



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
(IMBB-FORTH)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ
ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ:
ΔΟΜΗ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ, ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ

ΕΣΤΕΡ ΚΑΛΕΦ-ΕΖΡΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ Δ. (ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ)
ΣΠΗΛΙΑΝΑΚΗΣ Χ. (ΜΕΛΟΣ)
ΤΟΚΑΤΛΙΔΗΣ Κ. (ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ)

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, 2016

Τριμελής επιτροπή:

Αλεξανδράκη Δ. (Υπεύθυνη Καθηγήτρια)

Σπηλιανάκης Χ. (Μέλος)

Τοκατλίδης Κ. (Υπεύθυνος Ερευνητής)

Επταμελής επιτροπή:

Αλεξανδράκη Δ. (Αναπληρώτρια Καθ. Αναπτυξιακής - Μοριακής Βιολογίας)

Ζαγανάς Ι. (Επίκουρος Καθ. Νευρολογίας)

Πετράτος Κ. (Κύριος Ερευνητής IMBB)

Σπανάκη Κ. (Επίκουρη Καθ. Νευρολογίας)

Σπηλιανάκης Χ. (Επίκουρος Καθ. Βιοχημείας)

Ταβερναράκης Ν. (Καθ. Μοριακής Βιολογίας - Βιολογίας Συστημάτων)

Τοκατλίδης Κ. (Ερευνητής IMBB)

Στον πατέρα μου Τζων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή κ. Κώστα Τοκατλίδη του Πανεπιστημίου Κρήτης, που με δέχτηκε στο εργαστήριο που διευθύνει στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας και που μου εμπιστεύτηκε την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής σε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Του είμαι ευγνώμων για τη επιστημονική του καθοδήγηση, τις συμβουλές του καθώς και για την παροχή εξοπλισμού και υποδομής για την υλοποίηση των σχετικών πειραμάτων.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, τους καθηγητές του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Δέσποινα Αλεξανδράκη και κ. Χαράλαμπο Σπηλιανάκη για τις επιστημονικές τους συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου για την λήψη διδακτορικού διπλώματος και για την άδειά τους να χρησιμοποιήσω εξοπλισμό των εργαστηρίων τους.

Θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές από το συνεργαζόμενο Εργαστήριο Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, τον κ. Ανδρέα Πλαϊτάκη, τον κ. Ιωάννη Ζαγανά και την κ. Κλειώ Σπανάκη που με έκαναν να αισθανθώ πραγματικό μέλος του εργαστηρίου τους και με φιλοξενούσαν στις επιστημονικές συναντήσεις της ομάδας τους. Τους ευχαριστώ ακόμα για τις επιστημονικές συμβουλές, κυρίως σε θέματα ιατρικής, και γενικότερα για τη συνεργασία τους. Επίσης, τους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την θετική τους ενέργεια και τον ενθουσιασμό τους, ο οποίος μου έδινε δύναμη να συνεχίσω.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κυριάκο Πετράτο για τις συμβουλές του ως 4^ο μέλος των εξετάσεων ποιότητας (Qualifying Examinations) στην αρχή της διδακτορικής μου διατριβής και που δέχτηκε να είναι και μέλος της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής. Επίσης, ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Νεκτάριο Ταβερναράκη, κ. Ιωάννη Ζαγανά και την κ. Κλειώ Σπανάκη, που δέχτηκαν να είναι μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής.

Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή κ. Εμμανουήλ Λαδουκάκη για τις επιστημονικές του συμβουλές σχετικά με την χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής στην μελέτη της εξέλιξης της γλουταμικής αφυδρογονάσης μεταξύ των οργανισμών. Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή κ. Orlhy Pines του Εβραϊκού Πανεπιστημίου της Ιερουσαλήμ και τα μέλη της ομάδας του, ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Adi Naamati, για την παροχή του στελέχους σακχαρομύκητα *icr55Δ* και την ανταλλαγή απόψεων σχετικά με ορισμένα πειράματα της διδακτορικής μου διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους δασκάλους που

είχα στη ζωή μου οι οποίοι με βοηθήσανε να αποκτήσω τα εφόδια έτσι, ώστε να μπορέσω να ξεκινήσω την εν λόγω διατριβή.

Από καρδιάς ευχαριστώ την ιατρό και υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Κοτζαμάνη του Εργαστηρίου Νευρολογίας για την άψογη συνεργασία μας στη σχεδίαση, στην εκτέλεση και στην ανάλυση ορισμένων πειραμάτων της συγκεκριμένης διατριβής. Την ευχαριστώ για τον επιστημονικό της ενθουσιασμό και την κριτική της σκέψη. Επίσης, την ευχαριστώ θερμά για τις όμορφες συζητήσεις μας και για το γεγονός ότι μου στάθηκε σαν πραγματική φίλη σε διάφορες δύσκολες καταστάσεις που αντιμετώπισα κατά καιρούς. Ευχαριστώ επίσης, τον πολυαγαπημένο γιο της, Σταύρο, που έκανε ατέλειωτες ώρες υπομονή, όταν τον στερούσα από το παιχνίδι της μαμάς του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τεχνικό του εργαστηρίου Α203 κ. Νίτσα Κατρακίλη για τις συμβουλές της και τη βοήθειά της στις απομονώσεις μιτοχονδρίων από στελέχη σακχαρομύκητα. Επίσης, ευχαριστώ τις συμφοιτήτριές μου Εμμανουέλα Καλλέργη και Αφροδίτη Χατζή που με δίδαξαν τις κυριότερες τεχνικές του εργαστηρίου και που, ακόμα και από την άλλη άκρη της Ευρώπης, ήταν πάντα πρόθυμες να με βοηθήσουν. Επιπλέον, ευχαριστώ τα παλιά μέλη του εργαστηρίου Α203 Γεωργία Χαραλάμπους, Έρση Εμμανουηλίδου, Κατερίνα Καραγκούνη-Δαλακούρα, Μαρία Ανδρεαδάκη, Παρασκευή Μάρα, Φανή Μαγκανά, Bruna Giraldi και Esther Nuebel για το ευχάριστο εργαστηριακό κλίμα και τη στήριξη που μου έχουν προσφέρει κατά καιρούς.

Ευχαριστώ πολύ την Ειρήνη Λιονάκη για τις συμβουλές της σχετικά με την μη αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και τον κ. Γιώργο Φραγκιαδάκη για τη βοήθειά του σχετικά με τον διμερισμό των ολιγονουκλεοτιδίων. Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Νευρολογίας Χριστίνα Δημοβασίλη, Εμμανουέλα Βιογιατζή, και Ζωή Πετράκη για τις ευχάριστες συζητήσεις μας, επιστημονικές και μη.

Ευχαριστώ πολύ την γραμματέα του εργαστηρίου Νευρολογίας κ. Ειρήνη Τζανάκη για τις συμβουλές της σε διάφορα γραφειοκρατικά προβλήματα που έκαναν τη ζωή μου λιγότερο δύσκολη.

Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους και εξαιρετικούς φίλους από τα γειτονικά εργαστήρια στο ΙΤΕ Άντα Σαλατάι, Δήμητρα Διαλυνάκη, Πέτρο Τζέρπο, Χρύσα Σταθοπούλου και ιδιαίτερα τον Δημήτρη Νάσια και την Μαρία Στρατηγοπούλου για τις επιστημονικές τους συμβουλές, την συντροφιά τους και την υποστήριξή τους σε πολλαπλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Εκτός από την εργαστηριακή δουλειά, στο πανέμορφο νησί της Κρήτης είχα την ευκαιρία να γνωρίσω εξαιρετικούς ανθρώπους και φίλους, που έκαναν τη ζωή μου πιο

ενδιαφέρουσα. Ευχαριστώ πολύ τους ανεκτίμητους φίλους που απέκτησα στην Κρήτη Ειρήνη Καλαϊτζάκη, Λύδα Φωκίτη, Μανώλη Δασκαλάκη και, Νικολή Κυριακάκη. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αλμπέρτο Μπέγα για την υπομονή του, το χαμόγελό του και την συμπαράστασή του και την Γεωργία Καρατζιά για την υποστήριξη σε πολλαπλά επίπεδα, όπως για τις καλλιτεχνικές της συμβουλές.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με έχουν στηρίξει όσο κανείς άλλος σε κάθε πτυχή της ζωής μου σε πολλαπλά επίπεδα, την οικογένειά μου. Χωρίς την υποστήριξή και την αγάπη τους θα μου ήταν ακόμα πιο δύσκολο να συνεχίσω. Ευχαριστώ πολύ τη γιαγιά μου, που ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου, για την αμέριστη υπομονή τους, τις συμβουλές τους και την υποστήριξή τους με κάθε δυνατό τρόπο. Ευχαριστώ πολύ την μητέρα μου που άκουγε τους προβληματισμούς μου και με τον τρόπο της μου έδινε δύναμη. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον πατέρα μου που με κάνει πάντα να προσπαθώ περισσότερο, να πιστεύω στις δικές μου δυνάμεις και να ακολουθώ τα όνειρά μου όσο μακρινά και δύσκολα κι αν φαίνονται. Για αυτό και του αφιερώνω την παρούσα διατριβή.

Αυτό το έργο έχει χρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο-ΕΚΤ) και από Ελληνικά εθνικά κονδύλια μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Πρόγραμμα Χρηματοδότησης Έρευνας: ΘΑΛΗΣ-ΥΟΟ, Τίτλος «Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες» (Κωδικός 377226).

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Επώνυμο: **Καλέφ-Εζρά** Όνομα: **Έστερ**
Γέννηση: 28/07/1987, Ιωάννινα Διεύθυνση: Ζαγορίου 14, Ιωάννινα
Email: esterkafezra@gmail.com Τηλέφωνο: 2651032390

Εκπαίδευση

Διδακτορική (2012–2016): Τμήμα Βιολογίας - Παν. Κρήτης,
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας - Ίδρυμα Έρευνας και Τεχνολογίας
Τίτλος Διδακτ. Διατριβής: Μιτοχονδριακή στόχευση της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης:
δομή σινιάλου στόχευσης, λειτουργία και εξέλιξη

Υπεύθυνος ερευνητής: καθ. Κ. Τοκατλίδης, Υπεύθυνη καθηγήτρια: καθ. Δ. Αλεξανδράκη

Μεταπτυχιακή (2010–2012): Πρωτεύουσα Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης

Τίτλος Διπλωμ. εργασίας: Γενετική και βιοχημική ανάλυση της οξειδωτικής αναδίπλωσης πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια

Υπεύθυνος ερευνητής: καθ. Κ. Τοκατλίδης, Υπεύθυνη καθηγήτρια: καθ. Δ. Αλεξανδράκη

Τριμηνιαίες Εργαστηριακές Ασκήσεις στα πλαίσια του ΠΜΣ:

Τίτλος: Ποσοτική και ποιοτική μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Rad9 / Aft1 και της ικανότητας ομοδιμερισμού της πρωτεΐνης Mac1 στον *S. cerevisiae* σε συνθήκες βλάβης DNA

Υπεύθυνη καθηγήτρια: καθ. Δ. Αλεξανδράκη

Τίτλος: Χαρακτηρισμός της ανθρώπινης FAD-σουλφυδριλικής οξειδάσης ALR με συνδυασμό μεταλλαξιγένεσης, καθαρισμού πρωτεϊνών και δοκιμές συμπληρωματικότητας ζύμης

Υπεύθυνος ερευνητής: καθ. Κ. Τοκατλίδης

Βασική ΑΕΙ (2005–2010): Τμήμα Βιολογίας – Παν. Πατρών

Λυκειακή (2003-2005): Γενικό Λύκειο Ζωσιμαίας Σχολής Ιωαννίνων

Άλλες πιστοποιημένες επιστημονικές γνώσεις

Χειρισμός μικρών πειραματοζώων (5 ECTS)

Στοιχεία βιοφωτονικής και μοριακής απεικόνισης (3 ECTS)

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

- Evolution of glutamate dehydrogenase presequence among organisms (under preparation)
- Kalef-Ezra E, Kotzamani K, Zaganas I, Katrakili N, Plaitakis A, Tokatlidis K. (2016) Efficient import of a major mitochondrial enzyme depends on the synergistic action of two distinct helical structures of its presequence (submitted)
- Kallergi E, Kalef-Ezra E, Karagouni-Dalakoura K, Tokatlidis K. (2014) Common players in mitochondria biogenesis and neuronal protection against stress induced apoptosis. *Neurochemical Research*, **39**, 546-55 (doi: 10.1007/s11064-013-1109-x)

Προφορικές παρουσιάσεις σε επιστημονικά συνέδρια / ημερίδες

2015 Workshop "Mitochondria: function and dysfunction", Νεκρά Θάλασσα (Ισραήλ)

2014 65^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Θεσσαλονίκη

2011 Summer School of Protein Biotechnology, Ηράκλειο

Αναρτημένες ανακοινώσεις σε επιστημονικά συνέδρια / ημερίδες

2015 66^ο Πανελλήνιο Συνέδριο & 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νέων Επιστημόνων της ΕΕΒΜΒ, Αθήνα

2015 FEBS/EMBO Course on Mitochondria in life, death and disease. Φώδελε Ηρακλείου

2013- 64^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της ΕΕΒΜΒ, Αθήνα

2013 Conference: "Proteins from birth to disease", Ιερουσαλήμ (Ισραήλ)

Υποτροφίες

2016: Υποτροφία για Πρακτική άσκηση μέσω του προγράμματος Erasmus+

Τίτλος: Intra-mitochondrial gene expression. Υπεύθυνος καθηγητής: καθ. Robert Lightowers

2015: Υποτροφία εγγραφής στο 66^ο Συνέδριο της ΕΕΒΜΒ

2012–2015: Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Θαλής, Κωδ. 377226)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	8
Εικόνες.....	11
Πίνακες.....	15
Συνοπτομογραφίες.....	16
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	19
ABSTRACT.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	24
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	24
1. Τα μιτοχόνδρια.....	24
2. Τα κύρια μονοπάτια εισόδου των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια.....	27
3. Σιινιάλα στόχευσης των πρωτεϊνών στην μιτοχονδριακή μήτρα.....	32
4. Πρωτεάσες που κόβουν τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες στην μιτοχονδριακή μήτρα.....	33
Β. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΔΙΤΤΗ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	36
Γ. Η ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ (GDH).....	39
1. Γενικές πληροφορίες για την GDH.....	39
2. Η GDH ομαδοποιείται σε διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών.....	40
3. Η δομή της GDH.....	40
4. Η αλλοστερική ρύθμιση της GDH.....	41
5. Διαμερισματοποίηση της GDH.....	43
6. Η GDH στον άνθρωπο.....	44
7. Κυτταρική διαμερισματοποίηση των hGDHs.....	46
8. Είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια.....	50
Δ. Ο ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑΣ ΩΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ – ΜΟΝΤΕΛΟ.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	53
Α. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	53
Β. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας.....	56
1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA.....	56
1.2 Κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακούς φορείς (Clonings).....	58
1.3 Μεταλλαξιγενέσεις γονιδίων (mutagenesis).....	58
2. Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη μικροοργανισμών.....	59
2.1. <i>E. coli</i>	59

2.2. <i>S. cerevisiae</i> (yeast)	59
2.3. Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα.....	60
3. Χειρισμός μιτοχονδρίων	60
3.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από κύτταρα <i>S. cerevisiae</i>	60
3.2 Απομόνωση μιτοχονδρίων από την κυτταρική σειρά HEK293.....	61
4. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών	66
4.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικού τύπου πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE)	67
4.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση (Western Blot).....	68
4.4 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA.....	70
5. Έκφραση της πρωτεΐνης hGDH1	70
6. Προγράμματα Βιοπληροφορικής.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
A. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ: ΔΟΜΗ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	73
1. Το σύστημα εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η διαμερισματοποίηση των ανθρώπινων GDHs	73
1.1 Οι hGDHs μπορούν να εισέλθουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα	73
1.2 Οι hGDHs διαμερισματοποιούνται στην μιτοχονδριακή μήτρα.....	76
1.3 Η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από το Δψ και τη συγκέντρωση δισθενών μεταλλικών ιόντων	77
1.4 Οι hGDHs μπαίνουν στην μιτοχονδριακή μήτρα μέσω του καναλιού TIM23.....	78
1.5 Οι hGDHs μπορούν να σχηματίσουν εξαμερή, όταν εισέλθουν στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα	79
2. Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs είναι απαραίτητο για να μπουν οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες στα μιτοχόνδρια	80
3. Η α1 έλικα της hGDH2 είναι απαραίτητη για να διαμερισματοποιηθεί η hGDH2 στα μιτοχόνδρια	81
4. Το N53 των hGDHs είναι ικανό να στοχεύσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια.....	82
5. Η α1 έλικα παίζει κυρίαρχο ρόλο, ενώ η α2 έχει βοηθητικό ρόλο στην μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2	86
6. Η α1 έλικα της hGDH2 όταν συζευχθεί στο καρβοξυτελικό άκρο του DHFR, αποτυγχάνει να το οδηγήσει στα μιτοχόνδρια	92
7. Η αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης δεν είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή στόχευση των hGDHs	92
8. Πρωτεάσες της μιτοχονδριακής μήτρας που είναι υπεύθυνες για την αποκοπή του N53 των hGDHs	94
9. Το θετικό φορτίο παίζει πιο σημαντικό ρόλο σε σχέση με την αμφιπαθικότητα στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης της hGDH2.....	97
10. Ανάλυση της ικανότητας μιτοχονδριακής στόχευσης του κοινού πολυμορφισμού G35R της hGDH2.....	101
11. Η hGDH1 όταν συζευχθεί στο καρβοξυτελικό της άκρο με τον επίτοπο His, εξακολουθεί να μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και να σχηματίζει εξαμερή	102
12. Μελέτη πιθανής εξόδου των hGDHs από τα μιτοχόνδρια μετά την είσοδό τους και την αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής τους στόχευσης σε αυτά.....	103

B. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ.....	108
1. Προβλέψεις με τη χρήση προγραμμάτων Βιοπληροφορικής	108
1.1 Η μιτοχονδριακή στόχευση της GDH πιθανώς συν-εξελίχθηκε με την αλλοστερική της ρύθμιση	108
1.2 Οι GDHs παρουσιάζουν διπλή διαμερισματοποίηση μεταξύ των οργανισμών .	110
1.3 Οι GDHs από τους νηματώδεις μέχρι τον άνθρωπο έχουν θέση αναγνώρισης για την πρωτεάση Icp55	111
1.4 Η γλουταμική αφυδρογονάση δεν βρέθηκε να έχει κάποιο ευδιάκριτο σινιάλο πυρηνικής στόχευσης, αλλά έχει σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς.....	111
1.5 Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των GDHs είναι περισσότερο συντηρημένο σε σχέση με το ώριμο τμήμα τους.....	112
1.6 Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των GDHs στους ζωικούς οργανισμούς γίνεται μεγαλύτερο, περισσότερο θετικά φορτισμένο και ισχυρότερο με την εξέλιξη των οργανισμών, με πιθανή εξαίρεση την GDH στα πτηνά και στα ερπετά.....	113
1.7 Στο MTS της GDH των θηλαστικών η α1 έλικα είναι πιο συντηρημένη σε σχέση με την α2.....	115
2. Πειραματικά ευρήματα σχετικά με την εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης.....	117
2.1 Το MTS της GDH από τα βλεφαριδοφόρα μέχρι τον άνθρωπο φαίνεται να είναι ικανό να στοχεύσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια	117
2.2 Το MTS της GDH της <i>T. thermophila</i> αδυνατεί να στοχεύσει την ώριμη hGDH2 στα μιτοχόνδρια	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	121
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132
1. Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία	132
2. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	132
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο : ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	152
Οργανισμοί στους οποίους μελετήθηκε η GDH	152
Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά	154

ΕΙΚΟΝΕΣ

1.1. Η δομή των μιτοχονδρίων.....	25
1.2. Οι περισσότερες πρωτεΐνες εκφράζονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και διαμερισματοποιούνται στα μιτοχόνδρια χρησιμοποιώντας διαφορετικά μιτοχονδριακά μονοπάτια ανάλογα με τη θέση τους σε αυτά.....	27
1.3. Οι πρόδρομες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που στοχεύονται στην μιτοχονδριακή μήτρα μπορεί να έχουν αποκοπτόμενα ή μη αποκοπτόμενα σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης.....	34
1.4. Η πρωτεΐνη Icp55 των οργανισμών <i>S. cerevisiae</i> , <i>A. thaliana</i> και <i>H. sapiens</i>	35
1.5. Η διττή διαμερισματοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους.....	38
1.6. Διαγραμματική απεικόνιση της αντίδρασης της γλουταμικής αφυδρογονάσης.....	39
1.7. Δομή της GDH στα θηλαστικά.....	41
1.8. Η επικράτεια της αντένας στη GDH πρωτοεμφανίστηκε στα πρωτόζωα πριν την ρύθμιση των πουρινών.....	42
1.9. Οι πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2 διαμερισματοποιούνται στα μιτοχόνδρια σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών.....	47
1.10. Το N53 της hGDH2 είναι απαραίτητο για την μιτοχονδριακή της στόχευση.....	48
1.11. Οι hGDHs μπορεί να εντοπίζονται μερικώς στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά όχι στα νουκλεοσώματα.....	49
1.12. Οι ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες εμφανίζουν υψηλή ομολογία.....	50
1.13. Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του N53 των hGDH1 και hGDH2.....	51
1.14. Η έλικα α1 είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2.....	51
4.1. Είσοδος των <i>in vitro</i> συντιθέμενων ραδιενεργά σσημασμένων hGDH1 και hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.....	74
4.2. Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της Εικόνας 4.1.A.....	75
4.3. Οι hGDHs διαμερισματοποιούνται στην μιτοχονδριακή μήτρα.....	77
4.4. Η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Δψ).....	77
4.5. Η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δισθενών μεταλλικών ιόντων.....	78

4.6. Οι hGDHs μπαίνουν στα μιτοχόνδρια μέσω του καναλιού TIM23 της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.....	79
4.7. Οι hGDHs όταν μπουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, σχηματίζουν εξαμερή με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Είσοδος της hGDH1 και hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, μη αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.....	80
4.8. Το N53 είναι απαραίτητο για την μιτοχονδριακή στόχευση των hGDHs.....	80
4.9. Η $\alpha 1$ έλικα του N53 της hGDH2 είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή της στόχευση.....	82
4.10. Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs από μόνο του είναι ικανό να οδηγήσει την μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη DHFR στα μιτοχόνδρια.....	83
4.11. Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της Εικόνας 4.10.B.....	83
4.12. Το N53 των hGDHs μπορεί να στοχεύσει το EGFP στα μιτοχόνδρια σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.....	84
4.13. Τα N53 των hGDHs όταν συζευχθούν στο αμινοτελικό άκρο του EGFP, μπορούν να μπουν στα μιτοχόνδρια και να ανιχνευτούν στα μιτοχονδριακά κλάσματα.....	86
4.14. Είσοδος του N53 της hGDH2 και των επιμέρους τμημάτων του σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.....	87
4.15. Το πεπτιδίο $\alpha 1$ του N53 της hGDH2, αλλά όχι το $\alpha 2$, είναι ικανό από μόνο του να οδηγήσει το EGFP στα μιτοχόνδρια από τις κυτταρικές σειρές HEK293 και HeLa....	88
4.16. Χρειάζεται η ύπαρξη και των δύο ελίκων της hGDH2 για να στοχευθεί το ώριμο τμήμα της hGDH2 πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια.....	90
4.17. Υποκυτταρική διαμερισματοποίηση των υβριδικών πεπτιδίων $\Delta 53hGDH2-EGFP$, $\alpha 1-\Delta 53hGDH2-EGFP$ και $\alpha 1\alpha 2-\Delta 53hGDH2-EGFP$	90
4.18. Η $\alpha 1$ της hGDH2 μπορεί να στοχεύσει το DHFR στα μιτοχόνδρια όταν βρίσκεται συζευγμένο με το αμινοτελικό τμήμα του, αλλά όχι στο καρβοξυτελικό τμήμα του DHFR.....	92
4.19. Η αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs δεν είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή τους στόχευση.....	93
4.20. Διαγραμματική απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας του οδηγού πεπτιδίου των hGDHs και οι προτεινόμενες θέσεις κοπής τους από τις πρωτεάσες MPP και Icp55 σύμφωνα με τα συνήθη μοτίβα που αυτές αναγνωρίζουν.....	95
4.21. Οι hGDHs δεν μπορούν να εισέλθουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια που έχουν παραχθεί σε θρεπτικό μέσο YPD.....	96

