally to the CX3C motifs.

#### The MISS/ITS can target Mia40-independent and nonmitochondrial proteins to the organelle

We wanted to know whether the MISS/ITS can target efficiently (a) mitochondrial proteins that are not substrates for Mia40 and (b) nonmitochondrial proteins. We first used Sue of ATPase (subunit e of yeast mitochondrial F1FoATPase), which is targeted to the inner membrane independently of Mia40 (Fig. 8 A; Tokatlidis et al., 1996; Everard-Gigot et al., 2005). Deletion of the N-terminal end transmembrane anchor ( $\Delta$ N23Sue) abolished import of Sue. Fusion of the MISS/ITS of Tim10 to the N-terminal end of  $\Delta$ N23Sue (with Sue lacking its unique endogenous C28 to avoid aberrant disulfides)

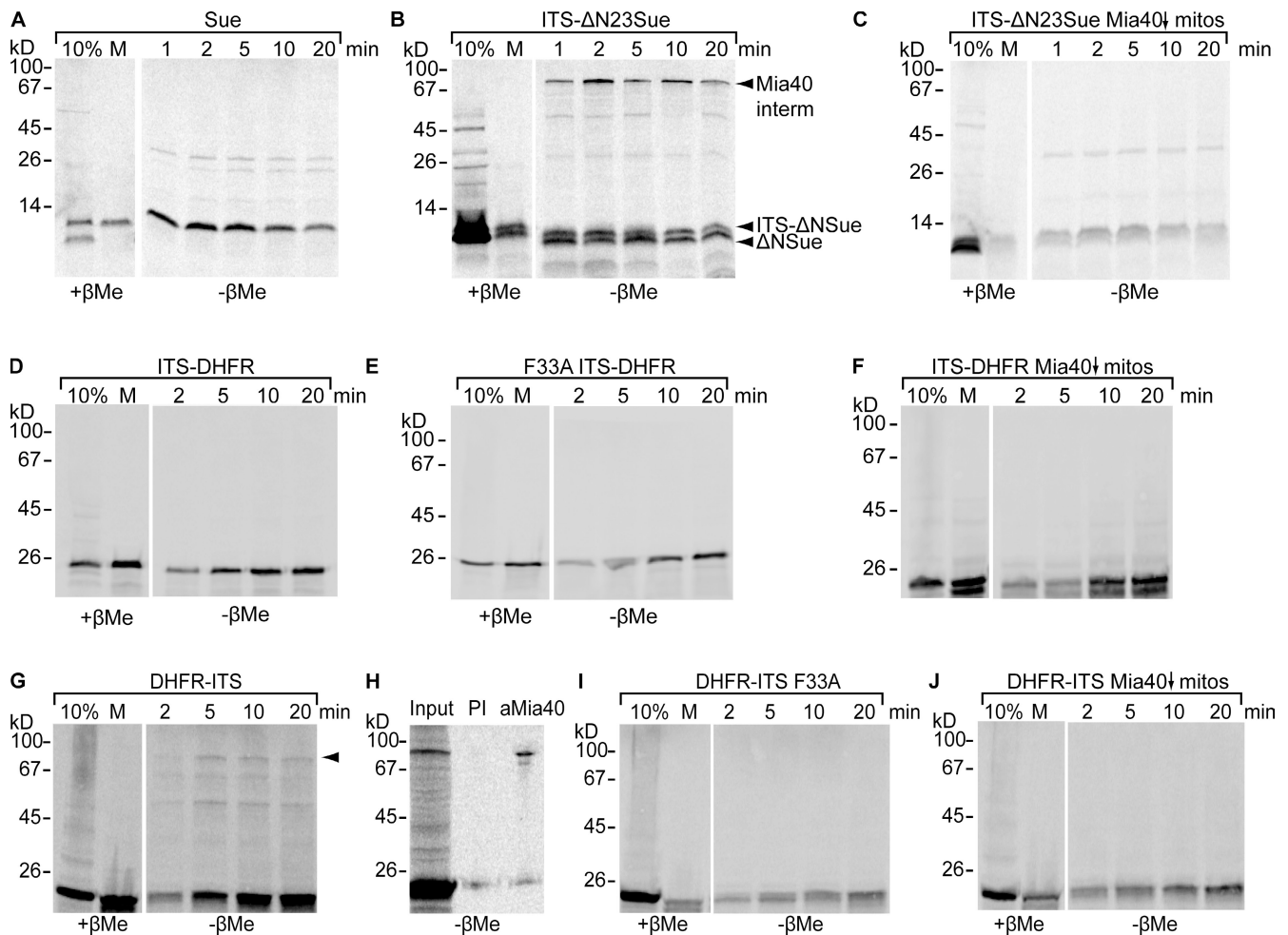


Figure 8. **Fusion of the ITS can target to mitochondrial Mia40-independent substrates and nonmitochondrial proteins.** (A) Import of Sue in wild-type mitochondria. (B) As in A for ITS-DHFR. *interm*, intermediate. (C) As in B but in Mia40-depleted mitochondria. (D) ITS-DHFR import as in A. (E) As in D but with the F33A Tim10 ITS mutant. (F) As in D but in Mia40-depleted mitochondria. (G) DHFR-ITS fusion and import as in D. The arrowhead indicates the Mia40 mixed intermediate. (H) Immunoprecipitation after the import of DHFR-ITS with anti-Mia40 or preimmune serum (PI). (I) As in G but with the F33A Tim10 ITS mutant. (J) As in G but in Mia40-depleted mitochondria.

restored import substantially (Fig. 8, A and B) and formed a  $\beta$ -Me-sensitive Mia40 intermediate (Fig. 8 B) not observed for wild-type Sue (Fig. 8 A). Consistently, the ITS- $\Delta$ N23Sue import decreased substantially, and no intermediate was formed in Mia40-depleted mitochondria (Fig. 8 C). The low but measurable amount of ITS- $\Delta$ N23Sue still imported in this case (and is thus Mia40 independent) is attributable to the ability of the MISS/ITS to direct import across the OM (see next two paragraphs). As interaction with Mia40 suggested localization in the IMS, we tested this directly (Fig. S5 A). The Mia40 intermediate and the monomeric ITS- $\Delta$ N23Sue were largely degraded in mitoplasts treated with protease, indicating that they are accessible in the IMS.

