



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ο ρόλος της πρωτεΐνης Gpx3 και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) στην οξειδωτική αναδίπλωση στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων**

**ΜΑΓΚΑΝΑ ΦΑΝΗ**

**Επιβλέπων καθηγητής: Κ. Τοκατλίδης**

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας  
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας  
(Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας)

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2013**

*Στην οικογένειά μου...*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα .....	3
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: Εισαγωγή .....	9
1. Γενική ανασκόπηση .....	10
1.1. Τα μιτοχόνδρια ως οργανίδια .....	10
1.2. Δομικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων .....	12
1.3. Μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών .....	13
2. Οξειδωτική αναδίπλωση στα μιτοχόνδρια .....	18
2.1. Το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης Mia40-Erv1 .....	18
2.2. Υποστρώματα του μονοπατιού Mia40-Erv1 .....	22
3. Το οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια .....	23
3.1. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου και οι τρόποι αντιμετώπισής τους .....	23
3.2. Ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης Grx3 στον σακχαρομύκητα: το μονοπάτι ενεργοποίησης του Yap1 .....	25
3.3. Πρόσφατες ανακαλύψεις και προοπτικές .....	28
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: Υλικά και Μέθοδοι .....	30
Υλικά .....	31
Μέθοδοι .....	35
1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας .....	35
1.1. Μεταλλαξιγένεση (Mutagenesis).....	35
1.2. Κλωνοποίηση (Cloning) .....	35
1.3. Ανοσοκατακρήμνιση .....	35
2. In organello τεχνικές.....	36
2.1. Απομόνωση μιτοχονδρίων.....	36
2.2. Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών με το <i>in vitro</i> σύστημα συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης .....	36
2.3. Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια .....	37
2.4. Δημιουργία μιτοπλαστών.....	38

3. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών .....	39
3.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Tris-Tricine SDS PAGE) .....	39
3.2. Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης .....	39
3.3. Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ανοσοαποτύπωση (Western blotting) .....	40
3.4. Έκφραση πρωτεϊνών .....	40
3.5. Καθαρισμός και μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης .....	41
3.6. Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης .....	41
3.7. Μέθοδος πρόσδεσης σε συστοιχία ακινητοποιημένων πεπτιδίων (Pepscan assay) .....	42
3.8. Ομοιοπολική διασύνδεση πρωτεϊνών με τη χρήση προσδετών (crosslinkers) .....	43
4. Χειρισμός κυττάρων σακχαρομύκητα ( <i>S. cerevisiae</i> ) .....	44
4.1. Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα .....	44
4.2. Αποσιώπηση γονιδίων σακχαρομύκητα (gene disruption) .....	45
4.3. Έλεγχος μετασηματισμένων στελεχών σακχαρομύκητα με χρήση PCR (yeasy colony PCR) .....	45
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: Αποτελέσματα .....	46
1. Μηχανισμός ελέγχου των επιπέδων H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων ..	47
1.1. Η πρωτεΐνη Gpx3 – γενικά χαρακτηριστικά .....	47
1.2. Επιβεβαίωση της τοπολογίας της Gpx3 .....	48
1.3. Αναζήτηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων .....	49
1.4. Είσοδος της Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων .....	51
1.5. <i>In vitro</i> αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Gpx3 και Mia40 .....	54
1.6. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Gpx3 και της Mia40 .....	60
1.7. Ανίχνευση του συμπλόκου Gpx3-Mia40 <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> .....	62
2. Ο ρόλος του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> στα μιτοχόνδρια .....	64
2.1. Επίδραση του οξειδωτικού στρες στην ανάπτυξη κυττάρων .....	64
2.1. Επίδραση του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> στη δυνατότητα εισαγωγής των πρωτεϊνών Tim10 και Mia40 .....	65
ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: Συζήτηση και Προοπτικές .....	68

ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: Βιβλιογραφία .....	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	79
Πίνακας εικόνων .....	80

# Περίληψη

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικά οργανίδια του κυττάρου, υπεύθυνα για διαδικασίες που θεωρούνται σημαντικές για τη ζωή. Μέσα στους ρόλους που επιτελούν είναι και η οξειδωτική αναδίπλωση των πρωτεϊνών, διαδικασία η οποία πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού Mia40-Erv1. Πιο συγκεκριμένα, το Mia40-Erv1 μονοπάτι αποτελεί ένα μελετημένο μηχανισμό, μέσω του οποίου πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων μπορούν και αναδιπλώνονται, προκειμένου να γίνουν λειτουργικές. Πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλα διαμερίσματα του κυττάρου (ενδοπλασματικό δίκτυο) έχουν δείξει ότι σε αντίστοιχο συντηρημένο μονοπάτι (PDI-Ero1) εμπλέκονται πρωτεΐνες με δράση έναντι του οξειδωτικού στρες (PrxIV). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας διερευνήθηκε ο ρόλος της Grx3, μιας πρωτεΐνης ευρέως μελετημένης όσον αφορά τη δράση της στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη φαίνεται να εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, γεγονός που οδήγησε στη μελέτη της όσον αφορά την επανοξείδωση της Mia40, ως μέρος ενός εναλλακτικού μονοπατιού λειτουργικής αναδίπλωσης πρωτεϊνών που μπορεί να ενεργεί κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες.

## **ABSTRACT**

Mitochondria are considered to be essential organelles, responsible for a series of different procedures important for cell viability. One of the roles they are responsible for is the oxidative folding of protein molecules, a process performed primarily by the Mia40-Erv1 pathway. This well-described pathway is considered to be crucial for the oxidative folding of proteins that function in the mitochondrial intermembrane space. Recent studies in other sub-cellular compartments revealed that oxidative folding of proteins through a similar conserved pathway (PDI-Ero1) requires the presence of antioxidant proteins, such as PrxIV. The aim of this study was to elucidate the role of Gpx3, a well-known antioxidant protein recently found through proteomic analysis to reside in the mitochondrial intermembrane space, as part of an alternative redox regulation pathway.



# ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

## Εισαγωγή

---

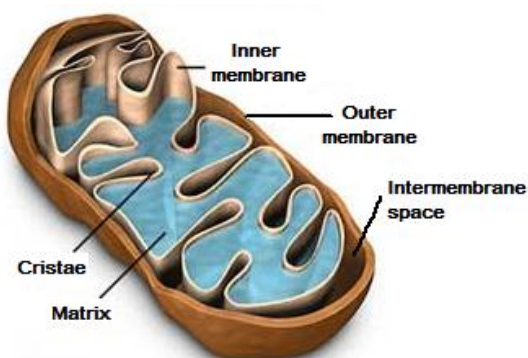
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Κεφάλαιο 1: Γενική ανασκόπηση

#### 1.1. Τα μιτοχόνδρια ως οργανίδια

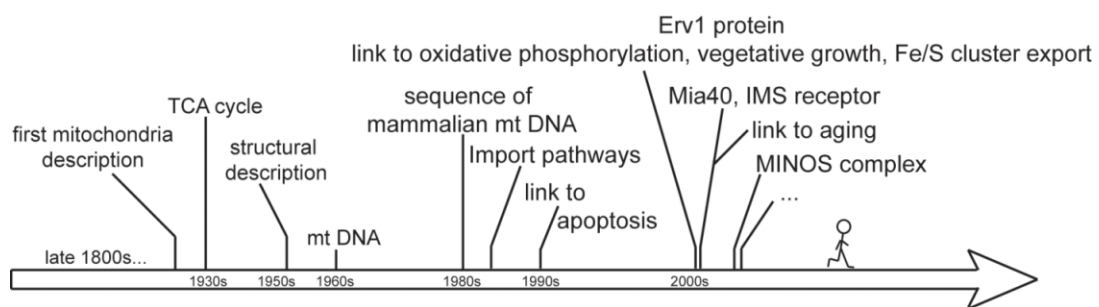
Τα μιτοχόνδρια είναι βασικά οργανίδια του κυττάρου και είναι απαραίτητα για την παραγωγή της ενέργειας των κυττάρων. Η πρώτη περιγραφή των μιτοχονδρίων στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα από τον R. Altmann, που ονόμασε τις δομές αυτές “bioblasts” και τις χαρακτήρησε ως βασικούς οργανισμούς που ζουν μέσα στα κύτταρα και εκτελούν σημαντικές λειτουργίες (Altmann, 1890). Το 1898, τα οργανίδια αυτά απέκτησαν τη σημερινή τους ονομασία – “μιτοχόνδρια” (Εικόνα 1).

Υπάρχουν δύο θεωρίες σχετικά με την προέλευση των μιτοχονδρίων: η αυτόνομη και η ενδοσυμβιωτική θεωρία. Η αυτόνομη θεωρία προτείνει ότι τα μιτοχόνδρια προήλθαν όταν τμήμα του πυρηνικού DNA του ευκαρυωτικού κυττάρου αποκόπηκε και περικλείστηκε από μεμβράνες που δεν μπορούσαν να διαπεραστούν από πρωτεΐνες. Η ενδοσυμβιωτική θεωρία, από την άλλη, προτείνει ότι τα μιτοχόνδρια προήλθαν από την ενσωμάτωση ενός πρωτεοβακτηρίου σε ένα κύτταρο-ξενιστή. Το πρωτεοβακτήριο αυτό λέγεται ότι είχε την ικανότητα να εκτελεί μια σειρά από οξειδωτικές διαδικασίες που δεν ήταν δυνατόν να γίνουν από το ευκαρυωτικό κύτταρο, με αποτέλεσμα η εξέλιξη να το διατηρήσει σε αυτή τη νέα θέση: ως ενδοσυμβιώτη του ευκαρυωτικού κυττάρου (Martin and Müller, 2007).



**Εικόνα 1:** Το μιτοχόνδριο. Το οργανίδιο αυτό αποτελείται από 4 διαφορετικά διαμερίσματα: την εξωτερική μεμβράνη (ΟΜ), την εσωτερική μεμβράνη (ΙΜ), το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (ΙΜΣ) και τη μήτρα (matrix).

Στην εικόνα 2 φαίνεται μια σύντομη ιστορική ανασκόπηση όλων των σημείων αναφοράς στο πεδίο έρευνας των μιτοχονδρίων (Ernster and Schatz, 1981; Schatz, 2013). Ιδιαίτερα σημαντικά γεγονότα αποτελούν η αναγνώρισή τους ως οργανίδια υπεύθυνα για την κυτταρική αναπνοή, η περιγραφή του κύκλου του κιτρικού οξέος (γνωστού και ως κύκλου του Krebs) (Krebs and Johnson, 1937), η περιγραφή της διάταξης των μεμβρανών του μιτοχονδρίου (Palay and Palade, 1955; Sjöstrand, 1953) και η ανακάλυψη του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) (Nass and Nass, 1963). Συνεχώς γίνονται νέες ανακαλύψεις που συνδέουν τα μιτοχόνδρια με μια σωρεία διαφορετικών λειτουργιών και φαινοτύπων, όπως είναι η βιοσύνθεση των συμπλόκων σιδήρου-θείου, η δυνατότητα πραγματοποίησης οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, η γήρανση, καθώς και μια σειρά απο νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Fraga and Ventura, 2013; Jefferies, 2013; Lill, 2009; Scorrano, 2013).



**Εικόνα 2:** Ιστορική ανασκόπηση σημαντικών ανακαλύψεων στο πεδίο έρευνας των μιτοχονδρίων

Περίπου 20 χρόνια μετά την ανακάλυψη του μιτοχονδριακού DNA , δημοσιεύτηκε ο γονιδιακός χάρτης του ανθρώπινου mtDNA μορίου (Anderson et al., 1981). Σε αυτό βρέθηκε ότι κωδικοποιούνται 13 mRNA, 22 tRNA και 2rRNA. Τα 13 αυτά mRNA κωδικοποιούν για κάποιες ιδιαίτερα υδρόφοβες πρωτεΐνες που αποτελούν βασικά συστατικά των διαφόρων συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι αποτελούν ένα ιδιαίτερα μικρό κλάσμα του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα μιτοχόνδρια (~1500 για τον άνθρωπο και ~1000 για το σακχαρομύκητα) και που είναι απαραίτητα για τη σωστή δομή και λειτουργία τους (Alexeyev et al., 2013; Sickmann et al., 2003; Sztolsztener et al., 2013). Η πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιείται από το γονιδίωμα του πυρήνα και παράγεται από τα

ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος. Αυτό αυτόματα οδηγεί στην ανάγκη ύπαρξης ενός μηχανισμού που να είναι υπεύθυνος για την εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Τέτοιοι μηχανισμοί θα αναλυθούν εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο.

## 1.2. Δομικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια ως οργανίδια έχουν μια ιδιαίτερη αρχιτεκτονική, καθώς αποτελούνται από δύο διακριτές διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων (κυτταρικές μεμβράνες). Οι μεμβράνες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη διαφορετικών πρωτεϊνών και, κατ'επέκταση, είναι απαραίτητες για διαφορετικές διεργασίες του κυττάρου. Μια κύρια διαφορά ανάμεσα στις δύο μεμβράνες του οργανιδίου είναι το γεγονός ότι η εσωτερική μεμβράνη περιέχει τρεις φορές μεγαλύτερη ποσότητα καρδιολιπίνης (έναν τύπο φωσφολιπιδίου) σε σχέση με την εξωτερική μεμβράνη, γεγονός που την καθιστά αδιαπέραστη από μικρά μόρια. Το συγκεκριμένο φωσφολιπίδιο συντίθεται στα μιτοχόνδρια και φαίνεται να είναι αρκετά πιο άφθονο στα σημεία εκείνα όπου υπάρχει επαφή ανάμεσα στην εξωτερική και την εσωτερική μεμβράνη (Houtkooper and Vaz, 2008). Μάλιστα, έχει φανεί ότι αλλοιώσεις στα φωσφολιπίδια (και ιδιαίτερα στην καρδιολιπίνη) των μιτοχονδρίων έχουν συσχετιστεί με μια σειρά ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων (Jefferies, 2013; Puntoni et al., 2012).

Η παρουσία των δύο μεμβρανών οδηγεί στη δημιουργία τεσσάρων διαφορετικών υπο-μιτοχονδριακών διαμερισμάτων, με διαφορετικά χαρακτηριστικά το καθένα (Εικόνα 1):

- την εξωτερική μεμβράνη (outer membrane – OM)  
Δρα ως φραγμός και διαχωρίζει το μιτοχόνδριο από το κυτταρόπλασμα. Παρ'όλα αυτά, επιτρέπει την ανταλλαγή μικρών μορίων ανάμεσα στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα μέσω μικρών καναλιών που λέγονται πορίνες (porins). Επίσης, περιέχει τις πρωτεΐνες μεταφορείς της εξωτερικής μεμβράνης (translocase of the outer membrane – TOM – complex), από όπου γίνεται η είσοδος των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια.
- το διαμεμβρανικό χώρο (intermembrane space – IMS)

Πρόκειται για το διαμέρισμα στο οποίο πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

- την εσωτερική μεμβράνη (inner membrane – IM)

Περιέχει τις πρωτεΐνες που συνιστούν το μονοπάτι της οξειδωτικής αναδίπλωσης (mitochondrial import and assembly – MIA – pathway), καθώς και τις πρωτεΐνες μεταφορείς της εσωτερικής μεμβράνης (translocase of the inner membrane – TIM – complex).

- τη μήτρα (matrix)

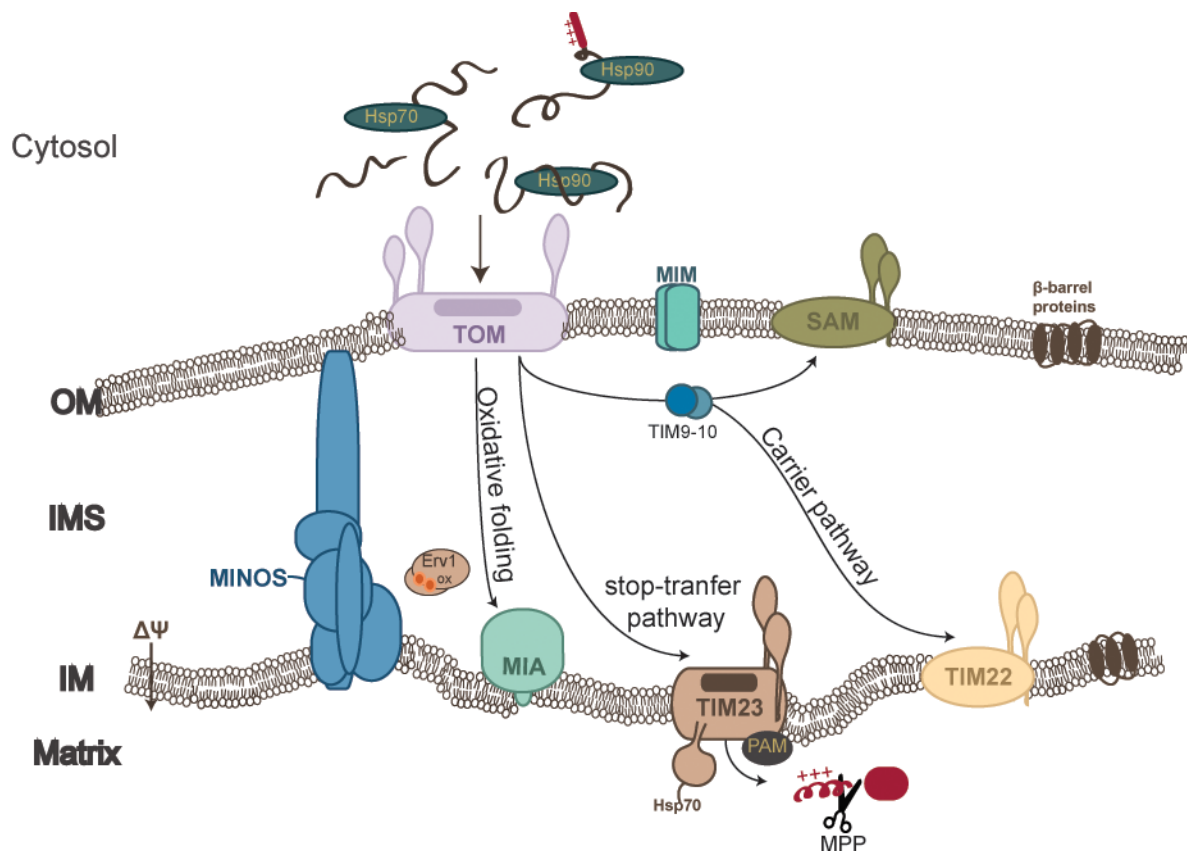
Περιέχει αρκετά αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA (Alexeyev et al, 2013), καθώς και την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Μερικές από τις βασικές λειτουργίες των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σχετίζονται με την απόπτωση (Jozsa et al., 2001), την σύνθεση των συμπλόκων σιδήρου-θείου (Lill, 2009) και την κυτταρική αναπνοή (McBride et al., 2006).

### 1.3. Μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών

Η είσοδος πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία, με πολλαπλά βήματα ελέγχου. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η ύπαρξη αυτών των μηχανισμών εισόδου είναι εξέχουσας σημασίας, καθώς η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία του μιτοχονδρίου κωδικοποιούνται στο πυρηνικό γονιδίωμα και παράγονται στο κυτταρόπλασμα (Dudek et al., 2013). Τα πρόδρομα αυτά μόρια στοχεύονται στα μιτοχόνδρια και αναδιπλώνονται πλήρως όταν βρεθούν στο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα στο οποίο είναι λειτουργικά.

Η στόχευση διαφέρει ανάλογα με το διαμέρισμα στο οποίο δρα η πρωτεΐνη. Συνήθως, όμως, πρόκειται για τμήματα αλληλουχίας μήκους 15-50 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της κάθε πρωτεΐνης, που δημιουργούν μια δευτεροταγή δομή  $\alpha$ -έλικας με θετικά φορτία από τη μια της πλευρά. Το σήμα αυτό αποκόπτεται μετά την είσοδο του πρωτεϊνικού μορίου στο μιτοχόνδριο (Mossmann et al., 2012). Σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη “εσωτερικών” σημάτων στόχευσης, που καθοδηγούν τις πρωτεΐνες στο

κατάλληλο διαμέρισμα του μιτοχονδρίου μετά την εισαγωγή τους από τα σύμπλοκα της εξωτερικής μεμβράνης.



**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Ανάλογα με τον τελικό τους προορισμό μέσα στα μιτοχόνδρια, οι πρόδρομες πρωτεΐνες μπορούν να αξιοποιήσουν μια σειρά από εναλλακτικά μονοπάτια, όπως τα σύμπλοκα SAM, TIM23 ή TIM22, ή ακόμη και να αναδιπλωθούν μέσω του μονοπατιού MIA.

Σε κάθε δεδομένη στιγμή υπάρχουν μια σειρά από διαφορετικά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει ένα πρόδρομο πρωτεϊνικό μόριο μετά τη σύνθεσή του στο κυτταρόπλασμα. Αυτά αναλύονται με περισσότερες λεπτομέρειες παρακάτω (Εικόνα 3):

- Αρχική είσοδος του πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου μέσω του συμπλόκου TOM

Μετά την παραγωγή του πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου στο κυτταρόπλασμα προσελκύονται σε αυτό πρωτεΐνες-συνοδοί (chaperones), προκειμένου να προστατεύσουν

τις υδρόφοβες περιοχές του μορίου από το υδατικό περιβάλλον και να αποτρέψουν τη λανθασμένη αναδίπλωση του ή ακόμα και τη δημιουργία συσσωματωμάτων (Chacinska and Rehling, 2004). Οι πρωτεΐνες-συνοδοί έχουν τη δυνατότητα να φέρνουν την πρόδρομη πρωτεΐνη σε γειτνίαση με την εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, ώστε να γίνει δυνατή η αναγνώρισή της από τους υποδοχείς της μεμβράνης, και συγκεκριμένα, το σύμπλοκο TOM. Οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν και παραλαμβάνουν το υπόστρωμα είναι οι Tom20, Tom22 και Tom70, ενώ η πρόδρομη πρωτεΐνη εισέρχεται μέσα στο μιτοχόνδριο μέσω του πόρου που δημιουργείται από την πρωτεΐνη Tom40 (δομή β-βαρελιού) (Hill et al., 1998; Kunkele et al., 1998). Βοηθητικά προς τους υποδοχείς που αναφέρθηκαν παραπάνω φέρεται να δρουν μια σειρά από μικρομοριακές πρωτεΐνες, όπως είναι οι Tom5, Tom6 και Tom7 (Dietmeier et al., 1997; Model et al., 2001). Το σύμπλοκο TOM θεωρείται ως ο γενικός υποδοχέας των πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου (Endo et al., 2011), οι οποίες, στη συνέχεια, ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια, ανάλογα με το τελικό διαμέρισμα στόχευσής τους.