4.22. Μελέτη της πιθανής συσχέτισης εισόδου των hGDHs με την πρωτεάση της μιτοχονδριακής μήτρας Icp55Δ.....	97
4.23. Πειράματα κινητικής της εισόδου αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένων μορφών της hGDH2 για 2 ή 5min στους 30°C.....	99
4.24. Πειράματα κινητικής των μεταλλαγμένων μορφών της hGDH2 (R3A-L5A και R3A-K7A) για 0,5, 2 και 5min στους 16°C.....	100
4.25. Πειράματα κινητικής της εισόδου αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένων μορφών του υβριδικού πεπτιδίου α1-DHFR για 2 ή 5min στους 30°C σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.....	100
4.26. Η hGDH2-G35R μπορεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια με παρόμοιο ρυθμό σε σχέση με την wt hGDH2.....	101
4.27. Η πρωτεΐνη hGDH1-His μπορεί να εισέλθει σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και να σχηματίσει εξαμερή.....	102
4.28. Μελέτη πιθανής παλίνδρομης κίνησης των hGDHs.....	104
4.29. Η hGDH1 δεν φαίνεται να μπορεί να εκφραστεί στα κύτταρα σακχαρομύκητα.....	106
4.30. Η πρωτεΐνη hGDH1-His εκφράζεται σε βακτήρια <i>E. coli</i> (DE3), αλλά αδυνατεί να προσδεθεί στη στήλη νικελίου	107
4.31. Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της κυτταρικής διαμερισματοποίησης της γλουταμικής αφυδρογονάσης διαφορετικών οργανισμών.	108
4.32. Η εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης στους ζωικούς οργανισμούς.....	114
4.33. Στα θηλαστικά, το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι αρκετά συντηρημένο. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν την α1 έλικα είναι πιο συντηρημένα από αυτά της α2.....	116
4.34. Τα σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης της GDH των οργανισμών <i>T. thermophila</i> , <i>C. elegans</i> , <i>D. melanogaster</i> και <i>X. laevis</i> είναι ικανά από μόνα τους να στοχεύσουν το DHFR σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.....	118
4.35. Τα MTS της GDH των οργανισμών <i>T. thermophila</i> , <i>C. elegans</i> , <i>D. melanogaster</i> και <i>X. laevis</i> είναι ικανά από μόνα τους να οδηγήσουν το EGFP στα μιτοχόνδρια σε κύτταρα HEK293 και HeLa.....	119
4.36. Το MTS της GDH της <i>T. thermophila</i> αδυνατεί να αντικαταστήσει πλήρως το MTS της hGDH2.....	120
4.37. Το MTS της GDH της <i>T. thermophila</i> μπορεί να στοχεύσει σε μικρό βαθμό την	

ώριμη hGDH2 συζευγμένη με το EGFP στα μιτοχόνδρια σε κύτταρα HeLa.....120

5.1. Διαμερισματοποίηση της GDH μεταξύ των οργανισμών και το σινιάλο
μιτοχονδριακής της στόχευσης.....128

Πίνακες

1.1. Γενικές πληροφορίες για τις hGDHs.....	46
3.1. Πλασμιδιακοί φορείς.....	56
3.2. Πλασμιδιακές κατασκευές.....	57
3.3. Μεταλλαξιγενέσεις.....	58
3.4. Tris-Tricine SDS.....	66
3.5. SDS-PAGE.....	67
3.6. Gradient 5-12% BN-PAGE.....	68
3.7. Running Buffers for BN-PAGE.....	68
4.1. Πρόβλεψη μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDH1 και hGDH2.....	76
4.2. Πρόβλεψη κυτταρικής διαμερισματοποίησης των hGDH1 και hGDH2.....	81
4.3. Συνοπτική παρουσίαση των <i>in silico</i> προβλέψεων για την μιτοχονδριακή στόχευση της GDH από διαφορετικούς οργανισμούς.....	109
4.4. Πρόβλεψη κυτταρικής διαμερισματοποίησης των GDHs από διαφορετικούς οργανισμούς.	112
4.5. Υπολογισμός ομολογίας της αμινοξικής σύστασης μεταξύ των ζωικών οργανισμών του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης και του ώριμου τμήματος της GDH.....	113
4.6. Πρόβλεψη φορτίου του MTS των GDHs από διαφορετικούς οργανισμούς.....	115

Συντομογραφίες

ADP	Adenosine Diphosphate
APS	Ammonium Persulfate
ATP	Adenosine Triphosphate Synthase
Atp17	F1-F0 ATP synthase
BN	Blue Native
C	Cytosol
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CHO	Chinese Hamster Ovary cell line
CK2	Casein Kinase 2
COS7	CV-1 & carrying the SV40 genetic material 7 cell line
ctrl	control
DDM	n-Dodecyl -D-Maltoside
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DsREd2	Discosoma sp. Red fluorescent protein
EGCG	Epigallocatechin gallate
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Endoplasmic Reticulum
Erv1	Essential for Respiration and Vegetative Growth 1
Fum	Fumarate hydratase
GDH	Glutamate Dehydrogenase
GLUD	Glutamate Dehydrogenase (human gene)
GS	Glutamine Synthetase
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HEK293	Human Embryonic Kidney Cell Line 293
HeLa	Henrietta Lack's cell line (cervical cancer cells)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hGDH	Glutamate Dehydrogenase (human protein)
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
HRP	Horse Raddish Peroxidase
Hsp70	Heat shock protein 70
Icp55	Intermediate Cleaving Peptidase 55

IM	Inner Membrane
IMP	Inner Membrane Peptidase
IMS	Intermembrane space
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ITS	IMS-Targeting Signal
LB	Lysogeny Broth medium
M	Mitochondria
Mcr1	Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase
MIA	Mitochondrial Intermembrane space Import & Assembly
Mim1	Mitochondrial Import 1
MISS	Mitochondrial Intermembrane space Sorting Signal
MnSOD	Manganese-dependent Superoxide Dismutase
MP	Mitoplast
MPP	Mitochondrial Processing Peptidase
MSF	Mitochondrial import Stimulation Factor
mtDNA	mitochondrial Deoxyribonucleic Acid
mtHsp70	mitochondrial Heat shock protein 70
MTS	Mitochondrial Targeting Signal
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
Oct1	Octapeptidylpeptidase 1
OM	Outer Membrane
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAM	Presequence translocase Associated Motor complex
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene Glycol
PK	Proteinase K
PKA	Protein Kinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
RRL	Rabbit Reticulocyte Lysate
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid
S	Supernatant
SAM	Sorting and Assembly Machinery
SBTI	Soybean Trypsin Inhibitor

SDS	Sodium Docecyl Sulfate
Su9	Subunit 9 of the ATP synthase
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TCA	Tricloroacetic Acid
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tim	Translocase of the inner membrane
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	transfer Ribonucleic Acid
TX-100	Tetramethylbutyl)-phenyl ether (Triton-100)
wt	wild type
XPNPEP3	X-prolyl aminopeptidase 3 (human Icp55)
YPD	Yeast Peptone Dextrose
YPLactate	Yeast Peptone Lactate
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TOM	Translocase of the Outer Membrane
PRDX	Peroxioredoxin

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια απαραίτητα για την βιωσιμότητα των περισσότερων ευκαρυωτικών κυττάρων και η βιογένεσή τους στηρίζεται στα μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών σε αυτά. Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) είναι ένα ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και έχει βρεθεί σε όλους σχεδόν τους ζώντες οργανισμούς. Στα θηλαστικά η GDH αποτελεί σε ορισμένες περιπτώσεις περισσότερο από το 10% των πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής μήτρας. Στον άνθρωπο και τα ανώτερα πρωτεύοντα εμφανίζεται με δύο ισομορφές, την hGDH1 και την hGDH2, οι οποίες έχουν ένα ασυνήθιστα μεγάλο σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης (MTS) αποτελούμενο από 53 αμινοξέα (N53). Το N53 έχει την τάση σχηματισμού δύο αμφιπαθών α-ελίκων ($\alpha 1$, $\alpha 2$). Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σκοπό τον χαρακτηρισμό του πεπτιδίου N53 των hGDHs και την μελέτη της εξέλιξης του MTS της GDH μεταξύ των οργανισμών.

Στο πρώτο τμήμα της διατριβής, βρήκαμε ότι οι *in vitro* συντιθέμενες hGDHs μπορούν να εισέλθουν, να κοπούν και να σχηματίσουν εξαμερή σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από το κανάλι TIM23, το ηλεκτροχημικό δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και τη συγκέντρωση των δισθενών μεταλλικών ιόντων. Παρόλο που τα τμήματα N53 των hGDH1 και hGDH2 έχουν 83% ομολογία, βρέθηκε ότι η ισομορφή hGDH2 μπαίνει ή/και αποκόπτεται ταχύτερα στα μιτοχόνδρια από ότι η hGDH1. Με το ερώτημα αν υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην μιτοχονδριακή στόχευση στον άνθρωπο λόγω της μεταλλαγής G35R στην hGDH2 που προκύπτει από τον συχνό στον πληθυσμό πολυμορφισμό του γονιδίου *GLUD2* c.G103A (*Plaitakis et al, 2010*), μελετήσαμε την επίδρασή της μεταλλαγής αυτής σε μιτοχόνδρια και είδαμε ότι δεν επηρεάζει την είσοδό της hGDH2 στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Επίσης, με σκοπό να φτιάξουμε μία κατασκευή που να μπορεί χρησιμοποιηθεί για την εύρεση μοριακών συνοδών της hGDH1, βρήκαμε ότι η εισαγωγή του επιτόπου His στο καρβοξυτελικό άκρο της hGDH1 (hGDH1-His), δεν επηρεάζει την ικανότητά της να στοχεύεται στα μιτοχόνδρια και να δημιουργεί εξαμερή.

Μελετήσαμε το πεπτίδιο N53 κατά τμήματα και επίσης ξεχωριστά από την υπόλοιπη hGDH, ώστε να κατανοήσουμε της ιδιότητές του. Πειράματα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια έδειξαν ότι το πεπτίδιο N53 είναι απαραίτητο για την μιτοχονδριακή στόχευση των hGDHs και είναι ικανό από μόνο του να οδηγήσει την μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη DHFR στα μιτοχόνδρια. Επίσης, βρέθηκε ότι όταν απουσιάζει η $\alpha 1$ έλικα της hGDH2, η

hGDH2 χάνει την ικανότητά της για μιτοχονδριακή στόχευση. Παρατηρήθηκε ότι η α1 της hGDH2 όταν συζευχθεί στο N-τελικό άκρο (α1-DHFR), αλλά όχι με στο C-τελικό του DHFR (DHFR-α1), μπορεί να οδηγήσει το πεπτίδιο DHFR στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, η α2 δεν βρέθηκε να έχει αυτόνομη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης. Παρατηρήθηκε ότι το συζευγμένο πεπτίδιο α1α2, αλλά όχι το πεπτίδιο α1 από μόνο του, είναι ικανό να οδηγήσει στα μιτοχόνδρια την ώριμη hGDH2. Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με πειράματα που έγιναν από τους συνεργάτες μας του Εργαστηρίου Νευρολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών με τον επίτοπο EGFP. Ως εκ τούτου, βρέθηκε ότι η μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2 στηρίζεται στη συνεργατική δράση των δύο α-ελίκων και ότι η α1 έχει πρωταγωνιστικό ρόλο.

Γενικά, θεωρείται ότι τα MTS δεν έχουν κάποιο συγκεκριμένο αμινοξικό μοτίβο, αλλά είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα, χαρακτηρίζονται από αμφιπαθικότητα και τάση για δημιουργία α-έλικας. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το ηλεκτρικό φορτίο στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου N53 της hGDH2 είναι πιο σημαντικό για την μιτοχονδριακή στόχευση της από ότι η αμφιπαθικότητα, η ελικοειδής διαμόρφωση και το φορτίο στο C-τελικό άκρο του. Επίσης, βρέθηκε ότι η πρωτεολυτική αποκοπή του N53 δεν είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή στόχευση των hGDHs.

Στο δεύτερο τμήμα της διατριβής, μελετήθηκε η εξέλιξη του MTS της GDH μεταξύ των οργανισμών χρησιμοποιώντας *in silico* προγράμματα πρόβλεψης για ~170 διαφορετικές πρωτεϊνικές αλληλουχίες GDH. Προβλέφθηκε ότι η εμφάνιση ύπαρξης αποκοπτόμενου MTS πιθανώς να ξεκίνησε από τα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα και να εξελίχθηκε σταδιακά σε ένα πολύ ισχυρό, μεγαλύτερο, περισσότερο θετικά φορτισμένο και πολυπλοκότερο σινιάλο MTS στα θηλαστικά, με πιθανή εξαίρεση την GDH στα πτηνά και τα ερπετά. Επίσης, προβλέφθηκε ότι τα φυτά έχουν μη αποκοπτόμενο MTS στην GDH, ενώ δεν καταφέραμε να προβλέψουμε MTS στην GDH στους μύκητες. Στα θηλαστικά παρατηρήθηκε ότι τα αμινοξέα που απαρτίζουν την α1 έλικα είναι εξελικτικά περισσότερο συντηρημένα σε σχέση με αυτά που απαρτίζουν την α2 έλικα.

Πειραματικές *in vivo* και *in organello* μελέτες σε συνεργασία με το Εργαστήριο Νευρολογίας έδειξαν ότι τα MTS της GDH των οργανισμών *T. thermophila* (βλεφαριδοφόρο), *C. elegans* (σκουλήκι), *D. melanogaster* (μύγα) και *X. laevis* (βατράχι) είναι ικανά να στοχεύσουν τις πρωτεΐνες DHFR και EGFP στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, βρέθηκε ότι το MTS της *T. thermophila* αδυνατεί να στοχεύσει αποδοτικά την ώριμη hGDH2 στα μιτοχόνδρια.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης στοιχειοθετούν ένα σημαντικό βήμα προς την πλήρη αποκάλυψη των μοριακών ιδιοτήτων, των λειτουργικών χαρακτηριστικών και της εξέλιξης των σινιάλων μιτοχονδριακής στόχευσης για την μιτοχονδριακή βιογένεση.

ABSTRACT

Mitochondria are essential organelles of most eukaryotic cells and their biogenesis relies on mitochondrial protein import pathways. Glutamate dehydrogenase (GDH), an enzyme that plays a central role in cellular metabolism, is present in almost all living organisms. In mammals, GDH makes up, in some instances, more than 10% of the mitochondrial matrix proteins. In human and in great apes it exists in two isoforms, hGDH1 and hGDH2, which both have an unusually large mitochondrial targeting signal (MTS) consisting of 53 amino acid residues (N53). Their N53 peptide has the tendency to form two amphipathic α -helices (α 1, α 2). In this PhD thesis, the N53 peptides of hGDHs were characterized. Moreover, the evolution of the GDH MTS among organisms was studied.

In the first section we have found that the *in vitro* synthesized hGDHs can be efficiently imported, proteolytically processed into isolated yeast mitochondria and they form hexamers. The mitochondrial import of hGDHs process depends on the TIM23 complex, on the mitochondrial inner membrane potential and on the concentration of divalent metal ions. Although the N53 peptides of hGDHs share 83% homology, we observed that the isoform hGDH2 is imported or/and processed faster in mitochondria than hGDH1. We observed that the mutation G35R in hGDH2, that arises from the common polymorphism *GLUD2(c.G103A)* (Plaitakis *et al*, 2010), does not affect its mitochondrial targeting capacity. Furthermore, in order to make a construct that can be used to search new molecular protein partners of hGDH1, we found that the addition of the epitope His at the C-terminus of hGDH1 (hGDH1-His) does not interrupt either the mitochondrial targeting efficiency or hexameric formation.

We studied the N53 peptide in portions and separate from the rest hGDH, in order to understand its properties. Import experiments in already isolated mitochondria showed that the N53 peptides of hGDHs are essential for mitochondrial localization of hGDHs and they are able to target the non-mitochondrial protein DHFR into mitochondria. Additionally, deletion of the α 1 helix of hGDH2 abolishes its mitochondrial import. The α 1 helix of hGDH2 is sufficient to target the DHFR protein into mitochondria, when it is fused N-terminally (α 1-DHFR) but not, when it is fused C-terminally (DHFR- α 1). However, the α 2 does not seem to have an autonomous mitochondrial targeting capacity. We found also that the fused peptide α 1 α 2, but not the α 1 alone, is able to target the mature hGDH2 protein into mitochondria. Our findings are in agreement with experiments in mammalian cell lines with the epitope EGFP from our collaborators at the Neurology Laboratory of the

University of Crete. Therefore, we found that the mitochondrial targeting of hGDH2 relies on the synergistic effect of the two α -helical structures, with the first one having the leading role.

It is generally believed that the MTS do not have a common motif. However, the MTS are rich in positively charged amino acids and are characterized by amphipathicity and tendency for α -helix formation. Our data suggest that the net positive charge of the N-terminal part of the N53 of hGDH2 rather than the net positive charge of the C-terminal part of the N53 or the amphipathicity and propensity for α -helix formation is the main determinant for their mitochondrial import. Moreover, the proteolytic removal of the N53 in the mitochondrial matrix is not essential for the import of hGDHs in mitochondria.

In the second section, we have studied the evolution of the MTS of GDH among organisms using *in silico* prediction programs for ~170 distinct GDH proteins. This study suggested that the GDH cleavable MTS first arose in the kingdom of ciliophora protista and then evolved step by step into highly efficient, substantially complex and more positive charged MTS in mammals, with potential exceptions the GDH in birds and reptiles. Moreover, the plants are predicted to have GDH with non-cleaved MTS and we failed to predict MTS in the GDH in fungi. In addition, our analyses showed that in mammals, the α 1 helix is evolutionary more conserved than the α 2 helix

Experimentally, *in vivo* and *in organello* studies carried out in collaboration with the Neurology Laboratory showed that the MTS of GDH from *T. thermophila* (ciliate), *C. elegans* (roundworm), *D. melanogaster* (fly) and *X. laevis* (frog) alone are able to target DHFR and EGFP into mitochondria. However, the MTS of GDH from *T. thermophila* seems not to be sufficient to target efficiently the mature hGDH2 into mitochondria.

The findings of the present study are an important step towards revealing the full molecular details underlying the functional characteristics and the evolution of the mitochondrial targeting signals for mitochondrial biogenesis.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

1.

Τα μιτοχόνδρια

Οι πρώτοι προκαρυωτικοί οργανισμοί εμφανίστηκαν πριν από ~3,8 δισεκατομμύρια χρόνια, ενώ οι πρώτοι ευκαρυωτικοί πριν από ~1,5 δισεκατομμύρια χρόνια (*Gray et al, 1999; Martin et al, 2007*). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα εμφανίζουν διαμερισματοποίηση, η οποία βοηθάει στον καλύτερο συντονισμό διαφορετικών μεταβολικών διαδικασιών. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια πρέπει να μεταφερθούν στο «κατάλληλο» κυτταρικό διαμέρισμα έτσι, ώστε να μπορέσουν να εκτελέσουν τις λειτουργίες που χρειάζεται το κύτταρο.

Η εγκόλπωση ενός α-πρωτεοβακτηρίου από ένα άλλο, ήταν ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη των σύγχρονων ευκαρυωτικών οργανισμών καθώς είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των μιτοχονδρίων (*Gray et al, 1997; Martin et al, 2007*). Τα μιτοχόνδρια κληρονόμησαν τα υπο-διαμερίσματα του πατρικού βακτηρίου και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του, όπως το γονιδίωμά του, τον μηχανισμό πρωτεϊνικής του σύνθεσης και τη διαφορά μεμβρανικού δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης. Κατά την εξέλιξη των ευκαρυωτικών κυττάρων δημιουργήθηκαν νέα γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν ορισμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται για παράδειγμα με την μεταφορά των μεταβολιτών (*Palmieri, et al, 2006*) και την απόπτωση (*Kuwana et al, 2003*).

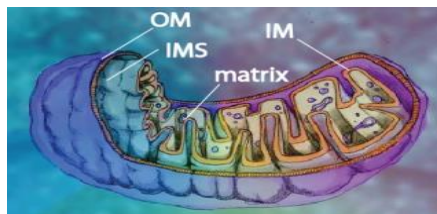
Τα μιτοχόνδρια είναι ιδιαίτερα σημαντικά οργανίδια για τη λειτουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων, καθώς αποτελούν τα σημαντικότερα οργανίδια στην διαδικασία παραγωγής ενέργειας στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα για διάφορες διαδικασίες, όπως είναι η οξειδωση του πυροσταφυλικού οξέος, η σύνθεση των συμπλοκών Fe/S, ο κύκλος του κιτρικού οξέος (εναλλακτικά ονομάζεται και κύκλος του Krebs), και η αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Επίσης, τα μιτοχόνδρια σχετίζονται με την οξειδωση των λιπαρών οξέων και τη βιοσύνθεση της αίμης. Τέλος, τα μιτοχόνδρια σχετίζονται με την αποθήκευση και την απελευθέρωση του ασβεστίου, με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση.

Τα μιτοχόνδρια υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα του σακχαρομύκητα δεν μπορούν να μεγαλώσουν χωρίς μιτοχόνδρια

(Baker & Scatz, 1991), αλλά μπορούν να επιβιώσουν με μη λειτουργική οξειδωτική αλυσίδα (Grivell, 1995).