To address the capacity of MISS/ITS to target nonmitochondrial proteins to the organelle, we used mouse dihydrofolate reductase (DHFR), a small, well-folded protein used traditionally as a model in such experiments. As a control, fusion of the nontargeting 30 first residues of yeast ADP/ATP carrier N-terminally to DHFR did not allow significant import (Fig. S5 B). In contrast, a substantial amount of DHFR (around 10%;

Fig. 8 D) was imported into mitochondria when fused with ITS at its N-terminal end, supporting the ability of MISS/ITS to target DHFR across the OM. However, no intermediate with Mia40 could be observed (Fig. 8 D), import was not affected when the mutant F33A ITS, which abolishes the interaction with Mia40 (Fig. 4 D), was used (Fig. 8 E), and finally, import into Mia40-depleted mitochondria was unaffected (Fig. 8 F). This suggested that although MISS/ITS ensured translocation across the OM, interaction with Mia40 did not occur or was not stable enough, which might lead to import into the matrix. Indeed, this was the case, as intramitochondrial localization of ITS-DHFR (Fig. S5 C) showed it remained intact in protease-treated mitoplasts (similar to the endogenous matrix protein cpn10).

Thus, appending the ITS to the N-terminal end of a nonphysiological substrate for Mia40 is sufficient for translocation across the OM, which illustrates an important new function for the MISS/ITS signal, which is apparently Mia40 independent. In authentic Mia40 substrates, the OM translocation function is coupled to the Mia40-dependent oxidative folding of the substrate. However, for nonmitochondrial proteins, although the

ITS is sufficient for OM translocation, subsequent interaction with Mia40 is not always guaranteed. Conceivably, the ITS may not be accessible enough in well-folded protein domains like DHFR to bind to Mia40. This can be rationalized on the basis that MISS/ITS is not present at the very N-terminal end of physiological Mia40 substrates and that sequences upstream of ITS could enhance the interaction with Mia40. We alternatively appended the ITS C-terminally to DHFR, as this could allow better accessibility of the ITS, which is in line with the result of  $\Delta N39$ Tim10-ITS (Fig. 7). Indeed, the DHFR-ITS fusion protein interacted efficiently with Mia40 (Fig. 8, G–J). It formed a  $\beta$ -Me-sensitive intermediate upon import (Fig. 8 G) that was Mia40 specific (Fig. 8 H), abolished when the F33A mutant of ITS was used (Fig. 8 I), and absent from Mia40-depleted mitochondria (Fig. 8 J). Intramitochondrial localization experiments confirmed that DHFR-ITS is in fact localized in the IMS (Fig. S5 D).

#### **MISS/ITS-dependent binding to Mia40 is mediated by hydrophobic interactions of micromolar affinity**

The discovery of the ITS targeting to Mia40, the crucial role of the hydrophobic residues as shown by mutagenesis, and the structural requirement for these to be on the same side of the MISS/ITS helix (supported by the theoretical modeling and the Cys mutagenesis experiments) all point to a key role of hydrophobic interactions in this targeting process. These noncovalent hydrophobic interactions must be strong enough to properly orient the substrate so that disulfide bonding can then occur in a second step locking the interaction with Mia40. To directly test the importance of these noncovalent hydrophobic interactions, we (a) evaluated in binding experiments *in vitro* the effect of salt and detergent and (b) measured the thermodynamics of the ITS-mediated interaction of the substrate with Mia40 by isothermal titration calorimetry (ITC). For these experiments, we used  $\Delta N290$ Mia40SPS, which (a) lacks the first 290 residues that are not important for interaction and dispensable *in vivo* (unpublished data) and (b) has both cysteines of the active site CPC exchanged to Ser so that it maintains its capacity for noncovalent interaction with the substrate without making the subsequent covalent disulfide bonding with the substrate.

Binding *in vitro* was tested in pull-downs of different radioactively labeled precursors onto pure, His-tagged  $\Delta N290$ Mia40SPS immobilized on Ni beads. The results (Fig. 9 A) are in agreement with those from import assays. Wild-type Tim10 binds substantially as expected; deletion of the first 30 residues weakens binding to some extent, but entirely eliminating MISS/ITS ( $\Delta N39$ ) completely abolishes binding. Similar results were obtained with the  $\Delta N23$ Sue precursor, for which substantial binding was detected only when the MISS/ITS was N-terminally fused to  $\Delta N23$ Sue. Because this *in vitro* assay for noncovalent binding of precursors to Mia40 faithfully reflects binding in organello (Figs. 2 and 8), we tested the effect of salt and detergent in this assay. Salt did not seem to influence the interaction up to 500 mM NaCl (Fig. 9 B), confirming that ionic interactions are not crucial. In contrast, increasing detergent concentration weakened the interaction substantially (Fig. 9 C), arguing for a

major role of hydrophobic interactions in the binding process. These data provide the first experimental support to the concept that the ITS–Mia40 interaction occurs primarily through hydrophobic interactions, underpinning the packing of the corresponding aromatic and aliphatic residues suggested by the theoretical docking in Fig. 5 B. They are also in full agreement with previous mutagenesis of the Mia40 substrate-binding cleft (Banci et al., 2009) and the mutagenesis of the substrate ITS presented in this study.

The thermodynamic noncovalent interactions between Tim10 and Mia40 were analyzed by ITC. As ITC data can be dominated by the strong energetic contribution of covalent bond formation, thus masking the lower contribution of noncovalent interactions,  $\Delta N290$ Mia40SPS was used as explained in the previous paragraph. Tim10 was reduced as shown by AMS thiol-trapping experiments (Fig. S5 E). A clear interaction between  $\Delta N290$ Mia40SPS (injected) and wild-type Tim10 (in the cuvette) was detected with a measured  $K_d$  of 3.3  $\mu$ M ( $3.3 \times 10^{-6} \pm 0.7 \times 10^{-6}$  M;  $\Delta G -7.42$  kcal/mol; Fig. 9 D, top left), which is consistent with a specific interaction *in vivo*. Deletion of the first 30 residues of Tim10 ( $\Delta N30$ Tim10) lowered the affinity 19-fold ( $K_d \sim 63$   $\mu$ M;  $6.29 \times 10^{-5} \pm 0.14 \times 10^{-5}$  M;  $\Delta G -5.68$  kcal/mol; Fig. 9 D, top right), a value still consistent with a physiologically relevant interaction. However, deletion of a further nine residues, thus entirely cleaving the ITS, completely abolished the interaction (Fig. 9 D, bottom left; background binding with Mia40 injected alone to the buffer solution without any substrate in Fig. 9 D, bottom right). These results provide the first direct measurement of the affinity of the noncovalent interaction between Mia40 and one of its substrates, are in agreement with the binding data (Fig. 9 A), and correlate well with the import and interaction of the relevant versions of Tim10 with Mia40 in organello (Fig. 2 B).