- *Στόχευση στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου: το σύμπλοκο SAM*

Οι πρωτεΐνες εκείνες που καθορίζονται για ενσωμάτωση στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο SAM (sorting and assembly machinery). Χαρακτηρίζονται από δομή β-βαρελιού και παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες Tim40 και porίνη. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες, μετά την εισαγωγή τους στο μιτοχόνδριο από το σύμπλοκο TOM, αλληλεπιδρούν με το εξαμερές σύμπλοκο Tim9/Tim10 στο IMS, το οποίο τις μεταφέρει στο σύμπλοκο SAM ώστε να ενσωματωθούν στην εξωτερική μεμβράνη (Kunkele et al., 1998; Wiedemann et al., 2003).

- *Στόχευση στη μήτρα ή την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου: η τρανσλοκάση TIM23*

Η τρανσλοκάση TIM23 είναι ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, του οποίου η λειτουργία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το μεμβρανικό δυναμικό (Vögtle et al., 2009). Οι πρόδρομες πρωτεΐνες που αξιοποιούν τη συγκεκριμένη

τρανσλοκάση είναι πρωτεΐνες που πρόκειται να στοχευθούν είτε στη μήτρα είτε στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (μονοπάτι διακοπτόμενης μεταφοράς – stop transfer pathway) και φέρουν σήματα στόχευσης στο αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας τους (Bohnert et al., 2010; Glick et al., 1992).

- *Στόχευση στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου: το σύμπλοκο TIM22*

Το σύμπλοκο TIM22 αποτελεί το κύριο μονοπάτι για την ενσωμάτωση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Οι πρωτεΐνες του συγκεκριμένου υπομιτοχονδριακού διαμερίσματος χαρακτηρίζονται από πολλαπλές αλληλουχίες στόχευσης και δομές που περιλαμβάνουν μια σειρά από  $\alpha$ -έλικες. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο Tim9/Tim10/Tim12 στο IMS και οδηγούνται στο κανάλι TIM22, ώστε να αρχίσει η διαδικασία της ενσωμάτωσής τους (Koehler et al., 1998; Luciano et al., 2001).

- *Στόχευση στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων*

Οι πρωτεΐνες που έχουν ως τελικό στόχο το διαμεμβρανικό χώρο (IMS) κάνουν χρήση μιας σειράς από διαφορετικά μονοπάτια προκειμένου να παραμείνουν στο σωστό διαμέρισμα. Αυτά είναι τα εξής:

- Χρήση του μονοπατιού διακοπτόμενης μεταφοράς (stop transfer).  
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, γίνεται αναγνώριση από το σύμπλοκο TIM23 και απελευθέρωση των πρωτεϊνών μετά από τη δράση του συμπλόκου πρωτεάσης της εσωτερικής μεμβράνης (Glick et al., 1992)
- Πρόσδεση συμπαραγόντων  
Οι διαλυτές πρωτεΐνες που εισάγονται στο μιτοχόνδριο μπορούν να παγιδευτούν στο IMS μέσω της πρόσδεσης συμπαραγόντων. Παράδειγμα τέτοιας περίπτωσης είναι το κυτόχρωμα c.
- Χρήση του μονοπατιού οξειδωτικής αναδίπλωσης (mitochondrial import and assembly – MIA – pathway)



Τα δύο βασικά συστατικά αυτού του μονοπατιού είναι η οξειδοαναγωγή Mia40 (mitochondrial intermembrane space import and assembly) και η σουλφυδρυλοξειδάση Ern1 (essential for respiration and vegetative growth). Η αναγνώριση των υποστρωμάτων γίνεται μέσω της δημιουργίας μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου της Mia40 και των υποστρωμάτων και έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την εισαγωγή δισουλφιδικών δεσμών στα υποστρώματα και την κατακράτησή τους στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Sideris and Tokatlidis, 2010). Το σύστημα αυτό θα αναλυθεί περισσότερο στο επόμενο κεφάλαιο.

## *Κεφάλαιο 2: Οξειδωτική αναδίπλωση στα μιτοχόνδρια*

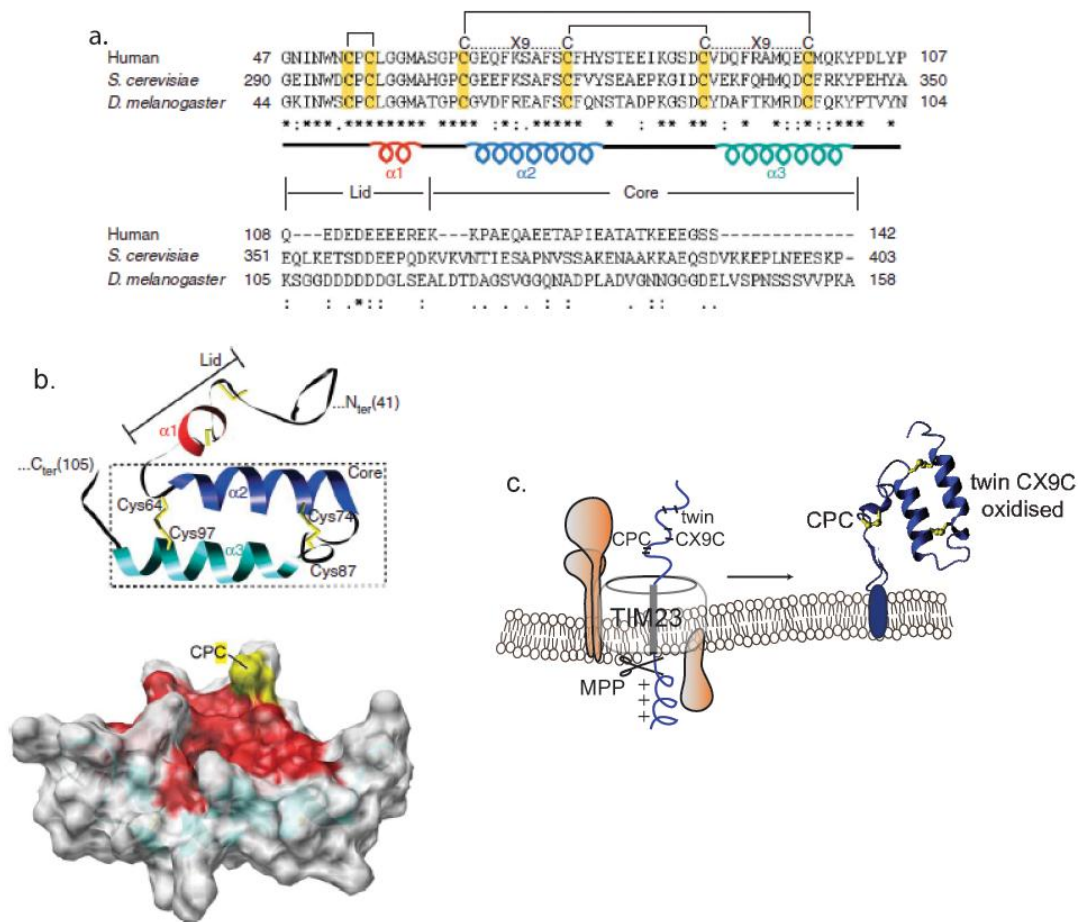
### *2.1. Το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης Mia40-Erv1*

Το μονοπάτι Mia40-Erv1, γνωστό και ως μονοπάτι οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, είναι υπεύθυνο για την είσοδο και την αναδίπλωση πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων, μέσω της εισαγωγής δισουλφιδικών δεσμών σε αυτές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της βιογένεσής τους (Mesecke et al., 2005; Sideris and Tokatlidis, 2010).

Οι δύο κεντρικές πρωτεΐνες του μονοπατιού αυτού είναι η Mia40 και η Erv1 και παρακάτω θα αναλυθούν τα βασικά χαρακτηριστικά τους.

Η πρωτεΐνη Mia40 είναι ένας υποδοχέας εισόδου που εδράζεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και υπόκειται σε ρύθμιση από το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του διαμερίσματος. Είναι απαραίτητη για την ζωτικότητα των κυττάρων του σακχαρομύκητα και φαίνεται να είναι αρκετά συντηρημένη στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Chacinska et al., 2004; Hell, 2008; Sideris and Tokatlidis, 2010).

Στον σακχαρομύκητα, η πρωτεΐνη Mia40 βρίσκεται αγκυροβολημένη στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του αμινοτελικού της άκρου, με την καρβοξυτελική περιοχή, που περιλαμβάνει το καταλυτικό CPC μοτίβο της, να βρίσκεται εκτεθειμένη στο διαμεμβρανικό χώρο. Εκτενείς μελέτες όσον αφορά τη δομή της Mia40 έχουν γίνει με τη χρήση πειραμάτων NMR (nuclear magnetic resonance), όπου χρησιμοποιήθηκε κατά κύριο λόγο η ανθρώπινη ισομορφή της πρωτεΐνης. Παρ'όλα αυτά, μελέτη της διαλυτής μορφής Mia40 του σακχαρομύκητα επιβεβαίωσε αυτές τις μελέτες (Banci et al., 2009) (Εικόνα 4).

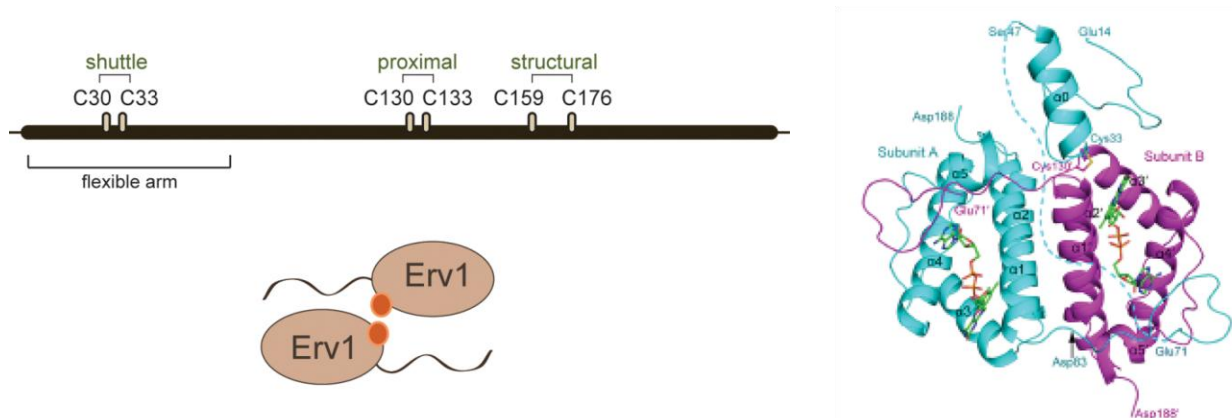


**Εικόνα 4:** Η οξειδάση του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων, Mia40. a) Απεικόνιση των συντηρημένων μοτίβων της αλληλουχίας της Mia40 (CPC-CX<sub>9</sub>C-CX<sub>9</sub>C). b) Απεικόνιση της αναδιπλωμένης μορφής της ανθρώπινης Mia40. Στο χωροπληρωτικό μοντέλο είναι εμφανής η περιοχή της υδρόφοβης κοιλότητας (κόκκινο), με το ενεργό κέντρο (καταλυτικό CPC μοτίβο – κίτρινο) να βρίσκεται από πάνω. c) Η Mia40 του σακχαρομύκητα βρίσκεται αγκυροβολημένη στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, όπου εμπεδώνεται μέσω της δράσης του συμπλόκου TIM23 (διακοπτόμενη μεταφορά – stop transfer). Εικόνα από (Banci et al., 2009).

Η πρωτεΐνη Mia40 ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών με συντηρημένο μοτίβο έξι κυστεϊνικών καταλοίπων (-CPC-CX<sub>9</sub>C-CX<sub>9</sub>C-), όπου όλα είναι σημαντικά για τη σωστή αναδίπλωση και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (Sideris and Tokatlidis, 2010; Terziyska et al., 2009). Τα υποστρώματα του υποδοχέα αυτού εισάγονται στα μιτοχόνδρια κάνοντας χρήση του συμπλόκου TOM της εξωτερικής μεμβράνης και αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό CPC μοτίβο της Mia40. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των υποστρωμάτων, πρόκειται κατά κύριο λόγο για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (6-22kDa) με

συντηρημένα κυστεϊνικά μοτίβα, όπως είναι τα CX<sub>2</sub>C και τα διπλά CX<sub>3</sub>C και CX<sub>9</sub>C (Banci et al., 2009; Gabriel et al., 2007; Sideris et al., 2009; Terziyska et al., 2009).

Το δεύτερο μέλος του μονοπατιού αυτού είναι η Erv1. Η πρωτεΐνη Erv1 είναι μια σουλφυδρυλοξειδάση, η δράση της οποίας εξαρτάται από τη μη ομοιοπολική δέσμευση ενός μορίου FAD στο καρβοξυτελικό της άκρο (Lee et al., 2000). Περιέχει έξι συντηρημένες κυστεΐνες, τέσσερις από τις οποίες βρίσκονται σε CX<sub>2</sub>C μοτίβα (Εικόνα 5). Οι άλλες δύο κυστεΐνες έχουν προταθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της δέσμευσης του μορίου FAD στην πρωτεΐνη (Lee et al., 2000; Sideris and Tokatlidis, 2010). Οι τέσσερις κυστεΐνες των CX<sub>2</sub>C μοτίβων φαίνεται να παίζουν ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στο μόριο FAD, το οποίο με τη σειρά του μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα c (cytochrome c) και την αναπνευστική αλυσίδα (Stojanovski et al., 2008). Εναλλακτικά, τα ηλεκτρόνια μπορούν με μεταφερόμενη απευθείας στο μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>), γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σαν παραπροϊόν.

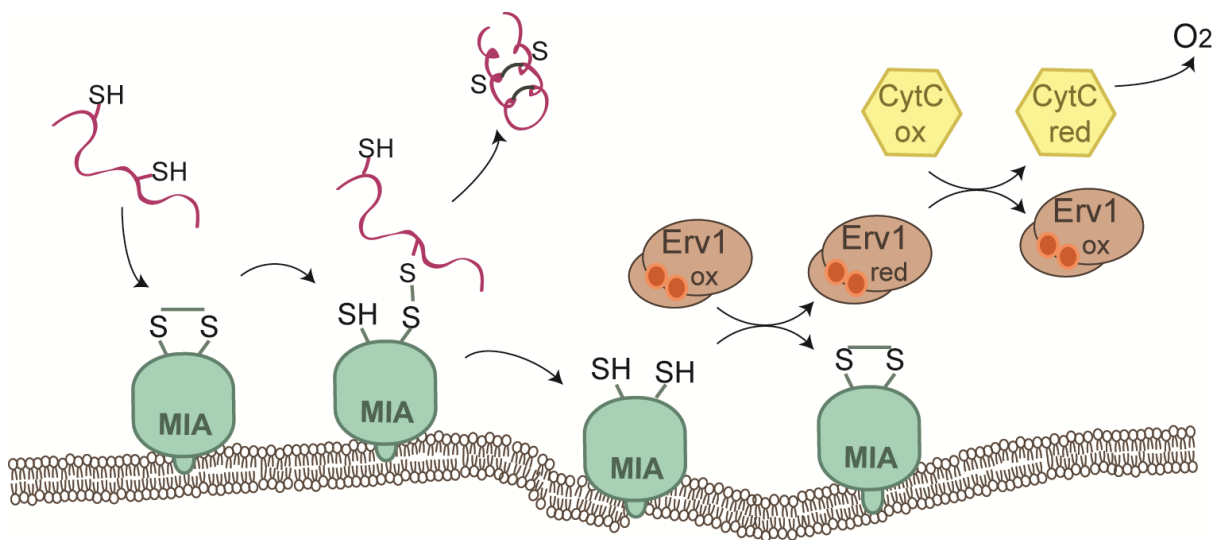


**Εικόνα 5:** Η σουλφυδρυλοξειδάση, Erv1. Απεικόνιση των συντηρημένων μοτίβων της, καθώς και της δομής της. Στα μιτοχόνδρια έχει δειχθεί ότι δρα σαν διμερές. Εικόνα από (Guo et al., 2012).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η Mia40 έχει ένα καταλυτικό CPC μοτίβο στην αλληλουχία της. Αυτό το μοτίβο είναι οξειδοαναγωγικά ενεργό (redox active), που σημαίνει ότι έχει τη δυνατότητα να εναλλάσσεται ανάμεσα σε οξειδωμένη και ανηγμένη κατάσταση χωρίς να επηρεάζεται η δομή του υπόλοιπου μορίου της Mia40 (Banci et al., 2009).

Σχετικά πρόσφατες ανακαλύψεις έδειξαν ότι η αναγνώριση των υποστρωμάτων από τη Mia40 εξαρτάται από την παρουσία μιας μικρής αλληλουχίας μήκους 9 αμινοξέων, η οποία

βρίσκεται στο εσωτερικό της αλληλουχίας των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων αυτού του μονοπατιού. Η αλληλουχία αυτή αποτελεί σήμα στόχευσης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδριών και ονομάζεται ITS (IMS targeting signal). Έχει την ικανότητα να αναδιπλώνεται σε δευτεροταγή δομή α-έλικας, η οποία με τη σειρά της μπορεί να αλληλεπιδράσει μέσω ασθενών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τη Mia40. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις φέρνουν σε γειτνίαση μια από τις κυστεΐνες του υποστρώματος με τις κυστεΐνες του CPC μοτίβου της Mia40. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου ανάμεσα στη Mia40 και το υπόστρωμα. Στη συνέχεια, έχουμε την οξείδωση του υποστρώματος με τη δημιουργία ενός δισουλφιδικού δεσμού και, ως συνέπεια αυτού, την αναγωγή της Mia40 (Sideris et al., 2009). Το υπόστρωμα απελευθερώνεται σε αναδιπλωμένη, πλέον, κατάσταση και η ανηγμένη Mia40 είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με το δεύτερο μέλος του μονοπατιού, την πρωτεΐνη Erv1 (Allen et al., 2005; Tienison et al., 2009) (Εικόνα 6).

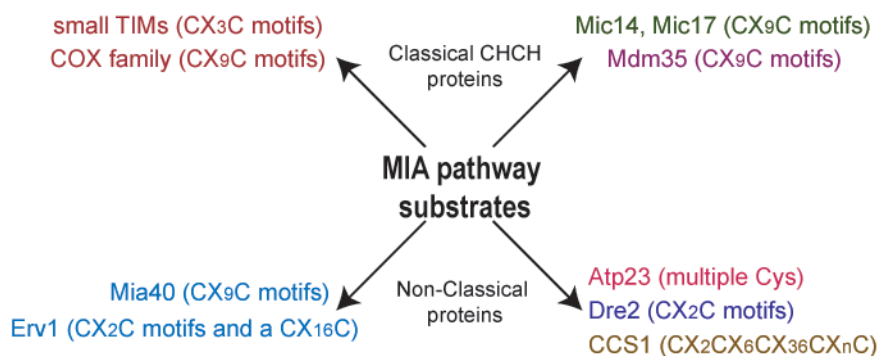


**Εικόνα 6:** Το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης Mia40-Erv1. Τα υποστρώματα του υποδοχέα Mia40 αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό CPC μοτίβο της πρωτεΐνης, δημιουργώντας ένα μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο. Μετά την εισαγωγή του δισουλφιδικού δεσμού από τη Mia40, το υπόστρωμα απελευθερώνεται σε αναδιπλωμένη κατάσταση. Η Mia40 μπορεί να επανοξειδωθεί στο CPC μοτίβο της μέσω της δράσης της πρωτεΐνης Erv1.

## 2.2. Υποστρώματα του μονοπατιού Mia40-Erv1

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τυπικά υποστρώματα του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι πρωτεΐνες που φέρουν συγκεκριμένα κυστεϊνικά μοτίβα, όπως είναι τα CX<sub>3</sub>C και CX<sub>9</sub>C. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτεϊνών που φέρουν CX<sub>3</sub>C μοτίβα είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών Tims, που επιτελούν το ρόλο μοριακών συνοδών (chaperones) για την στόχευση πρωτεϊνών στις μεμβράνες (Chacinska et al., 2009), ενώ, αντίστοιχα, για τα CX<sub>9</sub>C μοτίβα είναι οι πρωτεΐνες του συμπλόκου COX (cytochrome c oxidase), Cox17, Cox19 και Cox23 (Carr and Winge, 2003). Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες φέρουν τη διαμόρφωση “coiled coil – helix – coiled coil – helix” (CHCH).

Παρόλα αυτά, ο κατάλογος των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων του συγκεκριμένου μονοπατιού έχει επεκταθεί μέσα στα τελευταία χρόνια και συμπεριλαμβάνει και πλήθος πρωτεϊνών που δεν περιέχουν τα τυπικά κυστεϊνικά μοτίβα. Τέτοια παραδείγματα είναι η ίδια η Mia40, η οποία περιέχει CX<sub>9</sub>C μοτίβο, αλλά έχει σημαντικά μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με τα κλασικά υποστρώματα, καθώς και η Erv1, που φέρει δύο CX<sub>2</sub>C και ένα CX<sub>16</sub>C μοτίβα (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7:** Υποστρώματα του υποδοχέα Mia40. Διαχωρισμός σε τέσσερις διακριτές ομάδες.

### Κεφάλαιο 3: Το οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια

#### 3.1. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου και οι τρόποι αντιμετώπισής τους

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS) είναι μόρια που προέρχονται από το μοριακό οξυγόνο και που έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά το ρόλο τους στο οξειδωτικό στρες. Παραδείγματα τέτοιων μορίων είναι το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), με τις ελεύθερες ρίζες τους να φέρουν ένα ή περισσότερα ελεύθερα ηλεκτρόνια. Αυτά τα μόρια προέρχονται ως αποτέλεσμα φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών (π.χ. δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών) ή ως αποτέλεσμα έκθεσης των κυττάρων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (Margittai et al., 2012).

Για να μπορέσουν τα κύτταρα του σακχαρομύκητα να ανταπεξέλθουν στον οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την παρουσία των ROS, έχουν αναπτύξει μια σειρά από μηχανισμούς που δρουν αντιοξειδωτικά. Αυτοί μπορούν να είναι είτε μη-ενζυμικοί, όπως το τριπεπτίδιο της γλουταθιόνης και το ασκορβικό οξύ, είτε ενζυμικοί, που θα αναλυθούν παρακάτω (Εικόνα 8).