Τα μιτοχόνδρια καταλαμβάνουν το ~18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ο αριθμός τους διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και από οργανισμό σε οργανισμό. Για παράδειγμα τα ηπατοκύτταρα έχουν ~1.700 μιτοχόνδρια και τα ωκύτταρα των αμφιβίων έχουν ~10.000.000 μιτοχόνδρια (Αλεξανδρή-Χατζηαντωνίου, 2004). Τα μιτοχόνδρια έχουν την ικανότητα σχάσης, σύντηξης και κίνησης μέσα στο κύτταρο και επομένως το σχήμα τους δεν είναι σταθερό. Τα μιτοχόνδρια έχουν συνήθως επίμηκες σχήμα και το μέγεθός τους ποικίλει από μήκος 2-8μm και πλάτος 0,2-1μm. Ως εκ τούτου, σε αντίθεση με τα περισσότερα οργανίδια του κυττάρου, τα μιτοχόνδρια είναι αρκετά μεγάλα έτσι, ώστε να μπορούν να διακριθούν με οπτικό μικροσκόπιο.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από δύο μεμβράνες λιπιδίων, την εξωτερική (OM) και την εσωτερική (IM), το μικρό διαμεμβρανικό χώρο ανάμεσα στις δύο μεμβράνες (IMS) και την μιτοχονδριακή μήτρα (matrix) (**Εικόνα 1.1**). Οι δύο μιτοχονδριακές μεμβράνες, OM και IM, διαφέρουν ως προς την αναλογία τους σε λιπίδια και πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται κατά 50% από λιπίδια και 50% από πρωτεΐνες, ενώ η IM από 20% και 80% λιπίδια και πρωτεΐνες, αντίστοιχα (Αλεξανδρή-Χατζηαντωνίου, 2004). Οι πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα κατανέμονται περίπου κατά 14% στην OM, 36% στην IM, 8% στο IMS και 39% στην μιτοχονδριακή μήτρα (Vögtle et al, 2009).



Εικόνα 1.1 Η δομή των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από την εξωτερική (OM) και εσωτερική (IM) την μιτοχονδριακή μεμβράνη, το διαμεμβρανικό χώρο ανάμεσα στις δύο μεμβράνες (IMS) και την μιτοχονδριακή μήτρα (matrix).

Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη περιέχει οξειδωτικά ένζυμα καθώς και πρωτεΐνες μεταφοράς, όπως είναι για παράδειγμα η πρωτεΐνη διάυλος πορίνη (porin), που επιτρέπει τη διέλευση μορίων μέχρι 10 kDa. Επιπλέον, περιέχει ένζυμα που εμπλέκονται στη ρύθμιση μιτοχονδριακών λιπιδίων και ένζυμα που μετατρέπουν λιπίδια σε μορφή που να μπορούν να μεταβολιστούν στην μιτοχονδριακή μήτρα.

Η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει πολυάριθμες πτυχωσείς ή ακρολοφίες (cristae), με αποτέλεσμα να έχει δέκα φορές περισσότερη επιφάνεια σε σχέση με την πλασματική

μεμβράνη ενός δεδομένου κυττάρου. Στην IM και στην OM υπάρχουν γειτονικές-οριακές μεμβράνες (boundary membranes), οι οποίες διευκολύνουν την μεταφορά των λιπιδίων, την είσοδο των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και σχετίζονται με τη συναρμολόγηση του αναπνευστικού συμπλόκου (*Reichert & Neupert, 2002*). Ανάμεσα στις δύο περιοχές υπάρχουν στενές σωληνοειδείς δομές, οι οποίες ονομάζονται διασυνδέσεις των ακρολοφιών (cristae junctions) (*Mannella et al, 1994; Perkins, et al, 1997*).

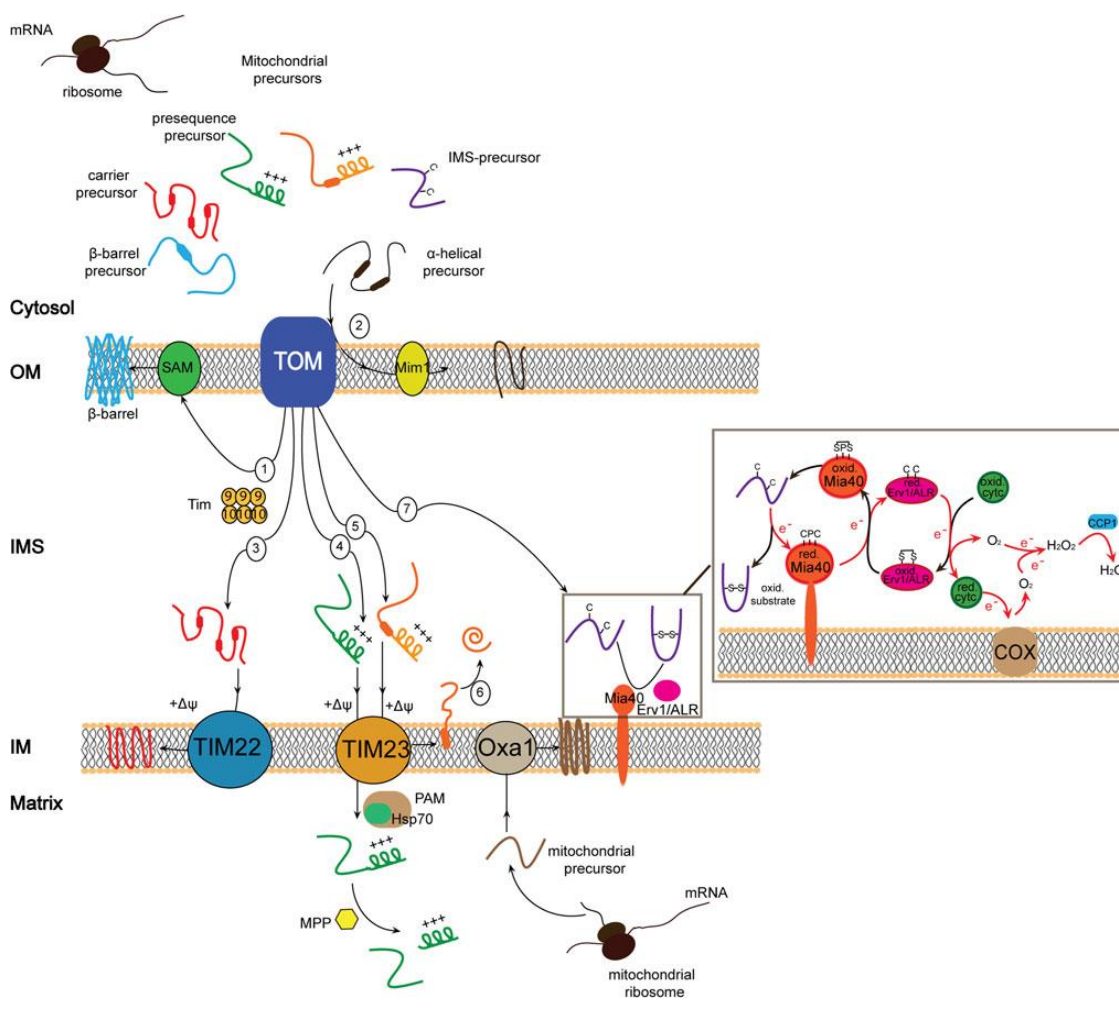
Η εσωτερική μεμβράνη έχει ιδιαίτερα λιπιδική σύσταση, καθώς περιέχει το φωσφολιπίδιο καρδιολιπίνη, το οποίο συμβάλλει μαζί με την πολύ πλούσια πρωτεϊνική σύσταση της IM στη διεξαγωγή πολύ σημαντικών λειτουργιών. Επίσης περιέχει ορισμένες πρωτεΐνες που είναι πολύ σημαντικές για τη λειτουργία του κυττάρου, όπως είναι τα ένζυμα των οξειδωτικών αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας και το σύμπλοκο συνθετάση του ATP (Adenosine Triphosphate Synthase). Επίσης, περιέχει ειδικές πρωτεΐνες μεταφοράς μεταβολιτών προς την μιτοχονδριακή μήτρα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία ηλεκτροχημική βαθμίδωση, που οδηγεί σε διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της ($\Delta\psi$).

Ο διαμεμβρανικός χώρος των μιτοχονδρίων πιστεύεται ότι έχει την ίδια κατανομή ιόντων και μορίων με το κυτοσόλιο. Στο IMS γίνεται μεταφορά μεταβολιτών, πρωτεϊνών, ιόντων και λιπιδίων από την μια μεμβράνη στην άλλη και συναρμολογείται το σύμπλεγμα μεταφοράς του χαλκού. Στον εν λόγω χώρο στεγάζονται πρωτεΐνες σχετικές με την παραγωγή του ATP, την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την αποτοξίνωση από ενεργές ρίζες οξυγόνου (*Bihlmaier et al, 2008*). Επίσης στο IMS διαμερισματοποιείται η πρωτεΐνη Pink1 η οποία έχει συσχετιστεί με τη νόσο του Parkinson (*Silvestri et al, 2005*), καθώς και ορισμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση.

Η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει ένα πολύ σημαντικό μίγμα εκατοντάδων πρωτεϊνών, μεταξύ αυτών, εκείνων που απαιτούνται για την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος και των λιπαρών οξέων, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και το tRNA. Στον άνθρωπο το mtDNA είναι κυκλικό μόριο, που αποτελείται από ~16.000 bp, και είναι μητρικής προέλευσης. Ορισμένες ανθρώπινες ασθένειες έχουν συσχετιστεί με μεταλλαγές στο mtDNA. Για παράδειγμα, η κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber οφείλεται σε μεταλλαγές σε μιτοχονδριακά γονίδια που σχετίζονται με την αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Άλλες μεταλλαγές σε μιτοχονδριακά γονίδια θεωρείται ότι συμβάλλουν σε ορισμένες περιπτώσεις στις νόσους του Parkinson και του Alzheimer.

2. Τα κύρια μονοπάτια εισόδου των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν παράγουν καινούργια μιτοχόνδρια κάθε φορά που διαιρούνται. Αντίθετα, τα μιτοχόνδρια διαιρούνται διπλασιάζοντας τον αριθμό τους και κατανέμονται στα δύο νέα κύτταρα πριν από την κυτταρική διαίρεση. Σήμερα το mtDNA κωδικοποιεί μόνο μερικές από τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μεταφορά των ηλεκτρονίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Το mtDNA στον άνθρωπο κωδικοποιεί 2 rRNAs και 22 tRNAs του μιτοχονδρίου. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων (>99%) κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Έτσι, κάθε μόριο προερχόμενο από το κυτοσόλιο πρέπει να τοποθετηθεί στο ειδικό μιτοχονδριακό υποδιαμέρισμα έτσι, ώστε να είναι λειτουργικό. Επομένως, οι περισσότερες πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων συντίθενται στο κυτοσόλιο και μπαίνουν στα μιτοχόνδρια μέσα από ειδικά μοριακά μονοπάτια εισόδου, ανάλογα με την τελική τους θέση μέσα στα μιτοχόνδρια, όπως περιγράφεται συνοπτικά στην **Εικόνα 1.2**.



Εικόνα 1.2 Οι περισσότερες πρωτεΐνες εκφράζονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και διαμερισματοποιούνται στα μιτοχόνδρια χρησιμοποιώντας διαφορετικά μιτοχονδριακά μονοπάτια ανάλογα με τη θέση τους σε αυτά. (Kallergi et al, 2014)

Αν και τα πρώτα συστατικά των μονοπατιών εισόδου των πρωτεϊνών από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια έχουν ανιχνευτεί πριν από τουλάχιστον 20 χρόνια, ο μηχανισμός εισόδου δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Συγκεκριμένα, μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς μελέτες στο σακχαρομύκητα, στα θηλαστικά, στο σκουλήκι και στο φυτό *A. Thaliana* και έχει παρατηρηθεί ότι τα μονοπάτια αυτά είναι αρκετά συντηρημένα μεταξύ των οργανισμών. Αντίθετα, έχουν πραγματοποιηθεί λιγότερες μελέτες σχετικά με τα μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια άλλων οργανισμών όπως για παράδειγμα στο τρυπανόσωμα.

Η είσοδος των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια δεν είναι μια στατική διαδικασία. Αντιθέτως, είναι μια πολύ δυναμική διαδικασία και ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση ορισμένων πρωτεϊνών-κλειδιών για την είσοδο των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια από κυτταροπλασματικές κινάσες, όπως η CK2 (Casein Kinase 2) και η PKA (Protein Kinase A) (Schmidt et al, 2011; Rao et al, 2011; Rao et al, 2012).

Οι μέχρι τώρα μελέτες συγκλίνουν στο ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες στοχεύονται με μετα-μεταφραστικό τρόπο στα μιτοχόνδρια. Έτσι, οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες εκφράζονται από τα πολυριβοσώματα στο κυτοσόλιο και στη συνέχεια εισέρχονται στα μιτοχόνδρια. Οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες συχνά προσδένονται σε διάφορες πρωτεΐνες-μεταφορείς του κυτταροπλάσματος, όπως είναι οι πρωτεΐνες MSF (Mitochondrial import Stimulation Factor) και η κυτοσολική μοριακή συνοδός Hsp70 (Heat shock protein 70). Η πρόσδεση αυτή απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και βοηθάει τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες να παραμείνουν ξεδίπλωτες στο κυτοσόλιο προτού εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, σε άλλες πρωτεΐνες η διαδικασία της μετάφρασης στα πολυριβοσώματα γίνεται παράλληλα με την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια (Kellems et al, 1975; Yogev et al, 2007).

Οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες εκτός από το γεγονός ότι χρησιμοποιούν διαφορετικά μονοπάτια, έχουν και διαφορετικά σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης, ανάλογα με το σημείο στο οποίο στοχεύονται μέσα σε αυτά (**Εικόνα 1.2**). Ορισμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχουν ένα «κλασικό» αποκοπτόμενο σινιάλο στο N-τελικό τους άκρο (Dolezal et al, 2006; Neupert & Herrmann, 2007; Bolender et al, 2008), το οποίο ονομάζεται σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης (MTS, Mitochondrial Targeting Sequence) ή presequence (Herrmann & Neupert, 2003; Chacinska et al, 2009). Οι πρωτεΐνες αυτές οδηγούνται στην μιτοχονδριακή μήτρα, στην IM ή στο IMS (**Εικόνα 1.2**). Τα MTS συνήθως αποκόπτονται όταν οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Για παράδειγμα, στο σακχαρομύκητα έχει αναφερθεί ότι το ~69,6% των MTS αποκόπτονται

όταν εισέλθουν στα μιτοχόνδρια (*Vögtle et al, 2009*). Ορισμένες ανωμαλίες στην αποκοπή των MTS στα μιτοχόνδρια έχουν συσχετισθεί με ασθένειες στον άνθρωπο, όπως είναι η κληρονομική σπαστική παραπληγία (*Nolden et al, 2005*).

Αντίθετα, άλλες πρωτεΐνες που στοχεύονται στην OM, IM ή στο IMS δεν έχουν «κλασικό» MTS, αλλά εσωτερικές κρυφές αλληλουχίες στόχευσης μέσα στην ώριμη πρωτεΐνη (**Εικόνα 1.2**). Τα σινιάλα αυτά, καθώς και τα μονοπάτια εισόδου τους στα μιτοχόνδρια, περιγράφονται στις ενότητες 2.1 – 2.4.

2.1. Είσοδος πρωτεϊνών στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη

Σχεδόν όλες οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες εισέρχονται στα μιτοχόνδρια μέσω του συμπλόκου TOM (Translocase of the Outer Membrane) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (**Εικόνα 1.2**). Το σύμπλεγμα TOM προσδένει τις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες και παρέχει ένα κανάλι στην εξωτερική μεμβράνη για την μεταφορά τους μέσα στα μιτοχόνδρια. Το σύμπλοκο TOM αποτελείται από την πρωτεΐνη Tom40, η οποία σχηματίζει τον κύριο πόρο (*Ahting et al, 1999; Model et al, 2008*), την Tom22 η οποία έχει ρόλο υποδοχέα και σχετίζεται με τον ολιγομερισμό του συμπλόκου (*van Wilpe et al, 1999*), τις πρωτεΐνες Tom5, Tom6, Tom7, οι οποίες σχετίζονται με τη δομή και τη σταθερότητα του συμπλόκου (*Meisinger et al, 2001; Model et al, 2001; Sherman et al, 2005; Schmitt et al, 2005*) και τις πρωτεΐνες Tom20 και Tom70 οι οποίες σχετίζονται με την αναγνώριση των πρόδρομων πολυπεπτιδικών αλυσίδων (*Brix et al, 1997; Kiebler et al, 1993; Saitoh et al, 2007*).

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης που έχουν δομή β-βαρελιού (π.χ. Tom40, porin) εκφράζονται στο κυτοσόλιο περνούν στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του καναλιού TOM, μεταφέρονται από το σύμπλεγμα σαπερονών Tim8-Tim13 (Translocase of the Inner Membrane 8 & 13) και εμπεδώνονται στην εξωτερική μεμβράνη μέσω του συμπλόκου SAM (Sorting and Assembly Machinery) (*Wiedemann et al, 2003; Hoppins & Nargang, 2004*).

Από την άλλη πλευρά, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης με δομή α-έλικας έχουν υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα ως σινιάλα στόχευσης και η στόχευσή τους στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από το σύμπλοκο TOM και την πρωτεΐνη Mim1 (Mitochondrial Import 1) της OM (*Popov-Celeketic et al, 2008; Becker et al, 2008; Hulett et al, 2008*).

2.2. Είσοδος πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

Όλες οι πρωτεΐνες που διαμερισματοποιούνται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το μονοπάτι το οποίο χρησιμοποιούν για να εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα, χωρίζονται σε αυτές που έχουν ένα αμφιμερές (bipartite) N-τελικό σινιάλο στόχευσης και σε αυτές που έχουν εσωτερικό (internal) σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης. Οι πρωτεΐνες με αμφιμερές N-τελικό σήμα στόχευσης, όπως είναι το κυτόχρωμα c (cytochrome c), χρησιμοποιούν το σύμπλοκο TIM23 (Translocase of the Inner Membrane 23) και απελευθερώνονται πλευρικά στη λιπιδική διπλοστοιβάδα ως διαλυτές πρωτεΐνες μέσω του μηχανισμού «διακοπής-μεταφοράς» (stop transfer mechanism) (Glick *et al*, 1991). Η μεταφορά αυτή απαιτεί την κατανάλωση ATP και εξαρτάται από το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης ($\Delta\psi$). Οι πρωτεΐνες παίρνουν την ώριμή τους μορφή από πεπιδάσεις των μιτοχονδρίων.

Ορισμένες πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου έχουν ένα εσωτερικό σινιάλο στόχευσης με χαρακτηριστικά κυστεϊνικά μοτίβα (διπλό Cx6C ή διπλό Cx9C), τα οποία ονομάζονται ITS (IMS-Targeting Signal) ή MISS (Mitochondria IMS-Sorting Signal) (Sideris *et al*, 2009; Milenkovic *et al*, 2009), όπως είναι για παράδειγμα οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών πρωτεϊνών Tim. Οι εν λόγω πρωτεΐνες ακολουθούν το μονοπάτι MIA (Mitochondrial Import and Assembly), στο οποίο οι πρόδρομες πρωτεΐνες αφού περάσουν στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του καναλιού TOM, αναγνωρίζονται και οξειδώνονται από την πρωτεΐνη Mia40 (Mitochondrial Import and Assembly 40) έτσι, ώστε να πάρουν τη τελική μορφή τους και να παγιδευτούν στο διαμεμβρανικό χώρο (Sideris & Tokatlidis, 2010). Στη συνέχεια, η Mia40 επανοξειδώνεται από την πρωτεΐνη Erv1 (Essential for Respiration and Vegetative Growth 1) και ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό O_2 . Η διαδικασία αυτή δεν απαιτεί την κατανάλωση ATP και είναι ανεξάρτητη από το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης.

2.3. Είσοδος πρωτεϊνών στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης έχουν εσωτερικό σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης, αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα Tom70 και διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη μέσω του συμπλόκου TOM (Brix *et al*, 1999). Στη συνέχεια, οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες χρησιμοποιούν το σύμπλεγμα Tim9-Tim10 του διαμεμβρανικού χώρου (Εικόνα 1.2). Το σύμπλεγμα Tim9-Tim10 δρα ως μοριακός

συνοδός (chaperons) για την καθοδήγηση πρόδρομων πρωτεϊνικών μορίων στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (*de Marcos-Lousa et al, 2006*). Έτσι, αφού διασχίσουν το διαμεμβρανικό χώρο, οι πρωτεΐνες εμπεδώνονται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του καναλιού TIM22 (Translocase of the Inner Membrane 22) (*Koehler et al, 1998; Sirrenberg et al, 1996*). Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης και δεν απαιτεί την κατανάλωση μορίων ATP. Εξαιρέση αποτελούν μερικές πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης οι οποίες έχουν ένα υδρόφοβο σινιάλο μετά το MTS και χρησιμοποιούν το εναλλακτικό κανάλι εισόδου TIM23 (Translocase of the Inner Membrane 23) στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπεδώνονται στην εσωτερική μεμβράνη με πλαϊνή εισαγωγή.

2.4. Είσοδος πρωτεϊνών στην μιτοχονδριακή μήτρα

Οι πρωτεΐνες που στοχεύονται στην μιτοχονδριακή μήτρα αποτελούν περίπου τα 2/3 των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (*Tokatlidis et al, 2000*). Οι εν λόγω πρωτεΐνες μετά την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια μέσω του καναλιού TOM (**Εικόνα 1.2**) διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη διαμέσου του συμπλόκου TIM23 (*Alder et al, 2008*). Το σύμπλοκο TIM23 αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες και αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα TOM και το σύμπλεγμα PAM (Presequence translocase–Associate import–Motor). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Tim23 σχηματίζει ένα κανάλι στο σύμπλοκο TIM23 (*Meinecke et al, 2006*). Η πρωτεΐνη Tim17 εμπλέκεται στη συναρμολόγηση του συμπλέγματος PAM και στην πλευρική μεταφορά των πρόδρομων μορίων (*Chacinska et al, 2005*), ενώ η πρωτεΐνη Tim50, που λειτουργεί ως υποδοχέας των πρόδρομων νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο TOM και σχετίζεται με το κλείσιμο του καναλιού απουσία νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών (*Mokranjac et al, 2003; Chacinska et al, 2005; Meinecke et al, 2006; Mokranjac et al, 2009; Tamura, et al, 2009*). Η πρωτεΐνη Tim21 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο TOM καθώς και με τα σύμπλοκα III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας (*Chacinska et al, 2005; van der Laan et al, 2006; Wiedemann, et al, 2007; Dienhart et al, 2008*).

Οι πρωτεΐνες που εισέρχονται στην μιτοχονδριακή μήτρα για να περάσουν την εσωτερική μεμβράνη χρειάζονται εκτός από το σύμπλοκο TIM23 και τη δράση του συμπλόκου PAM. Το σύμπλοκο PAM περιλαμβάνει την πρωτεΐνη mtHsp70 (mitochondrial Heat shock protein 70). Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από το $\Delta\psi$ και από τη συγκέντρωση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine Triphosphate, ATP). Οι

πρωτεΐνες που κατευθύνονται προς την μιτοχονδριακή μήτρα, ενσωματώνονται στη θέση τους εντός ~1-2min από την απελευθέρωσή τους από τα πολυριβωσώματα.

3. Σινιάλα στόχευσης των πρωτεϊνών στην μιτοχονδριακή μήτρα

Οι περισσότερες από τις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που στοχεύονται στην μιτοχονδριακή μήτρα, έχουν συνήθως ένα αποκοπτόμενο σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης στο N-τελικό τους άκρο (**Εικόνα 1.3**). Τα MTS συνήθως αποτελούνται από ~15-50 αμινοξικά κατάλοιπα (*Herrmann & Neupert, 2003; Chacinska et al, 2009*). Στο σακχαρομύκητα και στα θηλαστικά τα MTS αποτελούνται κατά μέσο όρο από 30 αμινοξικά κατάλοιπα (*Vögtle et al, 2009*), ενώ στο φυτό *A. thaliana* και στο ρύζι 50 και 45 αντίστοιχα (*Teixeira et al, 2013*). Στο σακχαρομύκητα το 91% των MTS που στοχεύουν πρωτεΐνες στην μιτοχονδριακή μήτρα αποτελούνται από λιγότερα των 50 αμινοξέων (*Vögtle et al, 2009*). Παρόλα αυτά, υπάρχουν πρωτεΐνες με πολύ μικρό MTS όπως είναι η Atp17 (F1F0 ATP synthase) στο σακχαρομύκητα η οποία έχει ένα αποκοπτόμενο MTS αποτελούμενο από 6 αμινοξικά κατάλοιπα (*Vögtle et al, 2009*).