## **Discussion**

Previous analyses of the Mia40-dependent oxidative folding showed that Mia40 recognizes specific cysteines in this process based on studies with the small Tims showing that the first Cys of the CX3C motifs is crucial for docking (Milenkovic et al., 2007; Sideris and Tokatlidis, 2007). Binding of other substrates remained a conundrum. We report the surprising finding that Cox17, a CX9C substrate, docks to Mia40 via its third or fourth Cys of the twin CX9C motifs, which is in sharp contrast to the small Tims. This clear difference can now be rationalized in the light of our identification of a novel targeting signal (the ITS) that is conserved among small Tims and Cox17 and allows a particular Cys, different in each substrate, to dock to Mia40. The ITS has several defined features. It is a 9-aa peptide that is conserved among small Tims immediately upstream of their N-terminal end first Cys. The consensus sequence is X[Ar]XX[Hy][Hy]XXC. The Ar residue at position  $-7$  relative to the first Cys is crucial as single mutagenesis of this residue abolishes targeting. The Hy at position  $-4$  is also important but not crucial. The ITS tends to form a helix that aligns uncharged/hydrophobic residues (in particular Ar and Hy at  $-7$  and  $-4$  and  $-3$ ) to the same side of the crucial docking Cys.

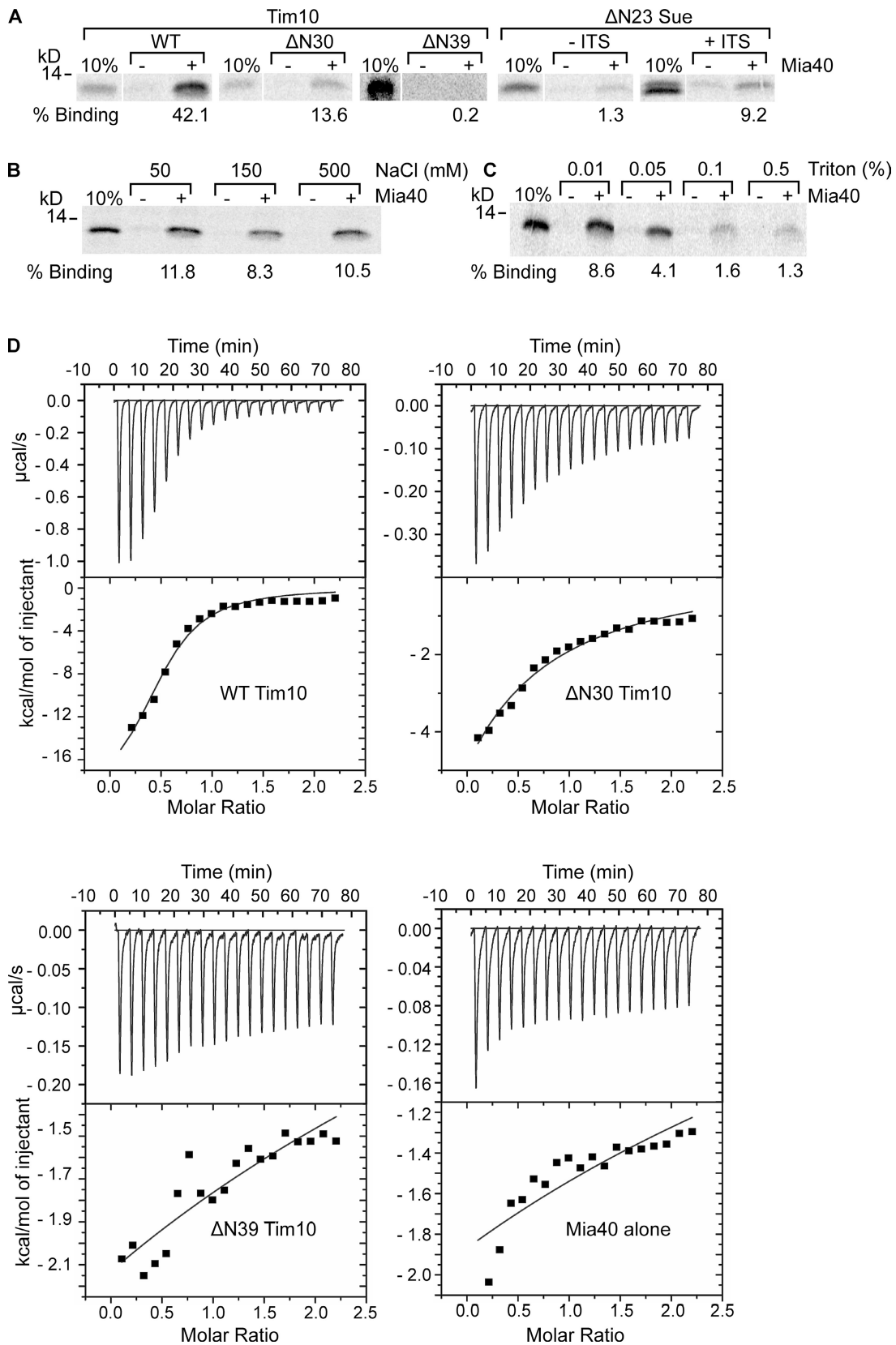


Figure 9. **The noncovalent ITS-dependent binding of substrates to Mia40 is mediated by hydrophobic interactions.** (A) Purified His-tagged  $\Delta N290$ Mia40SPS was bound to  $Ni^{2+}$ -NTA beads.  $^{35}S$ -labeled proteins were incubated with Ni-NTA beads with or without  $\Delta N290$ Mia40SPS at 15°C for 2 h. (B)  $^{35}S$ -labeled Tim10 was incubated with Ni-NTA bead-immobilized  $\Delta N290$ Mia40SPS for 2 h at 30°C in the presence of 50, 150, or 500 mM NaCl. (C) As in B, but binding was performed in the presence of 0.01, 0.05, 0.1, or 0.5% Triton X-100. (D) ITC of 0.25 mM  $\Delta N290$ Mia40SPS alone (bottom right) or with 0.025 mM of wild-type (WT) Tim10 (top left), Tim10  $\Delta N30$  (top right), or Tim10  $\Delta N39$  (bottom left).