#### *Δισμουτάσες του υπεροξειδίου (superoxide dismutase – SOD)*

Ο σακχαρομύκητας κωδικοποιεί δύο γονίδια δισμουτασών υπεροξειδίου στο γονιδίωμά του: τη Sod1 και τη Sod2. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από αυτά τα γονίδια τοποθετούνται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου, με την Sod1 να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και, σε μικρές ποσότητες, στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, και την Sod2 να βρίσκεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων (Fridovich, 1995; Sturtz et al., 2001). Ο ρόλος των δύο αυτών πρωτεϊνών είναι να αποδομήσουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι η δράση τους εξαρτάται από την πρόσδεση των κατάλληλων μεταλλικών ιόντων (χαλκού (Cu) και ψευδαργύρου (Zn) για τη Sod1 και μαγγανίου (Mn) για τη Sod2).

## *Καταλάσες*

Οι καταλάσες είναι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να ανάγουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε οξυγόνο και μόρια νερού. Το γονιδίωμα του σακχαρομύκητα κωδικοποιεί για δύο διαφορετικές καταλάσες: την Ctt1, που εντοπίζεται στα υπεροξυσώματα, και την Cta1, που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τη μιτοχονδριακή μήτρα (Petrova et al., 2004). Έχει πραγματοποιηθεί σειρά μελετών πάνω σε αυτές τις πρωτεΐνες, όμως παρ'όλα αυτά ο ρόλος τους δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, καθώς απαλοιφή τους δεν φαίνεται να οδηγεί σε ισχυρούς φαινοτύπους (Grant et al., 1998).

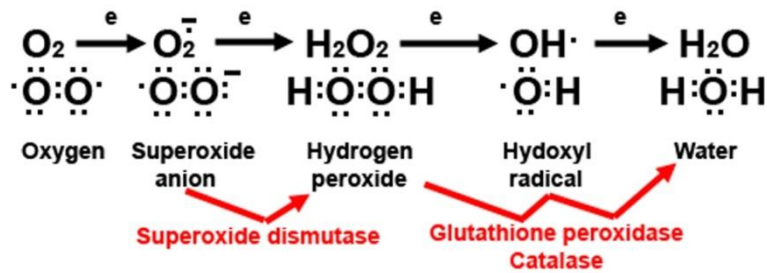
## *Συστήματα υπεροξειδασών θειορεδοξίνης και γλουταθειόνης (TRX/GPX)*

Μια τρίτη κατηγορία ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες είναι οι υπεροξειδάσες. Η δράση των πρωτεϊνών αυτών εξαρτάται από τα ενεργά τους κέντρα, που περιέχουν κυστεϊνικά κατάλοιπα. Οι υπεροξειδάσες διακρίνονται με βάση τον αρχικό δότη ηλεκτρονίων σε δύο κατηγορίες: τις υπεροξειδάσες γλουταθειόνης (GPX), που αξιοποιούν το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης (Gpx1, Gpx2, Gpx3), και τις υπεροξειδάσες θειορεδοξίνης (TRX), που είναι γνωστές και ως "peroxiredoxins" (Trx1, Trx2, Trx3) (Brigelius-Flohé, 2006).

Μέχρι πρότινος, οι μόνες πρωτεΐνες από τις παραπάνω που φαινόταν να συσχετίζονται με τα μιτοχόνδρια ήταν η Gpx1 (που φαίνεται να αλληλεπιδρά με την εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου) και η Trx3 (που βρίσκεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων). Παρ'όλα αυτά, μια πρόσφατη δημοσίευση έδειξε ότι τόσο η Gpx3 όσο και η Trx1 (μαζί με την αντίστοιχη αναγωγάση της θειορεδοξίνης, Trr1) εντοπίζονται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, κάτι που θα αναλυθεί περαιτέρω στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα" (Vögtle et al., 2012).



### Formation and Elimination of Reactive Oxygen Species (ROS)



**Εικόνα 8:** Ενζυμικοί μηχανισμοί καταπολέμησης του οξειδωτικού στρες. Οι δισμουτάσες υπεροξειδίου μετατρέπουν το ανιόν υπεροξειδίου σε  $\text{H}_2\text{O}_2$ , το οποίο με τη σειρά του μπορεί να μετατραπεί σε νερό, και άρα, να μην αποτελεί πρόβλημα για το κύτταρο.

Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι έχουν γίνει εκτενείς έρευνες όσον αφορά το ρόλο του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στο ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum – ER) κυττάρων ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (κατά κύριο λόγο, καλλιέργειών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων). Αυτές έχουν δείξει ότι το  $\text{H}_2\text{O}_2$  μπορεί να δράσει σαν αποδέκτης ηλεκτρονίων κατά τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών από ελεύθερες θιόλες κυστεϊνών στο συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα, μέσω της δημιουργίας ενδιάμεσων σουλφενικού οξέος (Bulleid and Ellgaard, 2011; Margittai et al., 2012; Tavender et al., 2010).

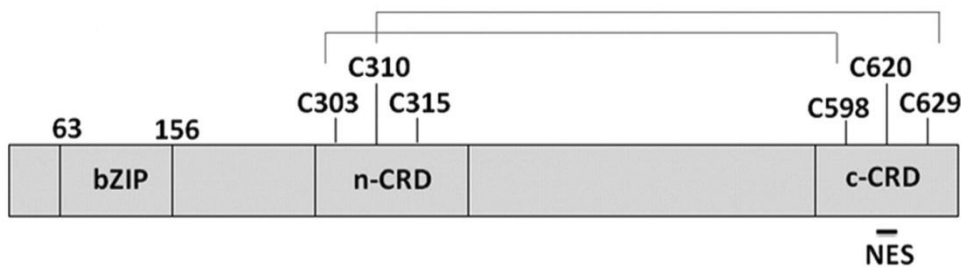
### 3.2. Ο φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης Gpx3 στον σακχαρομύκητα: το μονοπάτι ενεργοποίησης του Yap1

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 3 (glutathione peroxidase 3 – Gpx3; επίσης γνωστή και ως Hgr1 και Orp1) είναι μια υπεροξειδάση θειολών μοριακού βάρους 18kDa, που δρα ως υποδοχέας  $\text{H}_2\text{O}_2$  στο κυτταρόπλασμα του σακχαρομύκητα. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να δρα σαν αισθητήρας των ενδοκυττάρων επιπέδων του  $\text{H}_2\text{O}_2$  και να το χρησιμοποιεί ως σηματοδοτικό μόριο για την ενεργοποίηση γονιδίων σημαντικών στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες (Delaunay et al., 2002).

Στον σακχαρομύκητα, η πρωτεΐνη που δρα ως ο κεντρικός ρυθμιστής της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Yap1 (yeast AP-1). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 72kDa, που ανήκει στην κατηγορία των bZIP (“basic leucine zipper”) μεταγραφικών παραγόντων. Ενεργοποιείται από την παρουσία υψηλών επιπέδων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή άλλων παραγόντων που παρεμβάλλονται στη φυσιολογική κατάσταση των θειολών (π.χ. diamide) μέσω της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών, και αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στην τοποθέτηση του παράγοντα Yap1 στον πυρήνα του κυττάρου. Μόλις βρεθεί στον πυρήνα, ο παράγοντας αυτός είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση περίπου 100 γονιδίων για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες, συμπεριλαμβανομένων μιας θειορεδοξίνης (Trx) και μιας αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Glr) (Delaunay et al., 2000, 2002; Paulsen and Carroll, 2009).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Yap1 έχει τη δομή που φαίνεται στην εικόνα 9, με μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA (bZIP) στο αμινοτελικό της άκρο και δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες (cysteine rich domains – CRDs) στο αμινοτελικό (n-CRD) και στο καρβοξυτελικό άκρο (c-CRD). Η πρωτεΐνη φέρει ένα μη-τυπικό μοτίβο πλούσιο σε λευκίνες ως σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal – NES), το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό της c-CRD περιοχής. Υπο φυσιολογικές καταστάσεις, η πρωτεΐνη Yap1 έχει την ικανότητα να εισέρχεται στον πυρήνα, παρ’όλα αυτά δεν μπορεί να διατηρηθεί εκεί, καθώς υπάρχουν πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν το NES και την εξάγουν στο κυτταρόπλασμα. Σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες, έχουμε τη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών που απεικονίζονται στην εικόνα 9, ανάμεσα στις κυστεΐνες των δύο CRD περιοχών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το NES να μην μπορεί πλέον να αναγνωριστεί από τις πρωτεΐνες-εξαγωγείς του πυρήνα, με την πρωτεΐνη να κατακρατάται στον πυρήνα και να εκκινεί τη μεταγραφή των ~100 γονιδίων που ρυθμίζει (Mulford and Fassler, 2011; Yan et al., 1998).

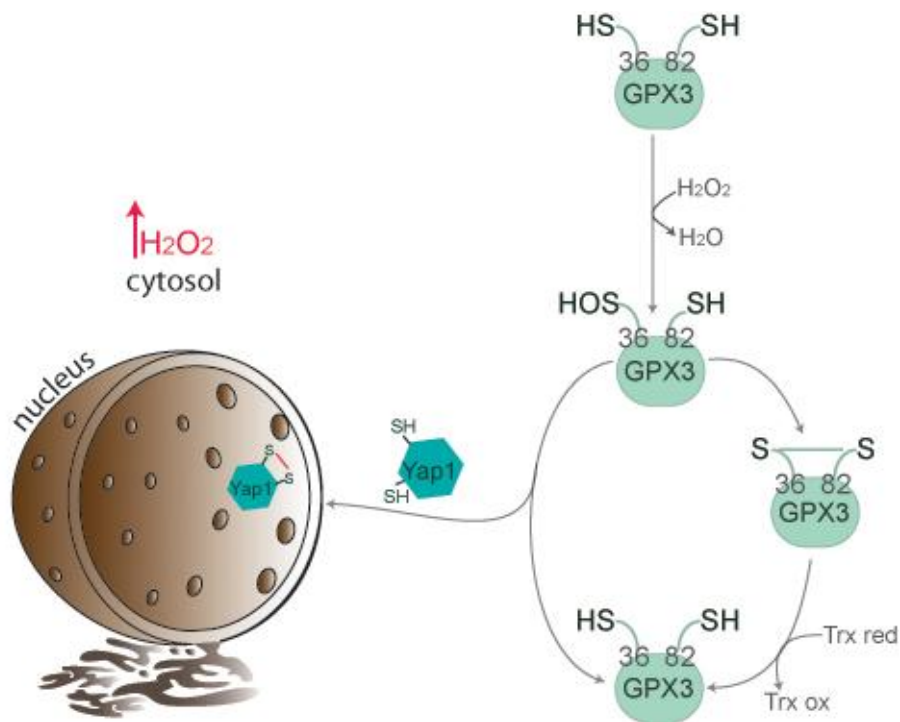
Έχει φανεί ότι σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών που ενεργοποιούν τον παράγοντα Yap1 παίζει η Gpx3 μέσω της δημιουργίας μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες, με ένα μηχανισμό που θα αναλυθεί παρακάτω. Επιπροσθέτως, ο Yap1 μπορεί να αλληλεπιδράσει και με τις πρωτεΐνες Ybp1 και Ybp2 (Yap-binding proteins), που έχουν φανεί να επηρεάζουν την πυρηνική τοποθέτηση του Yap1 κάτω από συνθήκες στρες (Gulshan et al., 2004; Veal et al., 2003).



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών του μεταγραφικού παράγοντα Yap1. Διακρίνονται οι δύο πλούσιες σε κυστεΐνες περιοχές (CRDs), καθώς και η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (bZIP). Εικόνα από (Mulford and Fassler, 2011)

Το μοντέλο που προτάθηκε από τους Delauney et al. (2002) προτείνει ότι η Gpx3 έχει διττό ρόλο ως αισθητήρας (sensor) και ως καταναλωτής (scavenger) του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο κυτταρόπλασμα. Πιο συγκεκριμένα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να οξειδώσει την ενεργή κυστεΐνη της Gpx3 (Cys36) σε σουλφενικό οξύ. Από αυτό το σημείο και πέρα, η αντίδραση μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικές οδούς (Εικόνα 10):

- a) **Καταναλωτής (scavenger):** Η ομάδα του σουλφενικού οξέος μπορεί να αλληλεπιδράσει με την Cys82 της Gpx3, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού και την οξείδωση της πρωτεΐνης. Η Gpx3 μπορεί να ανακυκλωθεί μέσω της δράσης της πρωτεΐνης Trx1.
- b) **Αισθητήρας (sensor):** Η ομάδα του σουλφενικού οξέος μπορεί να αλληλεπιδράσει με την Cys598 του μεταγραφικού παράγοντα Yap1, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Αυτό οδηγεί σε μια ανταλλαγή θιόλης-δισουλφιδίου και την τελική δημιουργία ενός δισουλφιδικού δεσμού ανάμεσα στις κυστεΐνες 598 και 303 του Yap1. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η δημιουργία αυτού του δισουλφιδικού δεσμού καλύπτει το NES που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του Yap1 και καθιστά ικανή την κατακράτηση του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα (Delaunay et al., 2002; Paulsen and Carroll, 2009).



**Εικόνα 10:** Μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Yap1. Η Gpx3 μπορεί να “αισθανθεί” ή/και να καταναλώσει το  $H_2O_2$  που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της οξείδωσης των ενεργών κυστεϊνικών καταλοίπων Cys36 και Cys82. Το μονοπάτι μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικές οδούς: α) το  $H_2O_2$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη Gpx3 προκειμένου να αυτο-οξειδωθεί, και στη συνέχεια, να ανακυκλωθεί μέσω της δράσης της Trx1, ή β) το  $H_2O_2$  μπορεί να γίνει αιθητό από τη Gpx3, μέσω της σουλφενυλίωσης της Cys36, ώστε αυτή να μπορεί να αλληλεπιδράσει και να ενεργοποιήσει το μεταγραφικό παράγοντα Yap1.

### 3.3. Πρόσφατες ανακαλύψεις και προοπτικές

Μια πρόσφατη δημοσίευση από την ερευνητική ομάδα του Chris Meisinger (Vögtle et al., 2012) περιέγραψε το πρωτέωμα του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η Gpx3 δεν εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στο διαμεμβρανικό χώρο. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερα

σημαντική, καθώς αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να αξιοποιηθεί από τη Gpx3 με αντίστοιχο τρόπο όπως και στο ER. Αυτό, με τη σειρά του, θα μπορούσε να σημαίνει ότι υπάρχει πιθανή σύνδεση της παρουσίας της Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο με το μονοπάτι Mia40-Erv1 που περιγράφηκε παραπάνω.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να δημιουργηθεί ως παραπροϊόν της λειτουργίας της Erv1, καθώς και από άλλες διαδικασίες που συμβαίνουν φυσιολογικά στο μιτοχόνδριο (π.χ. κατάλυση των ανιόντων υπεροξειδίου από τη δράση της δισμουτάσης υπεροξειδίου Sod1). Η ανακάλυψη ότι η Gpx3 εντοπίζεται και στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων δημιουργεί το ερώτημα του αν τα μιτοχόνδρια μπορούν να αξιοποιήσουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για να εισάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς στο συγκεκριμένο διαμέρισμα. Πιο συγκεκριμένα, το ερώτημα που τίθεται είναι το κατά πόσο το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη Gpx3 προκειμένου να επανοξειδώσει τη Mia40 και να την επαναφέρει στην λειτουργική της κατάσταση. Αυτή η εικασία ενισχύεται από τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν πρόσφατα όσον αφορά έναν καινούριο μηχανισμό εισαγωγής δισουλφιδικών δεσμών στο ενδοπλασματικό δίκτυο ανθρώπινων κυττάρων, μέσω της δράσης της πρωτεΐνης PrxIV (peroxiredoxin IV) (Tavender et al., 2010). Περαιτέρω ενίσχυση της εικασίας επέρχεται από το γεγονός ότι οι δύο πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την ανακύκλωση της Gpx3 στο κυτταρόπλασμα (οι Trx1 και Trr1 (thioredoxin reductase – αναγωγάση της θειορεδοξίνης)) εντοπίζονται και αυτές στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Vögtle et al., 2012).

Στόχος της συγκεκριμένης διατριβής ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το αν η Gpx3 έχει την ικανότητα να ανακυκλώνει τη Mia40, καθώς και το αν αυτό το εναλλακτικό μονοπάτι οξειδωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και από άλλες πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου. Άρα, η παρουσία της Gpx3 θα μπορούσε από τη μια να υποδυναμεί την ύπαρξη ενός εναλλακτικού μονοπατιού επανοξειδωσης πρωτεϊνών, ενώ από την άλλη να θεωρηθεί ότι αποτελεί μέρος ενός εναλλακτικού μονοπατιού καταπολέμησης του οξειδωτικού στρες.

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### Υλικά και Μέθοδοι

---

## **ΥΛΙΚΑ**

### **Ένζυμα**

Όλες οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες MINOTECH και NEW ENGLAND BIOLABS. Η T4 DNA Ligase προήλθε από την εταιρία MINOTECH BIOTECHNOLOGY. Τα θερμοανθεκτικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμερισμού (PCR) προήλθαν από τις εταιρίες MINOTECH BIOTECHNOLOGY (Taq Polymerase) και Stratagene (Pfu Ultra DNA Polymerase).

### **Μεμβράνες**

Για τη μεταφορά πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκαν οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran (μέγεθος πόρου 0.45μm) και PVDF (μέγεθος πόρου 0.2μm) της εταιρίας GE Healthcare.

### **Ολιγονουκλεοτίδια**

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής προήλθαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ (IMBB-FORTH).

### **Αντισώματα**

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη εργασία προήλθαν από τις εταιρίες Davids Biotechnologie και Sigma.

### **Καθαρισμένες πρωτεΐνες**

Οι καθαρισμοί (purifications) των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν από τον Χ. Ποζίδη. Οι πρωτεΐνες αυτές καθαρίστηκαν από βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες είχε γίνει υπερέκφραση τους. Οι διαδικασίες της υπερέκφρασης και του καθαρισμού περιγράφονται στο επόμενο κεφάλαιο.

### **Χρωστικές**

Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται από τους Sambrook και Russell στο εργαστηριακό εγχειρίδιο (Sambrook 2001). Για τη χρώση πρωτεϊνών κατόπιν ηλεκτροφόρησής τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. Για τη χρωση πρωτεϊνών μετά από ανοσοαποτύπωσή τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Ponceau S.

### **Θρεπτικά υλικά**

Τα θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη τόσο των βακτηριακών κυττάρων, όσο και των κυττάρων σακχαρομύκητα, κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγχειριδίων Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel F.M and K. 1999) και Molecular Cloning (Sambrook 2001).

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό LB (Lysogeny Broth) συμπληρωμένο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά [1% (w/v) bacto-tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract και 1% (w/v) NaCl (+ 1.5% (w/v) agar για την παρασκευή στερεών μέσων καλλιέργειας)]

Για την ανάπτυξη των κυττάρων σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκαν τόσο πλούσια όσο και φτωχά θρεπτικά μέσα, ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος.

- YPD/YPGal/YPL (πλούσια θρεπτικά μέσα)  
2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη για τα YPD, γαλακτόζη για τα YPGal και γαλακτικό οξύ για τα YPL), 1% (w/v) yeast extract και 2% (w/v) peptone (+ 2% (w/v) agar για την παρασκευή στερεών μέσων καλλιέργειας)
- Synthetic Casamino acid media (SCD/SCGal/SCL)  
2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη για τα SCD, γαλακτόζη για τα SCGal και γαλακτικό οξύ για τα SCL), 0.67% (w/v) yeast nitrogen base w/o amino acids, 0.6% (w/v) casamino acids (+ 2% (w/v) agar για την παρασκευή στερεών μέσων καλλιέργειας)
- Synthetic (minimal) media (SD/SGal)  
2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη για τα SD και γαλακτόζη για τα SGal), 0.67% (w/v) yeast nitrogen base w/o amino acids (+ 2% (w/v) agar για την παρασκευή στερεών μέσων καλλιέργειας)

Συνέπεια της χρήσης των συνθετικών (synthetic) θρεπτικών μέσων ήταν η παρασκευή διαλυμάτων αμινοξέων και βάσεων που να μπορούν να προστεθούν σε αυτά ώστε τα κύτταρα να μπορούν να μεγαλώνουν λαμβάνοντας υπόψη και τις αυξοτροφίες τους. Τα διαλύματα αυτά ήταν τα εξής:

- Αδενίνη (τελική συγκέντρωση 40μg/ml)



- Ουρακίλη (τελική συγκέντρωση 20μg/ml)
- Λευκίνη (τελική συγκέντρωση 60μg/ml)
- Ιστιδίνη (τελική συγκέντρωση 20μg/ml)
- Τρυπτοφάνη (τελική συγκέντρωση 40μg/ml)

### **Βακτηριακά στελέχη**

Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία είναι τα **DH5α** – για την παραγωγή και τον επαναπολλαπλασιασμό ανασυνδυασμένων πλασμιδίων – και τα **BL21(DE3)** – για την υπερέκφραση πρωτεϊνών κλωνοποιημένων σε ειδικά πλασμίδια.

### **Στελέχη σακχαρομύκητα**

Τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν κατά της παρούσα εργασία αποτελούν τόσο στελέχη που είναι γνωστά από τη βιβλιογραφία (μητρικά στελέχη), όσο και στελέχη που κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

<b>Στέλεχος</b>	<b>Γονότυπος</b>	<b>Σύντομη περιγραφή</b>
FT5	MATα, ura3-52, trp I-Δ63, his3-Δ200, leu2::PET56	Wild type στέλεχος
BY4741	MATα, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0	Wild type στέλεχος
D273-10B	MATα	Wild type στέλεχος – χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μιτοχονδρίων
GalMia40	FT5 υπόβαθρο, όπου ο υποκινητής Gal1-10 έχει εισαχθεί μαζί με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη	Στέλεχος στο οποίο το γονίδιο Mia40 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή Gal1-10
Δgpx3 (BY4741)	BY4741 υπόβαθρο, όπου η	Στέλεχος στο οποίο

	απαλοιφή του γονιδίου έχει γίνει με τη χρήση κασετας καναμυκίνης	απουσιάζει η κωδική περιοχή του ενδογενούς γονιδίου Gpx3
--	--	--

**Πίνακας 1:** Στελέχη σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας

#### 1.1. Μεταλλαξιγένεση (Mutagenesis)

Για την δημιουργία της σημειακής μεταλλαγής C82A στο γονίδιο της Gpx3 χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο PCR based Quick Change site-directed mutagenesis. Σαν μήτρα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pSP64 στο οποίο είχε προηγουμένως κλωνοποιηθεί το αγρίου τύπου γονίδιο, ενώ η σχεδίαση των εκκινητών και οι συνθήκες της αντίδρασης έγιναν βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (Stratagene).

#### 1.2. Κλωνοποίηση (Cloning)

Οι επιθυμητές κλωνοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν με τον πολλαπλασιασμό μέσω PCR των ενθεμάτων και τη μετέπειτα πέψη τους χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Οι φορείς στους οποίους εντέθηκαν κόπηκαν με τα αντίστοιχα ένζυμα και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τη χρήση DNA λιγάσης, ώστε να προκύψει το επιθυμητό πλάσμιδιο.