Τα MTS που στοχεύουν πρωτεΐνες στην μιτοχονδριακή μήτρα δεν έχουν κάποιο συγκεκριμένο αμινοξικό μοτίβο, αλλά είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα και/ ή υδροξυλιωμένα αμινοξέα, ενώ έχουν συνήθως ελάχιστα έως καθόλου αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (*Chacinska et al, 2009*). Επίσης, τα MTS έχουν την τάση δημιουργίας μιας (συνήθως) ή περισσότερων αμφιπαθικών α-ελίκων (amphipathic helices), όπου από τη μια πλευρά της έλικας βρίσκονται τα θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα και από την άλλη ομαδοποιούνται αφόρτιστα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα (*Roise & Schatz, 1988; Chacinska et al, 2009*).

4. Πρωτεάσες που κόβουν τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες στην μιτοχονδριακή μήτρα

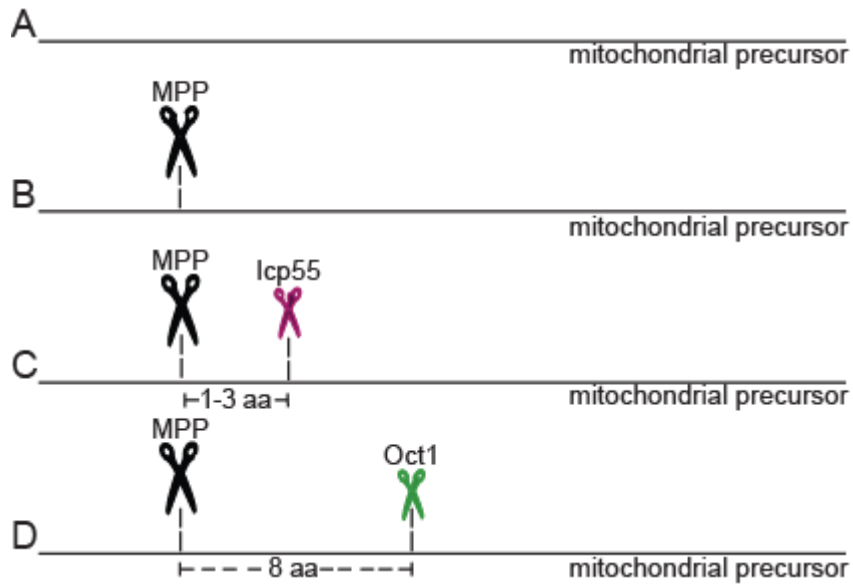
Η κύρια πεπτιδάση των MTS στην μιτοχονδριακή μήτρα ονομάζεται MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) (*Taylor et al, 2001; Neupert & Herrmann, 2007*) (**Εικόνα 1.3.A**) και η δράση της εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δισθενών μεταλλικών ιόντων (*Luciano et al, 1998*). Η πρωτεάση MPP αναγνωρίζει το μοτίβο (-2R,-3R) στη θέση κοπής (*Vögtle et al, 2009*). Στο σακχαρομύκητα και στον άνθρωπο, η MPP διαμερισματοποιείται στην μιτοχονδριακή μήτρα, ενώ στα φυτά η MPP είναι ενσωματωμένη στο σύμπλοκο bc1 της αναπνευστικής αλυσίδας (*Braun et al, 1992*).

Ορισμένες πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μήτρας εκτός από την αποκοπή του MTS από την MPP, απαιτούν ένα δεύτερο συμπληρωματικό βήμα κοπής ώστε να πάρουν την ώριμη τελική μορφή τους στην μιτοχονδριακή μήτρα. Η πέψη αυτή διασφαλίζεται από την πρωτεάση Oct1 (Octapeptidylpeptidase 1), η οποία ονομάζεται και MIP (Mitochondrial Intermediate Peptidase) (*Isaya et al, 1991; Vögtle et al, 2011*), ή εναλλακτικά από την πρωτεάση Icp55 (Intermediate Cleaving Peptidase 55) (*Naamati et al, 2009; Vögtle et al, 2009*) (**Εικόνες 1.3.C-D**). Η πρωτεάση Oct1 λειτουργεί μετά την MPP και αφαιρεί ένα οκταπεπτιδίο από τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες (*Gakh et al, 2002*) (**Εικόνα 1.3.D**).

Η Icp55 ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών APP (aminopeptidase P) (*Ersahin et al, 2005; Rawlings et al, 2008*). Η Icp55 στον σακχαρομύκητα εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μήτρα και στον κυτταρικό πυρήνα (*Naamati et al, 2009*). Η Icp55 του σακχαρομύκητα κόβει 1-3 αμινοξέα μετά τη θέση κοπής από την MPP (*Naamati et al, 2009; Vögtle et al, 2009*) (**Εικόνα 1.3.C**) και έχει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια (*Vögtle et al, 2009*). Η πρωτεΐνη cp55 του σακχαρομύκητα αναγνωρίζει και κόβει τα υποστρώματα που έχουν το μοτίβο Y/L/F↓S/A (*Vögtle et al, 2009*).

Πολύ πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι η ομόλογη πρωτεΐνη της Icp55 στο φυτό *A. thaliana* σχετίζεται με τη σταθερότητα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και αναγνωρίζει μεγαλύτερο εύρος διαφορετικών υποστρωμάτων σε σχέση με αυτήν του σακχαρομύκητα (*Huang et al, 2015*). Στον άνθρωπο έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη XPNPEP3 (X-prolyl aminopeptidase 3) είναι πιθανώς ομόλογη ή ορθόλογη της Icp55 του σακχαρομύκητα και είναι γνωστό ότι η XPNPEP3 σχετίζεται με μία νεφροπάθεια (*O'Toole et al, 2010; Stames et al, 2013*). Μέχρι τώρα δεν έχουν αποσαφηνιστεί τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης XPEP3 σε σχέση με τη δράση της ως πεπτιδάσης. Στην **Εικόνα 1.4** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα

της πολλαπλής στοίχισης (multiple sequence alignment) της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της Icp55 του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, του φυτού *A. Thaliana* και του ανθρώπου.



Εικόνα 1.3 Οι πρόδρομες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που στοχεύονται στην μιτοχονδριακή μήτρα μπορεί να έχουν αποκοπτόμενα (B-D) ή μη αποκοπτόμενα (A) σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης. Τα πρόδρομα μόρια μπορεί να αποκόπτονται στην μιτοχονδριακή μήτρα αποκλειστικά από την πρωτεάση MPP (B). Εναλλακτικά, οι πρόδρομες πολυπεπτιδικές αλυσίδες μπορεί να αποκόπτονται από την πρωτεάση MPP και σε επόμενο στάδιο να αποκόπτονται από την πρωτεάση Icp55 1-3 αμινοξέα μετά τη θέση κοπής από την MPP (C), ή αποκόπτονται από την πρωτεάση Oct1 8 αμινοξέα μετά τη θέση κοπής από την MPP (D).

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

Saccharomyces_cerevisiae  -----MLHRINPVR---FSMQSCQRYFSKLVSPLEQHKSNTFTNRVRIPIEAGQPL
Homo_sapiens              MPWLLSAPKLVPAVANVRGLSGCMLCSQRRYSL-----QPVPERRIPNRYLGQPS
Arabidopsis_thaliana     MQFL-----ARNLVRVRSRTQVVSRYST-----QTVRDIGQPT
                               **                .:. :*                ***

Saccharomyces_cerevisiae  HETRPFLLIKSGELTPGISALEYYERRIRLAETLPPKS-----CVILAGNDIQFASGA
Homo_sapiens              PFTHPHLLRPGEVTPGLSQVEYALRRHKLSLIQKEAQQSGTDQTVVVLNSPTYYSND
Arabidopsis_thaliana     PASHPHLMAEGEVTGPIRIEYIGRRKLVLELLPENS-----LAIISSAPVKMMTDV
                               :*:.*:  **:*:*:  ** ** :*  . :  : :                .:. .      :

Saccharomyces_cerevisiae  VFYPFQQENDLFYLSGWNEPNSVMILEK-PTDSLSDTI FHMLVPPKDAFAEKWEGFRSGV
Homo_sapiens              IPYTFHQDNNFLYLCGFQEPDSIILVLSLPGKQLPSHKAILFVPRRDPSPRELWDGFRSGT
Arabidopsis_thaliana     VPYTFRQDADYLYLTGCGQPGGVAVLSDERG-----LCMFMPESTPKDIAWEGEVAGV
                               : * *:*:  : :* *  :*  . : :*..                ::*                *:*  :*.

Saccharomyces_cerevisiae  YGVQEIFNADESASINDLSKYLPKI INRNDFIYFDMLSTSNPSSS-NFKHKISLLDGSNG
Homo_sapiens              DGAIALTGVD EAYTLEEFQHLLPKMKAETNMVWYDWMRPSHAQLHSDYMQ-----
Arabidopsis_thaliana     DAASEVFKADQAYPI SKLPEILSDMIRHSSKVFHNVSASQRYT-----N-----
                               ..  :  .*: :  :..  . *  . :  . . . : :  *  .

Saccharomyces_cerevisiae  SNRSLNSIANKTIKPIKRIAEFRKIKSPQELRIMRRAGQISGRSFNQAF--AKRFRNER
Homo_sapiens              PLTEAKAKSKNKVRGVQQLIQRLRLIKSPA EIERMQIAGKLTSAFIETMFTSKAFVEEA
Arabidopsis_thaliana     LDDFQNSASLGKVKTLSSLTHELRLIKSPAELKLMRESAS IACQLLKTMLHSGKGFPEG
                               : :  :  . :  . .  . : *  * * *  * . :  : : : : :  : :  : :  : *  : *

Saccharomyces_cerevisiae  TLDSFLHYKFI SGGCKD KDAYIPV VATGSNSLCIHYTRNDDVMFDEEMVLVDAAGSLGGYC
Homo_sapiens              FLYAKFEFECRARGADILAYPPVAGGNRSNTLHYVKNNQLIKDGMVLLDGGCESSCYV
Arabidopsis_thaliana     ILSAQVEYECRVRGAQRMAFN PVVGGGSNASVIHYSRNDQRIKGDGLVLDMDMGCELHG YV
                               *  :  . : :  *  . :  *  : * * . * . :  : *  : * : :  *  : * * * . *

Saccharomyces_cerevisiae  ADISRTWPNSGKFTDAQRDLYEAVLNVQRDCIKLCKASNNSLHDIHEKSITLMKQELKN
Homo_sapiens              SDITRTWPVNGRFTAPQAEELYEAVLEIQRDCLALCFPGT--SLENIYSMMLTLIGQKLD
Arabidopsis_thaliana     SDLTRTWPPCGKFSVQEELYDLILQTNKECIKQCKPGT--TIRQLNTYSTELLCDGLMK
                               :*::****  *:*:  *  :*:*:  :*  : : : :  *  . .  : : : :  *  :  : *  .

Saccharomyces_cerevisiae  LGIDKVS GWN-----VEKLYPHYIGHNLGLDVHDPKVSRYEPLKVGQVITIEPGLYIPN
Homo_sapiens              LGIMKNIKENNAFKAARKYCPHHVGHYLGMDVHDT PDMPRSLPLQPGMVTIEPGIYIPE
Arabidopsis_thaliana     MGILKSRRL-----YHQLNPTSIGHYLGMDVHDSSAVGYDRPLQPGFVITIEPGVYIPS
                               :* *                . :  *  : * * : * * * :  :  * * : *  * * * * * : * * * .

Saccharomyces_cerevisiae  E-ESFPSYFRNVGIRIEDDIAIGEDTYTNLTVEAVKEIDDL ENVMQNGSLTKFEEDQVAP
Homo_sapiens              DDKDAPEKFRGLGVRIEDDVVVTQDSPLILSADCPKEMNDIEQICSQAS-----
Arabidopsis_thaliana     S-FDCPERFQIGIRIEDDLITETGYEVL TGSMPKEIKHIETLNNHCHDNSAR-SFAS
                               .  .  *  . * :  : * : * * * :  :  :  *  :  .  * * : : * :  :  :