A theoretical docking of the ITS onto the substrate-binding cleft of Mia40 shows (a) very good surface complementarity (buried surface area of 1,471 Å<sup>2</sup> or 2,090 Å<sup>2</sup> for TIM9–Mia40 and TIM10–Mia40 complexes, respectively) and (b) stabilizing hydrophobic interactions between the crucial elements of ITS and aliphatic side chains in the substrate cleft of Mia40. Cys-scanning experiments provided independent support to the concept that the ITS must fold in its interaction with Mia40. This structural, rather than simply sequential, feature of the ITS led us to look for such a signal in the vicinity of the docking Cys C45 of COX17, identifying it just downstream of C45, which is a striking result. Underscoring the importance of the precise nature of the residues in the ITS stretch, we found that in yCox17, this signal is oriented in such a way in the cleft of Mia40 that the last Cys of the twin CX9C motif is primed for docking to Mia40. The identification of the ITS for Cox17 agrees with the theoretical docking for a putative complex between COX17 and MIA40 (Banci et al., 2009). Interestingly, both Tims and Cox17 are oriented in the Mia40 substrate cleft similarly and perpendicularly to the two helices  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  of the Mia40 core. Also, the length of the ITS (9 aa) fits exactly to the substrate-binding cleft, ending up in the crucial Cys pair between the substrate and Mia40.

The variable positioning of the ITS in different Mia40 substrates suggested that it functions independently. Swapping the ITS to the C-terminal end of Tim10 without affecting targeting indeed proved this point. Further, fusing the ITS to either a mitochondrial protein that is not a substrate for Mia40 (Sue of ATPase) or a nonmitochondrial protein (DHFR) was sufficient for targeting. The results were more compelling in the case of a C-terminal fusion of the ITS to DHFR, presumably because in this case (as in the  $\Delta N23TIM10$ -ITS), the ITS sequence is more accessible for binding to Mia40. The N-terminal end fusion ITS-DHFR retained the ability for complete translocation across the OM, illustrating this new role for the ITS, which is Mia40 independent. This analysis allowed us to uncouple the two events of translocation across the OM and Mia40-dependent folding, which are tightly coupled for authentic Mia40 substrates.

Having identified the ITS as the crucial targeting element in the Mia40 pathway, we checked for ITS-like signals in the known and predicted substrates of Mia40 (Table S2). The criteria for defining a sequence as a putative ITS were (a) a length of 9 aa upstream or downstream of the Cys and (b) the presence of one aromatic and one hydrophobic residue at positions 4 and 7. For the 15 known/predicted Mia40 substrates (Gabriel et al., 2007), we discovered at least one ITS identified (Table S2), with the exception of only yTim13. In light of the results for yeast and human Cox17, the putative ITS identified in Table S2 may be oriented in different ways in the cleft of Mia40. In any case, though, this signal primes a unique Cys for interaction with Mia40. Therefore, it appears that the presence of ITS is quite general. Furthermore, it appears that in CX3C substrates, ITS signals prime preferentially the first Cys for docking, whereas in CX9C substrates, this is less strict but with a preference for priming one of the C-terminal end cysteines.

The ITS expands the repertoire of mitochondrial-targeting signals. Its propensity to form an amphipathic helix is a common

feature with the typical matrix-targeting signal, which may account for the capacity of ITS to cross the OM. In contrast, the ITS is much shorter, and its functionality relies mainly on the hydrophobic residues and the crucial Cys in contrast to the matrix-targeting signal, where both hydrophobicity and charge are important (Abe et al., 2000). One other ITS was reported for the cytochrome *c* heme lyase but is not present in other proteins and has very different properties from the ITS (~60 residues long and strongly hydrophilic; Diekert et al., 1999). During preparation of our manuscript, Milenkovic et al. (2009) reported the identification of the MISS targeting signal in Tim9 and -10. This partially overlaps with the ITS signal sequence reported in this study, with good agreement between the data. In our study, identification of ITS in the small Tims provided the starting point to additionally (a) identify such a signal in different substrates, (b) solve the conundrum of how different substrates are recognized equally well by Mia40, and (c) dissect the structural and biophysical basis of this recognition process.

The noncovalent protein–protein interactions that are crucial for Mia40 binding and precede the covalent Cys docking were found to be primarily hydrophobic, as they were not affected by salt but were substantially competed by detergent *in vitro*. These results are in line with the theoretical docking experiments for a putative complex of different types of substrates (Tims or Cox17) with Mia40, in which hydrophobic packing of interacting residues seems to play a major role.

We measured for the first time the affinity of the noncovalent binding of the substrate to Mia40 by ITC. It was found that Tim10 had a strong noncovalent thermodynamic affinity to Mia40, indicating a specific recognition of Tim10 by Mia40 before the redox chemistry can take place. This also makes sense thermodynamically, as the subsequent interaction of a folded (oxidized) Tim10 with its partner Tim9 is two orders of magnitude stronger with a  $K_d$  of 30 nM (Lu et al., 2004), and thus, the entire process can be thermodynamically driven by a cascade of increasing affinities. The initial interaction that guides the substrate to Mia40 is mainly caused by the MISS/ITS, as cleavage of this segment ( $\Delta N39Tim10$ ) completely abolishes binding. The fact that binding is decreased but still measurable for  $\Delta N30$  suggests that the upstream 30 residues potentially stabilize the MISS/ITS structure for optimal interaction within the Mia40 cleft.

We propose a working model (Fig. 10) whereby the MISS/ITS has a dual function: first it guides the precursors through the OM, and then it orients them via hydrophobic interactions to the cleft of Mia40. The latter reflects the recognition by Mia40 (step 1: sliding step, ITS guided and noncovalent) and provides the basis for the receptor function of Mia40 in the IMS. Juxtaposition of the correct substrate-docking Cys to the active site Cys of Mia40 is a consequence of this initial recognition process, which thereby allows the correct disulfide to be formed (step 2: docking step, Cys dependent and covalently bound). Correct Cys priming in each substrate as determined by the ITS provides a mechanistic framework for the key role of Mia40 in the mitochondrial oxidative folding pathway.