Συγκεκριμένα, τα γονίδια τα οποία κλωνοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ybp1, Ybp2 στο φορέα pSP64 με τη χρήση των ενζύμων HindIII και BamHI
- Yap1 στο φορέα pSP64 με τη χρήση των ενζύμων HindIII και PstI
- Gpx3, Trx1, Trr1 στο φορέα pSP64 με τη χρήση των ενζύμων HindIII και PstI
- Gpx3, Trx1, Trr1 στο φορέα pET24 με τη χρήση των ενζύμων NdeI και XhoI

Όλες οι κλωνοποιήσεις ελέγχθηκαν με colony PCR και με περιοριστική κοπή χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, για να επιβεβαιωθεί ότι περιέχουν κάθε φορά το προς μελέτη γονίδιο. Για κάθε γονιδιακή κατασκευή ακολούθησε αλληλούχιση του DNA ενθέματος που εισήλθε, για επιβεβαίωση του αποτελέσματος της κλωνοποίησης.

#### 1.3. Ανοσοκατακρήμνιση

Οι πρωτεΐνες οι οποίες πρόκειται να μελετηθούν όσον αφορά τη δυνατότητα αλληλεπίδρασής τους επεξεργάζονται, ώστε να βρίσκονται στην επιθυμητή κατάσταση (οξειδωμένες ή ανηγμένες). Στη συνέχεια, αραιώνονται με το διάλυμα ανοσοκατακρύμησης (IP buffer) και επωάζονται με τα εκάστοτε αντισώματα και Protein A ή G σφαιρίδια (Amersham) για 2 ώρες στους 4°C. Το προσδεμένο υλικό ξεπλένεται τρεις φορές με διάλυμα IP και επαναδιαλύεται σε Laemmli sample buffer. Το ανοσοκατακρημνισμένο υλικό αναλύεται σε αναγωγικό ή μη-αναγωγικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (ανάλογα με την περίπτωση), και ελέγχεται είτε με αυτοραδιογραφία (όταν οι πρωτεΐνες είναι ραδιενεργά σημασμένες) είτε με ανοσοαποτύπωση (western blot).

## **2. *In organello* τεχνικές**

### **2.1. Απομόνωση μιτοχονδρίων**

Η απομόνωση μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκε από το αγρίου τύπου στέλεχος D273-10B (MATα). Για να μπορέσει να επαχθεί η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στους 30°C και χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα το γαλακτικό οξύ. Η ουσία αυτή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας στο κυτταρόπλασμα (μέσω της γλυκόλυσης), με αποτέλεσμα να επάγεται η ανάπτυξη μόνο των κυττάρων αυτών που έχουν λειτουργικά μιτοχόνδρια.

Η διαδικασία απομόνωσης των μιτοχονδρίων γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Daum et al. Το πρωτόκολλο αυτό περιλαμβάνει τη χρήση του πολυσακχαρίτη Nycodenz για το διαχωρισμό των μιτοχονδρίων από τα λοιπά υποκυτταρικά οργανίδια.

Για την απομόνωση μιτοχονδρίων από τα στελέχη GalMia40 και GalMia40 *Δaif1* προστέθηκε 0.2% (w/v) γλυκόζη και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 24 ώρες στους 30°C, ώστε να επιτευχθεί πλήρης καταστολή του ενδογενούς γονιδίου.

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, τα μιτοχόνδρια φυλάσσονται στους -80°C.

### **2.2. Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών με το *in vitro* σύστημα συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης**

Για τη σύνθεση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών γίνεται χρήση του TNT SP6-coupled transcription/translation kit (Promega), ακολουθώντας τις οδηγίες που προσφέρει ο κατασκευαστής. Η σήμανση των πρωτεϊνών προϋποθέτει την ύπαρξη πλασμιδίου όπου το επιθυμητό γονίδιο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της SP6 πολυμεράσης και πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένη <sup>35</sup>S μεθειονίνη. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε κυτταρικό εκχύλισμα ερυθρών αιμοσφαιρίων από κουνέλι (rabbit reticulocyte lysate), χρησιμοποιώντας την SP6 πολυμεράση και τοποθετείται στους 30°C για 90 λεπτά. Η πρωτεΐνη απομακρύνεται από τα ριβοσώματα με φυγοκέντρηση στα 21000g στους 4°C, για 30 λεπτά.

### **2.3. Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια**

Τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύονται σε import buffer σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml, παρουσία 2mM ATP και 2.5mM NADH και εξισορροπούνται στους 30°C. Στην συνέχεια, προστίθεται το ραδιενεργό πρόδρομο υπόστρωμα (ανάλογα με το ποσοστό σήμανσης του υποστρώματος κυμαίνεται από 2-10% κ.ο.) και συνεχίζεται η επώαση στους 30°C για τον απαιτούμενο χρόνο σύμφωνα με το πείραμα. Σε πειράματα κινητικής, με το τέλος του χρόνου επώασης, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Μετά την αντίδραση εισαγωγής, τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 14000 στροφές στους 4°C. Το ραδιενεργό πρόδρομο μόριο που δεν έχει εισαχθεί στα μιτοχόνδρια απομακρύνεται με επαναδιάλυση του ίζηματος σε ισοτονικό διάλυμα παρουσία πρωτεϊνάσης K (0.025 mg/ml) στους 4°C για 20 λεπτά ή τρυψίνης (0.05mg/ml) στους 4°C για 30 λεπτά. Η αναστολή της δράσης των πρωτεασών πραγματοποιείται με την προσθήκη PMSF (2mM) για 10 λεπτά στους 4°C για την πρωτεϊνάση K και με την προσθήκη SBTI (soybean trypsin inhibitor – 0.5mg/ml) για 10 λεπτά στους 4°C για την τρυψίνη. Τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 15μl 2x Laemmli sample buffer με/χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα δείγματα βράζονται στους 95°C για 5 λεπτά και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε 12% Tris-Tricine SDS-PAGE. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης στεγνώνουν με τη χρήση της συσκευής Biorad Gel Dryer και στην συνέχεια, εκτίθενται για 24-48 ώρες σε ειδική κασέτα αποθήκευσης του ραδιενεργού σήματος. Το αποτέλεσμα του πειράματος εισόδου αναλύεται στον phosrho-imager με αυτοραδιογραφία (Molecular Dynamics).

## 2.4. Δημιουργία μιτοπλαστών

Για την δημιουργία μιτοχονδρίων απαλλαγμένων από την εξωτερική τους μεμβράνη (μιτοπλάστες), τα μιτοχόνδρια επωάζονται με υποτονικό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύονται σε συγκέντρωση 5mg/ml με 1x import buffer και αμέσως μετά, αραιώνονται σε 9 όγκους mitoplasting buffer, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση μιτοχονδρίων να είναι 0.5mg/ml. Το υπερκείμενο (διαμεμβρανικός χώρος) διαχωρίζεται από την πελέτα (μιτοπλάστες και τμήματα της εξωτερικής μεμβράνης) με φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές στους 4°C για 5 λεπτά.

### **Διαλύματα**

#### Import buffer

100mM Hepes, pH 7.1, 1.2M sorbitol, 4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM L-Methionine, 2mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), 2mM ATP, 2.5mM NADH.

#### Ισοτονικό διάλυμα επαναδιάλυσης μιτοχονδρίων

0.6M sorbitol, 20mM K<sup>+</sup>MES pH 7.4

#### Mitoplasting buffer

20mM Hepes-KOH pH 7.4, 1mM DTT

#### 10x Laemmli sample buffer

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

#### Coomassie Staining Solution

30% methanol, 10% acetic acid, 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250

#### Destaining buffer

15% methanol, 10% acetic acid

### 3. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών

#### 3.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Tris-Tricine SDS PAGE)

Για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Τα πρωτεϊνικά δείγματα επεξεργάζονται με διάλυμα που περιέχει SDS, ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Στην περίπτωση που εξετάζεται ο σχηματισμός ομοιοπολικά συνδεδεμένων συμπλόκων στα δείγματα, δεν προστίθενται αναγωγικοί παράγοντες, όπως β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT, οι οποίοι σπάνε δισουλφιδικούς δεσμούς. Για τον πολυμερισμό των πηκτωμάτων χρησιμοποιείται 0.1% APS και 0.01% TEMED. Το πήκτωμα επιστοιβάξης εναποθέτεται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού ώστε να διευκολύνει την είσοδο των πρωτεϊνών μέσα στο πλέγμα του πηκτώματος διαχωρισμού. Η σύσταση των διαλυμάτων που απαιτούνται για την ηλεκτοφόρηση ενός πηκτώματος Tris-Tricine αναφέρονται παρακάτω:

##### 12% πήκτωμα διαχωρισμού (Separating)

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

##### 5% πήκτωμα επιστοιβάξης (Stacking)

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

##### Cathode buffer

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

##### Anode buffer

0.2M Tris pH 8.9

#### 3.2. Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης πραγματοποιείται με τη χρώση Coomassie Brilliant Blue. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η Coomassie Brilliant Blue R-250 η οποία βάφει μπλε τις πρωτεϊνικές ζώνες και έχει

ευαισθησία μέχρι 0.1μg. Στην περίπτωση που τα πρωτεϊνικά δείγματα είναι ραδιενεργά τότε οι σημάνσεις μπορούν να φανούν με αυτοραδιογραφία, δηλαδή με την τοποθέτηση ενός φιλμ ακτινογραφίας επάνω στην πηκτή. Πιο συγκεκριμένα, το πήκτωμα βάφεται με διάλυμα χρώσης το οποίο περιέχει επιπλέον οξικό οξύ και μεθανόλη για την μονιμοποίηση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, η περίσσια Coomassie απομακρύνεται με τη χρήση διαλύματος αποχρωματισμού, που περιέχει οξικό οξύ και μεθανόλη, αλλά απουσιάζει η χρωστική. Το πήκτωμα στεγνώνεται σε συσκευή Biorad Gel Dryer και τοποθετείται σε κασέτα για έκθεση. Στην περίπτωση που απαιτείται να γίνει ενίσχυση του ραδιενεργού σήματος, το πήκτωμα θερμαίνεται με 5% TCA για 5 λεπτά, εξουδετερώνεται το χαμηλό pH με 1M Tris-base για 2 λεπτά και επώάζεται για 20 λεπτά με 1M σαλικυλικό νάτριο (sodium salicylate) προτού στεγνωθεί στον gel dryer και τοποθετηθεί στην κασέτα.

### **3.3. Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ανοσοαποτύπωση (Western blotting)**

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

### **3.4. Έκφραση πρωτεϊνών**

Όλες οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εκφράστηκαν στο στέλεχος κυττάρων *E. coli* BL21(DE3). Αρχικά, μοναδικές αποικίες εμβολιάζονται σε μικρές καλλιέργειες LB, με τα εκάστοτε αντιβιοτικά. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών για 14 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια, αραιώνονται 1:50 σε φρέσκο θρεπτικό υγρό με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Τα



κύτταρα επωάζονται και πάλι στους 37°C, μέχρι να φτάσουν περίπου στο μέσο της εκθετικής φάσης της ανάπτυξής τους (O.D ~ 0.4-0.7). Σε αυτό το σημείο, προστίθενται 0.4 mM IPTG και ακολουθεί επώαση για κατάλληλο χρόνο και σε κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με το φορέα που χρησιμοποιείται και την πρωτεΐνη που θέλουμε να εκφράσουμε. Στις περιπτώσεις των γονιδίων Grx3 και Trx1 (που κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET24), η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιείται στους 18° C για 12-14 ώρες (overnight).

Μετά την ολοκλήρωση της επαγωγής, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 5000g στους 4°C. Οι κυτταρικές πελέτες είτε χρησιμοποιούνται αμέσως για απομόνωση πρωτεΐνης είτε φυλάσσονται στους -20°C μέχρι την ημέρα του καθαρισμού.

### **3.5. Καθαρισμός και μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης**

Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε διάλυμα A (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4) και σπάνε με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Οι πρωτεΐνες Grx3 και Trx1 δε δημιουργούν συσσωμάτωμα και άρα μπορούν να απομονωθούν από την υπερκείμενη φάση (κυτταρόπλασμα). Το υπερκείμενο προσδένεται σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads, Qiagen). Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια ξεπλένονται με διάλυμα A στο οποίο έχουν προστεθεί 50 mM ιμιδαζόλιο. Οι πρωτεΐνες εκλύονται από τα σφαιρίδια με διάλυμα A στο οποίο έχουν προστεθεί 300 mM ιμιδαζόλιο.

Σε κάποιες περιπτώσεις, είναι πιθανό η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη να βρίσκεται ως επί το πλείστον στο κλάσμα της πελέτας (λόγω σχηματισμού συσσωματωμάτων). Η διαδικασία για τον καθαρισμό είναι η ίδια, με τη διαφορά ότι στο διάλυμα A προστίθενται 8M ουρίας.

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

### **3.6. Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης**

Για τη μέτρηση της διαφοράς ενθαλπίας ( $\Delta H$ ), της εντροπίας ( $\Delta S$ ) και της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) της πρόσδεσης της ΔN290Mia40 SPS με την Grx3 C82A χρησιμοποιήθηκε η

τεχνική της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης. Τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση μικροθερμιδόμετρου VP-ITC (Microcal). Τα πρωτεϊνικά δείγματα υπέστησαν εκτεταμένη διαπίδυση διαμέσω μεμβράνης (dialysis) σε διάλυμα 50 mM KPi pH 7.4 για 12 ώρες στους 4 °C.

Οι δύο πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν σε μια πληθώρα διαφορετικών συγκεντρώσεων (και συνδυασμών αυτών των συγκεντρώσεων) προκειμένου να εξακριβωθεί ο καταλληλότερος συνδυασμός τους. Οι συγκεντρώσεις τους προσδιορίστηκαν μετρώντας την απορρόφηση στα 280 nm, με βάση τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές της σταθεράς απόσβεσης.

### **3.7. Μέθοδος πρόσδεσης σε συστοιχία ακινητοποιημένων πεπτιδίων (Pepscan assay)**

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης Mia40-Grx3 χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη (JPT Technologies) που έφερε 57 ακινητοποιημένα πεπτίδια, μήκους 13 αμινοξέων το καθένα, τα οποία στο σύνολό τους αφορούσαν την αμινοξική αλληλουχία της Grx3 πρωτεΐνης του οργανισμού *S. cerevisiae*. Τα 13-μερή πεπτίδια αλληλεπικαλύπτονταν μεταξύ τους ανά 10 αμινοξικά κατάλοιπα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με 500nM καθαρισμένην ανασυνδυασμένην πρωτεΐνην ΔN290Mia40wt ή ΔN290Mia40 LMFFFM σε διάλυμα που περιείχε 100mM KCl, 30mM Tris pH 8.0, 5% sucrose, 0.5% Tween-20, 0.5% BSA, με ανάδευση για δύο ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν πλυσίματα της μεμβράνης με 1x T-TBS (50mM Tris pH 8, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 0,05% Tween 20) καθώς και μεταφορά της προσδεμένης Mia40 σε μεμβράνη PVDF, ως εξής: η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω σε χαρτιά Whatman, εμποτισμένα με Anode buffer II (300mM Tris, 20% (v/v) methanol) και Anode buffer I (30mM Tris, 20% (v/v) methanol) και στη συνέχεια πάνω από τη PVDF τοποθετήθηκε η μεμβράνη των πεπτιδίων. Πάνω από αυτή, τέλος, τοποθετήθηκαν χαρτιά Whatman εμποτισμένα με Cathode buffer (25 mM Tris, 40 mM 6-aminoheptanoic acid, 20% (v/v) methanol pH 9.2). Η μεταφορά της Mia40 από την μεμβράνη πεπτιδίων στην PVDF πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια στα 55mA/cm<sup>2</sup>. Η πρώτη και η δεύτερη μεταφορά έγιναν για 30 λεπτά η καθεμία, ενώ η τρίτη για 60 λεπτά, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης μεταφορά της πρωτεΐνης Mia40 που προσδέθηκε στα πεπτίδια της μεμβράνης. Η ανίχνευσή της έγινε χρησιμοποιώντας το ειδικό για αυτή αντίσωμα α-Mia40

(αραίωση 1-1000) και το δευτερογενές α-rabbit (Sigma, αραίωση 1-10000). Τα σήματα ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Image Quant 5.2. Σημειώνεται ότι τα πεπτίδια της Gpx3 που ακινητοποιήθηκαν πάνω στη μεμβράνη αφορούσαν την επιμηκυσμένη μορφή της πρωτεΐνης (+18Gpx3), καθώς επίσης και ότι οι κυστεΐνες της Gpx3 αντικαταστήθηκαν με σερίνες για την αποφυγή σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πεπτιδίων.

### **3.8. Ομοιοπολική διασύνδεση πρωτεϊνών με τη χρήση προσδετών (crosslinkers)**

Για την ανίχνευση του ενδιάμεσου συμπλόκου Mia40-Gpx3 έγινε χρήση μορίων που έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες και να συγκρατούν μαζί πρωτεΐνες όταν βρίσκονται σε πολύ κοντινές αποστάσεις στο χώρο (δηλαδή αλληλεπιδρούν). Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν οι προσδέτες γλουταραλδεΐδη (GA) και BS3. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών Mia40 και Gpx3 χρησιμοποιώντας 3 όγκους (3V) κορεσμένου διαλύματος θειούχου αμμωνίου (ammonium sulphate) για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 25000g για 30 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε επώαση της Mia40 με 5mM DTT (dithiothreitol), προκειμένου το CPC μοτίβο της να βρεθεί σε ανηγμένη κατάσταση και επώαση της Gpx3 με 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, προκειμένου να οξειδωθεί πλήρως.

#### - Για το προσδέτη GA

Οι πρωτεΐνες επώαστηκαν με την κατάλληλη συγκέντρωση διασυνδέτη (έγιναν διαβαθμίσεις συγκεντρώσεων τόσο για τις πρωτεΐνες όσο και για το διασυνδέτη) για 5 λεπτά στους 30°C. Μετά το πέρας του χρόνου, οι αντιδράσεις σταμάτησαν με την προσθήκη 10μl 1M Tris-HCl pH 7.4. Τέλος, προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα Laemmli sample buffer χωρίς αναγωγικό παράγοντα (DTT ή β-μερκαπτοαιθανόλη) και τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

#### - Για τον προσδέτη BS3

Οι πρωτεΐνες επώαστηκαν με την κατάλληλη συγκέντρωση διασυνδέτη (έγιναν διαβαθμίσεις συγκεντρώσεων τόσο για τις πρωτεΐνες όσο και για το διασυνδέτη) για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας του χρόνου, οι αντιδράσεις σταμάτησαν με την προσθήκη 10μl 1M Tris-HCl pH 7.4. Τέλος, προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα Laemmli sample buffer χωρίς αναγωγικό παράγοντα (DTT ή β-μερκαπτοαιθανόλη) και τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

## 4. Χειρισμός κυττάρων σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae*)

### 4.1. Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα

Για το μετασχηματισμό των κυττάρων του σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της TRAF0 με οξικό λίθιο (LiAc). Αρχικά, έγινε καλλιέργεια κυττάρων, μέχρις ότου αυτά να βρεθούν στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους ( $OD \sim 0.4-0.8$ ). Στη συνέχεια, η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 3000rpm για 5 λεπτά, ξεπλύθηκε χρησιμοποιώντας  $\frac{1}{2}$  V αποστειρωμένο και διπλά απεσταγμένο νερό (st. ddH<sub>2</sub>O) και επαναφυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Η κυτταρική πελέτα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε 1ml 100mM LiAc και μεταφέρθηκε σε σωληνάκι τύπου erpendorf. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 13000rpm για 15'' και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια (με τη σειρά με την οποία αναφέρονται):

- 240μl 50% PEG<sub>3000-5000</sub>
- 36μl 1M LiAc
- 25μl ssDNA (2mg/ml)
- (DNA + st. ddH<sub>2</sub>O) = 50μl - Η ποσότητα του DNA αλλάζει ανάλογα με τη συγκέντρωσή του.

Μόλις έχουν προστεθεί όλα τα αντιδραστήρια, ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) μέχρι να επαναδιαλυθεί πλήρως η πελέτα των κυττάρων. Μια ανάδευση 1<sup>ος</sup> λεπτού συνήθως αρκεί. Αν δεν είναι δυνατή η επαναδιάλυση, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε πιπέτα.

Στο επόμενο στάδιο, το σωληνάκι με το μείγμα του μετασχηματισμού επωάζεται στους 30°C (ή χαμηλότερη θερμοκρασία, αν το απαιτεί το στέλεχος) για 30 λεπτά, προτού υποστεί το θερμικό σοκ (heat shock) στους 42°C για 20-25 λεπτά. Τα κύτταρα τότε φυγοκεντρούνται στις 8000rpm για 1 λεπτό και αφαιρείται όλο το υπερκείμενο. Είναι σημαντικό να μην μείνει μεγάλη ποσότητα PEG στα κύτταρα. Τέλος, ακολουθείται μία από τις παρακάτω δύο οδούς, ανάλογα με την περίπτωση:

- Αν δεν πρόκειται για περίπτωση επιλογής σε αντιβιοτικό, τότε επαναδιάλυσουμε την πελέτα των κυττάρων σε  $\leq 200\mu\text{l}$  st. ddH<sub>2</sub>O και απλώνουμε σε πιάτο επιλογής.

- Αν πρόκειται για περίπτωση επιλογής σε αντιβιοτικό, τότε επαναδιαλύουμε σε περίπου 1ml YPD (μη επιλεκτικού θρεπτικού μέσου) και επωάζουμε για 2-3 ώρες για να γίνει επανάκαμψη των κυττάρων. Στη συνέχεια, φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες με πάνω και άπλωμα σε πιάτο επιλογής.

#### **4.2. Αποσιώπηση γονιδίων σακχαρομύκητα (gene disruption)**

Η αποσιώπηση γονιδίων του σακχαρομύκητα βασίζεται στο φαινόμενο του ομόλογου αναδυνδασμού. Για την περίπτωση της διαγραφής του γονιδίου Aif1 από το γονιδίωμα του οργανισμού (στο στέλεχος GalMia40) χρησιμοποιήθηκε η κασέτα τρυπτοφάνης από το πλασμίδιο pYM6. Η συγκεκριμένη κασέτα ενισχύθηκε με PCR από το πλασμίδιο, χρησιμοποιώντας ένα σετ ολιγονουκλεοτιδίων (primers) που εμφάνιζαν συμπληρωματικότητα τόσο ως προς την κασέτα της τρυπτοφάνης, όσο και προς τις περιοχές του γονιδιώματος που περιβάλλουν το γονίδιο Aif1 (ανοδικά και καθοδικά αυτού). Το προϊόν αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού. Συνήθως απαιτούνται ποσότητες DNA από 1 έως 10μg.