Saccharomyces_cerevisiae  L----
Homo_sapiens              -----
Arabidopsis_thaliana     FSLQG

```

Εικόνα 1.4 Η πρωτεΐνη Icp55 των οργανισμών *S. cerevisiae*, *A. thaliana* και *H. sapiens*.

B. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΔΙΤΤΗ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ

Οι πρωτεΐνες που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα μπορεί να εκρίνονται στον εξωκυτταρικό χώρο ή να στοχεύονται στο κυτταροπλάσμα, στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες ή σε άλλες κυτταρικές θέσεις (κυτταρικά διαμερίσματα). Υπάρχουν πρωτεΐνες (ίδιες ή παρόμοιες) οι οποίες διαμερισματοποιούνται σε περισσότερες από μία κυτταρικές θέσεις οι οποίες ονομάζονται ισοπρωτεΐνες (isoproteins or echoproteins) (Regev-Rudzki *et al*, 2005). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται διττή διαμερισματοποίηση (dual localization). Η διττή διαμερισματοποίηση είναι ένα σχετικά συχνό φαινόμενο. Πιο συγκεκριμένα, αφορά περισσότερο από το 33% των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών του σακχαρομύκητα (Ben-Menachem *et al*, 2011) και περισσότερες από 100 πρωτεΐνες στα φυτά (Carrie & Small, 2013). Παραδείγματα διττής διαμερισματοποίησης έχουν αναφερθεί και για ορισμένες ιϊκές πρωτεΐνες (Mavinakere *et al*, 2004; Mandic *et al*, 2009).

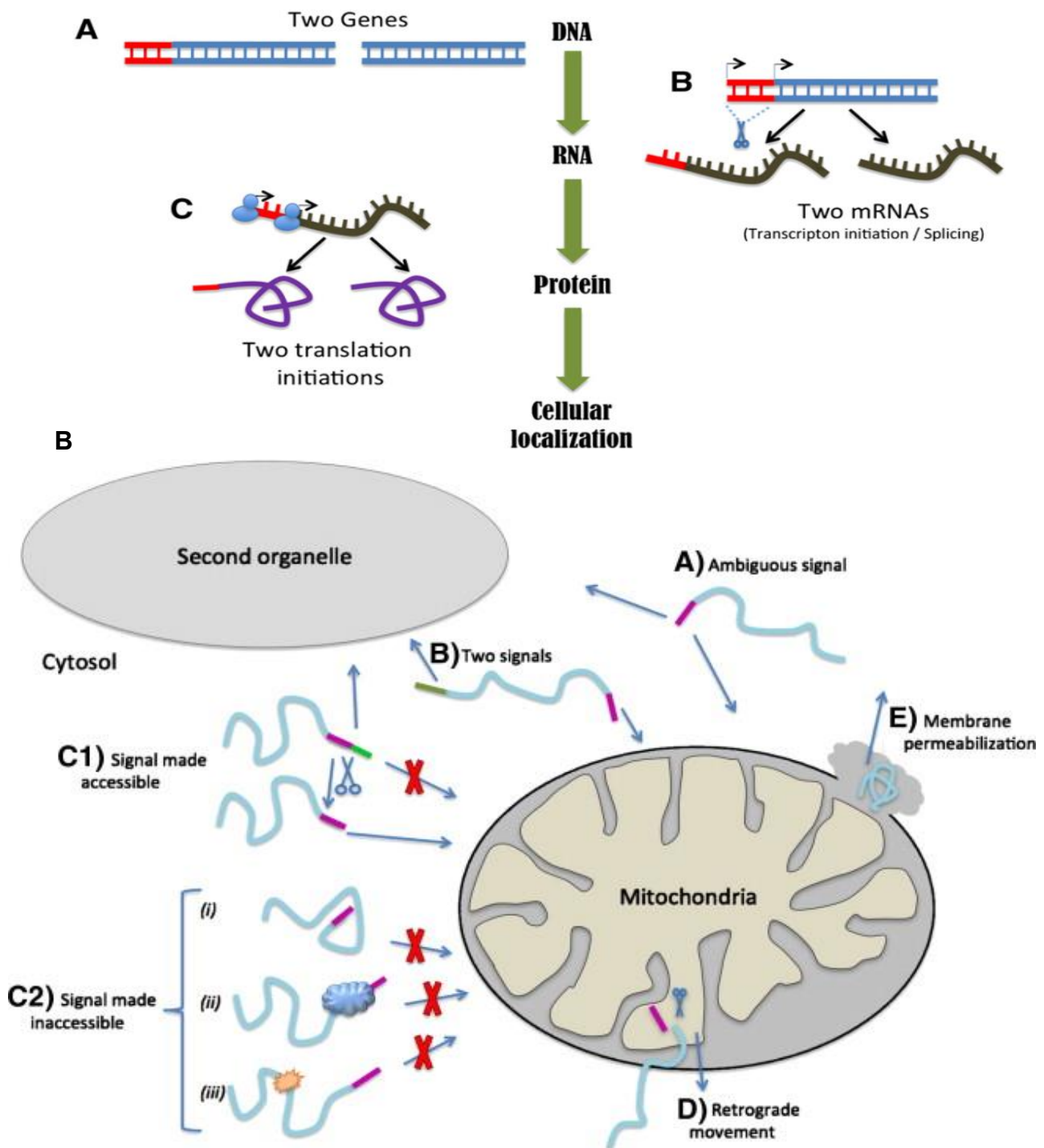
Η διττή διαμερισματοποίηση θεωρείται ότι αποτελεί εξελικτικό πλεονέκτημα γιατί παρέχει τη δυνατότητα αύξησης των κυτταρικών λειτουργιών χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα γονιδίων. Πρόκειται για μία ιδιαίτερα δυναμική διαδικασία που παρέχει στα κύτταρα ευελιξία, καλύτερη και ταχύτερη ικανότητα αντίδρασης στις μεταβολές του περιβάλλοντος και σχετίζεται με την επικοινωνία μεταξύ των οργανιδίων π.χ. ανάμεσα στα μιτοχόνδρια και στα πλαστίδια.

Η διττή διαμερισματοποίηση μπορεί να εμφανίζεται σε κυτταρικό επίπεδο ή σε διαφορετικά υπο-διαμερίσματα ενός οργανιδίου (alternative topogenesis). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη Mcr1 (Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase) του σακχαρομύκητα διαμερισματοποιείται στην OM και στο IMS (Meineke *et al*, 2008). Επιπλέον, έχει αναφερθεί το φαινόμενο της ιστο-ειδικής στόχευσης (tissue-specific targeting), όπου μια πρωτεΐνη εντοπίζεται σε ένα μόνο κυτταρικό διαμέρισμα σε έναν ιστό, ενώ κατανέμεται διαφορετικά σε έναν άλλο ιστό. Για παράδειγμα, γλουταμική συνθετάση του κοτόπουλου (glutamine synthetase, GS) εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα στα αστροκύτταρα, ενώ στα ηπατοκύτταρα εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Matthews *et al*, 2010). Αυτό στο ότι η διαφορά μεμβρανικού δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης στα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων είναι 40 φορές υψηλότερη από αυτή των αστροκυττάρων (Matthews *et al*, 2010).

Η διττή διαμερισματοποίηση των ισοπρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφορετικών μοριακών μονοπατιών (Yogev & Pines, 2011). Πιο συγκεκριμένα, η διττή διαμερισματοποίηση μπορεί να δημιουργηθεί από την ύπαρξη ενός ή περισσότερων του

ενός γονιδίων (**Εικόνα 1.5.A.A**), από τη δημιουργία δύο διαφορετικών mRNAs από το ίδιο γονίδιο (**Εικόνα 1.5.A.B**) ή από τη σύνθεση δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που προέρχονται από το ίδιο mRNA (**Εικόνα 1.5.A.C**).

Οι ισοπρωτεΐνες μπορεί να είναι πανομοιότυπες και να έχουν διττή διαμερισματοποίηση με άλλους τρόπους. Για παράδειγμα, η διττή διαμερισματοποίηση μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη ενός σινιάλου που οδηγεί σε περισσότερες από μία κυτταρικές θέσεις (**Εικόνα 1.5.B.A**) ή στην ύπαρξη περισσότερων του ενός σινιάλων κυτταρικής στόχευσης (**Εικόνα 1.5.B.B**). Επίσης, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ένα σινιάλο στόχευσης μπορεί να μη γίνεται προσβάσιμο. Μία άλλη περίπτωση σχετίζεται με το φαινόμενο της παλίνδρομης κίνησης (retrograde movement) (**Εικόνα 1.5.B.D**). Χαρακτηριστικό παράδειγμα παλίνδρομης κίνησης αποτελεί η πρωτεΐνη φουμαράση του σακχαρομύκητα (*yFum*, fumarate hydratase), η οποία αρχικά εισέρχεται και κόβεται στα μιτοχόνδρια και στη συνέχεια ένα μέρος της βγαίνει στο κυτταρόπλασμα (*Knox et al, 1998*). Κινητήρια δύναμη για την παλίνδρομη κίνηση της *yFum* είναι η γρήγορη αναδίπλωσή της στο κυτταρόπλασμα (*Sass et al, 2003*). Τέλος, είναι γνωστό ότι ορισμένες πρωτεΐνες μπορεί να βγουν από ένα κυτταρικό διαμέρισμα, όταν αυτό χάσει την μεμβρανική του ακεραιότητα ή σε συνθήκες στρες (**Εικόνα 1.5.B.E**).

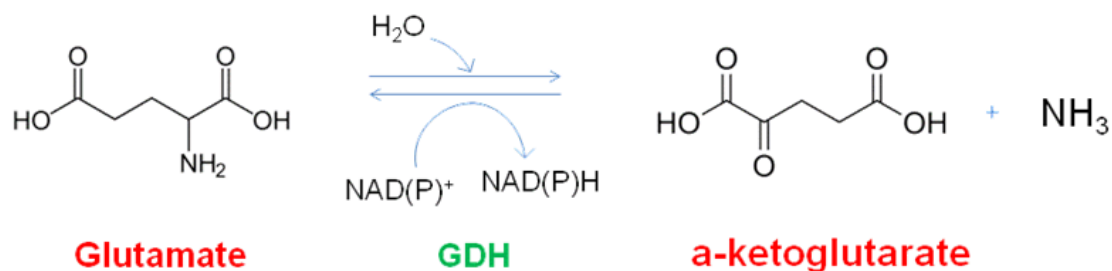


Εικόνα 1.5 Η διτή διαμερισματοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. (A). Μπορεί να προκύψει από δύο διαφορετικά γονίδια (A.A) ή από ένα γονίδιο που δίνει δύο mRNAs (A.B) ή δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες (A.C). (B). Η διτή διαμερισματοποίηση μπορεί να δημιουργηθεί ακόμα και από πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς. (Yogev & Pines, 2011)

Γ. Η ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ (GDH)

1. Γενικές πληροφορίες για την GDH

Η γλουταμική αφυδρογονάση (Glutamate Dehydrogenase, GDH) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναστρέψιμη οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού οξέος (glutamate) σε α-κετογλουταρικό (α-ketoglutarate) και αμμωνία χρησιμοποιώντας ως συμπαραγόντες μόρια NAD^+ ή NADP^+ (**Εικόνα 1.6**) (Smith et al, 1975). Σημειώνεται ότι το γλουταμικό οξύ αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο των θηλαστικών και ενέχεται σε μία ποικιλία λειτουργιών του κεντρικού νευρικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των κινητικών, αισθητικών και γνωστικών διεργασιών (Fonnum et al, 1984; Bliss et al, 1993).



Εικόνα 1.6 Διαγραμματική απεικόνιση της αντίδρασης της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Η γλουταμική αφυδρογονάση μετατρέπει το γλουταμικό (glutamate) σε α-κετογλουταρικό (α-ketoglutarate) και αμμωνία ή αντίστροφα χρησιμοποιώντας μόρια $\text{NAD}(\text{H})$ και / ή $\text{NADP}(\text{H})$ ως συμπαραγόντες.

Η GDH έχει κυρίαρχο ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό καθώς συνδέει τον μεταβολισμό των αμινοξέων και των υδατανθράκων. Η GDH έχει συσχετιστεί με τη διαχείριση του γλουταμικού και πιθανώς να σχετίζεται με την προστασία των νευρώνων. Επίσης, η GDH έχει ιδιαίτερο ρόλο στον μεταβολισμό της ενέργειας στα κύτταρα του παγκρέατος καθώς οι τροποποιήσεις στη δραστικότητα της GDH από αλλοστερικούς ρυθμιστές μεταβάλλουν την έκκριση της ινσουλίνης από τα κύτταρα του παγκρέατος (Gylfe, 1976; Sener & Malaise, 1980; Sener et al, 1981). Επιπλέον, η GDH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αμμωνίας στους νεφρούς (Spanaki & Plaitakis, 2012).

Σε ορισμένα βακτήρια η GDH λειτουργεί κυρίως στην κατεύθυνση της παραγωγής του γλουταμικού για τον σχηματισμό άλλων αμινοξέων και έχει συσχετιστεί με την πρωτεϊνοσύνθεση (Li et al, 2011). Αντίθετα, στους εξελικτικά ανώτερους οργανισμούς η GDH φαίνεται να λειτουργεί κυρίως στην κατεύθυνση της οξειδωτικής απαμίνωσης του

γλουταμικού ενισχύοντας τον κύκλο του Krebs με στόχο την παραγωγή ενέργειας (*Allen et al, 2004*). Στον ποντικό έχει παρατηρηθεί ότι η απαλοιφή ή η γονιδιακή αποσιώπηση (knock down) του γονιδίου *GLUD1* στα αστροκύτταρα, επηρεάζει τον καταβολισμό του γλουταμικού οξέος, οδηγώντας σε συσσώρευση του γλουταμικού και του ασπαρτικού οξέος (*Frigerio et al, 2012; Skytt et al, 2012*).

2. Η GDH ομαδοποιείται σε διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών

Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες (GDHs) διαχωρίζονται με βάση την ειδικότητά τους για το συνένζυμο, σε γλουταμικές αφυδρογονάσες ειδικές για το NAD(H) (E.C. 1.4.1.2), σε ειδικές για το NADP(H) (E.C. 1.4.1.4). Επίσης, υπάρχουν γλουταμικές αφυδρογονάσες οι οποίες χρησιμοποιούν αμφότερα το NAD(H) και το NADP(H) (E.C. 1.4.1.3), όπως για παράδειγμα αυτές των σπονδυλωτών. Γενικά, θεωρείται ότι οι γλουταμικές αφυδρογονάσες που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NAD(H), εξυπηρετούν κυρίως τον καταβολισμό γλουταμικού, ενώ εκείνες που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NADP(H), εξυπηρετούν κυρίως βιοσυνθετικές λειτουργίες.

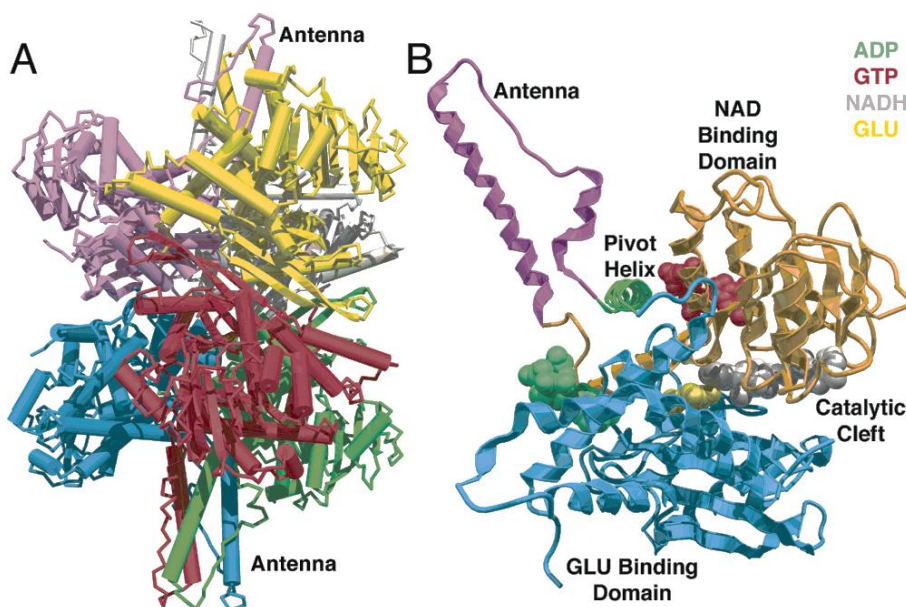
Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες θεωρείται ότι έχουν τη δομή ενός ομοπολυμερούς, αποτελούμενου είτε από 4 (οικογένειες GDH-3 & GDH-4) ή από 6 υπομονάδες (οικογένειες GDH-1 & GDH-2). Οι GDHs της οικογένειας GDH-1 έχουν βρεθεί σε βακτήρια και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ αυτές της οικογένειας GDH-2 έχουν βρεθεί σε όλα τα βασίλεια των οργανισμών και συμπεριλαμβάνουν όλες τις γλουταμικές αφυδρογονάσες των ζωικών οργανισμών. Οι γλουταμικές αφυδρογονάσες της οικογένειας GDH-3, που έχουν βρεθεί στα πρώτιστα, στους μύκητες και στα βακτήρια, έχουν μέγεθος ~115 kDa και σχετίζονται με τον καταβολισμό του γλουταμικού (*Andersson et al, 2003*). Από την άλλη πλευρά, οι GDHs της οικογένειας GDH-4, έχουν ανιχνευτεί μόνο σε ορισμένα βακτήρια (*Minambres et al, 2000*), έχουν μέγεθος ~180 kDa και χρησιμοποιούν ως συμπαραγόνα αποκλειστικά το NAD⁺.

3. Η δομή της GDH

Έχει πραγματοποιηθεί η απευθείας αλληλούχιση της GDH από διάφορους ιστούς, όπως για παράδειγμα από το ήπαρ του ανθρώπου (*Julliard & Smith, 1979*) και του κοτόπουλου (*Moon et al, 1973*). Η δομή της GDH έχει μελετηθεί σε διάφορους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα στην αγελάδα (*Peterson & Smith, 1999; Smith et al, 2001; Banerjee et al, 2003*) και στον άνθρωπο (*Smith et al, 2002; Banerjee et al, 2003*). Η

γλουταμική αφυδρογονάση στα θηλαστικά έχει μορφή ενός συμμετρικού ομοεξαμερούς, το οποίο αποτελείται από δύο ομοτριμερή (Peterson & Smith, 1999; Smith et al, 2001; Banerjee et al, 2003) (Εικόνα 1.6.A). Η GDH έχει αρκετά συντηρημένη δομή μεταξύ των οργανισμών (McKenna et al, 1996).

Κάθε υπομονάδα του ομοεξαμερούς αποτελείται από ~500 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος ~56 kDa (Smith, 1975) (Εικόνα 1.6.B). Σε κάθε υπομονάδα διακρίνονται τρεις περιοχές: α) στο N-τελικό άκρο η περιοχή στην οποία προσδένεται το υπόστρωμα (glutamate-binding domain), β) η περιοχή στην οποία προσδένεται το NAD(P)⁺ (NAD-binding domain) και γ) η ρυθμιστική (ή αλλοστερική) περιοχή, που περιλαμβάνει την αντέννα (antenna) και την περιστρεφόμενη έλικα (pivot helix) (Εικόνα 1.7.B). Σε κάθε τριμερές, οι αντέννες των τριών υπομονάδων διαπλέκονται μεταξύ τους (Εικόνα 1.7.A).

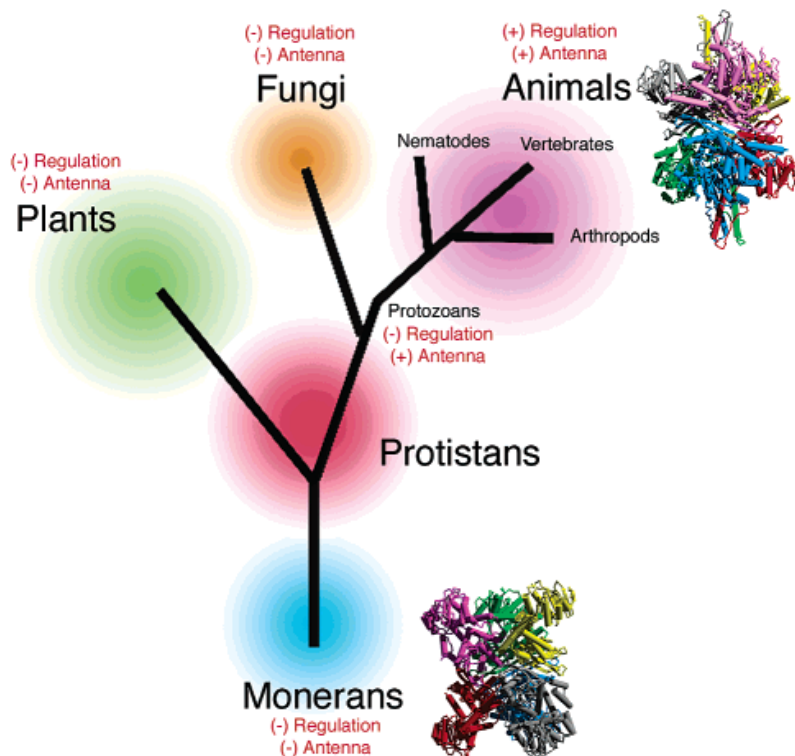


Εικόνα 1.7 Δομή της GDH στα θηλαστικά. (A). Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του εξαμερούς της GDH, όπου οι υπομονάδες παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα. (B). Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του μονομερούς. Παρουσιάζεται η επικράτεια πρόσδεσης του γλουταμικού, η επικράτεια πρόσδεσης του NAD, η αντέννα και ο άξονας περιστροφής με μπλε, πορτοκαλί, μωβ και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα. Οι θέσεις στις οποίες προσδένεται το GTP, το ADP, το NADH και το γλουταμικό οξύ παρουσιάζονται με κόκκινο, πράσινο, ασημί και κίτρινο χρώμα, αντίστοιχα. (Allen et al, 2004)

4. Η αλλοστερική ρύθμιση της GDH

Η αντέννα βρίσκεται στην GDH όλων των ζωικών οργανισμών, ενώ απουσιάζει από τα βακτήρια, τα φυτά και τους μύκητες (Banerjee et al, 2003) (Εικόνα 1.7). Η αλλοστερική ρύθμιση της GDH φαίνεται να ξεκίνησε από μια κατηγορία εξελιγμένων πρωτόζωων, τα οποία ονομάζονται βλεφαριδοφόρα (Ciliophora). Πιο συγκεκριμένα, στα βλεφαριδοφόρα πρωτοεμφανίστηκε μία προεξοχή ~50 αμινοξέων, η λεγόμενη κεραία ή αντέννα (antenna,

401-448αα στις ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες) (Allen et al, 2004). Η εμφάνιση της αντέννας συνέπεσε με τη σταδιακή μετακίνηση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων από τα λυσοσωμάτα στα μιτοχόνδρια (Allen et al, 2004). Η ύπαρξη της αντέννας ήταν προϋπόθεση για την αλλοστερική ρύθμιση της GDH από το GTP, ιδιότητα η οποία εμφανίστηκε σε επόμενο στάδιο της εξέλιξης (Banerjee et al, 2003, Allen et al, 2004) (Εικόνα 1.8). Σημειώνεται ότι τα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα θεωρείται ότι έχουν πιο εξειδικευμένα οργανίδια και ότι είναι πιο πολύπλοκα σε σχέση με τα άλλα πρωτόζωα.



Εικόνα 1.8 Η επικράτεια της αντέννας στη GDH πρωτοεμφανίστηκε στα πρωτόζωα πριν την ρύθμιση των πουρινών. Η αντέννα βρίσκεται σε όλους τους ζωικούς οργανισμούς όπως παρουσιάζεται στη σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης της αντέννας και της ρύθμισης των πουρινών. (Banerjee et al, 2003)

Η αντέννα της ανθρώπινης GDH αποτελείται από 48 αμινοξέα και αποτελείται από δύο α-έλικες με μία ενδιάμεση στροφή (loop) μεταξύ τους. Η ακριβής λειτουργικότητα της GDH στους διαφορετικούς ιστούς μέχρι τώρα δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, όμως είναι γνωστό ότι η δραστηριότητά της ρυθμίζεται από διάφορους αλλοστερικούς τροποποιητές, όπως είναι για παράδειγμα το ADP (adenosine diphosphate), το NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide), το GTP (Guanosine-5'-triphosphate), η L-λευκίνη, οι πολυαμίνες, οι στεροειδείς ορμόνες και ορισμένα νευροληπτικά φάρμακα (βλέπε «Άρθρα ανασκόπησης» Plaitakis et al, 2011; Li et al, 2012; Zaganas et al, 2014).

5. Διαμερισματοποίηση της GDH

Η GDH βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς στους οποίους έχει μελετηθεί και έχει εξελιχθεί από ένα κυτταροπλασματικό μη ρυθμιζόμενο ένζυμο στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, σε ένα υψηλά ρυθμιζόμενο μιτοχονδριακό ένζυμο στα θηλαστικά. Στο φυτό *A. thaliana* και στο ρύζι η GDH φαίνεται να διαμερισματοποιείται στα μιτοχόνδρια έχοντας ένα μη αποκοπτόμενο MTS (Huang et al, 2009). Η GDH εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς (housekeeping) των θηλαστικών εμφανίζοντας τα υψηλότερα επίπεδα στο ήπαρ, όπου αποτελεί πάνω από το 10% των πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής μήτρας (Krebs et al, 1968).

Η GDH διαμερισματοποιείται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των νεφρών, του εγκεφάλου, της καρδιάς, του παγκρέατος, της σπλήνας, του εντέρου και των λεμφαδένων και εμφανίζει μεγάλη δραστικότητα σε αυτά (Hogeboom & Schneider, 1953). Τα τελευταία 50 χρόνια πολλές μελέτες έδειξαν ότι στα θηλαστικά η GDH εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μήτρα (Schmidt & Schmidt, 1963; Salganicoff & De Robertis, 1963; Aoki et al, 1987; Rothe et al, 1994). Για παράδειγμα, στον εγκέφαλο η GDH εντοπίζεται κυρίως στα αστροκύτταρα, όπου αποτελεί πάνω από 10 mg/ml της μιτοχονδριακής μήτρας (Rothe et al, 1994). Τα εν λόγω κύτταρα αφαιρούν και μεταβολίζουν το γλουταμικό που απελευθερώνεται από τις νευρικές απολήξεις κατά τη διάρκεια της διεγερτικής σύναψης (McKenna et al, 1996). Η GDH εντοπίζεται σε μικρότερο ποσοστό στους νευρώνες στα κύτταρα της γλοίας (Aoki et al, 1987; Wenthold et al, 1987; Rothe et al, 1994) και στα ολιγοδενδροκύτταρα (Schmitt & Kugler, 1999; Werner et al, 2001).

Αν και στο παρελθόν η γλουταμική αφυδρογονάση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως μιτοχονδριακός μάρτυρας, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει βρεθεί η ύπαρξή της και εκτός των μιτοχονδρίων (Di Prisco & Casola, 1975; Colon et al, 1986; Rajas and Rousset, 1993). Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη δραστικότητας της GDH σε πυρηνικά κλάσματα ιστών ήπατος από αρουραίους (di Prisco et al, 1968). Επίσης, έχει εντοπιστεί η ύπαρξή της σε μιτοχονδριακά και πυρηνικά κλάσματα εγκεφαλικών ιστών από αρουραίους, όπου μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι έχει το ίδιο μοριακό μέγεθος και στα δύο υποκυτταρικά κλάσματα (Lai et al, 1986). Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί ο εντοπισμός της GDH στον κυτταρικό πυρήνα και σε άλλους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα στο σακχαρομύκητα (Lee et al, 2012), στο κοτόπουλο (Panda et al, 2011) και σε ορισμένους ιστούς στον εγκέφαλο του ανθρώπου (Spanaki et al, 2015).

Παρόλα αυτά, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην μύγα, δεν δίνουν ενδείξεις πυρηνικού εντοπισμού της GDH σε αυτό τον οργανισμό (*Tiwaria et al, 2014*). Μέχρι σήμερα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί ο τρόπος διαμερισματοποίησης της GDH και η αποσαφήνιση της λειτουργίας της στον πυρήνα. Παρ'όλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι η GDH του κοτόπουλου έχει δράση πεπτιδάσης της ιστόνης H3 (*Purohit et al, 2013; Mandal et al, 2014*). Επομένως, η διαμερισματοποίηση της GDH στον πυρήνα πιθανώς να έχει κάποιο ρόλο στην επιγενετική.

Ιστολογικές μελέτες από ιστούς ήπατος και εγκεφάλου στα θηλαστικά παρέχουν ενδείξεις για τον εντοπισμό της ώριμης GDH (απουσιάζει το σινιάλο μιτοχονδριακής της στόχευσης) στα λυσοσώματα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER, endoplasmic reticulum) (*Colon et al, 1986; Rajas & Rousset, 1993; Lee et al, 1999*). Συμπερασματικά, τα μέχρι τώρα ευρήματα δείχνουν ότι στους ζωικούς οργανισμούς ενώ η GDH είναι κατά κύριο λόγο μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, σε ορισμένους ιστούς εμφανίζει διπλή διαμερισματοποίηση και πιθανώς αυτό να εξυπηρετεί πολλαπλές λειτουργίες. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο πιθανός τρόπος διπλής διαμερισματοποίησης της GDH στους εν λόγω ιστούς αυτούς.

6. Η GDH στον άνθρωπο

Η βιολογική σημασία της γλουταμικής αφυδρογονάσης στον άνθρωπο ενισχύεται από παρατηρήσεις που δείχνουν ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί στο ώριμο τμήμα της ανθρώπινης GDH (hGDH) έχουν συσχετισθεί με νευροεκφυλιστικές διαταραχές (*Bao et al, 2009; Plaitakis et al, 2010*) και πιο πρόσφατα με το γλοιοβλάστωμα στον άνθρωπο (*Chen et al, 2014*). Για παράδειγμα, μία μεταλλάξη στην hGDH1 έχει συσχετισθεί με την νόσο του Parkinson (*Plaitakis et al, 2011*). Επίσης, η υπερέκφραση της GDH1 σε ποντίκια προβλέπει πιθανή συσχέτισή της με πρόωρη εμφάνιση της νόσου του Alzheimer (*Bao et al, 2009*). Επιπλέον, ορισμένες μεταλλάξεις της ανθρώπινης GDH1 έχουν συσχετισθεί με διαταραχές στην ομοίωση της ινσουλίνης που σχετίζονται με το σύνδρομο υπερινσουλιναϊμίας - υπεραμμωνιαϊμίας (*Stanley et al, 1998*). Σε αυτή την περίπτωση, η αυξημένη δραστηριότητα της hGDH1, λόγω μη αναστολής της ευαισθησίας της στο GTP, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απελευθέρωση της ινσουλίνης από τα κύτταρα του παγκρέατος (*Hsu et al, 2001; Kelly et al, 2001*).

Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο ισομορφές της γλουταμικής αφυδρογονάσης, η hGDH1 και η hGDH2, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα λειτουργικά γονίδια *GLUD1* και

GLUD2, αντίστοιχα (*Mavrothalassitis et al, 1988; Shashidharan et al, 1994*). Το γονίδιο *GLUD1* (χρωμόσωμα 10q23.3) είναι ομόλογο των GDHs των υπόλοιπων θηλαστικών και περιέχει 13 εξόνια (*Michaelidis et al, 1993; Deloukas et al, 1993*). Το γονίδιο *GLUD2* (χρωμόσωμα Χq25) προήλθε από ρετρομετάθεση του γονιδίου *GLUD1* πριν από λιγότερο από 23 εκατομμύρια χρόνια και είναι ένα από τα πιο «καινούργια» ανθρώπινα γονίδια (*Burki & Kaessmann, 2004*). Το γονίδιο *GLUD2* δεν περιέχει ιντρόνια και βρίσκεται μόνο στον άνθρωπο και στα ανώτερα πιθηκοειδή (*Shashidharan et al, 1994*). Έχει βρεθεί η ύπαρξη ορισμένων ψευδογονιδίων στον άνθρωπο, τα οποία ονομάζονται *GLUDP2*, *GLUDP3*, *GLUDP4* και *GLUDP5* (*Michaelides et al, 1993*).

Τα δύο ισοένζυμα της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης διαφέρουν ως προς την ιστοειδική τους έκφραση και την αλλοστερική τους ρύθμιση (**Πίνακας 1.1**). Η hGDH1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (*Hanauer et al, 1987; Mavrothalassitis et al, 1988; Anagnou et al, 1993; Michaelidis et al, 1993*). Αντίθετα, η hGDH2 εκφράζεται κυρίως στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, στους νεφρούς, και στα κύτταρα Sertoli στους όρχεις, τα οποία παίζουν ρόλο στη σπερματογένεση (*Shashidharan et al, 1994; Spanaki et al, 2010; Spanaki et al, 2012; Zaganas et al, 2012*), αλλά δεν έχει βρεθεί η εκφρασή της στο ήπαρ (*Spanaki et al, 2010*).

Η hGDH1 έχει υψηλότερη βασική δραστηριότητα, δηλαδή αυξημένη δραστηριότητα χωρίς την παρουσία αλλοστερικών τροποποιητών, (35-40% της μέγιστης) από την hGDH2 (35-40% της μέγιστης) (*Zaganas et al, 2002*). Αυτό αποδίδεται σε μια αμινοξική αντικατάσταση στην θέση 443 (R443S) (*Zaganas et al, 2002*). Η hGDH1 είναι πιο ευαίσθητη στο GTP από ότι η hGDH2 (*Plaitakis et al, 2003*), γεγονός που αποδίδεται σε μια αμινοξική αντικατάσταση στην θέση 456 (G456A) (*Zaganas & Plaitakis, 2002*). Η hGDH1 λειτουργεί άριστα στο pH 8.0, ενώ η hGDH2 είναι ενεργή σε μεγαλύτερο εύρος pH (pH 7.25-8.0) (*Kanavouras et al, 2007*). Επιπλέον, η hGDH2 είναι πιο ευαίσθητη στα οιστρογόνα και στα νευροληπτικά φάρμακα (*Shashidharan et al, 1997; Spanaki et al, 2012*), ενεργοποιείται από το ADP και τη L-leucine (*Shashidharan et al, 1997; Plaitakis et al, 2000*) και εμφανίζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην απενεργοποίησή της από τη θερμότητα σε σχέση με την hGDH1 (*Shashidharan et al, 1997; Plaitakis & Zaganas, 2001; Plaitakis et al, 2003; Mastorodemos et al, 2005*). Αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν στη hGDH2 να μπορεί να λειτουργήσει στο νευρικό σύστημα κατά τη διάρκεια της διεγερτικής διαβίβασης (*Plaitakis et al, 2000; 2003*). Σημειώνεται ότι η hGDH2 θεωρείται πως συνέβαλε στην ανάπτυξη του ανθρώπινου εγκεφάλου (*Burki & Kaessmann, 2004; Varki et al, 2004*).

Πίνακας 1.1 Γενικές πληροφορίες για τις hGDHs.

Γονίδιο	Έκφραση	Ενεργότητα
GLUD1 (Chr10q) 12 ιντρόνια <u>Σε όλα τα θηλαστικά</u>	<u>Συστατική</u> υψηλότερη στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, στους νεφρούς	<u>Βασική=35-40%</u> <u>Αναστέλλεται κυρίως από:</u> GTP, MgCl ₂ pH = 8.0
GLUD2 (ChrXq) Χωρίς ιντρόνια <u>Μόνο σε άνθρωπο και στα ανώτερα πιθηκοειδή</u>	<u>Ιστό-ειδική</u> ανιχνεύεται στους όρχεις, στον εγκέφαλο, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, στους νεφρούς	<u>Βασική= 3-8%</u> <u>Ενεργοποιείται κυρίως από:</u> ADP, L-leucine, οιστρογόνα, νευροληπτικά φάρμακα <u>Αναστέλλεται κυρίως από:</u> Spermidine, EGCG pH = 7.25 - 8.0

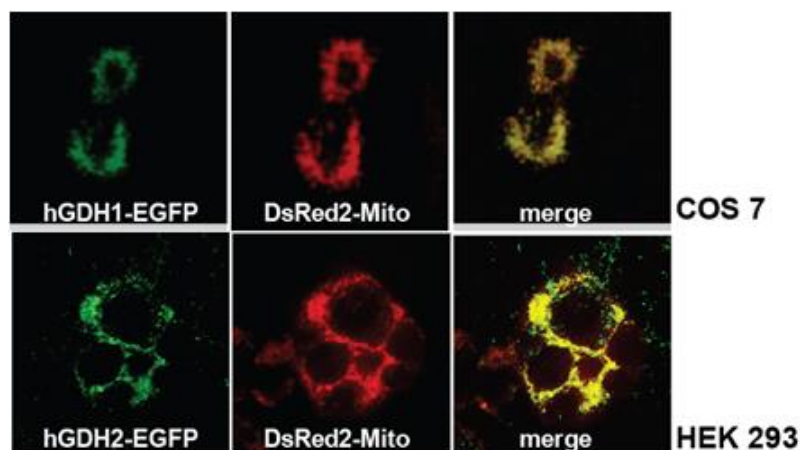
7. Κυτταρική διαμερισματοποίηση των hGDHs

Πολύ πρόσφατα μελετήθηκε ο εντοπισμός της GDH στον ανθρώπινο εγκέφαλο (*Spanaki et al, 2015*). Βρέθηκε ότι το ισοένζυμο hGDH1 εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και σε μικρότερο βαθμό στην πυρηνική μεμβράνη των αστροκυττάρων (*Spanaki et al, 2015*). Η hGDH1 εντοπίζεται, επίσης, στα ολιγοδενδροκύτταρα, αλλά όχι στους νευρώνες (*Spanaki et al, 2015*). Αντίθετα, η hGDH1 εντοπίζεται στον πυρήνα των ολιγοδενδροκυττάρων και στους πρόγονους των ολιγοδενδροκυττάρων (*Spanaki et al, 2015*). Από την άλλη πλευρά, η hGDH2 φαίνεται ότι διαμερισματοποιείται στην πυρηνική μεμβράνη ορισμένων νευρώνων, ενώ σε άλλους νευρώνες η hGDH2 διαμερισματοποιείται στα μιτοχόνδρια ή στο κυτταρόπλασμα (*Spanaki et al, 2015*).

Η υποκυτταρική διαμερισματοποίηση της hGDH1 και hGDH2 έχει μελετηθεί εκτενώς από την ομάδα των συνεργατών μας στο Εργαστήριο Νευρολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης, οι οποίοι πραγματοποίησαν πειράματα συν-διαμόλυνσης (co-transfections) σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία ή με υποκυτταρική κλασμάτωση σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Πραγματοποίησαν πειράματα συν-διαμόλυνσης της hGDH1 και της hGDH2 συζευγμένες με την πρωτεΐνη EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (hGDH1-EGFP & hGDH2-EGFP) και του πεπτιδίου DsRed2 (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη από το *Discosoma*, DsRed2) συζευγμένο με το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης της ανθρώπινης οξειδάσης του κυτοχρώματος c (cytochrome c oxidase subunit VIII) (Mito), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μιτοχονδριακός μάρτυρας, σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές θηλαστικών (*Mastorodemos et al, 2005; Mastorodemos et al 2009; Kotzamani et al, 2012*). Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε

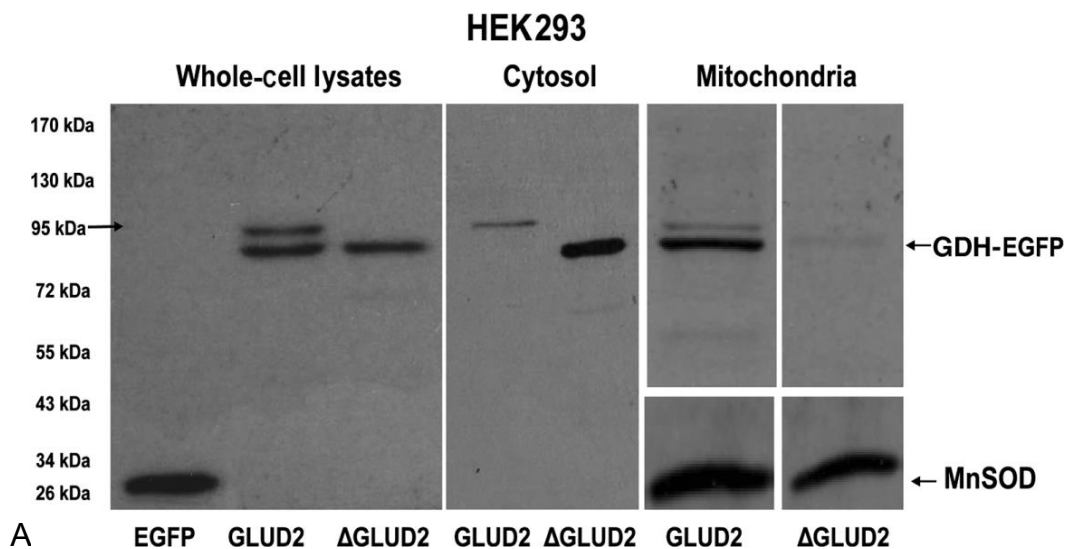
κύτταρα CHO (κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ), COS7 (νεφρικά κύτταρα πιθήκου), HEK293 (ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα), HeLa (ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου της μήτρας) και SHSY-5Y (κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος) (Mastorodemos et al, 2005; Mastorodemos et al 2009; Kotzamani et al, 2012). Βρέθηκε ότι και οι δύο ανθρώπινες ισομορφές της γλουταμικής αφυδρογονάσης συνεντοπίζονται με τον μιτοχονδριακό μάρτυρα (**Εικόνα 1.9**) (Mastorodemos et al, 2005; Mastorodemos et al, 2009; Kotzamani et al, 2012).

Η ερευνητική ομάδα των Rosso και των συνεργατών τους έκαναν πειράματα διαμόλυνσης με hGDH1-EGFP ή με hGDH2-EGFP σε συνδυασμό με χρώση των μιτοχονδρίων με Mito-tracker και βρήκαν ότι η hGDH2-EGFP διαμερισματοποιείται κυρίως στα μιτοχόνδρια, ενώ η hGDH1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια αλλά είναι και διάσπαρτη στο κυτοσόλιο (Rosso et al, 2008). Αναφέρουν ότι η hGDH2 εξελίχθηκε ώστε να έχει αυξημένη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης σε σχέση με την hGDH1 και ότι αυτό οφείλεται σε μία αμινοξική αλλαγή στη θέση 7 του N53 στη hGDH2 (Rosso et al, 2008).

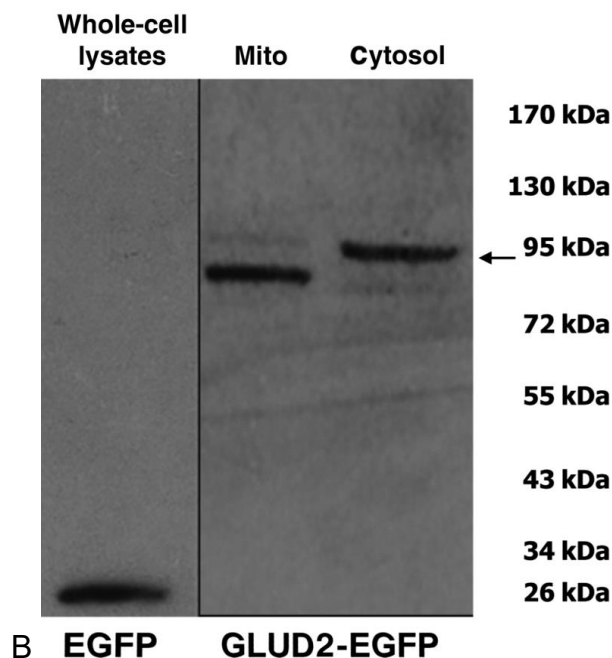


Εικόνα 1.9 Οι πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2 διαμερισματοποιούνται στα μιτοχόνδρια σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Μετασηματισμός κυττάρων COS7 και HEK293 έτσι, ώστε να υπερεκφράζουν ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες hGDH1-EGFP ή hGDH2-EGFP με τον μιτοχονδριακό μάρτυρα DsRed2-Mito και συνεστιακή μικροσκοπία. (Δήμητρα Κοτζαμάνη)

Πειράματα διαμόλυνσης εμβρυικών νεφρικών κυττάρων HEK293 σε συνδυασμό με ενδοκυτταρική κλασμάτωση έδειξαν ότι η hGDH2 συζευγμένη με το EGFP διαμερισματοποιείται κυρίως στο μιτοχονδριακό κλάσμα (**Εικόνα 1.10.A**) (Mastorodemos et al, 2009; Kotzamani & Plaitakis, 2012). Αντίθετα, στα νευρικά κύτταρα SHSY-5Y, η hGDH2-EGFP εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό (ώριμη μορφή της) και στο κυτταροπλασματικό κλάσμα (άκοπη μορφή της) (**Εικόνα 1.10.B**) (Mastorodemos et al, 2009).

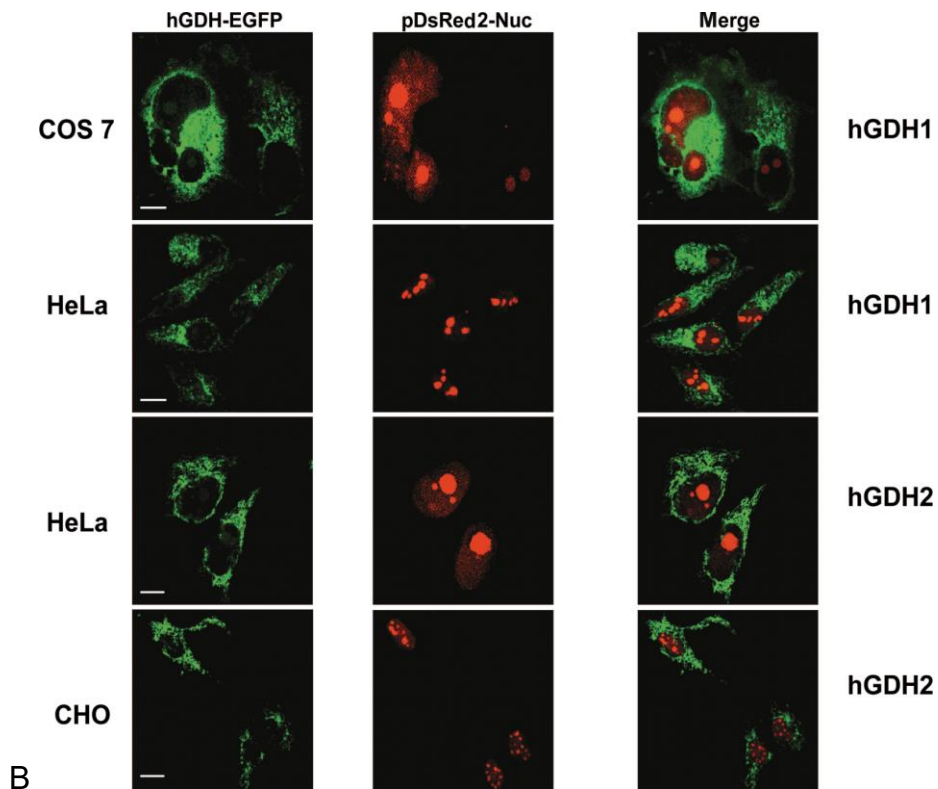
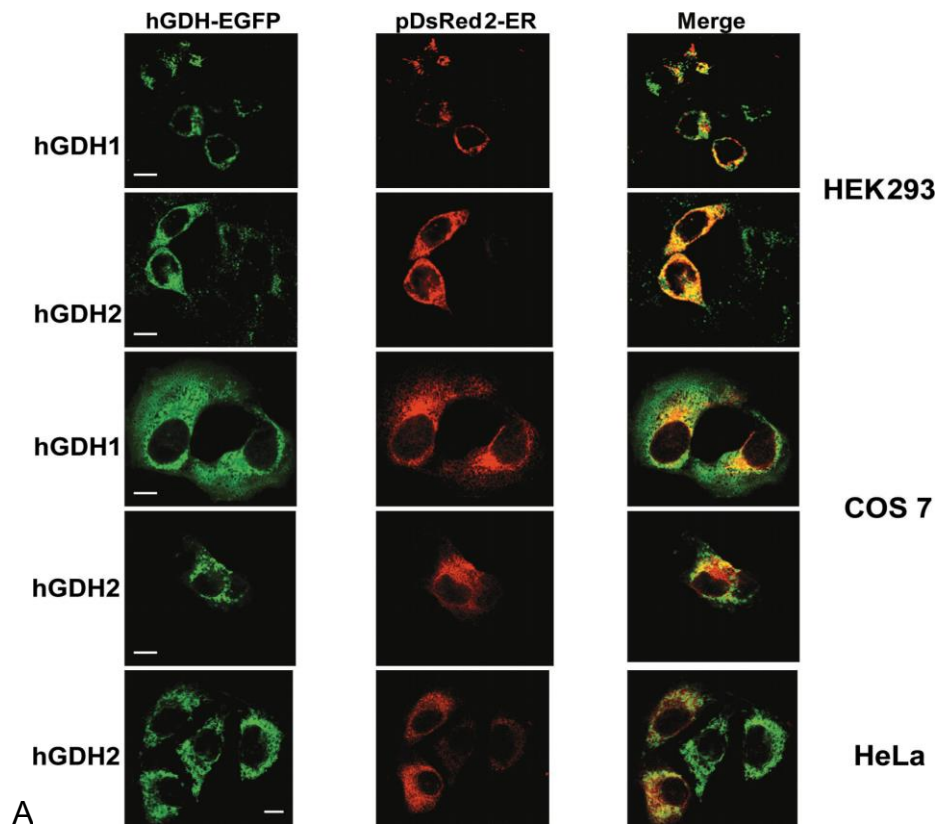


Neuroblastoma SHSY-5Y



Εικόνα 1.10 Το N53 της hGDH2 είναι απαραίτητο για την μιτοχondριακή της στόχευση. Μετασηματισμός κυττάρων HEK293 (A) και SHSY-5Y (B) ώστε να εκφράζουν τις πρωτεΐνες hGDH2 (wt & Δ53, προέρχονται από το γονίδιο *GLUD2*) συζευγμένες με το EGFP και υποκυτταρική κλασμάτωση. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με α-GFP και MnSOD (μιτοχondριακός μάρτυρας). (*Mastorodemos et al, 2009*)

Πειράματα συν-διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών θηλαστικών σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία έδειξαν ότι οι ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες συνεντοπίζονται μερικώς με το πεπτιδίο μάρτυρα του ER (**Εικόνα 1.11.A**), αλλά δεν φαίνεται να συνεντοπίζονται με το πεπτιδίο μάρτυρα για τα νουκλεοσώματα (**Εικόνα 1.11.B**) (*Mastorodemos et al, 2009*).



Εικόνα 1.11 Οι hGDHs μπορεί να εντοπίζονται μερικώς στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά όχι στα νουκλεοσώματα. Μετασηματισμός κυτάρων θηλαστικών με την hGDH1-EGFP ή την hGDH2-EGFP σε συνδυασμό με (A) τον μάρτυρα του ενδοπλασματικού δικτύου (DsRed2-ER) ή (B) τον μάρτυρα των νουκλεοσωμάτων (DsRed2-Nuc) και συνεσιακή μικροσκοπία. (*Mastorodemos et al, 2009*)

8. Είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια

Οι ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες έχουν ένα ασυνήθιστα μεγάλο N-τελικό σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης, το οποίο αποτελείται από 53 αμινοξέα (N53) και κόβεται όταν οι hGDHs εισέλθουν στα μιτοχόνδρια (*Mihara et al, 1982; Mavrothalassitis et al, 1988*). Το N53 των hGDHs είναι λιγότερο συντηρημένο (ομολογία 83%) σε σχέση με το ώριμο τμήμα τους (ομολογία 97%) (**Εικόνα 1.11**). Πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας καθώς και πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών έδειξαν ότι το πεπτίδιο N53 είναι απαραίτητο για την μιτοχονδριακή στόχευση και των δύο ισομορφών των hGDHs (**Εικόνα 1.10 & 1.12**) (*Mastorodemos et al, 2009; Kotzamani & Plaitakis, 2012*).

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

hGDH1      MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPLGALAARRHYSSEAVADR
hGDH2      MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHS AALLGRGRGQPAAASQPLGALAARRHYSSELVADR
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      EDDPNFFKMVEGFFDRGASIVEDKLVEDLRTRESEEQKRNRVRGILRIIKPCNHVLSLSF
hGDH2      EDDPNFFKMVEGFFDRGASIVEDKLVKDLRTQESEEQKRNRVRGILRIIKPCNHVLSLSF
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      PIRRDDGSWEVIEGYRAQHSQHRTPCGGIRYSTDVSVDVKALASLMTYKCAVVDVDFG
hGDH2      PIRRDDGSWEVIEGYRAQHSQHRTPCGGIRYSTDVSVDVKALASLMTYKCAVVDVDFG
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      GAKAGVKINPKNYTDNELEKITRRFTMELAKKGFIFGPGIDVPPAPDMSTGEREMSWIADTY
hGDH2      GAKAGVKINPKNYTENELEKITRRFTMELAKKGFIFGPGVDVPPAPDMNTGEREMSWIADTY
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      ASTIGHYDINAHACVTGKPI SQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMTPGFG
hGDH2      ASTIGHYDINAHACVTGKPI SQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMTPGFR
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      DKTFVVQGFNGVGLHSMRYLHRFGAKCIAVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHSILG
hGDH2      DKTFVVQGFNGVGLHSMRYLHRFGAKCIAVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHSILG
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      FPKAKPYEGSILEADCDILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIFLER
hGDH2      FPKAKPYEGSILEVDCDILIPAATEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIFLER
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      NIMVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLKLNHNHVSYGRLLTFKYERDSNYHLLMSVQESLERKFGK
hGDH2      NILVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLKLNHNHVSYGRLLTFKYERDSNYHLLLSVQESLERKFGK
          **.:*****:*****:*****:*****:*****
          *****

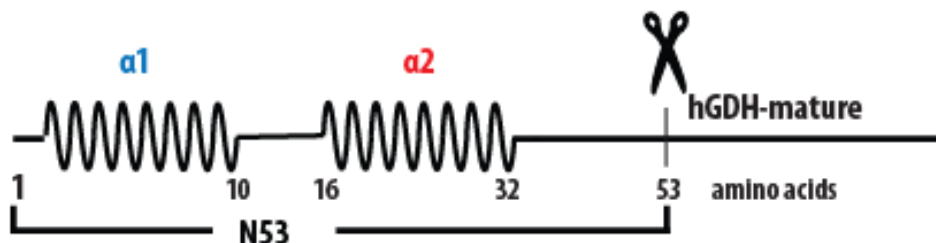
hGDH1      HGGTIPIVPTAEFQDRISGASEKDIVHSGLAYTMERSARQIMRTAMKYNLGLDLRTAAYV
hGDH2      HGGTIPIVPTAEFQDSISGASEKDIVHSALAYTMERSARQIMHTAMKYNLGLDLRTAAYV
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

hGDH1      NAIEKVFVKVYNEAGVTFT
hGDH2      NAIEKVFVKVYSEAGVTFT
          *****.:*** *****: .***** .***** ***** *****
          *****