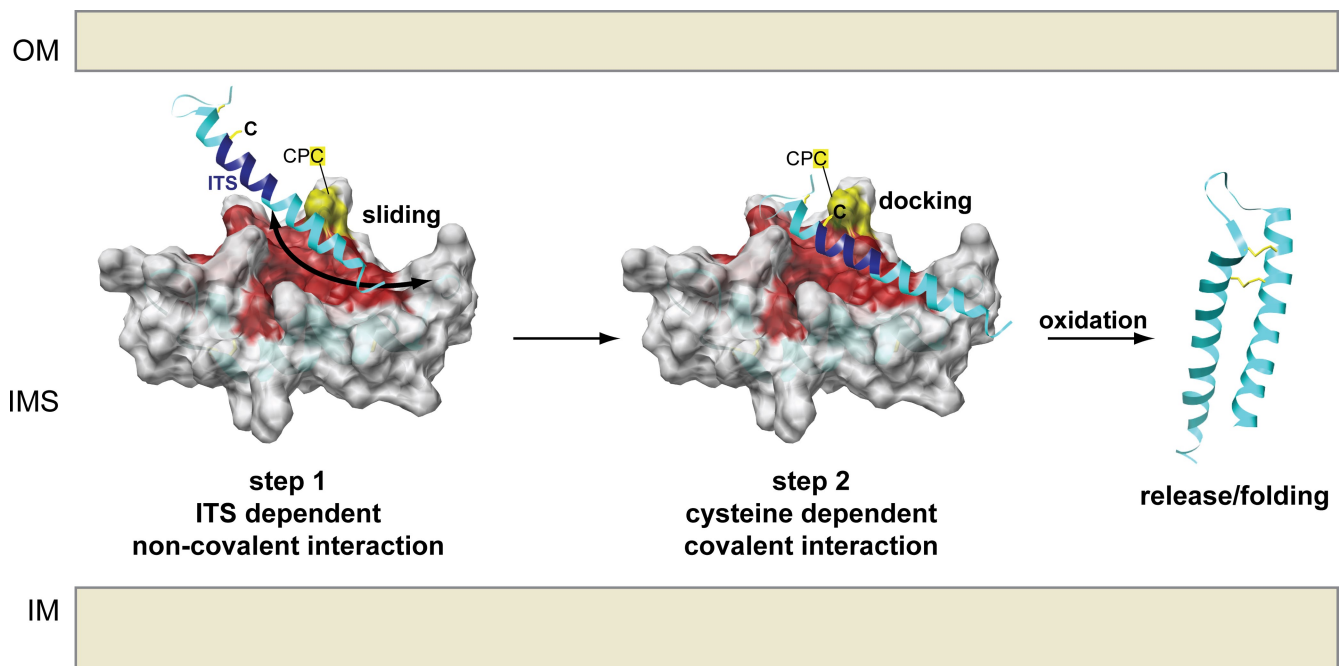


Figure 10. **Sliding-docking model for the interaction of substrates with Mia40.** (step 1, sliding) The substrate slides onto Mia40, where it is oriented by the MISS/ITS through noncovalent, mainly hydrophobic interactions in the cleft of Mia40. The correct Cys of the substrate is thus primed to make the disulfide with Mia40. (step 2, docking) The substrate now docks onto Mia40 via the covalent mixed disulfide bond between the substrate-docking Cys and the juxtaposed active site Cys of Mia40. Finally, complete oxidation releases the substrate in a folded state. IM, inner membrane.

## Materials and methods

### Isolation of mitochondria

Wild-type mitochondria and Mia40-depleted mitochondria were isolated from the *S. cerevisiae* strain D273-10B (MAT- $\alpha$ ) and from the GAL-Mia40 strain as described previously (Daum et al., 1982; Glick, 1991; Banci et al., 2009). The yeast strains were grown at 30°C in medium containing 1% (wt/vol) yeast extract, 2% (wt/vol) bacto-peptone, and 2% lactate (vol/vol) pH adjusted to 5.5 (YPL). In the case of the GAL-Mia40 strain, 0.2% glucose was added to maintain the suppression of the endogenous gene.

### Generation of mutant substrate proteins

Truncated versions of yeast Tim10, -9, and -12 were amplified by PCR and cloned into a pSP64 vector (Promega) downstream of the SP6 promoter for in vitro transcription/translation purposes. For the N-terminal deletions, a Met was added at position 1. To improve  $^{35}\text{S}$  labeling, three methionines were added at the C terminus where necessary. The sequence encoding the first 85 aa of cyb2, which constitutes its IMS-targeting sequence (Glick et al., 1992; Beasley et al., 1993; Schwarz et al., 1993), was then cloned upstream of  $\Delta\text{N}39\text{Tim}10$ ,  $\Delta\text{N}28\text{Tim}12$ , and  $\Delta\text{N}39\text{Tim}12$  in pSP64. The cyb2-targeting sequence was amplified from pSM4 (a gift from B. Glick, University of Chicago, Chicago, IL) by PCR using appropriate primers. For complementation in the yeast GAL-Tim12 strain, the whole cyb2 $\Delta\text{N}28\text{Tim}12$  and cyb2 $\Delta\text{N}39\text{Tim}12$  cassette was subcloned from pSP64 into pRS316, which contains the promoter and terminator of yeast Tim12. ITS- $\Delta\text{N}23$  (C28S) Sue fusion was generated by PCR using a primer that amplified the truncated segment of Sue containing a Cys to Ser substitution at position 28 and contained the 32–40-aa segment of yeast Tim10 as a 5' overhang. The fusion protein ITS-DHFR was amplified by PCR using as template the vector pQE16-DHFR (QIAGEN). The primer at the 5' end contained the 32–40-aa segment of yeast Tim10 as an overhang. The fusion protein DHFR-ITS was amplified by PCR using as template the vector pQE16-DHFR (QIAGEN) with a primer that contained at the 3' end the 32–40-aa segment of yeast Tim10 as an overhang. The fusion proteins ITS-F33A-DHFR and DHFR-ITS-F33A were cloned as ITS-DHFR and DHFR-ITS, respectively, but the primer contained the 32–40-aa segment of yeast Tim10 with a Phe substitution to Ala at position 33, which refers to the amino acid residue of the wild-type yeast Tim10. All fusion inserts were cloned in pSP64 for in vitro transcription/