#### **4.3. Έλεγχος μετασχηματισμένων στελεχών σακχαρομύκητα με τη χρήση PCR (Colony PCR)**

Αποικία του υπό έλεγχο στελέχους του σακχαρομύκητα λύεται σε 20μl 20mM NaOH (καυστικό νάτριο). Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 95° C και φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στις 13000rpm. 1μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την αντίδραση PCR.

## ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

### Αποτελέσματα

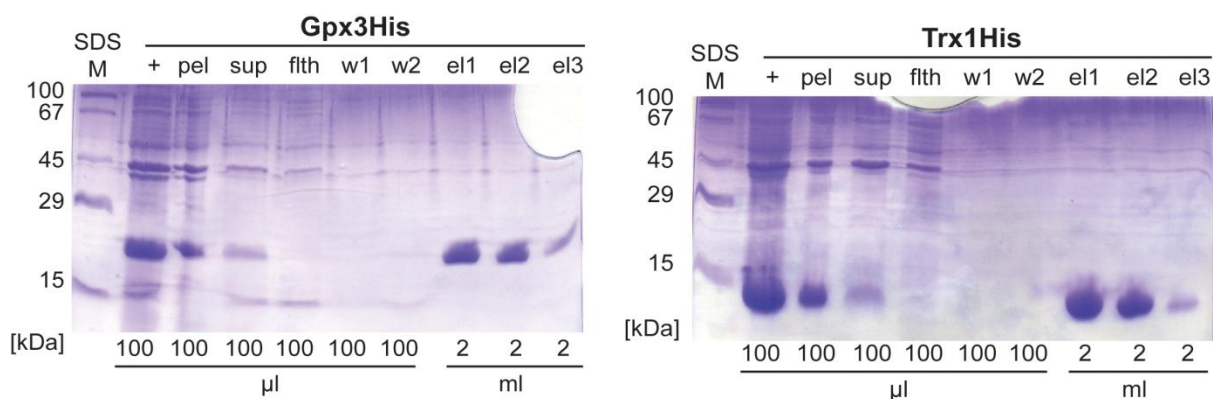
---

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Κεφάλαιο 1: Μηχανισμός ελέγχου των επιπέδων $H_2O_2$ στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

#### 1.1. Η πρωτεΐνη Gpx3 – γενικά χαρακτηριστικά

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, δύο ήταν οι σημαντικοί λόγοι που οδήγησαν στην μελέτη της πρωτεΐνης Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων: πρώτον, η ανακάλυψη ότι η παρουσία του  $H_2O_2$  στο ενδοπλασματικό δίκτυο φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα, και δεύτερον, ότι τα αποτελέσματα μίας μελέτης των πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας έδειξαν την παρουσία τριών νέων πρωτεϊνών στο διαμέρισμα, της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης Gpx3, της θειορεδοξίνης Trx1 και της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης Trr1. Οι πρωτεΐνες αυτές ήταν ήδη γνωστό ότι δρουν στο κυτταρόπλασμα σε μονοπάτια αντιμετώπισης οξειδωτικού στρες.

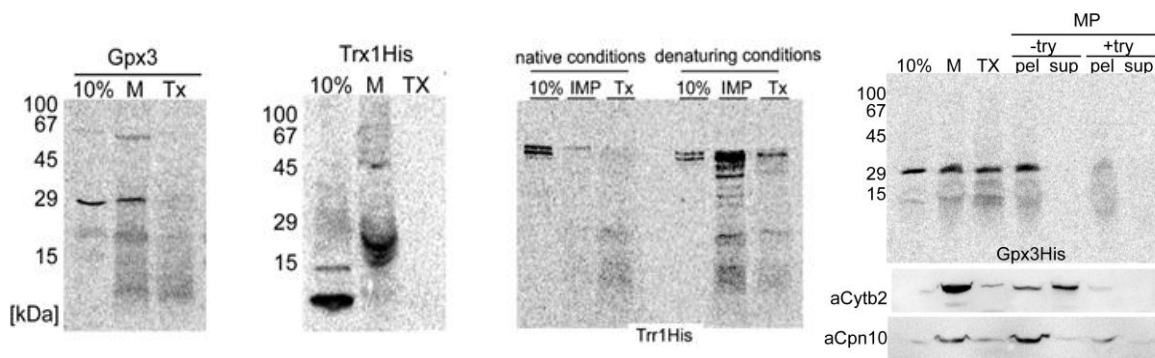


Εικόνα 11: Καθαρισμός των πρωτεϊνών Gpx3-His και Trx1-His

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών έπρεπε, κατ'αρχήν, να γίνουν οι κλωνοποιήσεις των γονιδίων σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, ώστε να είναι δυνατή η υπερέκφραση και ο καθαρισμός τους, αλλά και η παραγωγή τους ως ραδιενεργά μόρια. Γι'αυτούς τους λόγους, έγινε η κλωνοποίησή τους στους πλασμιδιακούς φορείς pET24 και pSP64, αντίστοιχα. Οι κλωνοποιήσεις αυτές έγιναν σε συνεργασία με την Α. Χατζή. Τα αποτελέσματα των καθαρισμών των πρωτεϊνών Gpx3 και Trx1 φαίνονται στην εικόνα 11.

## 1.2. Επιβεβαίωση της τοπολογίας της Gpx3

Η δημοσιευμένη μελέτη υποστήριξε την τοπολογία και των τριών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία μάζας σε συνδυασμό με πειράματα εισόδου σε μιτοχόνδρια. Παρ'όλα αυτά, θεωρήθηκε πρέπον να γίνει επιβεβαίωση της τοπολογίας τους. Γι'αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν πειράματα εισόδου σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Αυτά έδειξαν την δυνατότητα εισαγωγής της Gpx3 στα μιτοχόνδρια, και μάλιστα, ότι η πρωτεΐνη τοποθετείται πιο συγκεκριμένα στο διαμεμβρανικό χώρο, καθώς αποδομείται από την πρωτεάση τρυψίνη κατά τη διάρκεια της δημιουργίας μιτοπλαστών (Εικόνα 12)

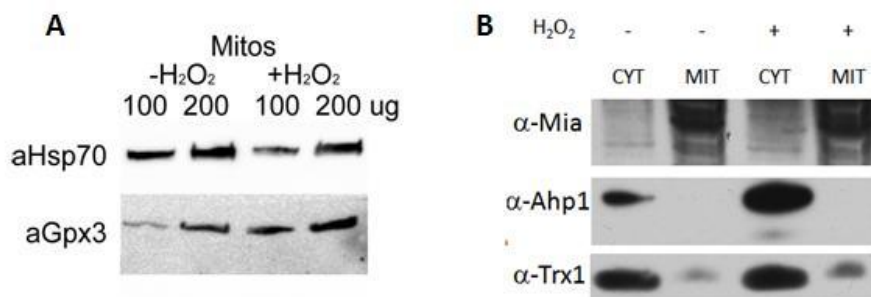


**Εικόνα 12:** Πειράματα εισόδου των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών Gpx3, Trx1 και Trr1. Και οι τρεις φέρουν την ικανότητα εισόδου στα μιτοχόνδρια. Στο δεξί τμήμα της εικόνας απεικονίζεται το πείραμα δημιουργίας μιτοπλαστών



Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζουν οι Trx1 και Trr1, που δείχνουν να εισέρχονται και οι δύο στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 12).

Θεωρήθηκε επίσης σημαντικό να ελεγχθεί το αν, κατά πόσο και κάτω από ποιές συνθήκες έχουμε παρουσία της Gpx3 και *in vivo*. Γι'αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε μιτοχόνδρια απομονωμένα από αγρίου τύπου στέλεχος (BY4741) που είχε προηγουμένως αναπτυχθεί είτε κάτω από στρεσογόνες (1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) είτε κάτω από μη στρεσογόνες συνθήκες. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από την εικόνα 13, τα επίπεδα τόσο της Gpx3 όσο και της Trx1 φαίνεται να είναι ελαφρώς αυξημένα στο κλάσμα των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί στρες.



**Εικόνα 13:** Ανίχνευση των επιπέδων των πρωτεϊνών Gpx3 (A) και Trx1 (B) με τη χρήση ανοσοαποτύπωσης (western blotting) σε μιτοχόνδρια που είτε έχουν υποστεί στρες είτε όχι. Το αντίσωμα α-Ahp1 έχει χρησιμοποιηθεί ως πρωτεΐνη-δείκτης του κυτταροπλάσματος και υποδεικνύει ότι ο διαχωρισμός των μιτοχονδρίων από το κυτταρόπλασμα έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς.

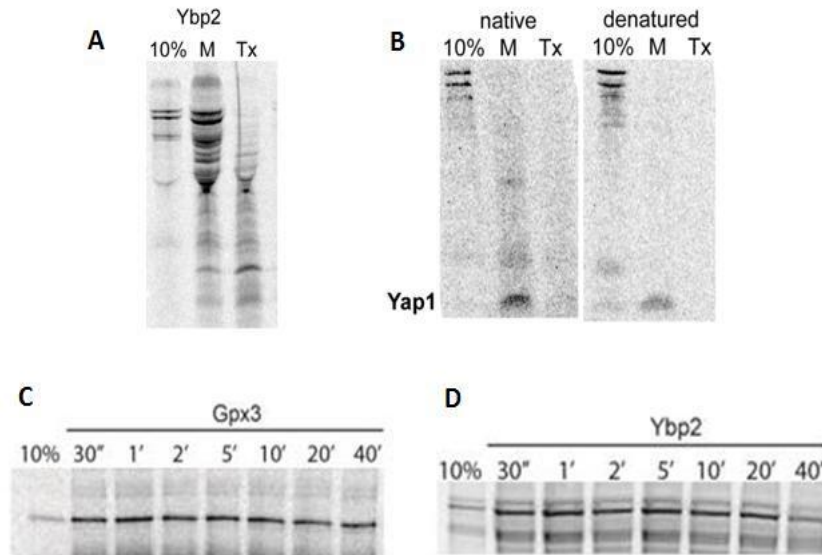
### 1.3. Αναζήτηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η πρωτεΐνη Gpx3 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Yap1. Συνεπώς, θεωρήθηκε σημαντικό να ελεγχθεί το αν η πρωτεΐνη Yap1, καθώς και οι δύο Yap-συνδεόμενες πρωτεΐνες (Yap-binding proteins) Ybp1 και Ybp2, είχαν και αυτές τη δυνατότητα να εισαχθούν στα μιτοχόνδρια.

Γι'αυτό το λόγο, έγινε κλωνοποίηση των γονιδίων αυτών σε πλασμιδιακούς φορείς pSP64, ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση πειραμάτων εισόδου των ραδιενεργών μορφών των πρωτεϊνών. Όπως φαίνεται από την εικόνα 14, η πρωτεΐνη Ybp2 μπορεί να εισαχθεί σε μιτοχόνδρια (το ίδιο ισχύει και για την πρωτεΐνη Ybp1 – δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Παρ'όλα αυτά, η πρωτεΐνη Yap1 δεν έχει την ικανότητα να εισάγεται σε μιτοχόνδρια, ούτε ως αναδιπλωμένη ούτε ως πλήρως αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτές τις παρατηρήσεις είναι το ότι, αφού η Gpx3 δεν βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο για να αλληλεπιδράσει με και να ενεργοποιήσει τον μεταγραφικό παράγοντα Yap1, είναι προφανές ότι η Gpx3 εκτελεί ένα διαφορετικό ρόλο στο διαμεμβρανικό χώρο απ'ότι στο κυτταρόπλασμα.

Πειράματα κινητικής που πραγματοποιήθηκαν για την εισαγωγή των Gpx3, Ybp1 και Ybp2 έδειξαν ότι η είσοδος και των τριών αυτών μορίων είναι αρκετά ταχεία διαδικασία, ενώ τα επίπεδά τους φαίνεται να διατηρούνται σταθερά κατά την πάροδο του χρόνου, χωρίς να παρατηρείται κάποια σημαντική αποδόμηση (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Α. Πείραμα εισόδου της πρωτεΐνης Ybp2 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Β. Πείραμα εισόδου της πρωτεΐνης Yap1 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. C,D. Πειράματα κινητικής της εισόδου των πρωτεϊνών Gpx3 και Ybp2.

#### 1.4. Είσοδος της Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

Για να γίνει δυνατή η καλύτερη κατανόηση του ρόλου της Gpx3 στα μιτοχόνδρια, θεωρήθηκε σημαντικό να εντοπιστούν τμήματα της αλληλουχίας του πρωτεϊνικού μορίου που θα μπορούσαν δυνητικά να δρουν ως σηματοδοτικές περιοχές για την εισαγωγή της στα μιτοχόνδρια.

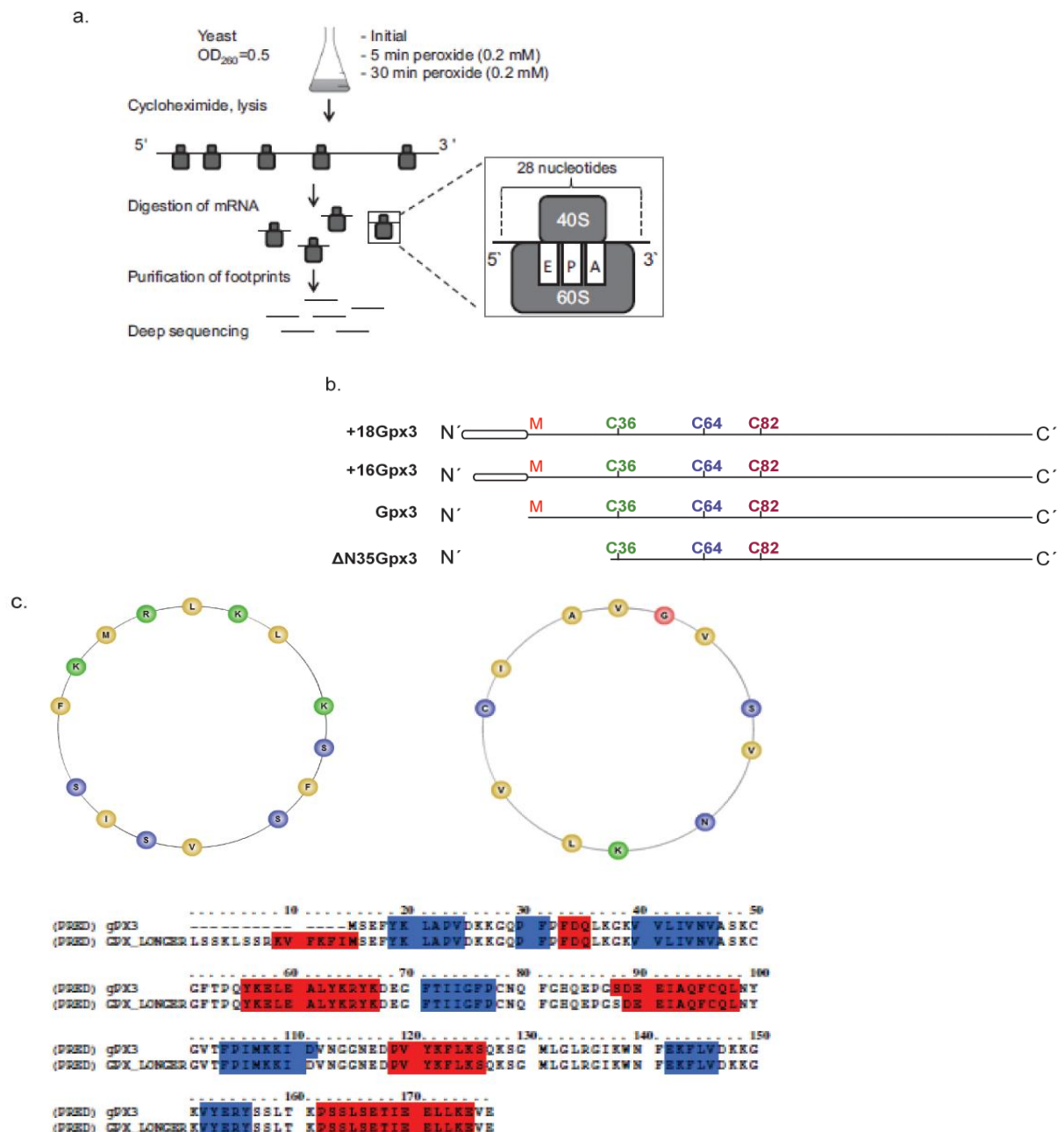
Μια πρόσφατη δημοσίευση (Gerashchenko et al., 2012) που περιελάμβανε την ανάλυση του ριβοσωμικού προφίλ των mRNA του σακχαρομύκητα σε συνδυασμό με εις βάθος αλληλούχιση αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη Gpx3 περιλαμβάνεται σε έναν μικρό κατάλογο πρωτεϊνών που εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο μετάφρασης κάτω από συνθήκες στρες. Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται ότι η Gpx3 μπορεί να έχει ένα εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης, το οποίο όμως να μην είναι AUG (Εικόνα 15).

Μετά απο επικοινωνία με τους συγγραφείς, προέκυψαν δυο με τρία κωδικόνια ανοδικά του AUG του γονιδίου, από τα οποία θα μπορούσε πιθανώς το ριβόσωμα να εκκινήσει τη μετάφραση. Τα πιθανά προϊόντα αυτών των εναλλακτικών παραγώγων της μεταφραστικής διαδικασίας είναι τρεις διαφορετικές εκδοχές της Gpx3 με αντίστοιχες αμινοτελικές επεκτάσεις 18, 16 ή 14 αμινοξέων. Μετά από ανάλυση των αλληλουχιών αυτό με τη χρήση του λογισμικού MitoProt, ενός προγράμματος που μπορεί να προβλέψει την πιθανότητα μιας αμινοτελικής αλληλουχίας να αποτελεί σήμα εισόδου μιας πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, διαπιστώθηκε ότι αυτές οι εκτεταμένες περιοχές είναι αρκετά πιθανό να έχουν αυτή τη δυνατότητα. Οι πιθανότητες εισαγωγής των διαφορετικών εκδόσεων της Gpx3 υπολογίστηκαν ως εξής:

- +18: 0.89
- +16: 0.74
- +14: 0.64
- Αγρίου τύπου: 0.0033

Επιπροσθέτως, κατά την αναζήτηση αντίστοιχων περιοχών, οι οποίες όμως να βρίσκονται μέσα στην κύρια αλληλουχία, βρέθηκαν δυο ακόμα περιοχές που θα μπορούσαν να οδηγούν στη στόχευση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια: α) η αμινοτελική περιοχή από την

αρχική μεθειονίνη μέχρι την πρώτη κυστεΐνη (Cys36), δηλαδή η περιοχή N35, και β) η καρβοξυτελική περιοχή αμέσως μετά την τρίτη κυστεΐνη (Cys82). Και οι δύο αυτές περιοχές χαρακτηρίζονται από την παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων με την τάση να δημιουργούν δευτεροταγή δομή α-έλικας και άρα, ακολουθούν το μοτίβο που προτάθηκε από τους Sideris et al. (2009) (Εικόνα 15).

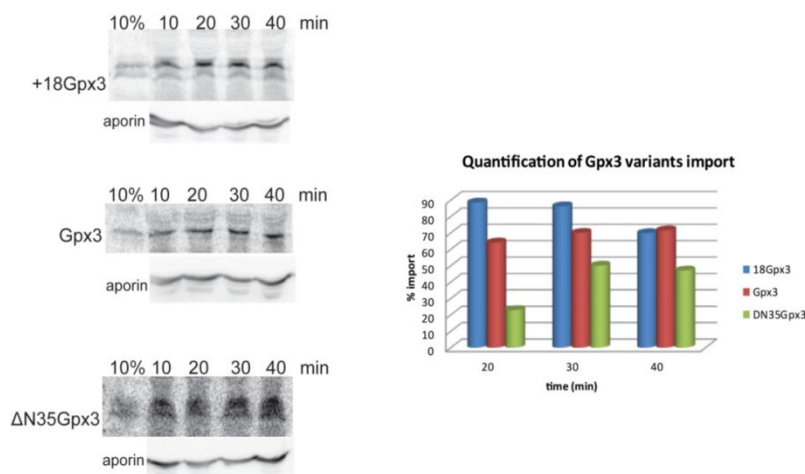


**Εικόνα 15:** Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να οδηγεί στην παραγωγή μιας επιμηκυμένης μορφής της πρωτεΐνης Gpx3. a) Σχηματική απεικόνιση των πειραμάτων ανάλυσης ριβοσωμικού προφίλ. b) Απεικόνιση των διαφόρων μορφών της Gpx3 που ελέχθηκαν. c) Εικόνα ελικωτής ρόδας της αμινοτελικής προέκτασης

(+18) της Gpx3 και της περιοχής ανοδικά της C36. Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των δύο μορφών της Gpx3 με τη χρήση του λογισμικού Praline (με κόκκινο οι προβλεπόμενες α-έλικες και με μπλέ οι β-πτυχωτές επιφάνειες).

Για την οπτικοποίηση αυτών των συμπερασμάτων έγινε χρήση του λογισμικού για τη δημιουργία ελικωτής ρόδας (helical wheel), τόσο για την επέκταση των 18 αμινοξέων όσο και για την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης, καθώς και του εργαλείου Praline, που έχει τη δυνατότητα να προβλέπει τις δευτεροταγείς δομές μιας πρωτεΐνης με βάση την αλληλουχία της (Εικόνα 15).

Για να μπορέσουμε να ελέγξουμε την ικανότητα εισαγωγής των διαφόρων μορφών της Gpx3 παρήχθησαν ραδιενεργές μορφές τριών εκδοχών της: της επιμήκους +18, της αγρίου τύπου και της κομμένης ΔN35. Το πρώτο βήμα στην όλη διαδικασία ήταν η πραγματοποίηση απλών πειραμάτων εισόδου σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια, από όπου παρατηρήθηκε ότι και οι τρεις εκδοχές της πρωτεΐνης έχουν την ικανότητα να εισαχθούν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής, έτσι ώστε να γίνουν διακριτές τυχόν διαφορές στο ρυθμό εισαγωγής των ραδιενεργών πρόδρομων μορίων στα μιτοχόνδρια. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 16, και οι τρεις μορφές της πρωτεΐνης εισάγονται στα μιτοχόνδρια, με την +18 εκδοχή να εμφανίζει τον ταχύτερο ρυθμό.



**Εικόνα 16:** Η επιμηκυσμένη μορφή (+18) της Gpx3 εισάγεται ταχύτερα στα μιτοχόνδρια. Με τη χρήση πειραμάτων κινητικής φάνηκε ότι και οι τρεις έχουν την ικανότητα να εισάγονται σε μιτοχόνδρια, με την +18 μορφή να εισάγεται σχετικά πιο γρήγορα.