```

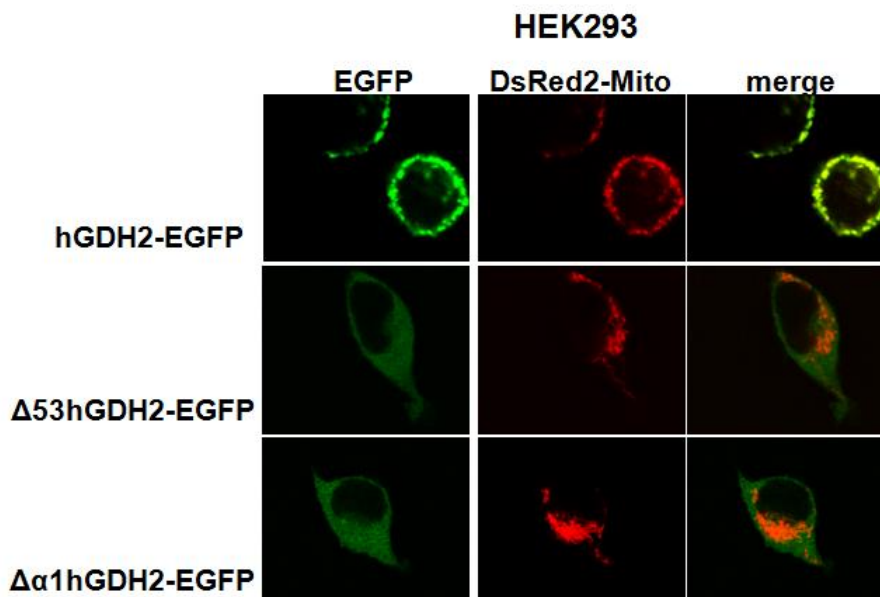
Εικόνα 1.12 Οι ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσες εμφανίζουν υψηλή ομολογία. Αποτέλεσμα πολλαπλής στοίχισης της hGDH1 και της hGDH2 με το πρόγραμμα Clustal Omega.