translation purposes. Yeast Mia40  $\Delta\text{N}290$  containing a double Cys to Ser substitution at the CPC catalytic center was cloned in pET22 (EMD) for bacterial periplasmic expression with a C-terminal His<sub>6</sub> tag by PCR from pGEX/yMia40SPS (Banci et al., 2009). Amino acid substitutions for COX17, yeast Cox17, and yeast Tim10 were generated by PCR-based site-directed mutagenesis (QuikChange site-directed mutagenesis kit; Agilent Technologies) from pSP64-based plasmids containing the COX17, yeast Cox17, and yeast Tim10 gene, respectively. Primer design and the PCR conditions were performed according to the manufacturer's guidelines. The mutations were verified by sequencing reactions.

### Import in yeast mitochondria

$^{35}\text{S}$ -labeled precursor proteins were synthesized using the TNT SP6-coupled transcription/translation kit (Promega). The radioactive material was imported in 50–100  $\mu\text{g}$  of wild-type yeast mitochondria in the presence of 2 mM ATP and 2.5 mM NADH for the indicated time points at 30°C. Mitochondria were then resuspended in 1.2 M sorbitol and 20 mM Hepes, pH 7.4, followed by a treatment with 0.1  $\text{mg ml}^{-1}$  proteinase K with or without 1% (vol/vol) Triton X-100 to remove unimported material. Finally, they were resuspended in Laemmli sample buffer with or without  $\beta$ -Me as indicated, analyzed by SDS-PAGE, and visualized by digital autoradiography (Molecular Dynamics).

### BN analysis of imported precursor

After import of radioactive  $^{35}\text{S}$ -labeled protein in wild-type mitochondria, the samples were solubilized in 0.16% *N*-dodecylmaltoside buffer (50 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM Hepes/KOH, pH 7.4, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, and 1 mM PMSF) for 30 min on ice. The solubilized material was separated by a 20-min centrifugation at 100,000 *g*, which was then loaded on 6–16% gradient BN electrophoresis gel (Schägger and von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). The radioactive material was detected by autoradiography. For antibody depletion, the solubilized material was incubated with antibodies against Mia40 for 20 min on ice and then with protein A-Sepharose beads (GE Healthcare) for 20 min on ice. The unbound material was separated by centrifugation at 2,500 *g* for 2 min before loading on the gradient BN gel.

### Coimmunoprecipitation of imported precursor in mitochondria

After import of radioactive  $^{35}\text{S}$ -labeled protein in wild-type mitochondria for 10 min at 30°C, the samples were treated with 0.1  $\text{mg ml}^{-1}$  proteinase K to remove unimported material. Mitochondria were then resuspended in

lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 0.5% Triton X-100, and 1% SDS) and boiled for 5 min at 95°C. The sample was then diluted 20 times with immunoprecipitation buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, and 0.5% Triton X-100) and incubated with antibodies against Mia40 and protein A–Sepharose beads for 2 h at 4°C. The bound material on the beads was washed three times with immunoprecipitation buffer and then resuspended in Laemmli sample buffer. The immunoprecipitated material was analyzed under reducing and nonreducing SDS-PAGE and visualized by digital autoradiography.

#### Protein purification

Recombinant proteins were expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain from pET22a ( $\Delta$ N290Mia40SPS) or pGEX (wild type,  $\Delta$ N30, and  $\Delta$ N39 Tim10 as a GST fusion) constructs. Cells carrying the pET22 $\Delta$ N290Mia40SPS plasmid were harvested after induction with 0.4 mM IPTG for 3 h at 37°C. Cells were then resuspended in buffer A (150 mM NaCl and 50 mM Tris HCl, pH 7.4) and sonicated for 5 min at 50% amplification. Samples were centrifuged for 30 min at 4°C and 21,000 g. Protein was purified from the soluble fraction. 15 mM imidazole was added and then loaded onto Ni–nitrilotriacetic acid (NTA) resin (QIAGEN) using 2.5 ml of resin per liter of culture. Ni-NTA resin was washed in buffer A + 50 mM imidazole. Then, the protein was eluted by buffer A + 300 mM imidazole. Eluted protein was further purified by anion exchange chromatography on a MonoQ HR 5/5 column (GE Healthcare). Cells carrying the pGEX constructs were harvested after induction with 0.4 mM IPTG overnight at 18°C. Cells were then resuspended in buffer A and sonicated for 5 min at 50% amplification. Samples were centrifuged for 30 min at 4°C and 21,000 g. The soluble fraction was incubated with 1 ml of swollen glutathione beads per liter of culture overnight or for 6 h at 4°C. Beads were washed with buffer A and then eluted with buffer A + 50 mM reduced glutathione. Then, 5 U/ml thrombin was added and left to cut the GST tag overnight or for 6 h at 0°C. The cleaved fused protein was isolated from the GST tag by gel filtration with a Superdex75 column (GE Healthcare).

#### Ni-NTA beads pull-down assay

Purified recombinant  $\Delta$ N290Mia40SPS was incubated with Ni-NTA beads (QIAGEN) for 20 min at 4°C. 1  $\mu$ g of pure protein was used per 1  $\mu$ l of beads. The beads were washed with binding buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, 15 mM imidazole, 0.1% BSA, and 0.01% Triton X-100). <sup>35</sup>S-labeled proteins were produced using the TNT SP6-coupled transcription/translation kit. After the reaction, the lysates were treated with saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution for 20 min in ice and centrifuged for 20 min at 16,000 g to precipitate the <sup>35</sup>S-labeled protein and remove the globins of the lysates. After precipitation, the pellet was resuspended in denaturing buffer (8 M urea, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, and 1 mM DTT) in a volume equal to the volume of the lysates before precipitation and incubated for 1 h at room temperature. The denatured <sup>35</sup>S-labeled proteins were incubated with Ni-NTA beads equilibrated in binding buffer with or without  $\Delta$ N290Mia40SPS (5  $\mu$ l of denatured protein, 20  $\mu$ l of beads, and 175  $\mu$ l of binding buffer) for 2 h at the indicated temperature. After incubation, the beads were collected by centrifugation and washed three times with 180  $\mu$ l of binding buffer. The bound material was resuspended in Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE, and visualized by autoradiography.