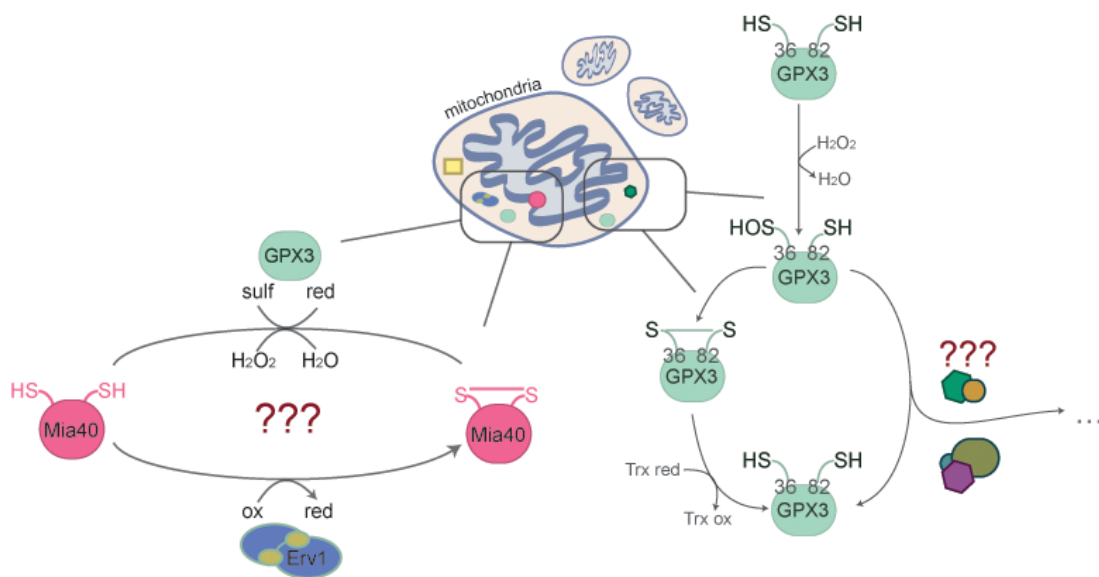
### 1.5. *In vitro* αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Gpx3 και Mia40

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, η Gpx3 δρα στο κυτταρόπλασμα με έναν πολύ συγκεκριμένο τρόπο: η παρουσία του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο κυτταρικό αυτό διαμέρισμα οδηγεί στη σουλφενυλίωση μιας εκ των κυστεϊνών της Gpx3, γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί είτε στη δημιουργία μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με το μεταγραφικό παράγοντα Yap1 είτε στην πλήρη οξείδωση της Gpx3 με τη δημιουργία ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού. Επιπροσθέτως, πρόσφατες μελέτες στο ενδοπλασματικό δίκτυο έδειξαν ένα μονοπάτι εναλλακτικής οξείδωσης της PDI (αντίστοιχης της Mia40 στο ER) μέσω H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Συνεπώς, έχουν προταθεί δύο πιθανά μοντέλα που να εξηγούν την παρουσία και τη δράση της Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Εικόνα 17):

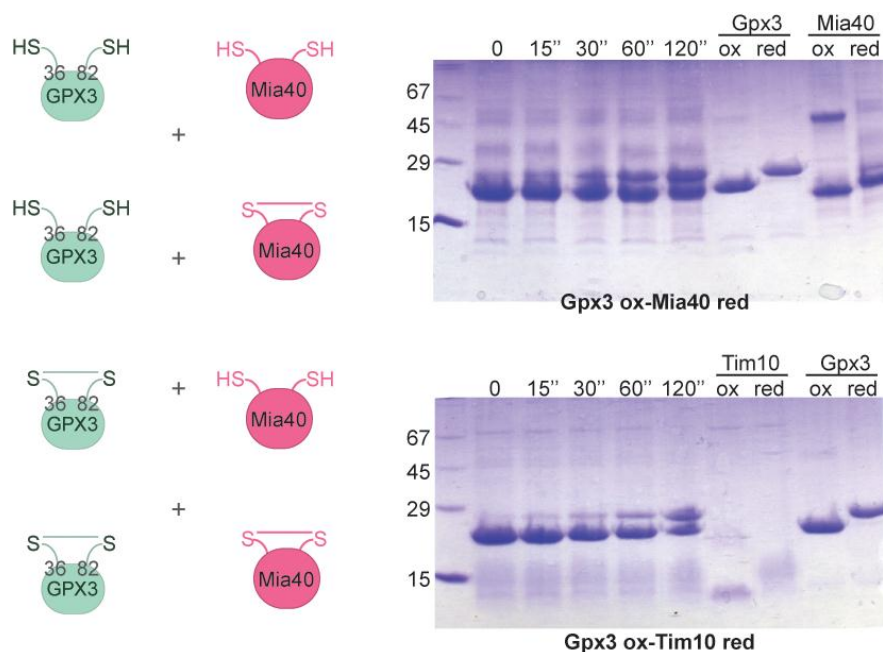
A) Κατ'αντιστοιχία με το μοντέλο που βρέθηκε να ισχύει στο ER, θα μπορούσε η Mia40 να αλληλεπιδρά με τη Gpx3, με τη δεύτερη να δρα σαν μια εναλλακτική οξειδάση για την επανενεργοποίηση της Mia40, και

B) Η Gpx3 να δρα μαζί με τις Trx1 και Trx2 ως ένα σύστημα για την αποτοξίνωση του συγκεκριμένου υπομιτοχονδριακού διαμερίσματος από τα αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου.



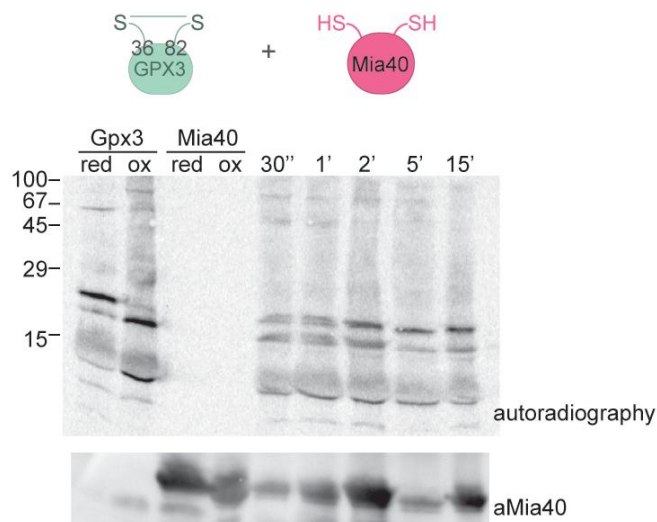
**Εικόνα 17:** Πιθανά μοντέλα εξήγησης του ρόλου της Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.

Για να εξετάσουμε το πρώτο μοντέλο, πραγματοποιήθηκε μια σειρά *in vitro* πειραμάτων που περιλάμβαναν την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των οξειδωμένων (ox) και των ανηγμένων (red) μορφών των καθαρών πρωτεϊνών Gpx3 και Mia40 σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς. Η μορφή της Mia40 που χρησιμοποιήθηκε γι'αυτά τα πειράματα ήταν η διαλυτή μορφή ΔN290Mia40His του σακχαρομύκητα. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν από τις Α. Χατζή και Π. Κριτσιλίγκου και έδειξαν ότι αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες παρατηρείται μόνο όταν η Mia40 βρίσκεται σε ανηγμένη κατάσταση ενώ η Gpx3 σε οξειδωμένη, αφού κατά τη διάρκεια του πειράματος φάνηκε ότι η ποσότητα της ανηγμένης Gpx3 συσσωρευόταν, όπως αντίστοιχα και η ποσότητα της οξειδωμένης Mia40. Το πείραμα περιελάμβανε την επώαση των δύο πρωτεϊνών για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, το πάγωμα των αντιδράσεων με τη χρήση 10% TCA (trichloroacetic acid) και την ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μετά από επώαση με τον αλκυλιωτικό παράγοντα AMS. Να σημειωθεί ότι η προσθήκη ενός μορίου AMS σε μια ελεύθερη (ανηγμένη) κυστεΐνη προσθέτει 0.5kDa στο μοριακό της βάρος και έτσι μπορούμε να παρατηρήσουμε την οξειδωτική κατάσταση των πρωτεϊνών (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18:** *In vitro* πείραμα αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις καθαρσμένες (purified) πρωτεΐνες Gpx3 και ΔN290Mia40. Στο αριστερό τμήμα της εικόνας φαίνονται οι διαφορετικοί συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στο πάνω δεξιά τμήμα, η περίπτωση όπου παρατηρείται αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Στο κάτω δεξιά τμήμα φαίνεται η αλληλεπίδραση που συμβαίνει ανάμεσα στις καθαρσμένες πρωτεΐνες Gpx3 και Tim10.

Λόγω του γεγονότος ότι η οξειδωτική κατάσταση της Mia40 δεν είναι τόσο εύκολο να ανιχνευτεί λόγω της μικρής διαφοράς μοριακού βάρους ανάμεσα στις ανηγμένες και οξειδωμένες μορφές, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει επανάληψη του πειράματος, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά μια από τις πρωτεΐνες σε ραδιενεργή μορφή. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Α. Χατζή και περιελάμβανε την επώαση ραδιενεργούς οξειδωμένης Gpx3 με καθαρή ανηγμένη Mia40. Ένα τέτοιο στήσιμο θα επέτρεπε την καλύτερη διάκριση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες, καθώς τυχαίνουν να έχουν παραπλήσια μοριακά βάρη. Και σε αυτή την περίπτωση, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι από τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης παρατηρείται οξείδωση της Mia40 στο ενεργό της κέντρο, με την ίδια τη Gpx3 να ανάγεται (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19:** *In vitro* αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πρωτεΐνες Gpx3 και Mia40 χρησιμοποιώντας αυτόραδιογραφία. Σε αυτή την περίπτωση, η Gpx3 σημάνθηκε ραδιενεργά και επώασθηκε με καθαρισμένη ΔN290Mia40 (όπως παραπάνω), για τον καλύτερο διαχωρισμό ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες.

Για να ελεγχθεί αν το φαινόμενο αυτό είναι ειδικό της Mia40-Gpx3 αλληλεπίδρασης, καθώς και το κατά πόσο η Gpx3 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση ελέγχου. Σε αυτή χρησιμοποιήθηκε ανηγμένη πρωτεΐνη Tim10 (red) και οξειδωμένη Gpx3 (ox), οι οποίες επώαστηκαν *in vitro* όπως ακριβώς και στην περίπτωση Mia40-Gpx3. Το πείραμα αυτό έδειξε ότι η Gpx3 έχει τη δυνατότητα να οξειδώσει και την πρωτεΐνη Tim10, όχι όμως με τον ίδιο ρυθμό, αφού η οξείδωση της Mia40 είναι σαφώς ταχύτερη (Εικόνα 18).



Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η Gpx3 μπορεί να λειτουργεί σαν ένας πιο γενικός οξειδωτικός μηχανισμός στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, με την οξείδωσή της από το υπεροξείδιο του υδρογόνου να χρησιμοποιείται για την οξείδωση άλλων πρωτεϊνών στο υπομιτοχονδριακό αυτό διαμέρισμα.

Για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (isothermal titration calorimetry - ITC). Με τη χρήση της μεθόδου αυτής μπορεί να γίνει μελέτη αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε δύο πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν προηγουμένως εκφραστεί από βακτήρια και καθαριστεί. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα ITC πρέπει οι πρωτεΐνες προς μελέτη να βρεθούν σε ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Για το πείραμα αυτό οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM KPi pH 7.4 χρησιμοποιώντας μεμβράνες διαπίδυσης (dialysis).

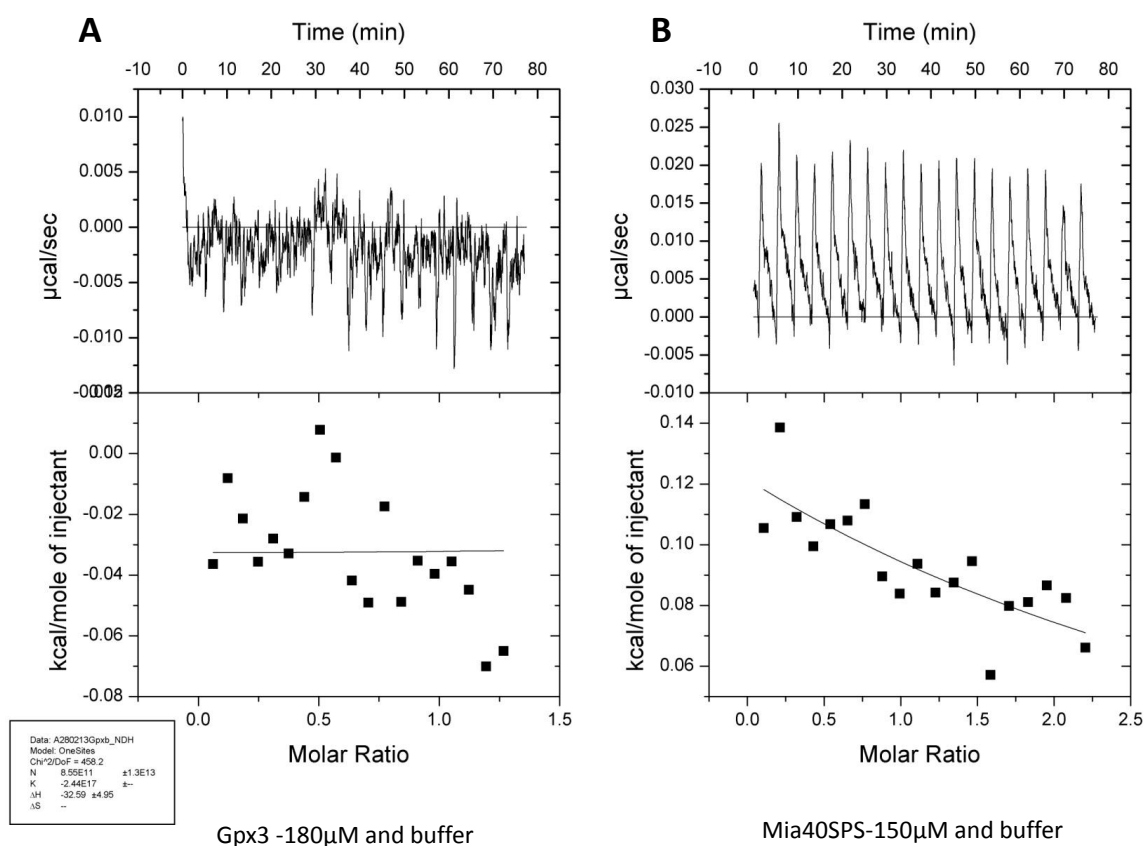
Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ο εξής:

Σε κάθε αλληλεπίδραση λαμβάνουν μέρος δύο πρωτεΐνες. Η μια εισάγεται στην σύριγγα του θερμιδόμετρου, ενώ η άλλη στην κυψελίδα. Η πρωτεΐνη που βρίσκεται στην σύριγγα ενύεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στην κυψελίδα. Με κάθε ένεση, η θερμοκρασία μέσα στην κυψελίδα αλλάζει λόγω της αντίδρασης που συμβαίνει ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Το μηχάνημα του ITC καταγράφει την ενέργεια που δαπανά ανά λεπτό της αντίδρασης προκειμένου να επαναφέρει το σύστημα στη θερμοκρασία αναφοράς. Σαν αντιδράσεις ελέγχου πραγματοποιούνται ενέσεις των πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα ίδιο με αυτό στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες (50mM KPi pH 7.4), όπου ουσιαστικά μετράται η αλλαγή της θερμότητας κατά την αραίωση της πρωτεΐνης στο ρυθμιστικό διάλυμα.

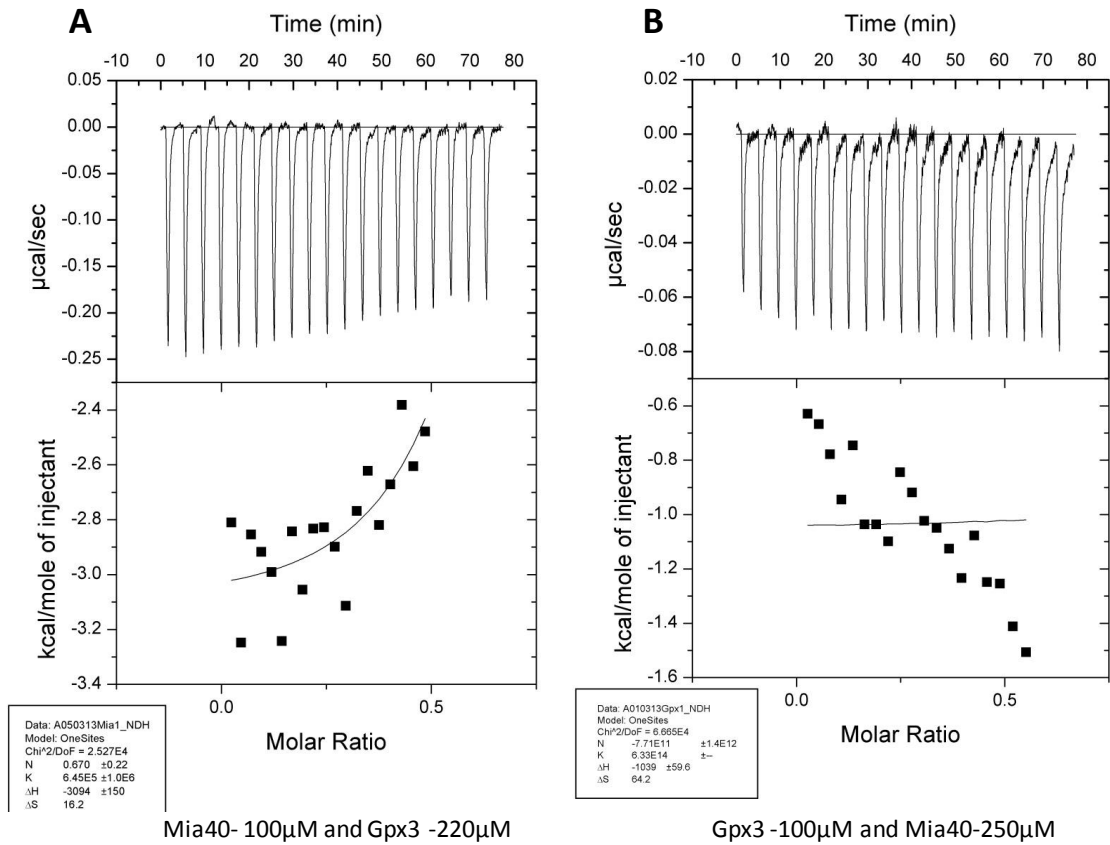
Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι δύο πρωτεΐνες ΔN290Mia40 και Gpx3. Λόγω του γεγονότος ότι θέλαμε να μελετήσουμε τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν οι μορφές των πρωτεϊνών που δεν έχουν τη δυνατότητα της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών, δηλαδή οι ΔN290Mia40 SPS και Gpx3 C82A. Λόγω του γεγονότος ότι το συγκεκριμένο σετ πρωτεϊνών δεν είναι γνωστό πως ακριβώς αλληλεπιδρά έγιναν διάφορες δοκιμές, τόσο με την Gpx3 στη σύριγγα και τη Mia40 στην κυψελίδα, όσο και αντίστροφα. Δοκιμάστηκαν επίσης μια σειρά από

διαφορετικές συγκεντρώσεις και για τις δύο περιπτώσεις, προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της εικόνας.

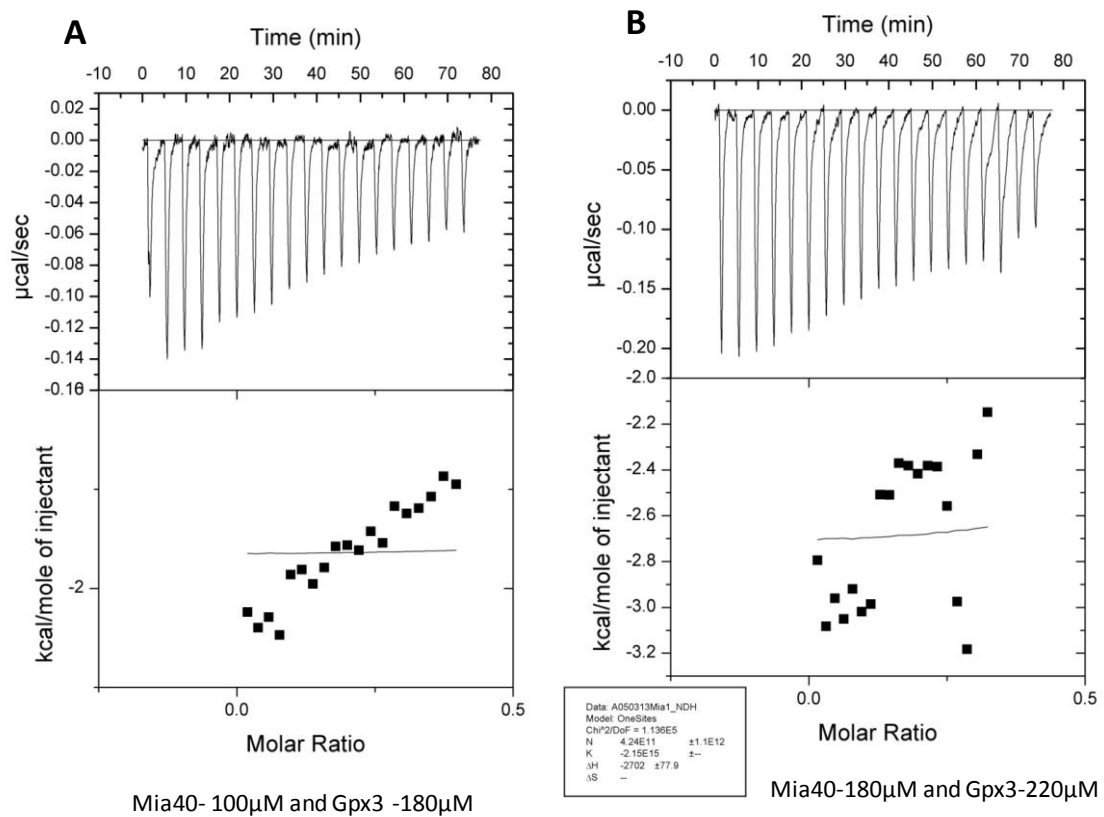
Κάποια από τα αποτελέσματα των πολλαπλών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στις εικόνες 20-22. Πιο συγκεκριμένα, στις εικόνες 20 A και B, μπορούμε να δούμε τις αντιδράσεις ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν, με την προσθήκη είτε της Grx3 είτε της Mia40 (σύριγγα) στο ρυθμιστικό διάλυμα (κυψελίδα). Στις εικόνες 21 A και B, μπορούμε να δούμε δύο μη επιτυχείς προσπάθειες, όπου η Mia40 βρίσκεται στη σύριγγα και η Grx3 στην κυψελίδα. Πολύ καλύτερη ήταν η εικόνα που λάβαμε όταν οι δύο πρωτεΐνες αντιστράφηκαν και η Grx3 τοποθετήθηκε στη σύριγγα, όπως φαίνεται στις εικόνες 22 A και B. Όπως μπορούμε να δούμε, η προσθήκη κάθε σταγόνας αποδιατάσσει σε μικρότερο βαθμό τη θερμοκρασία αναφοράς της κυψελίδας, που σημαίνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση και ότι, με την πάροδο του χρόνου, επέρχεται κορεσμός του φαινομένου. Το ιδανικό θα ήταν μέχρι το τέλος του πειράματος να έχει επέλθει πλήρης κορεσμός, κάτι το οποίο δεν συνέβη στη δική μας περίπτωση.