Τα πεππίδια N53 των hGDHs διαφέρουν από τα περισσότερα MTS εξαιτίας του ιδιαίτερα μεγάλου μεγέθους τους και της πολυπλοκότητας της δομής τους. Τα πεππίδια N53 των hGDHs προβλέπεται να έχουν την τάση σχηματισμού δύο διαφορετικών α-ελίκων, της α1 (1-10αα) και της α2 (αμινοξέα 16-32αα) οι οποίες χωρίζονται από μικρές στροφές (**Εικόνα 1.13**) (Kotzamani & Plaitakis, 2012).



Εικόνα 1.13 Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του N53 των hGDH1 και hGDH2. Το N53 και των δύο hGDHs έχει την τάση σχηματισμού δύο αμφιπαθών α-ελίκων, της α1 (αμινοξέα 1-10) και της α2 (αμινοξέα 16-32). Το ψαλίδι δείχνει τη θέση κοπής το N53. (Συνεργασία με Δημήτρα Κοτζαμάνη)

Πειράματα συν-διαμόλυνσης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία έδειξαν ότι η α1 έλικα είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2 (**Εικόνα 1.14**) (Kotzamani & Plaitakis, 2012).



Εικόνα 1.14 Η έλικα α1 είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2. Διαμόλυνση κυτάρων HEK293 ώστε εκφράζουν ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες hGDH2-EGFP, Δ53hGDH2-EGFP ή Δα1hGDH2-EGFP με τον υβριδικό πεππίδιο μάρτυρα DsRed2-Mito και συνεστιακή μικροσκοπία. (Δημήτρα Κοτζαμάνη)

Αν και προς το παρόν δεν φαίνεται να έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις στο N53 των hGDHs που να συσχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες, έχει εντοπιστεί η ύπαρξη ενός αρκετά συχνού πολυμορφισμού που αφορά την αντικατάσταση της Arg στη θέση 35 σε Gly στη hGDH2 με συχνότητα ~ 18% στον ανθρώπινο πληθυσμό, η οποία έχει άγνωστη μέχρι σήμερα βιολογική και κλινική σημασία (*Plaitakis et al, 2010; Dimovassili et al, oral communication*).

Δ. Ο ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑΣ ΩΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ – ΜΟΝΤΕΛΟ

Ο σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* είναι ένας μονοκύτταρος οργανισμός, με χρόνο διπλασιασμού 1.5-2h, ο οποίος μπορεί να καλλιεργηθεί εύκολα και με χαμηλό κόστος. Τον τελευταίο αιώνα ο *S. cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί πάρα πολύ ως οργανισμός μοντέλο για τα ευκαρυωτικά κύτταρα, εξαιτίας της ευκολίας στο χειρισμό του, του χαμηλού κόστους καλλιέργειάς του, του μικρού χρόνου διπλασιασμού του και της μεγάλης ποικιλίας τεχνικών και μεθόδων που μπορούν να εφαρμοστούν σε αυτόν. Έχει αλληλουχηθεί πλήρως το γονιδίωμα του σακχαρομύκητα και έχουν δημιουργηθεί πολλές βιβλιοθήκες διαφορετικών στελεχών του (*Botstein & Fink, 2011*). Περίπου 1000 γονίδια του σακχαρομύκητα είναι μέλη από ορθόλογες πρωτεΐνες που συσχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες (*Heinicke et al, 2007*) και ως εκ τούτου, ο σακχαρομύκητας έχει χρησιμοποιηθεί στην δημιουργία καινούργιων φαρμάκων (*Ma et al, 2001*). Πολλές ασθένειες του ανθρώπου έχουν μελετηθεί χρησιμοποιώντας ως οργανισμό μοντέλο το σακχαρομύκητα, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του μη πολυποειδούς καρκίνου του παχέος εντέρου (HNPCC, Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) (*Strand et al, 1993*). Μια πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε, μάλιστα, ότι περίπου το 47% των ομόλογων ανθρώπινων γονιδίων μπορούν να αντικαταστήσουν τα ομόλογά τους στο σακχαρομύκητα (*Kachroo et al, 2015*).

Ο σακχαρομύκητας έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την μελέτη της βιογένεσης και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων (*Altmann et al, 2007*). Αυτό οφείλεται, εκτός των άλλων, στο γεγονός ότι τα κύρια μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια είναι αρκετά συντηρημένα από το σακχαρομύκητα μέχρι τον άνθρωπο. Τέλος, μπορεί να απομονωθεί σχετικά εύκολα μεγάλη ποσότητα μιτοχονδρίων από το σακχαρομύκητα και τα μιτοχόνδρια να αποθηκευτούν στους -80° C χωρίς να χάσουν την ενεργότητά τους για μήνες έως χρόνια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Α. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αποσαφήνιση του τρόπου μιτοχονδριακής στόχευσης της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης (Κεφάλαιο Α) και η μελέτη της αρχικής εμφάνισης και εξέλιξης της μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Κεφάλαιο Β). Συγκεκριμένα, προσπαθήσαμε να απαντήσουμε τα εξής ερωτήματα ανά κεφάλαιο:

Κεφάλαιο 1: Μιτοχονδριακή στόχευση της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης: δομή σινιάλου στόχευσης και λειτουργία

- ✓ Ποιος είναι ο ρόλος του N53 των hGDHs;
- ✓ Τι παίζει πιο σημαντικό ρόλο στον σωστό μιτοχονδριακό εντοπισμό των hGDHs, η αμφιπαθικότητα, η ελικοειδής δομή, η ύπαρξη κάποιων συγκεκριμένων αμινοξέων ή το φορτίο;
- ✓ Γιατί οι hGDHs έχουν τόσο μεγάλο σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης;
- ✓ Ποιος είναι ο ρόλος των επιμέρους α-ελίκων;
- ✓ Υπάρχουν πολυμορφισμοί στο N53 των hGDHs που να σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο; Αν ναι, ποιος είναι ο ρόλος τους σε αυτές;

Κεφάλαιο 2: Εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης

- ✓ Ποιοί οργανισμοί εμφανίζουν GDH με μιτοχονδριακή στόχευση;
- ✓ Γιατί κάποιοι οργανισμοί εμφανίζουν διττή διαμερισματοποίηση της GDH; Είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό της GDH σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς; Τι εξελικτικό πλεονέκτημα έχει αυτό;
- ✓ Με ποιο μηχανισμό δημιουργείται η διττή στόχευση της GDH;

- ✓ Πότε ξεκίνησε η μιτοχονδριακή στόχευση και πώς εξελίχθηκε το MTS της GDH;
- ✓ Η μιτοχονδριακή στόχευση της GDH παρέμεινε συντηρημένη σε όλους τους οργανισμούς από τη στιγμή που δημιουργήθηκε; Αν όχι, γιατί;
- ✓ Το MTS της GDH των εξελικτικά κατώτερων οργανισμών μπορεί να οδηγήσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια; Το MTS της GDH των εξελικτικά κατώτερων οργανισμών μπορεί να αντικαταστήσει αυτό των ανθρώπινων ισομορφών, ώστε να οδηγήσει το ώριμο τμήμα των hGDHs στα μιτοχόνδρια;
- ✓ Το MTS της GDH έγινε πιο ισχυρό ως προς την ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης παράλληλα με την πολυπλοκότητα και την εξέλιξη των οργανισμών ή όχι;
- ✓ Η αύξηση του μεγέθους του MTS της GDH εξυπηρετεί κάποιο σκοπό ή αποτελεί απλά ένα εξελικτικό κατάλοιπο;

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί τμήμα μιας ευρύτερης μελέτης σχετικά με την μιτοχονδριακή στόχευση της γλουταμικής αφυδρογονάσης του ανθρώπου χρησιμοποιώντας ως πειραματικό μοντέλο τον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε υπό την καθοδήγηση του καθηγητή κ. Κώστα Τοκατλίδη στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).

Σημειώνεται ότι τα πειράματα στις κυτταρικές σειρές θηλαστικών πραγματοποιήθηκαν από την νευρολόγο ιατρό και υποψήφια διδάκτορα του Πανεπιστημίου Κρήτης, κα Δήμητρα Κοτζαμάνη στο συνεργαζόμενο Εργαστήριο Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης (δ/ντης ο ομότιμος καθηγητής κ. Ανδρέας Πλαϊτάκης) σε συνεργασία με τον επίκουρο καθηγητή Νευρολογίας, κ. Γιάννη Ζαγανά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας

1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές που περιγράφονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο των Maniatis και συνεργατών (*Maniatis et al, 1982*) και χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς που αναφέρονται στον **Πίνακα 3.1**.

Πίνακας 3.1 Πλασμιδιακοί φορείς.

Πλασμίδιο	Προέλευση	Αντιβιοτικό επιλογής
pSP64	Promega	Αμπικιλίνη (50μg/ml)
pSP65	Promega	Αμπικιλίνη (50μg/ml)
pEGFP-N3	BD Biosciences Clontech	Καναμυκίνη (30μg/ml)
pET24	Novagen	Καναμυκίνη (30μg/ml)
pRS316-up40	Προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου	Αμπικιλίνη (50μg/ml)

Για τις πλασμιδιακές κατασκευές τα περισσότερα ενθέματα πολλαπλασιάστηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή προέκυψαν από *in vitro* διμερισμό συντιθέμενων μικρών ολιγονουκλεοτιδίων (oligos). Οι πλασμιδιακοί φορείς και τα ενθέματα κόπηκαν με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (Minotech Biotechnology & New England Biolabs). Για την εισαγωγή μικρών ενθεμάτων πραγματοποιήθηκε διμερισμός μέσω υβριδοποίησης *in vitro* συντιθέμενων μικρών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία είχαν κατασκευαστεί ώστε να έχουν κολλώδη άκρα, κατάλληλα για να ενωθούν με τα πλασμίδια-φορείς. Στη συνέχεια, και στις δύο περιπτώσεις οι πλασμιδιακοί φορείς ενώθηκαν με τα ενθέματα με τη χρήση DNA λιγάσης (T4 DNA Ligase ή T4 DNA Ligase Quick, MINOTECH Biotechnology). Ακολούθησε μετασχηματισμός σε βακτηριακά κύτταρα στελέχους DH5α(+). Οι περισσότερες πλασμιδιακές κατασκευές ελέγχθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση αποικιών (colony PCR) και με περιοριστική ανάλυση των πλασμιδίων (digestion test). Όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές ελέγχθηκαν με αλληλούχιση των εντιθέμενων γονιδίων (Macrogen).

Πίνακας 3.2 Πλασμιδιακές κατασκευές (Clonings).

Πλασμιδιακός φορέας	Ένθεμα	Δημιουργία ενθέματος	Περιοριστικές Θέσεις	Κατασκευή
pSP64	GLUD1	Subcloning	BamHI / EcoRI	Δ. Κοτζαμάνη
pSP65	GLUD2	Subcloning	EcoRI / EcoRI	Δ. Κοτζαμάνη
pSP64	Δ53GLUD1	PCR	BamHI / EcoRI	Δ. Κοτζαμάνη
pSP64	Δ53GLUD2	PCR	BamHI / EcoRI	Παρούσα μελέτη
pSP64	Δα1GLUD2	PCR	BamHI / EcoRI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	N53 (GLUD1)	PCR	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	N53 (GLUD2)	PCR	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP64::DHFR	α1 (GLUD2)	Ds oligo annealing	BamHI / EcoRI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	α2 (GLUD2)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	α1α2 (GLUD2)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	α2α1 (GLUD2)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP64::Δ53GLUD2	α1 (GLUD2)	Ds oligo annealing	PstI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP64::Δ53GLUD2	α1α2 (GLUD2)	Ds oligo annealing	PstI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP64::His	GLUD1	Subcloning	NdeI / XhoI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	MTS-GDH (T. thermophila)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	MTS-GDH (C. elegans)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	MTS-GDH (D. melanogaster)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP65::DHFR	MTS-GDH (X. laevis)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pSP64::Δ53GLUD2	MTS-GDH (T. thermophila)	Ds oligo annealing	PstI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	N53 (GLUD1)	PCR	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	N53 (GLUD2)	PCR	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	α1 (GLUD2)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	α2(GLUD2)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	α1α2 (GLUD2)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	α2α1 (GLUD2)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::Δ53GLUD2-EGFP	α1 (GLUD2)	Ds oligo annealing	XhoI / EcoRI	Δ. Κοτζαμάνη
pSP64::Δ53GLUD2	α1α2 (GLUD2)	Ds oligo annealing	PstI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::Δ53GLUD2-EGFP	α1α2 (GLUD2)	Ds oligo annealing	XhoI / EcoRI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	MTS-GDH (T. thermophila)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	MTS-GDH (C. elegans)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	MTS-GDH (D. melanogaster)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::EGFP	MTS-GDH (X. laevis)	Ds oligo annealing	EcoRI / BamHI	Παρούσα μελέτη
pEGFP-N3::Δ53GLUD2-EGFP	MTS-GDH (T. thermophila)	Ds oligo annealing	XhoI / EcoRI	Παρούσα μελέτη
pET24	GLUD1	PCR	NdeI/ XhoI	Παρούσα μελέτη
pRS316::up40	GLUD1	Subcloning	BamHI / EcoRI	Παρούσα μελέτη
pRS316::up40	GLUD1-R50G-R51D	Subcloning	BamHI / EcoRI	Παρούσα μελέτη
pRS316::up40	GLUD1-Y53D-S54D	Subcloning	BamHI / EcoRI	Παρούσα μελέτη

* α1, α2: η 1^η και η 2^η α-έλικα από το αμινοτελικό σινιάλο στόχευσης της GLUD2.

1.2 Κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακούς φορείς (Clonings)

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν οι κλωνοποιήσεις που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**.

1.3 Μεταλλαξιγενέσεις γονιδίων (mutagenesis)

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Quick Change PCR based Quick Change Site-directed Mutagenesis για τη δημιουργία σημειακών μεταλλαγών. Η σχεδίαση των συνθηκών και των εκκινητών (primers) της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του εν λόγω πρωτοκόλλου (Stratagene). Όλες οι μεταλλαξιγενέσεις στις πλασμιδιακές κατασκευές ελέγχθηκαν με αλληλούχιση (Macrophen) και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.3**.

Πίνακας 3.3 Μεταλλαξιγενέσεις (Mutagenesis).

Μεταλλαγμένο γονίδιο	Αρχική πλασμιδιακή κατασκευή	Κατασκευή
GLUD2-R3A	pSP65::GLUD2	Παρούσα μελέτη
GLUD2-K7A	pSP65::GLUD2	Παρούσα μελέτη
GLUD2-R3A-K7A	pSP65::GLUD2-R3A	Παρούσα μελέτη
GLUD2-R3A-K7A-R13A	pSP65::GLUD2-R3A-K7A	Παρούσα μελέτη
GLUD2-R3A-L5A	pSP65::GLUD2-R3A	Παρούσα μελέτη
GLUD2-K7P	pSP65::GLUD2	Παρούσα μελέτη
GLUD2-L5P	pSP65::GLUD2	Παρούσα μελέτη
GLUD2-G35R	pSP65::GLUD2	Παρούσα μελέτη
GLUD1-R51D	pSP65-GLUD1	Παρούσα μελέτη
GLUD1-R50G-R51D	pSP64::GLUD1-R51D	Παρούσα μελέτη
GLUD1-Y53D-A56L	pSP64::GLUD1	Παρούσα μελέτη
GLUD1-Y53D-S53D-A56L	pSP64::GLUD1-Y53D	Παρούσα μελέτη
GLUD2-R51D	pSP65-GLUD2	Παρούσα μελέτη
GLUD2-R50G-R51D	pSP64::GLUD2-R51D	Παρούσα μελέτη
GLUD2-Y53D-A56L	pSP64::GLUD2	Παρούσα μελέτη
GLUD2-Y53D-S53D-A56L	pSP64::GLUD2-Y53D	Παρούσα μελέτη
EGFP (Delete M1)	pEGFP-N3::α1-EGFP*	Δ. Κοτζαμάνη
EGFP (Delete M1)	pEGFP-N3::α2-EGFP*	Δ. Κοτζαμάνη
DHFR-M1G	pSP65::α1-DHFR*	Παρούσα μελέτη
DHFR-M1G	pSP65::α2-DHFR*	Παρούσα μελέτη
Δ53hGDH2-M1G	pSP64::α1-Δ53GLUD2*	Παρούσα μελέτη
Δ53GLUD2-M1G	pEGFP-N3-α1-Δ53GLUD2-EGFP*	Δ. Κοτζαμάνη

* α1, α2: η 1^η και η 2^η α-έλικα από το αμινοτελικό σινιάλο στόχευσης της GLUD2.

2. Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη μικροοργανισμών

2.1. *E. coli*

Χρησιμοποιήθηκε το άγριου τύπου βακτηριακό στέλεχος DH5α(+) για την δημιουργία κλωνοποιήσεων και μεταλλαγίγενέσεων σε πλασμιδιακούς φορείς. Το στέλεχος DH5α(+) αναπτύχθηκε στους 37°C σε θρεπτικό μέσο LB.

- LB(1Lt): Bacto-tryptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 10g (pH 7 με NaOH)

2.2. *S. cerevisiae* (yeast)

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος D273-10B (MATα) για την παραγωγή μιτοχονδρίων υψηλής καθαρότητας αγρίου τύπου του *S. cerevisiae*.

Για να διερευνήσουμε αν οι πρωτεΐνες hGDHs χρησιμοποιούν το κανάλι TIM23 της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, το οποίο είναι απαραίτητο για την είσοδο των πρωτεϊνών στην μιτοχονδριακή μήτρα, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια υψηλής καθαρότητας από στέλεχος σακχαρομύκητα, το οποίο έχει μια σημειακή μεταλλαγή στην πρωτεΐνη Tim23 (Tim23-G112E, tim23-2) που το κάνει θερμό-ευαίσθητο (*Dekker et al, 1997*). Τα μιτοχόνδρια του στελέχους tim23-2 παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα εισόδου των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν το κανάλι TIM23 (*Dekker et al, 1997*).

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος σακχαρομύκητα icp55Δ (MAT alpha, can 1-100, ade 2-1, his 3-11,15, leu 2-3,112, trp 1-1, ura 3-1, YER078C::KAN) (δωρεά από την ερευνητική ομάδα εργαστήριου του καθηγητή Ophry Pines) έτσι, ώστε να παραχθούν μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα μέτριας καθαρότητας (χωρίς τη χρήση του πολυμερούς Nycodenz) από τα οποία απουσιάζει η πρωτεάση Icp55.

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος σακχαρομύκητα FT5 (MATα, ura3-52, trp I-Δ63, his3-Δ200, leu2::PET56) για πειράματα μετασχηματισμού.

Σε όλες τις περιπτώσεις, τα κύτταρα μεγάλωσαν σε θερμοκρασία 30°C σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή λακτόζη ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά μέσα:

- YPD: 2% (w/v) γλυκόζη, 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) πεπτόνη
- YPLactate: 2% (w/v) λακτόζη, 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) πεπτόνη (pH 5.5 με KOH)

2.3. Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα

Για τον μετασχηματισμό κυττάρων σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο με οξικό λίθιο (LiAc). Πιο συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν κύτταρα σακχαρομύκητα μέχρι την εκθετική φάση της ανάπτυξής τους (OD ~0.4-0.8). Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 3000rpm για 5min, ξεπλύθηκε χρησιμοποιώντας ½V αποστειρωμένο και διπλά απεσταγμένο νερό (st.ddH₂O) και φυγοκεντρήθηκε. Το κυτταρικό ίζημα που προέκυψε, επαναδιαλύθηκε σε 1ml 100mM LiAc και μεταφέρθηκε σε σωληνάκι τύπου Eppendorf. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 13000rpm για 15s. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα εξής αντιδραστήρια στο ίζημα με την αναφερόμενη σειρά: 240μl 50% PEG, 36μl 1M LiAc, 25 μl ssDNA (2mg/ml), DNA (DNA+st.ddH₂O=50μl). Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 1min. Το μείγμα του μετασχηματισμού επωάζεται στους 30°C για 30min, προτού υποστεί θερμικό σοκ στους 42°C για 20min. Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 8000rpm για 10min, αφαιρείται το υπερκείμενο και στρώνουμε τα κύτταρα σε πιάτο επιλογής.

3. Χειρισμός μιτοχονδρίων

3.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από κύτταρα *S. cerevisiae*

Απομονώθηκαν μιτοχόνδρια από το αγρίου τύπου (D273-10B) και tim23-2 στελέχη *S. cerevisiae* για να πραγματοποιηθούν πειράματα εισόδου ραδιενεργών πρόδρομων πρωτεϊνών σε καθαρά απομονωμένα μιτοχόνδρια. Τα κύτταρα σακχαρομύκητα αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια 30L σε θερμοκρασία 30°C σε θρεπτικό μέσο που περιείχε, εκτός των άλλων, και γαλακτικό οξύ (YPLactate), δεδομένου ότι το γαλακτικό οξύ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ενέργειας μέσω γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα του σακχαρομύκητα, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα

μιτοχόνδρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επιβιώνουν μόνο τα κύτταρα που διαθέτουν λειτουργικά μιτοχόνδρια, τα οποία αυξάνονται σε αριθμό. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να απομονωθούν μιτοχόνδρια σε μεγάλη ποσότητα. Η διαδικασία απομόνωσης των μιτοχονδρίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Daum και συνεργατών, το οποίο επιτρέπει την παραγωγή μιτοχονδρίων καθαρών από άλλα μεμβρανώδη οργανίδια, εξαιτίας της χρήσης του χημικού Nycodenz (*Daum et al, 1982; Glick, 1991*).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε απομόνωση μιτοχονδρίων μικρότερης κλίμακας (αρχική καλλιέργεια 2L σε κάθε περίπτωση) και μικρότερης καθαρότητας (χωρίς τη χρήση του χημικού σκευάσματος Nycodenz) από τα στελέχη σακχαρομύκητα D273-10B και icp55Δ τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο YPD ή σε YPLactate για την διεξαγωγή πειραμάτων εισόδου πρωτεϊνών σε αυτά. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα μιτοχόνδρια αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.2 Απομόνωση μιτοχονδρίων από την κυτταρική σειρά HEK293

Για την πραγματοποίηση πειραμάτων εισόδου ραδιενεργά συντιθέμενων πρωτεϊνών σε απομονωμένα ανθρώπινα μιτοχόνδρια, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια από την κυτταρική σειρά HEK293 (ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια από κύτταρα HEK293 χρησιμοποιώντας το Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific). Σε όλες τις περιπτώσεις ελέγχθηκε η απομόνωση των μιτοχονδρίων με ανοσοαποτύπωση Western με αντίσωμα α-MnSOD και α-actin.

3.3.1 Παραγωγή ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης (Coupled Transcription / Translation, TNT)

Για την *in vitro* παραγωγή ραδιενεργών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια υψηλής καθαρότητας και συγκέντρωσης, τα οποία απομονώθηκαν από κολώνα (Qiagen). Η σύνθεση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών με ³⁵S-μεθειονίνη πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή του TNT SP6-coupled transcription/translation kit (Promega). Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια που φέρουν το επιθυμητό κάθε φορά γονίδιο υπό τον υποκινητή SP6 και η ραδιοσήμανση έγινε με ³⁵S-μεθειονίνη. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η ³⁵S-μεθειονίνη και τα υπόλοιπα αμινοξέα σε μη ραδιενεργή μορφή στο *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης σε κυτταρικό εκχύλισμα πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων από κουνέλι (RRL, Rabbit Reticulocyte Lysate). Η αντίδραση παραγωγής της ραδιενεργής πρωτεΐνης έγινε για 90min σε θερμοκρασία 30°C. Η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη απομακρύνθηκε από τα ριβοσώματα με φυγοκέντρηση στις 25000g για 30min στους 4°C.