#### ITC

ITC was used to measure the association constant, enthalpy ( $\Delta$ H), entropy ( $\Delta$ S), and free energy ( $\Delta$ G) changes of Tim10 variants binding to  $\Delta$ N290Mia40SPS. At least two independent measurements of the reaction were made at 25°C. All experiments were performed on VP-ITC microcalorimetry (MicroCal). Protein samples were extensively dialyzed against 50 mM KPi, pH 7.4, for 12 h at 4°C. To ensure full reduction of the proteins, they were incubated for 1 h with 10 mM TCEP (Tris [2-carboxyethyl]phosphine) at 4°C and then dialyzed for 1 h with 50 mM KPi, pH 7.4, and 1 mM TCEP at 4°C to make sure that the proteins were in the same buffer conditions. Tim10,  $\Delta$ N30, and  $\Delta$ N39 were used at 0.025 mM, and  $\Delta$ N290Mia40SPS was injected at 0.25 mM at 15-s intervals. The concentration of the proteins was determined spectrophotometrically using their respective extinction coefficients.

#### Helical wheel projection and HADDOCK

Helical wheel representations were made using the helical wheel viewer for  $\alpha$  helices from the University of Virginia in Charlottesville (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>). Structural models

of the transient complex between human MIA40 and human TIM9 and between human MIA40 and human TIM10 were obtained with the HADDOCK program (Dominguez et al., 2003), combining mutagenesis analysis with in silico docking. Indeed, we constrained the modeling, taking account of the mutational analysis data for MIA40 (Banci et al., 2009) and for the Tims (reported in this study) as well as the experimental data that the N-terminal Cys of the Tims makes a disulfide pair with C55 of MIA40 (Milenkovic et al., 2007; Sideris and Tokatlidis, 2007). The structures of MIA40<sub>255</sub> (PDB ID 2K3J) and fully reduced TIM9 and -10 were used as input. The fully reduced TIM9 and -10 structures were generated from the human TIM9–TIM10 complex structure (PDB ID 2BSK) by removing the two disulphide bridges from the fully oxidized TIM9 and -10 protomer structures and randomly opening the two  $\alpha$  helices. The residues engaged in the MIA40 interaction for TIM9 and -10, obtained by site-directed mutagenesis combined with in vitro and in vivo assays using the almost identical yeast homologues, were Tyr21, Leu24, and Cys28 and Tyr22, Met25, and Cys29, respectively. Corresponding residues for MIA40 engaged in interaction were Cys55, Leu56, Met59, Phe72, Phe75, Phe91, and Met94, which were similarly obtained from site-directed mutagenesis combined with in vitro and in vivo assays (Banci et al., 2009). A disulphide bond between Cys28 for TIM9 or Cys29 for TIM10 and Cys55 of MIA40 was also imposed in docking calculations. Structural models of the complexes between yCox17 and yMia40 and between COX17 and MIA40 were obtained with the HADDOCK program after the same aforementioned procedure. The structures of human MIA40 (PDB ID 2K3J) and yeast Mia40 (PDB ID 2ZXT) were used as input in the human and yeast complexes, respectively. The residues engaged in the Mia40 interaction for COX17 and yCox17, obtained by site-directed mutagenesis combined with in vitro and in vivo assays (Banci et al., 2009; this study), were Leu48, Ile49, His52, and Cys45 and Phe50, Ile51, Tyr54, and Cys57, respectively. A disulphide bond between Cys45 for COX17 or Cys57 for yCox17 and Cys55 of MIA40 or Cys298 of yMia40, respectively, was also imposed in docking calculations.

#### Miscellaneous

Complementation in the yeast strain *GAL-Tim12* was performed as described previously (Lionaki et al., 2008). In brief, the *GAL-Tim12* strain was transformed with the pRS316 plasmid harboring the corresponding genes (fusion constructs cyb2 $\Delta$ N28Tim12 and cyb2 $\Delta$ N39Tim12) under the control of the endogenous Tim12 promoter. The transformed clones were grown in minimal medium containing 0.2% GAL and then shifted to 0.2% glucose for 36 h before the complementation test. The same dilution of cells was dropped on either SC or SG plates (minimal medium with 0.2% glucose or 0.2% GAL, respectively) and incubated at 30°C for 4 d. SDS-PAGE was performed according to standard procedures. For the separation of proteins below 15 kD, Tris-Tricine SDS-PAGE was applied (Allen et al., 2003). Quantification of radioactive bands was performed using the Image Quant software (Molecular Dynamics), and error bars were generated by quantification of at least three independent experiments. In some figures, nonrelevant gel lanes were excised by digital treatment. Western blots were performed on nitrocellulose membranes according to standard procedures.

#### Online supplemental material

Fig. S1 shows the interaction of COX17 and its Cys mutants with Mia40 in mitochondria. Fig. S2 shows the interaction of yeast Cox17 and its Cys mutants with Mia40 in mitochondria. Fig. S3 shows the import controls as a percentage of the translation mix used for import. Fig. S4 shows the theoretical modeling of the yeast Cox17 docking to the yeast Mia40 substrate-binding cleft using HADDOCK. Fig. S5 shows the localization of ITS fusion constructs in wild-type mitochondria. Table S1 lists the calculated parameters of the data-driven docking of substrates to Mia40. Table S2 shows the prediction of ITS in Mia40 substrates. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200905134/DC1>.

We thank S. Karamanou (Foundation for Research and Technology Hellas, Heraklion, Crete, Greece) for help with ITC, N. Pfanner and A. Chacinska (University of Freiburg, Freiburg im Breisgau, Germany) for sharing unpublished data, S. Makrogikas and P. Kritsiligkou for help with some mutants, and members of our group for discussions and comments.