**Εικόνα 20:** Πειράματα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης: αντιδράσεις ελέγχου



Εικόνα 21: Πειράματα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης: μη επιτυχείς προσπάθειες



Εικόνα 22: Πειράματα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης: οι δύο πιο επιτυχημένες προσπάθειες

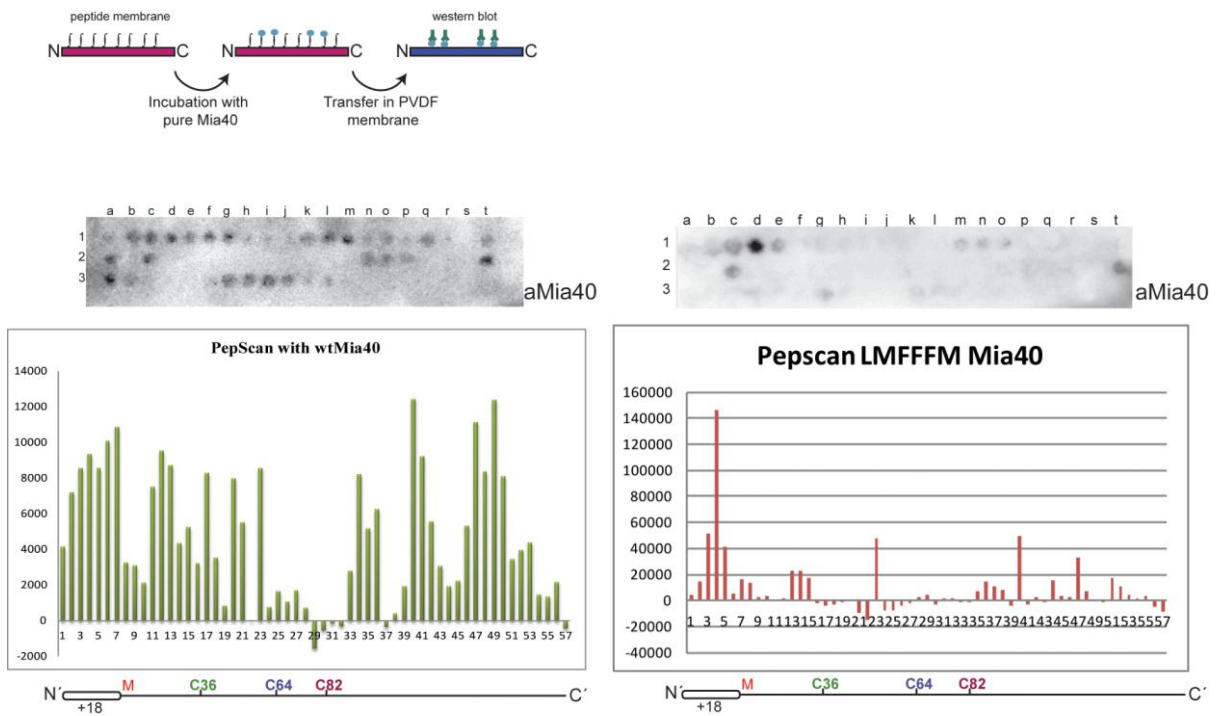
## 1.6. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Gpx3 και της Mia40

Η χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε αυτές τις δύο πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας αμερόληπτης τεχνικής, γνωστής ως μεμβράνη ακινητοποιημένων πεπτιδίων ή PepScan (JPT Peptide Technologies GmbH). Το PepScan είναι μια μεμβράνη ειδικού τύπου πάνω στην οποία μπορεί να γίνει ακινητοποίηση πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε για το παρόν πείραμα έφερε ακινητοποιημένη την πρωτεΐνη Gpx3 σε 57 πεπτίδια, 13 αμινοξέων το καθένα (και τα οποία αλληλοεπικαλύπτονταν κατά 10 αμινοξέα τη φορά). Η μορφή της πρωτεΐνης Gpx3 που ακινητοποιήθηκε ήταν η επιμήκης +18 Gpx3.

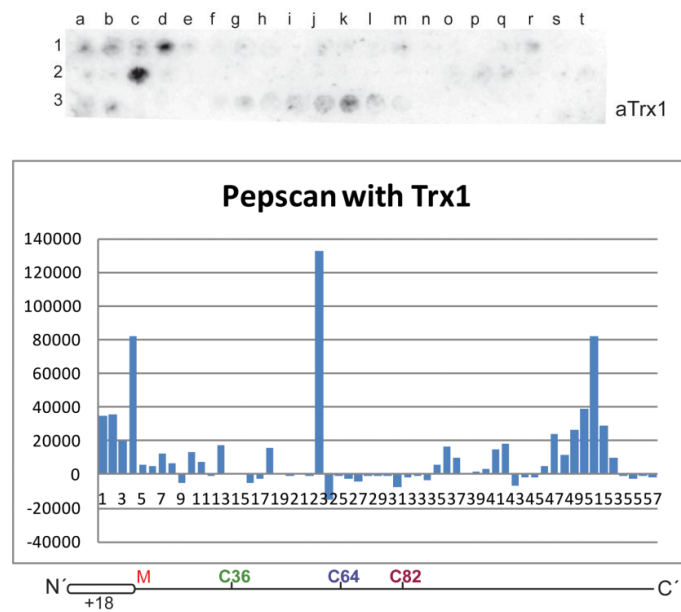
Η μεμβράνη αυτή επώαστηκε με καθαρή πρωτεΐνη Mia40 με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η πρωτεΐνη που προσδέθηκε μεταφέρθηκε σε μεμβράνη με μικρό μέγεθος πόρων (PVDF) και ανιχνεύθηκε με τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για τη Mia40.

Όπως είναι εμφανές και από την εικόνα 23, υπάρχουν τρεις περιοχές στην αλληλουχία της Gpx3 που φαίνεται να έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδράσουν με τη Mia40. Η πρώτη εντοπίζεται στην +18 αμινοτελική επέκταση, η δεύτερη πριν την ενεργή κυστεΐνη Cys36 (στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης) και η τρίτη αμέσως μετά την κυστεΐνη επίλυσης (resolving cysteine) Cys82 (στο καρβοξυτελικό άκρο) της Gpx3. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει την εικασία που έγινε παραπάνω σχετικά με τις πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης της Mia40 με τη Gpx3.

Σαν πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ένα από τα μεταλλάγματα της Mia40 που στερείται της ικανότητας να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια, λόγω των υδρόφοβων μεταλλαγών που έχουν εισαχθεί στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Σε αυτή την περίπτωση η εικόνα είναι αρκετά πιο καθαρή και το μοναδικό σήμα που συνεχίζει να υφίσταται είναι αυτό που εντοπίζεται στην +18 επέκταση της Gpx3 (Εικόνα 23). Ως ένα ακόμη πείραμα ελέγχου, η μεμβράνη επώαστηκε και με καθαρή πρωτεΐνη Trx1, μιας πρωτεΐνης που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τη Gpx3. Το προφίλ αλληλεπίδρασης που προέκυψε από αυτό το πείραμα εστιαζόταν κυρίως στο καρβοξυτελικό άκρο της Gpx3 (Εικόνα 24).



**Εικόνα 23:** Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Mia40 και Gpx3. Πάνω αριστερά φαίνεται η σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας (Pepscan assay). Κάτω αριστερά διακρίνονται τα σημεία αλληλεπίδρασης της Gpx3 με την αγρίου τύπου Mia40, ενώ κάτω δεξιά με το υδρόφοβο μετάλλαγμα (LMFFFM/A) της Mia40.



**Εικόνα 24:** Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Gpx3 και Trx1.

### 1.7. Ανίχνευση του συμπλόκου Gpx3-Mia40 *in vitro* και *in vivo*

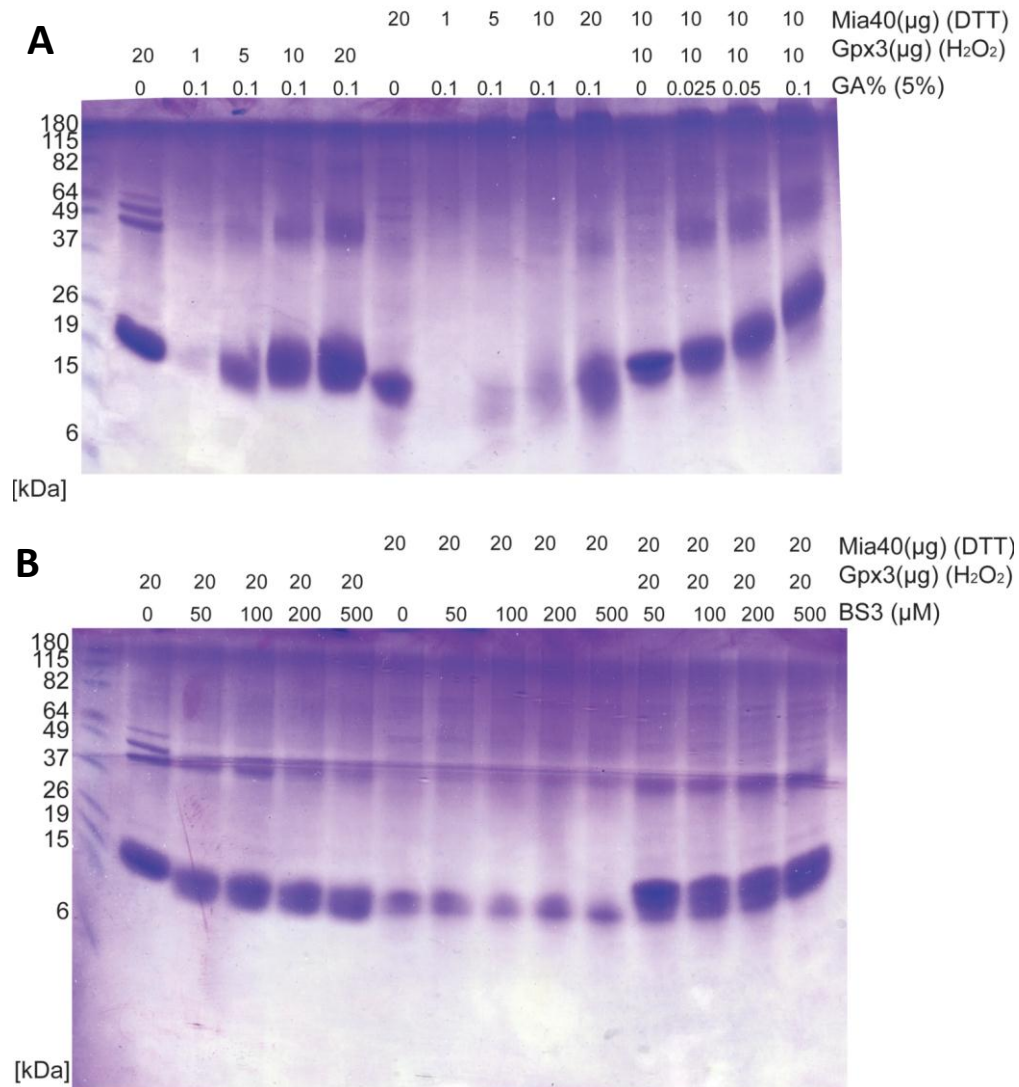
Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω αποτελούν ενδείξεις της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Gpx3 και Mia40. Ακολουθήσαμε όμως και δύο βασικές πειραματικές διαδικασίες προκειμένου να γίνει οπτικοποίηση του ενδιαμέσου και ταυτοποίηση ότι το ενδιάμεσο πραγματικά δημιουργείται.

Η πρώτη προσέγγιση (*in vitro*) περιελάμβανε τη χρήση ενός συνδευτικού μορίου (crosslinker) που να μπορεί να συνδεθεί και στις δύο πρωτεΐνες σε μια *in vitro* πειραματική διαμόρφωση. Σε περίπτωση που οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μέσα στο διάλυμα, η απόσταση ανάμεσα στα δύο πρωτεϊνικά μόρια θα είναι τόσο μικρή, που το μόριο του crosslinker θα μπορεί να συνδεθεί και στα δύο για να δημιουργήσει ένα σταθερό σύμπλοκο.

Λόγω του γεγονότος ότι, όπως φάνηκε από τα πειράματα που περιγράφηκαν παραπάνω, η μόνη περίπτωση που οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους είναι όταν η Mia40 βρίσκεται σε ανηγμένη κατάσταση ενώ η Gpx3 σε οξειδωμένη, επώασαμε τις δύο πρωτεΐνες με DTT (για τη Mia40) και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (για τη Gpx3), ώστε να βρεθούν στην κατάλληλη κατάσταση. Στη συνέχεια, προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα συνδευτικού μορίου και πραγματοποιήθηκε επώαση για τον κατάλληλο χρόνο. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού, προστέθηκε μια ποσότητα 1M Tris-Cl pH 7.4 για να γίνει κορεσμός και απενεργοποίηση του συνδευτικού μορίου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν είτε βάφοντας την πηκτή με Coomassie Staining Buffer είτε με τη χρήση αντισωμάτων ειδικών για τις δύο πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα των προσπαθειών που έγιναν με τη χρήση των συνδευτικών μορίων γλουταραλδεΐδη (glutaraldehyde – GA) και BS3 φαίνονται στην εικόνα 25.

Η δεύτερη προσέγγιση περιελάμβανε τη χρήση της μεθόδου της ανοσοκατακρήμνισης είτε σε μια *in vitro* πειραματική διαμόρφωση, όπου βρίσκονταν παρούσες μόνο οι δύο πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν, είτε σε μια *in vivo* πειραματική διαμόρφωση, όπου έγινε προσπάθεια απομόνωσης του συμπλόκου από μιτοχονδριακά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αυτών των προσπαθειών δεν απεικονίζονται, καθώς τα πειράματα που

έγιναν δεν ήταν επιτυχή. Παρ'όλα αυτά, οι προσπάθειες θα συνεχιστούν, με τη χρήση διαφορετικών τρόπων χειρισμού των δειγμάτων, προκειμένου να ληφθεί μια πιο καθαρή εικόνα.



**Εικόνα 25:** Πειράματα για την *in vitro* ανίχνευση του συμπλόκου Gpx3-Mia40. Α) Αποτέλεσμα μετά τη χρήση του διασυνδέτη (crosslinker) γλουταραλδεΐδη (GA). Β) Αποτέλεσμα μετά τη χρήση του διασυνδέτη BS3. Σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του συμπλόκου.

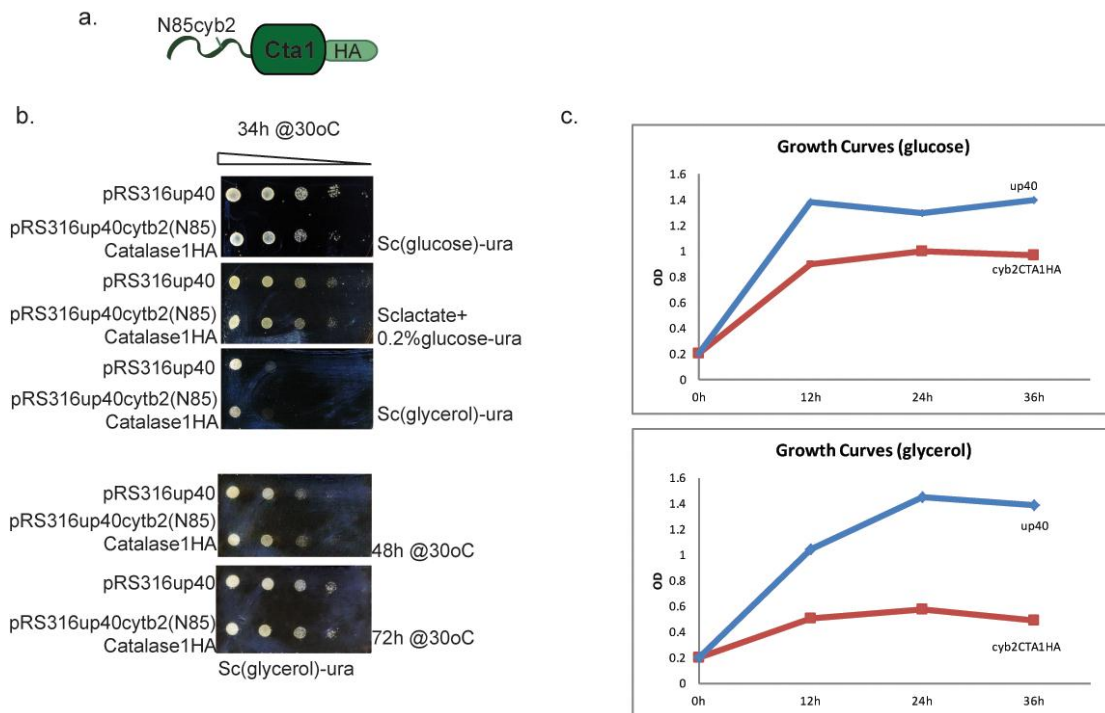
## Κεφάλαιο 2: Ο ρόλος του $H_2O_2$ στα μιτοχόνδρια

### 2.1. Επίδραση του οξειδωτικού στρες στην ανάπτυξη κυττάρων

Βασιζόμενοι σε μελέτες που έγιναν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, πραγματοποιήσαμε πειράματα σε κύτταρα σακχαρομύκητα, έτσι ώστε να αξιολογηθεί το κατά πόσο το υπεροξείδιο του υδρογόνου παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων (και άρα των κυττάρων). Πιο συγκεκριμένα, έγινε κλωνοποίηση της καταλάσης Cta1 σε φορέα pRS316, συζευγμένη σε ένα σήμα στόχευσης για το διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η καταλάση Cta1 είναι μια από τις δύο καταλάσες του σακχαρομύκητα και εντοπίζεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου και στα υπεροξυσώματα. Ο βασικός της ρόλος είναι η αποτοξικοποίηση των δύο αυτών διαμερισμάτων του κυττάρου από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στα υπεροξυσώματα, κύρια πηγή  $H_2O_2$  είναι η οξείδωση λιπαρών οξέων, ενώ στα μιτοχόνδρια παράγεται κατά κύριο λόγο από τη δράση των δισμουτασών υπεροξειδίου Sod1 και Sod2 κατά τη διαδικασία αποδόμησης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Το πλασμίδιο που αναφέρθηκε παραπάνω (pRS316-cytb2(N85)-CTA1-HA) μετασχηματίστηκε σε αγρίου τύπου κύτταρα σακχαρομύκητα, έτσι ώστε να μην επηρεάζεται η δράση και η κυτταρική τοποθέτηση της ενδογενούς καταλάσης του κυττάρου, αλλά η πρωτεΐνη που παράγεται από το πλασμίδιο να είναι αυτή που κατευθύνεται προς το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία  $H_2O_2$  στο θρεπτικό τους μέσο και η ανάπτυξή τους φαίνεται στην εικόνα 26. Να σημειωθεί ότι τα κύτταρα αναπτύχθηκαν τόσο σε θρεπτικό μέσο με γλυκόζη, όσο και σε θρεπτικό μέσο όπου η πηγή άνθρακα είναι μη ζυμώσιμη (γλυκερόλη), ώστε να παρατηρηθεί ο φαινότυπος σε κύτταρα που διαθέτουν πλήρως λειτουργικά μιτοχόνδρια. (Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν από την Α. Χατζή.)





**Εικόνα 26:** Τα επίπεδα  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των κυττάρων. α) Σχηματική απεικόνιση της στοχευόμενης στο IMS καταλάσης Cta1. β) *In vivo* πείραμα για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία της στοχευόμενης στο IMS καταλάσης Cta1. γ) Γραφική αναπαράσταση της κυτταρικής ανάπτυξης.

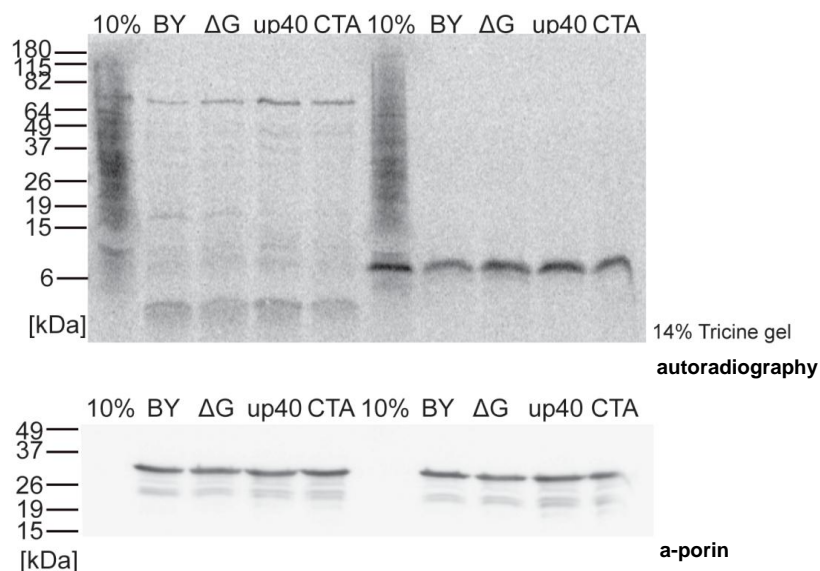
## 2.2. Επίδραση του $H_2O_2$ στη δυνατότητα εισαγωγής των πρωτεϊνών *Tim10* και *Mia40*

Σε ένα επόμενο στάδιο, αποφασίσαμε να ελέγξουμε το αν η παρουσία η απουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων επηρεάζει την ικανότητα εισαγωγής χαρακτηριστικών πρωτεϊνών του διαμερίσματος αυτού.

Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ένα τέτοιο πείραμα, έπρεπε αρχικά να γίνει απομόνωση μιτοχονδρίων από διάφορα στελέχη σακχαρομύκητα. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη αυτά ήταν τα: BY4741, *Δgpx3* (BY4741), FT5/pRS316-up40 και FT5/pRS316-up40-CTA1-HA. Τα *Δgpx3* χρησιμοποιήθηκαν ως μιτοχόνδρια με αυξημένα επίπεδα  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο, ενώ τα CTA1 ως μιτοχόνδρια με μειωμένα επίπεδα. Τα άλλα στελέχη είναι και τα δύο αγρίου τύπου και χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία αναφοράς για τα φυσιολογικά επίπεδα του  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.

Στη συνέχεια, έγινε παραγωγή των ραδιενεργών πρόδρομων μορίων Tim10 και Mia40, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα εισαγωγής στα διάφορα είδη μιτοχονδρίων, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο κεφάλαιο “Υλικά και μέθοδοι”. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 27, τα πρωτεϊνικά μόρια δεν εμφανίζουν διαφορές στην ικανότητα εισαγωγής τους. Για να ελεγχθεί η ακεραιότητα των μιτοχονδρίων, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης πορίνη ( $\alpha$ -porin), που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα.

Είναι προφανές ότι αυτό το αποτέλεσμα δεν είναι αρκετό για να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι δεν φαίνεται να εμφανίζεται αδυναμία στην εισαγωγή πρωτεϊνών σε μιτοχόνδρια με αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα  $H_2O_2$ . Το σίγουρο είναι ότι η εισαγωγή των πρωτεϊνών Mia40 και Tim10 δεν επηρεάζεται από το  $H_2O_2$ . Παρ’όλα αυτά, κάτι τέτοιο μπορεί να μην ισχύει για όλες τις πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων, που σημαίνει ότι θα πρέπει να γίνει έλεγχος και άλλων βασικών πρωτεϊνών προτού καταλήξουμε σε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το ρόλο του  $H_2O_2$  στην είσοδο πρωτεϊνών.



**Εικόνα 27:** Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων δεν φαίνεται να επηρεάζουν την ικανότητα εισόδου των πρωτεϊνών Mia40 και Tim10 σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Να σημειωθεί ότι τα μιτοχόνδρια BY και up40 είναι καθ’όλα αγρίου τύπου, τα ΔG (*Δgpx3*) θεωρείται ότι περιέχουν σχετικά

αυξημένα επίπεδα  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο, ενώ τα CTA περιέχουν την IMS-στοχευμένη καταλάση Cta1, που θεωρείται πως οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο.

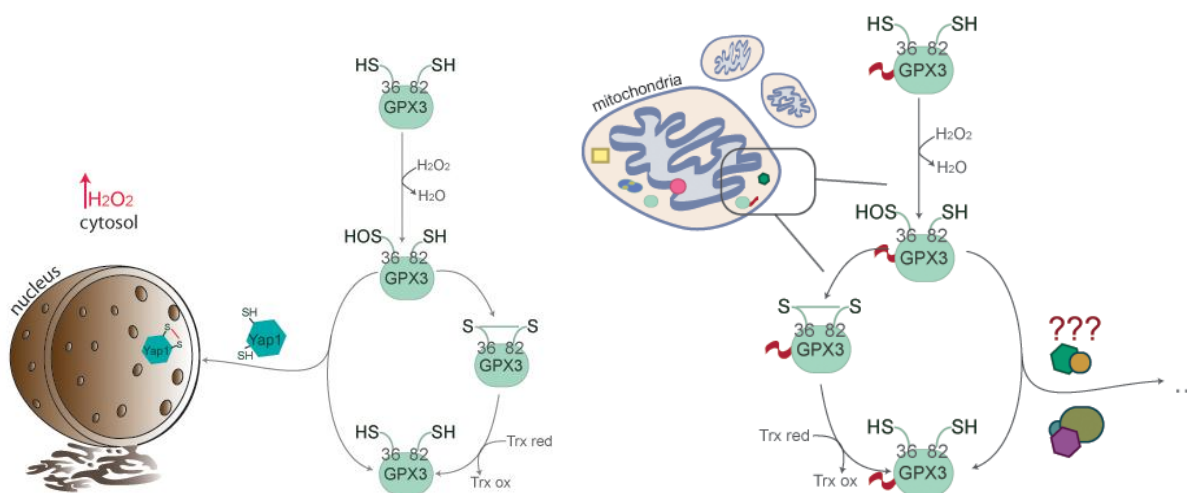
# ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

## Συζήτηση και Προοπτικές

---

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην εργασία αυτή, εξετάστηκε η τοπολογία της υπεροξειδάσης Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, καθώς και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις της με τη Mia40 και άλλες πρωτεΐνες του συγκεκριμένου διαμερίσματος. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο ρόλος της Gpx3 στο κυτταρόπλασμα έχει μελετηθεί εις βάθος, καθώς έχει βρεθεί ότι μπορεί να δρα τόσο σαν αισθητήρας του  $H_2O_2$ , όσο και σαν μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα Yap1. Παρ'όλα αυτά, λόγω του γεγονότος ότι η ανακάλυψη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων είναι σχετικά πρόσφατη, δεν έχει διερευνηθεί ο ρόλος που μπορεί να παίζει στο συγκεκριμένο υπο-μιτοχονδριακό διαμέρισμα. Επιπροσθέτως, δεν έχει μελετηθεί κάτω από ποιές συνθήκες παρατηρείται αυτή η εναλλακτική τοποθέτηση της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός πιθανού μονοπατιού ρύθμισης των επιπέδων του  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, με τον κεντρικό ρόλο να επιτελείται από την υπεροξειδάση Gpx3 (Εικόνα 28).



**Εικόνα 28:** Πιθανό μονοπάτι ρύθμισης των επιπέδων  $H_2O_2$  στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Στο αριστερό τμήμα της εικόνας απεικονίζεται το μονοπάτι όπως έχει αποσαφηνιστεί στο κυτταρόπλασμα, με τη Gpx3 να ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Yap1. Στο δεξί τμήμα της εικόνας απεικονίζεται το μονοπάτι που προτείνεται να ισχύει με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης. Σημειώνεται ότι σε αυτή την περίπτωση, αναφερόμαστε σε μια επιμηκυσμένη μορφή (+18) της Gpx3, η οποία μέσω σουλφενυλίωσής της φαίνεται να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου.

Η παρούσα εργασία χωρίστηκε σε δύο τμήματα: α) τη μελέτη της πρωτεΐνης Grx3 όσον αφορά το ρόλο της στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και β) τη μελέτη της σημασίας της παρουσίας του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο ίδιο διαμέρισμα.

Όσον αφορά το πρώτο τμήμα της εργασίας, αρχικά έγινε έλεγχος της τοποθέτησης της Grx3 στα μιτοχόνδρια, όπου βρέθηκε πως εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό χώρο, μαζί με τις άλλες δύο πρωτεΐνες του μονοπατιού (Trx1, Trr1), επιβεβαιώνοντας έτσι τα δεδομένα των Vögtle et al. (2012). Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι ο παράγοντας Yap1 απουσιάζει από το συγκεκριμένο διαμέρισμα, γεγονός που υποδεικνύει ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα Grx3-Trx1-Trr1 λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο απ'ότι στο κυτταρόπλασμα. Παρ'όλα αυτά, βρέθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες που συνδέονται με το Yap1 στο κυτταρόπλασμα (Ybp1 και Ybp2) μπορούν να εισαχθούν στα μιτοχόνδρια, χωρίς όμως να γίνει κάποιο πείραμα ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους σε αυτά. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν περιελάμβαναν την επαγωγή οξειδωτικού στρες σε κύτταρα, έδειξαν ότι τα επίπεδα της Grx3 στα μιτοχόνδρια αυξάνονται, φαινόμενο το οποίο υποστηρίζει ένα πιθανό ρόλο στο συγκεκριμένο διαμέρισμα όσον αφορά την καταπολέμηση του στρες.

Εν συνεχεία, χρησιμοποιώντας σαν σημείο αναφορά την πρόσφατη δημοσίευση των Gerashchenko et al. (2012), εξετάστηκε η παραγωγή εναλλακτικών μορφών της πρωτεΐνης Grx3, ως αποτέλεσμα της ύπαρξης υψηλών επιπέδων  $H_2O_2$ , καθώς και η ικανότητα εισαγωγής τους στα μιτοχόνδρια. Το αποτέλεσμα που εξήχθη από αυτή τη σειρά πειραμάτων ήταν ότι η επιμηκυσμένη μορφή (+18 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο) της Grx3 φαίνεται να εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς εισόδου στα μιτοχόνδρια, με την αμινοτελική προέκταση να λειτουργεί σαν σήμα στόχευσης για το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.

Σε επόμενο στάδιο, μελετήθηκε η δυνατότητα της αλληλεπίδρασης της Grx3 με το γενικό υποδοχέα του διαμεμβρανικού χώρου, Mia40. Φάνηκε ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν, με την αλληλεπίδραση αυτή να εμφανίζεται, κατα κύριο λόγο, στην αμινοτελική προέκταση της Grx3, και λιγότερο, στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης μετά τη μεθειονίνη έναρξης. Η αλληλεπίδραση αυτή βρέθηκε ότι έγκειται στο γεγονός ότι η Grx3 μπορεί να οξειδώσει το CPC μοτίβο της Mia40 *in vitro*, χωρίς όμως να είναι γνωστό αν η αλληλεπίδραση υποβοηθά με κάποιο τρόπο την είσοδο της Grx3 στα

μιτοχόνδρια. Πειράματα που διεξήχθησαν με άλλες πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου έδειξαν ότι η Gpx3 θα μπορούσε να έχει το ρόλο μιας εναλλακτικής οξειδάσης. Τα *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν έχουν δείξει την ύπαρξη ενός ενδιάμεσου μορίου που να περιλαμβάνει και τις δύο πρωτεΐνες, το οποίο δεν αποκλείει την δυνατότητα δημιουργίας του, καθώς είναι πιθανό να πρόκειται για μια πολύ παροδική αλληλεπίδραση.

Στο δεύτερο τμήμα της εργασίας μελετήθηκε ο ρόλος του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Το πρώτο πείραμα που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε τη μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων κάτω από συθήκες μειωμένων επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου στο διαμεμβρανικό χώρο, λόγω της παρουσίας μιας καταλάσης στο διαμέρισμα αυτό. Παρατηρήθηκε ότι, σε αυτή την περίπτωση, τα κύτταρα εμφάνιζαν μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης, φαινόμενο που συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές που θέλουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> να λειτουργεί ως βοηθητικό μόριο για την αναδίπλωση πρωτεϊνών (Tavender et al., 2010). Συνεπώς, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> φαίνεται να είναι ένας αρκετά σημαντικός παράγοντας για τη σωστή λειτουργία του μιτοχονδρίου.

Επιπλέον ελέγχθηκε αν η παρουσία ή απουσία του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων επηρεάζει την ικανότητα εισαγωγής βασικών πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου. Οι δύο πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν δεν φάνηκαν να επηρεάζονται από τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι μπορεί να μην υπάρχουν πρωτεΐνες που να επηρεάζονται από αυτό.

Ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων οδήγησαν στην περιγραφή ενός πιθανού μονοπατιού ρύθμισης των επιπέδων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, ο οποίος να δρα τόσο για την καταπολέμηση των υψηλών επιπέδων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, όσο και να μετέχει στην πραγματοποίηση οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων στο συγκεκριμένο διαμέρισμα. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν και κάποια ερωτήματα τα οποία θα πρέπει να απαντηθούν προκειμένου να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τη δράση της Gpx3. Αυτά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες ερωτημάτων που να εστιάζονται α) στο χαρακτηρισμό της δράσης της Gpx3 στα μιτοχόνδρια και β) στην αποσαφήνιση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Mia40 και Gpx3.

Όσον αφορά το χαρακτηρισμό της δράσης της Gpx3, θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω μελέτη όσον αφορά τα πιθανά υποστρώματα της στο διαμεμβρανικό χώρο, ώστε να

αποσαφηνιστεί το αν πρόκειται για ένα γενικό οξειδωτικό μηχανισμό του διαμερίσματος αυτού. Επιπλέον, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες που να εστιάζουν στις πρωτεΐνες Ybr1 και Ybr2, ώστε να μελετηθεί το αν οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται *in vivo* στα μιτοχόνδρια, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες μπορεί να γίνεται κάτι τέτοιο, καθώς και το ρόλο που επιτελούν.

Όσον αφορά την αποσαφήνιση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Mia40 και Grc3, πραγματοποιούνται επαναλήψεις των πειραμάτων ανοσοκατακρήνισης (immunoprecipitation), τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, σε μια προσπάθεια βελτιστοποίησης της εικόνας και απομόνωσης του ενδιάμεσου συμπλόκου. Επιπροσθέτως, πραγματοποιούνται παράλληλα πειράματα για τον έλεγχο της οξειδωτικής κατάστασης των δύο πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, παρουσία ή απουσία οξειδωτικού στρες.



# ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ

## Βιβλιογραφία

---

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G., and LeDoux, S. (2013). The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012641.

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.

Altmann, R. (1890). *Die Elementarorganismen Und Ihre Beziehungen Zu Den Zellen* (Leipzig).

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.

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

Bohnert, M., Rehling, P., Guiard, B., Herrmann, J.M., Pfanner, N., and van der Laan, M. (2010). Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Curr. Biol.* 20, 1227–1232.

Brigelius-Flohé, R. (2006). Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol. Chem.* 387, 1329–1335.

Bulleid, N.J., and Ellgaard, L. (2011). Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem. Sci.* 36, 485–492.

Carr, H.S., and Winge, D.R. (2003). Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc. Chem. Res.* 36, 309–316.

Chacinska, A., and Rehling, P. (2004). Moving proteins from the cytosol into mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 774–776.

Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán 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.

Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628–644.

Delaunay, a, Isnard, a D., and Toledano, M.B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* *19*, 5157–5166.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* *111*, 471–481.

Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P.J.T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M., and Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *388*, 195–200.

Dudek, J., Rehling, P., and van der Laan, M. (2013). Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 274–285.

Endo, T., Yamano, K., and Kawano, S. (2011). Structural insight into the mitochondrial protein import system. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 955–970.

Ernster, L., and Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* *91*, 227–255.

Fraga, H., and Ventura, S. (2013). Oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space in human health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 2916–2927.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *64*, 97–112.

Gabriel, K., Milenkovic, D., Chacinska, A., Müller, J., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007). Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J. Mol. Biol.* *365*, 612–620.

Gerashchenko, M. V, Lobanov, A. V, and Gladyshev, V.N. (2012). Genome-wide ribosome profiling reveals complex translational regulation in response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17394–17399.

Glick, B.S., Brandt, a, Cunningham, K., Müller, S., Hallberg, R.L., and Schatz, G. (1992). Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* *69*, 809–822.

Grant, C.M., Perrone, G., and Dawes, I.W. (1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *253*, 893–898.

Gulshan, K., Rovinsky, S.A., and Moye-Rowley, W.S. (2004). YBP1 and Its Homologue YBP2 / YBH1 Influence Oxidative-Stress Tolerance by Nonidentical Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *3*, 318–330.

Guo, P.-C., Ma, J.-D., Jiang, Y.-L., Wang, S.-J., Bao, Z.-Z., Yu, X.-J., Chen, Y., and Zhou, C.-Z. (2012). Structure of yeast sulfhydryl oxidase *erv1* reveals electron transfer of the disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* *287*, 34961–34969.

- Hell, K. (2008). The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 601–609.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., and Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395, 516–521.
- Houtkooper, R.H., and Vaz, F.M. (2008). Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2493–2506.
- Jefferies, J.L. (2013). Barth syndrome. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 163C, 198–205.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, a J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549–554.
- 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.
- Krebs, H.A., and Johnson, W.A. (1937). Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem. J.* 31, 645–660.
- Kunkele, K.-P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., and Neupert, W. (1998). of the Outer Membrane of Mitochondria. *Cell* 93, 1009–1019.
- Lee, J., Hofhaus, G., and Lisowsky, T. (2000). Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* 477, 62–66.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838.
- Luciano, P., Vial, S., Vergnolle, M. a, Dyall, S.D., Robinson, D.R., and Tokatlidis, K. (2001). Functional reconstitution of the import of the yeast ADP/ATP carrier mediated by the TIM10 complex. *EMBO J.* 20, 4099–4106.
- Margittai, É., Löw, P., Stiller, I., Greco, A., Garcia-Manteiga, J.M., Pengo, N., Benedetti, A., Sitia, R., and Bánhegyi, G. (2012). Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the endoplasmic reticulum promotes in vivo disulfide bond formation. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1088–1099.
- Martin, W.F., and Müller, M. (2007). *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16, R551–60.

- 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.
- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfanner, N., and Ryan, M.T. (2001). Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Biol.* *8*, 361–370.
- Mossmann, D., Meisinger, C., and Vögtle, F.-N. (2012). Processing of mitochondrial presequences. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 1098–1106.
- Mulford, K.E., and Fassler, J.S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot. Cell* *10*, 761–769.
- Nass, M.M., and Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J. Cell Biol.* *19*, 593–611.
- Palay, S.L., and Palade, G.E. (1955). The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *1*, 69–88.
- Paulsen, C.E., and Carroll, K.S. (2009). Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. *Chem. Biol.* *16*, 217–225.
- Petrova, V.Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V, and Schmitt, M.J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* *380*, 393–400.
- Puntoni, M., Sbrana, F., Bigazzi, F., and Sampietro, T. (2012). Tangier Disease: Epidemiology, Pathophysiology and Management. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* *12*, 303–311.
- Schatz, G. (2013). Getting mitochondria to center stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 407–410.
- Scorrano, L. (2013). Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur. J. Clin. Invest.* *43*, 886–893.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Meyer, H.E., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., et al. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 13207–13212.
- Sideris, D.P., and Tokatlidis, K. (2010). Oxidative Protein Folding in the Mitochondrial Intermembrane Space. *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 1189–1204.
- Sideris, D.P., Petrakis, N., Katrakili, N., Mikropoulou, D., Gallo, A., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., Bertini, I., and Tokatlidis, K. (2009). A novel intermembrane space–targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J. Cell Biol.* *187*, 1007–1022.
- Sjöstrand, F.S. (1953). Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes. *Nature* *171*, 30–31.

Stojanovski, D., Müller, J.M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2008). The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 610–617.

Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R., and Cizewski, V. (2001). A Fraction of Yeast Cu , Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone , CCS , Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276, 38084–38089.

Sztolsztener, M.E., Brewinska, A., Guiard, B., and Chacinska, A. (2013). Disulfide Bond Formation : Sulfhydryl Oxidase ALR Controls Mitochondrial Biogenesis of Human MIA40. *Traffic* 14, 309–320.

Tavender, T.J., Jennifer, J., and Bulleid, N.J. (2010). Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 29, 4185–4197.

Terziyska, N., Grumbt, B., Kozany, C., and Hell, K. (2009). Structural and Functional Roles of the Conserved Cysteine Residues of the Redox-regulated Import Receptor Mia40 in the Intermembrane Space of Mitochondria \*. *J. Biol. Chem.* 284, 1353–1363.

Tienson, H.L., Dabir, D. V, Neal, S.E., Loo, R., Hasson, S.A., Boontheung, P., Kim, S., Loo, J.A., and Koehler, C.M. (2009). Reconstitution of the Mia40-Erv1 Oxidative Folding Pathway for the Small Tim Proteins. *Mol. Biol. Cell* 20, 3481–3490.

Veal, E. a, Ross, S.J., Malakasi, P., Peacock, E., and Morgan, B. a (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 278, 30896–30904.

Vögtle, F.-N., Wortelkamp, S., Zahedi, R.P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., et al. (2009). Resource Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. *Cell* 139, 428–439.

Vögtle, F.-N., Burkhart, J.M., Rao, S., Gerbeth, C., Hinrichs, J., Martinou, J.-C., Chacinska, A., Sickmann, A., Zahedi, R.P., and Meisinger, C. (2012). Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 1840–1852.

Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424, 565–571.

Yan, C., Lee, L.H., and Davis, L.I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* 17, 7416–7429.

# Παράρτημα

---

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1:** Το μιτοχόνδριο

**Εικόνα 2:** Ιστορική ανασκόπηση σημαντικών ανακαλύψεων στο πεδίο έρευνας των μιτοχονδρίων

**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια

**Εικόνα 4:** Η οξειδάση του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων, Mia40

**Εικόνα 5:** Η σουλφυδρυλοξειδάση, Ern1

**Εικόνα 6:** Το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης Mia40-Ern1

**Εικόνα 7:** Υποστρώματα του υποδοχέα Mia40

**Εικόνα 8:** Ενζυμικοί μηχανισμοί καταπολέμησης του οξειδωτικού στρες

**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών του μεταγραφικού παράγοντα Yap1

**Εικόνα 10:** Μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Yap1

**Εικόνα 11:** Καθαρισμός των πρωτεϊνών Gpx3-His και Trx1-His

**Εικόνα 12:** Πειράματα εισόδου των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών Gpx3, Trx1 και Trr1.

**Εικόνα 13:** Ανίχνευση των επιπέδων των πρωτεϊνών Gpx3 και Trx1

**Εικόνα 14:** Πειράματα εισόδου και κινητικής των πρωτεϊνών Gpx3, Ybp2 και Yap1

**Εικόνα 15:** Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να οδηγεί στην παραγωγή μιας επιμηκυσμένης μορφής της πρωτεΐνης Gpx3

**Εικόνα 16:** Η επιμηκυσμένη μορφή (+18) της Gpx3 εισάγεται ταχύτερα στα μιτοχόνδρια

**Εικόνα 17:** Πιθανά μοντέλα εξήγησης του ρόλου της Gpx3 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

**Εικόνα 18:** *In vitro* πείραμα αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις καθαρισμένες (purified) πρωτεΐνες Gpx3 και ΔN290Mia40

**Εικόνα 19:** *In vitro* αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πρωτεΐνες Gpx3 και Mia40 χρησιμοποιώντας αυτοραδιογραφία

**Εικόνα 20:** Πειράματα θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης: αντιδράσεις ελέγχου



**Εικόνα 21:** Πειράματα θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης: μη επιτυχείς προσπάθειες

**Εικόνα 22:** Πειράματα θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης: οι δύο πιο επιτυχημένες προσπάθειες

**Εικόνα 23:** Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Mia40 και Gpx3

**Εικόνα 24:** Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Gpx3 και Trx1

**Εικόνα 25:** Πειράματα για την *in vitro* ανίχνευση του συμπλόκου Gpx3-Mia40

**Εικόνα 26:** Τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των κυττάρων

**Εικόνα 27:** Τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων δεν φαίνεται να επηρεάζουν την ικανότητα εισόδου των πρωτεϊνών Mia40 και Tim10 σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα

**Εικόνα 28:** Πιθανό μονοπάτι ρύθμισης των επιπέδων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