This work was supported by funds from the Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, the University of Crete, and the European Social Fund and national resources (to K. Tokatlidis), the European Network of Research Infrastructures for Providing

Submitted: 25 May 2009

Accepted: 19 November 2009

## References

- Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo, and D. Kohda. 2000. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*. 100:551–560. doi:10.1016/S0092-8674(00)80691-1
- Allen, S., H. Lu, D. Thornton, and K. Tokatlidis. 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. doi:10.1074/jbc.M306027200
- Arnesano, F., E. Balatri, L. Banci, I. Bertini, and D.R. Winge. 2005. Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure*. 13:713–722. doi:10.1016/j.str.2005.02.015
- Baker, M.J., C.T. Webb, D.A. Stroud, C.S. Palmer, A.E. Frazier, B. Guiard, A. Chacinska, J.M. Gulbis, and M.T. Ryan. 2009. Structural and functional requirements for activity of the Tim9–Tim10 complex in mitochondrial protein import. *Mol. Biol. Cell*. 20:769–779. doi:10.1091/mbc.E08-09-0903
- Banci, L., I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, A. Janicka, M. Martinelli, H. Kozlowski, and P. Palumaa. 2008. A structural-dynamical characterization of human Cox17. *J. Biol. Chem.* 283:7912–7920. doi:10.1074/jbc.M708016200
- Banci, L., I. Bertini, C. Cefaro, S. Ciofi-Baffoni, A. Gallo, M. Martinelli, D.P. Sideris, N. Katrakili, and K. Tokatlidis. 2009. MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:198–206. doi:10.1038/nsmb.1553
- Beasley, E.M., S. Müller, and G. Schatz. 1993. The signal that sorts yeast cytochrome b2 to the mitochondrial intermembrane space contains three distinct functional regions. *EMBO J.* 12:2303–2311.
- Chacinska, A., S. Pfannschmidt, N. Wiedemann, V. Kozjak, L.K. Sanjuán Szklarz, A. Schulze-Specking, K.N. Truscott, B. Guiard, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2004. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* 23:3735–3746. doi:10.1038/sj.emboj.7600389
- Daum, G., P.C. Böhni, and G. Schatz. 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.
- Diekert, K., G. Kispal, B. Guiard, and R. Lill. 1999. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:11752–11757. doi:10.1073/pnas.96.21.11752
- Dominguez, C., R. Boelens, and A.M. Bonvin. 2003. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* 125:1731–1737. doi:10.1021/ja026939x
- Everard-Gigot, V., C.D. Dunn, B.M. Dolan, S. Brunner, R.E. Jensen, and R.A. Stuart. 2005. Functional analysis of subunit e of the F1Fo-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryot. Cell*. 4:346–355. doi:10.1128/EC.4.2.346-355.2005
- Gabriel, K., D. Milenkovic, A. Chacinska, J. Müller, B. Guiard, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2007. Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J. Mol. Biol.* 365:612–620. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.038
- Glick, B.S. 1991. Protein import into isolated yeast mitochondria. *Methods Cell Biol.* 34:389–399. doi:10.1016/S0091-679X(08)61693-3
- Glick, B.S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Müller, R.L. Hallberg, and G. Schatz. 1992. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*. 69:809–822. doi:10.1016/0092-8674(92)90292-K
- Heaton, D., T. Nittis, C. Srinivasan, and D.R. Winge. 2000. Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J. Biol. Chem.* 275:37582–37587. doi:10.1074/jbc.M006639200
- Hell, K. 2008. The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1783:601–609. doi:10.1016/j.bbamer.2007.12.005
- Lionaki, E., C. de Marcos Lousa, C. Baud, M. Vougioukalaki, G. Panayotou, and K. Tokatlidis. 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. doi:10.1074/jbc.M800350200
- Lu, H., S. Allen, L. Wardleworth, P. Savory, and K. Tokatlidis. 2004. Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J. Biol. Chem.* 279:18952–18958. doi:10.1074/jbc.M313045200
- Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*. 121:1059–1069. doi:10.1016/j.cell.2005.04.011
- Milenkovic, D., K. Gabriel, B. Guiard, A. Schulze-Specking, N. Pfanner, and A. Chacinska. 2007. 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. doi:10.1074/jbc.M703294200
- Milenkovic, D., T. Rammig, J.M. Müller, L.S. Wenz, N. Gebert, A. Schulze-Specking, D. Stojanovski, S. Rospert, and A. Chacinska. 2009. Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol. Biol. Cell*. 20:2530–2539. doi:10.1091/mbc.E08-11-1108
- Müller, J.M., D. Milenkovic, B. Guiard, N. Pfanner, and A. Chacinska. 2008. Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Biol. Cell*. 19:226–236. doi:10.1091/mbc.E07-08-0814
- Naoé, M., Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and A. Chacinska. 2004. Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 279:47815–47821. doi:10.1074/jbc.M410272200
- Reddehase, S., B. Grumbt, W. Neupert, and K. Hell. 2009. The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1. *J. Mol. Biol.* 385:331–338. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.088
- Rissler, M., N. Wiedemann, S. Pfannschmidt, K. Gabriel, B. Guiard, N. Pfanner, and A. Chacinska. 2005. The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J. Mol. Biol.* 353:485–492. doi:10.1016/j.jmb.2005.08.051
- Schägger, H., and G. von Jagow. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199:223–231. doi:10.1016/0003-2697(91)90094-A
- Schägger, H., W.A. Cramer, and G. von Jagow. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217:220–230. doi:10.1006/abio.1994.1112
- Schwarz, E., T. Seytter, B. Guiard, and W. Neupert. 1993. Targeting of cytochrome b2 into the mitochondrial intermembrane space: specific recognition of the sorting signal. *EMBO J.* 12:2295–2302.
- Sideris, D.P., and K. Tokatlidis. 2007. Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Microbiol.* 65:1360–1373. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05880.x
- Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 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. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.072
- Terziyska, N., B. Grumbt, M. Bien, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2007. The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett.* 581:1098–1102. doi:10.1016/j.febslet.2007.02.014
- Terziyska, N., B. Grumbt, C. Kozany, and K. Hell. 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. doi:10.1074/jbc.M805035200
- Tokatlidis, K., T. Junne, S. Moes, G. Schatz, B.S. Glick, and N. Kronidou. 1996. Translocation arrest of an intramitochondrial sorting signal next to Tim11 at the inner-membrane import site. *Nature*. 384:585–588. doi:10.1038/384585a0
- Webb, C.T., M.A. Gorman, M. Lazarou, M.T. Ryan, and J.M. Gulbis. 2006. Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol. Cell*. 21:123–133. doi:10.1016/j.molcel.2005.11.010