3.3.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από *S. cerevisiae* και από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές για ανάλυση με αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία

Πριν την είσοδο της παραγόμενης πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια κρατείται δείγμα, που αντιστοιχεί στο 10% της πρωτεΐνης που εισάγεται σε αυτά (αποδιατεταγμένης ή μη) και φορτώνεται δίπλα στα υπόλοιπα δείγματα για ηλεκτροφόρηση, με στόχο τη συσχέτιση της *in vitro* σύστημα παραγόμενης πρωτεΐνης με την ποσότητα της πρωτεΐνης που τελικά εισάγεται στα μιτοχόνδρια.

Για την είσοδο σημασμένων με ³⁵S πρόδρομων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, τα μιτοχόνδρια από κύτταρα σακχαρομύκητα επαναδιαλύονται σε import buffer σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml, παρουσία 2mM ATP και 2,5mM NADH, ενώ τα μιτοχόνδρια από κύτταρα HEK293 επαναδιαλύονται σε import buffer σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml παρουσία 2mM KPi και 5mM

succinate. Στη συνέχεια τα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα και των HEK293 επωάζονται στους 30°C και στους 36°C αντίστοιχα, για 5s–30min, ανάλογα με τους στόχους του πειράματος. Σε περίπτωση πειράματος κινητικής, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Ακολουθεί η απομόνωση των μιτοχονδρίων με φυγοκέντρηση για 5min στις 16100g σε θερμοκρασία 4°C με στόχο την απομάκρυνση της ραδιενεργής πρωτεΐνης που δεν εισήχθη στα μιτοχόνδρια.

Στη συνέχεια, το ίζημα των μιτοχονδρίων επαναδιαλύεται σε ισοτονικό διάλυμα (Breaking Buffer), παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης πρωτεϊνάσης K (PK, 0,1mg/ml ή 0,05mg/ml) ή τρυψίνης (trypsin, 0,1mg/ml) με ή χωρίς την προσθήκη του απορρυπαντικού Triton (TX-100, 1%). Κατόπιν επωάζεται για 30min στους 4°C για την απομάκρυνση των ραδιενεργών μορίων, που έχουν κολλήσει στα τοιχώματα εξωτερικά των μιτοχονδρίων. Σημειώνεται ότι η PK είναι μία γενική πρωτεάση η οποία απενεργοποιείται από τον αναστολέα PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride), ενώ η trypsin κόβει το C-τελικό μέρος των πρωτεϊνών μετά από λυσίνη ή αργινίνη, εκτός αν ακολουθείται από προλίνη και απενεργοποιείται από το SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor). Το απορρυπαντικό TX-100 διαλυτοποιεί τις μεμβράνες, με αποτέλεσμα να μπορούν να αποικοδομηθούν οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μέσα στα μιτοχόνδρια από τις πρωτεάσες και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας ελέγχου της δράσης των πρωτεασών. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη PMSF (1mM) ή SBTI (1mg/ml) για 10min στους 4°C και τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με τις παραπάνω ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 7-15μl Laemmli sample buffer (2x) με β-μερκαπτοαιθανόλη (διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις πρωτεΐνες) και τα δείγματα βράζονται σε θερμοκρασία 95°C για 5min.

Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης επωάζεται σε Destaining buffer, το οποίο περιέχει, μεταξύ των άλλων, οξικό οξύ για την μονιμοποίηση των πρωτεϊνών και γλυκερόλη για να αυξηθεί η ανθεκτικότητα του πηκτώματος. Στη συνέχεια το πήκτωμα ξεπλένεται με νερό και στεγνώνεται σε συσκευή Gel Dryer για 40-60min. Τέλος, το πήκτωμα μεταφέρεται σε κασέτα για έκθεση 12 ή περισσότερων ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν

εμφανίζεται σε ψηφιακή εικόνα σε διάταξη αυτοραδιογραφίας με φωτοφωταύγεια, τύπου Phosphorimager (STORM Instruments) εφοδιασμένη με κασέτα αποθήκευσης φωσφορισμού (phosphor storage plate) με BaFBr:Eu²⁺, που σαρώνεται με laser στην περιοχή του ερυθρού (635nm) παρέχοντας μέσω του εκπεμπόμενου φωτός στην περιοχή του μπλε (390nm) στοιχεία για την κατανομή της ραδιενέργειας με υψηλή χωρική διακριτική ικανότητα.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Breaking Buffer: 0,6M sorbitol, 20mM Hepes pH 7.4
- Import buffer (2x): 100mM Hepes, pH 7.1, 1,2M sorbitol, 4mM KH₂PO₄, 100mM KCl, 20mM MgCl₂, 5mM Na₂EDTA, 10mM L-Methionine, 2mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), 2mM ATP, 2.5mM NADH
- 10x Laemmli sample buffer (SB): 0,5M Tris, 8mM EDTA, 0.4% SDS pH 6.8, 5% glycerol, 0.001% Bromophenol blue
- Coomassie: 30% methanol, 10% acetic acid, 0,2% R-250
- Destaining buffer: 15% methanol, 10% acetic acid

3.3.3 Δημιουργία μιτοπλαστών (mitoplasting) και εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο (carbonate extraction)

Για τη δημιουργία μιτοπλαστών (mitoplasting, MP), δηλαδή τη δημιουργία μιτοχονδρίων απαλλαγμένων από την εξωτερική τους μεμβράνη, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια με φυγοκέντρηση, μετά το πείραμα εισόδου των ραδιενεργών πρόδρομων μορίων σε αυτά και επαναδιαλύθηκαν σε υποτονικό διάλυμα (1x import buffer). Τα μιτοχόνδρια αραιώθηκαν σε 8 όγκους 20mM Hepes-KOH pH 7.4. Η επαναδιάλυση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία τρυψίνης (0,1 mg/ml) για 30min στους 4°C και ακολούθησε προσθήκη SBTI (1mg/ml) για 10min στην ίδια θερμοκρασία. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000g για 5min στους 4°C, όπου το υπερκείμενο (διαμεμβρανικός χώρος) διαχωρίζεται από το ίζημα (μιτοπλάστες και θραύσματα της εξωτερικής μεμβράνης). Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε Laemmli sample buffer (2x) με β-μερκαπτοαιθανόλη, ενώ το υπερκείμενο κατακρημνίστηκε με TCA (trichloro acetic acid, τελικής συγκέντρωσης 10%)

και οι πρωτεΐνες επαναδιαλύθηκαν σε 2x Laemmli sample buffer με β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

Για την περαιτέρω εξέταση του υπο-μιτοχονδριακού εντοπισμού των υπο μελέτη πρωτεϊνών έγινε επεξεργασία των μιτοχονδρίων με ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3). Έτσι, μετά από πείραμα εισόδου πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και επεξεργασία τους με πρωτεάση, τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε 0,1M φρέσκο και παγωμένο Na_2CO_3 και επωάστηκαν για 30min στους 4°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν στις 55.000g για 30min στους 4°C. Το υπερκείμενο κατακρημνίστηκε με προσθήκη TCA (τελικής συγκέντρωσης 10%) και το κατακρημνισμένο υλικό επαναδιαλύθηκε, όπως και το κλάσμα του ιζήματος σε διάλυμα 2x Laemmli buffer.

Στις παραπάνω περιπτώσεις, τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία και η υπό-μιτοχονδριακή κλασματοποίηση ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Crn10 και Cytb2 (cytochrome b2).

3.3.4 Είσοδος ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια *S. cerevisiae* και ανάλυση των συμπλόκων

Η εγγενής (μη αποδιατακτικού τύπου) ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια εισόδου πρόδρομων μορίων σε μιτοχόνδρια. Η παρούσα διαδικασία ακολουθεί την αντίδραση εισόδου ραδιενεργού πρωτεϊνικού υποστρώματος στα μιτοχόνδρια όπως αναφέρεται στη ενότητα 3.3.2. Μετά την είσοδο της ραδιενεργής πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια και την φυγοκέντρησή τους, τα μιτοχόνδρια ξεπλένονται δύο φορές με Breaking Buffer και επαναδιαλύονται στο ήπιο μη-ιοντικό απορρυπαντικό διάλυμα DDM (n-dodecyl -D-maltoside) για 30min στους 4°C, έτσι ώστε να διατηρηθούν ανέπαφα τα ενδογενή πρωτεϊνικά τους σύμπλοκα. Στη συνέχεια, το διαλυτό μέρος απομακρύνεται από τα μη διαλυτοποιημένα μιτοχόνδρια με φυγοκέντρωση στις 25000g για 30min και στο υπερκείμενο προστίθεται 5μl γλυκερόλη 25% και 1,5μl G-250.

Τέλος, τα δείγματα μετατοπίζονται σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα και ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

4. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών

4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνικών δειγμάτων με βάση το μέγεθός τους. Το πήκτωμα αυτό αποτελείται από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating) και το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking). Το πήκτωμα επιστοίβαξης εναποτίθεται μόνο αφού το πήκτωμα διαχωρισμού έχει πήξει με 100% ισοπροπανόλη από πάνω του. Με αυτόν τον τρόπο, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης τα πρωτεϊνικά δείγματα ευθυγραμμίζονται και αποκτούν κοινή αφετηρία στο πήκτωμα διαχωρισμού. Για τον πολυμερισμό των πηκτωμάτων χρησιμοποιείται 0,01% TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 0,1% APS (Ammonium Persulfate).

Τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν «φορτωθούν» βράζονται και εμπλουτίζονται με διάλυμα που περιέχει SDS το οποίο προσδίδει σε αυτές ένα αρνητικό φορτίο ανά δύο αμινοξικά κατάλοιπα κρατώντας παράλληλα τις πρωτεΐνες σε αποδιατεταγμένη μορφή.

Πίνακας 3.4 Tris-Tricine SDS (12%).

	Separating (ml)	Stacking (ml)
49,5% Total + 1,5% crosslinker	1,250	0,250
Gel Buffer (Tricine)	1,650	0,750
87% Glycerol	0,650	-
ddH ₂ O	1,400	2,100
10% APS	0,050	0,050
TEMED	0,005	0,005
Σύνολο	5,005	3,155

- Cathode Buffer: 0,1M Tris pH 8.25, 0,1M Tris-Tricine, 10% SDS

- Anode Buffer: 0,2M Tris pH 8.9

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα 12% Tris-Tricine ή 10-12% SDS (Glycine) ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος (**Πίνακες 3.4 & 3.5**). Τα Tris-Tricine πηκτώματα διαχωρίζουν καλύτερα τις μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες σε σχέση με τα Tris-Glycine. Η μετατόπιση των πρωτεϊνών στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 1 h στα 200V.

Πίνακας 3.5 SDS-PAGE (12%).

	Separating (ml)	Stacking (ml)
ddH ₂ O	1,600	3,400
30% Acrylamide mix	2,000	0,830
1,5M Tris	1,300 (pH 8.8)	0,630 (pH 6.8)
10% SDS	0,050	0,050
10% APS	0,050	0,050
TEMED	0,005	0,005
Σύνολο	5,005	4,915

- SDS Running Buffer(5x, τελικό 1L, pH 8.3): 15,1g Tris, 72g glycine, 5g SDS

4.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικού τύπου πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών απουσία SDS καλείται μη-αποδιατακτική ή εγγενής ηλεκτροφόρηση (BN-PAGE, Blue Native - PAGE) και χρησιμοποιείται για την μελέτη μη ομοιοπολικών συμπλόκων. Το κύριο πλεονέκτημά της είναι ότι η μετατόπιση των πρωτεϊνικών συμπλόκων εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος και όχι από το ενδογενές ηλεκτρικό φορτίο τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη της ανιονικής χρώσης Coomassie blue G250, η οποία προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές της διαλυτοποιημένης πρωτεΐνης και εξουδετερώνει το ενδογενές της φορτίο (*Schagger & von Jagow, 1991*). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για πήκτωμα πολυακρυλαμίδης βαθμίδωσης 5-12% για BN-PAGE φαίνονται στον **Πίνακα 3.6**. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.01% TEMED ΚΑΙ 0.1% APS Η μετατόπιση των πρωτεϊνών στην εγγενή ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 1h στα 300V (30min Cathode Buffer & 30min Cathode Buffer B/10) σύμφωνα με τον **Πίνακα 3.7**.

Πίνακας 3.6 Gradient BN-PAGE (5-12%).

	Separating 5% (ml)	Separating 12% (ml)	Stacking (ml)
Acrylamide 30%	0.450	0.800	0.700
Buffer for BN	0.670	0.670	2.000
Glycerol 87%	-	0.380	-
ddH ₂ O	0.880	0.150	3.330
10% APS	0.010	0.010	0,050
TEMED	0.001	0.001	0,005
Σύνολο	2	2	6

- Gel bf (3x): 75mM Imidazole, 1.5M 6-Aminohexanoic acid, pH=7.0

Πίνακας 3.7 Running Buffers for BN-PAGE.

	Cathode Buffer	Cathode Buffer B/10	Anode Buffer
Tricine (stock 1M)	7.5ml	7.5ml	
Imidazol (stock 1M)	1.125ml	1.125ml	(pH 7) 12,5ml
Coomasie G-250	0.02%	0.002%	
Σύνολο	150 ml	150ml	500ml

- Coomasie G250: 5% σε 500mM aminohexanoic acid

4.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση (Western Blot) είναι μια τεχνική ανίχνευσης μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα σε ένα μείγμα πρωτεϊνών. Αρχικά απομονώνεται το πρωτεϊνικό δείγμα και διαχωρίζεται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Στη συνέχεια μεταφέρονται οι πρωτεΐνες με ηλεκτροαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης με συσκευή ημίξηρης μεταφοράς Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή συσκευή (Biorad). Πιο συγκεκριμένα, η πηκτή εμβαπίζεται σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι πρωτεΐνες και να αποφευχθεί η διάχυσή τους εντός της πηκτής. Στο ίδιο διάλυμα εμβαπίζονται έξι κομμάτια διηθητικού χαρτιού τύπου Whatman 3mm καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυταρίνης ίδιων διαστάσεων με την πηκτή. Ακολούθως, τοποθετούνται στην κάθοδο της συσκευής ημίξηρης μεταφοράς (Semi-dry Transfer) με την έξης σειρά: τρία φύλλα χαρτιού Whatman, μεμβράνη νιτροκυταρίνης, πηκτή, και τρία φύλλα Whatman. Διώχνουμε τυχόν φυσαλίδες που ενδέχεται να εμποδίσουν την απρόσκοπτη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή προς τη μεμβράνη, τοποθετούμε την άνοδο της

συσκευής πάνω από τη διάταξη και ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 20V για 30-40min.

Ακολουθεί η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων με 5% φρέσκου διαλύματος μη λιπαρού γάλακτος διαλυμένο σε 1x TBST (Tris-Buffered Saline and Tween 20) για 1h σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N σε θερμοκρασία 4°C με ταυτόχρονη ανάδευση. Η μεμβράνη επωάζεται με το εκάστοτε ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα, σε 1% γάλα διαλυμένο σε 1x TBST για 1h σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N σε θερμοκρασία 4°C με ανάδευση ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές με 1x TBST προκειμένου να απομακρυνθεί από την μεμβράνη η περίσσεια του αντισώματος που δεν έχει δεσμευθεί ειδικά. Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα (συνήθως a-rabbit ή a-mouse) με αραιώση 1/10000 σε 1% γάλα διαλυμένο σε 1x TBST για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και η μεμβράνη ξεπλένεται ξανά.

Όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν πολυκλωνικά παραγμένα σε κουνέλια ή σε ποντίκια. Το δευτερογενές αντίσωμα ήταν συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horse raddish peroxidase), όπου παρουσία υπεροξειδίου (H_2O_2) και λουμινόλης (luminol) αλλάζει η οξειδωτική του κατάσταση και εκλύει φως (χημειοφωταύγεια). Το σήμα της χημειοφωταύγειας αναλύεται ψηφιακά με αναλυτή κατανομής εκπομπής φωτός τύπου LAS-3000 imaging system (FUJI FILM Life Sciences/ GE Image Quant) που είναι εφοδιασμένος με οπτική κάμερα τύπου CCD 3.2 Megapixel.

Σε περίπτωση που είναι αναγκαίο η ίδια μεμβράνη να επωαστεί μετά την εμφάνισή της ξανά με άλλο αντίσωμα, γίνεται έκδυση (stripping) της μεμβράνης για να απομακρυνθεί το προηγούμενο αντίσωμα με τη βοήθεια διαλύματος που περιέχει: 2% SDS και 62,5mM Tris pH 6.8 και 350μl β-μερκαπτοαιθανόλη ανά 50ml διαλύματος. Η εκάστοτε μεμβράνη επωάζεται σε αυτό το διάλυμα για 30min με πλυσίματα με 1x TBST ανά 10min σε θερμοκρασία δωματίου για την απομάκρυνση του διαλύματος έκδυσης και μπλοκάρονται ξανά οι μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης με 5% γάλα για 1h, ώστε η μεμβράνη να είναι έτοιμη να επωαστεί με το επόμενο αντίσωμα.

4.4 Κατακρήμιση πρωτεϊνών με TCA

Για την μείωση του όγκου ενός δείγματος προκειμένου να γίνει πιο συμπυκνωμένο σε πρωτεΐνες, ακολουθήθηκε η διαδικασία συμπύκνωσης πρωτεϊνών με τριχλωρικό οξύ (TCA precipitation). Για παράδειγμα, πραγματοποιήθηκε κατακρήμιση με TCA για την συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε δείγματα μετά από τη δημιουργία μιτοπλαστών και αλκαλική λύση μιτοχονδρίων από σακχαρομύκητα. Πιο συγκεκριμένα, σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί διάλυμα φόρτωσης, προσθέτουμε τριχλωρικό οξύ ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι τελικά 10% από ένα αρχικό διάλυμα 99% (Sigma) και επωάζουμε το δείγμα για 15-30min στον πάγο. Μετά το πέρας του χρόνου, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 16000g για 15-30min στους 4°C. Στη συνέχεια, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε διάλυμα φόρτωσης. Επειδή το διάλυμα φόρτωσης μπορεί να αλλάξει pH εξαιτίας του τριχλωρικού οξέος και να αποκτήσει κίτρινο χρώμα, αντί του κυανού χρώματος, επαναφέρουμε το pH του διαλύματος εισάγοντας στο δείγμα κατάλληλη ποσότητα Tris pH=8.0.

5. Έκφραση της πρωτεΐνης hGDH1

Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη GDH1 (μαζί με το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης, N53) συζευγμένη με τον επίτοπο His στο C-τελικό της άκρο εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3). Για το σκοπό αυτό, τα δεκτικά κύτταρα BL21(DE3) μετασχηματίζονται με το πλασμίδιο pET24α-GLUD1-His και καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο LB με αντιβιοτικό επιλογής. Στη συνέχεια, ορισμένες μοναδικές αποικίες εμβολιάζονται σε μικρές καλλιέργειες LB, με τα εκάστοτε αντιβιοτικά και ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών O/N στους 37°C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αραιώνονται 1:50 σε φρέσκο θρεπτικό υγρό με κατάλληλα αντιβιοτικά, ώστε να έχουν τελικό όγκο 4L. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C, μέχρι να φτάσουν περίπου στο μέσο της εκθετικής φάσης της ανάπτυξής τους. Σε αυτό το χρονικό σημείο, προστίθεται 0,4mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) και ακολουθεί επώαση για 3h στους 30°C. Μετά την ολοκλήρωση της επαγωγής, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3500rpm για 20min και τα κυτταρικά ιζήματα φυλάσσονται στους -20°C.

Για την απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος τα κύτταρα, επαναδιαλύονται σε διάλυμα A (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4) και προστίθεται 0,1mg/ml λυσοζύμη και 2mM PMSF. Σημειώνεται ότι η λυσοζύμη υδρολύει την πεπτιδογλυκάνη που υπάρχει στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και το PMSF χρησιμοποιείται ως αναστολέας πρωτεασών.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα σπάνε με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 21000g για 30min στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση παρατηρείται ότι η hGDH1-His εντοπίζεται στο ίζημα. Από το υπερκείμενο κρατείται δείγμα και απομακρύνεται, ενώ το ίζημα αποδιατάσσεται με 8M ουρία, ώστε να ανακτήσουμε την πρωτεΐνη η οποία υπάρχει στα σωματίδια εγκλεισμού του βακτηρίου (inclusion bodies). Το αποδιατεταγμένο πρωτεϊνικό διάλυμα προσδένεται σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης, τα οποία έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί σε διάλυμα B (Ni-NTA beads, Qiagen). Τα σφαιρίδια ξεπλένονται με διάλυμα A στο οποίο έχουν προστεθεί διαφορετικές αραιώσεις από ιμιδαζόλιο (imidazole) και ουρία, ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν έχουν δεσμευτεί ειδικά στη στήλη νικελίου. Τέλος, οι πρωτεΐνες εκλούνται από τα σφαιρίδια με διάλυμα A, στο οποίο έχει προστεθεί 150mM ιμιδαζόλιο. Σημειώνεται ότι κατά τη διάρκεια απομόνωσης της πρωτεΐνης κατακρατούνται ποσότητες από όλα τα δείγματα για περαιτέρω ελέγχους.

- Διάλυμα A: 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4
- Διάλυμα B: 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 8M Urea
- Ξέπλυμα 1: 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 6M Urea, 5mM imidazole
- Ξέπλυμα 2: 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 4M Urea, 15mM imidazole
- Ξέπλυμα 3: 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 2M Urea, 15mM imidazole
- Διάλυμα έκλουσης: 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 15mM imidazole

6. Προγράμματα Βιοπληροφορικής

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα *in silico* προγράμματα για την πρόβλεψη της πιθανότητας μιτοχονδριακής στόχευσης πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων τα ανοιχτής πρόσβασης διαδικτυακά προγράμματα MitoFates (*Fukasawa et al, 2015*), Target P (*Nielsen et al, 1997; Emanuelsson et al, 2000*), Mitoprot II (*Claros et al, 1996*) και Cello (*Yu et al, 2004; Yu et al, 2006*). Για την πρόβλεψη πιθανής ύπαρξης σήματος πυρηνικής στόχευσης χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά προγράμματα NLStradamus (*Yachdav et al, 2014*), cNLS Mapper (*Kosugi et al, 2008; 2009a; 2009b*) και NucPred (*Brameier et al, 2007*). Για την πολλαπλή στοίχιση πρωτεϊνικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clustal W και Clustal Omega (*Larkin et al, 2007; Sievers et al, 2011*) και για τον υπολογισμό πρωτεϊνικής ομολογίας το πρόγραμμα MUSCLE (*Edgar, 2004a; Edgar, 2004b*). Τέλος, για την πρόβλεψη της δευτεροτεγούς πρωτεϊνικής δομής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Predict Protein (*Yachdav et al, 2014*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Α. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ: ΔΟΜΗ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

1. Το σύστημα εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η διαμερισματοποίηση των ανθρώπινων GDHs

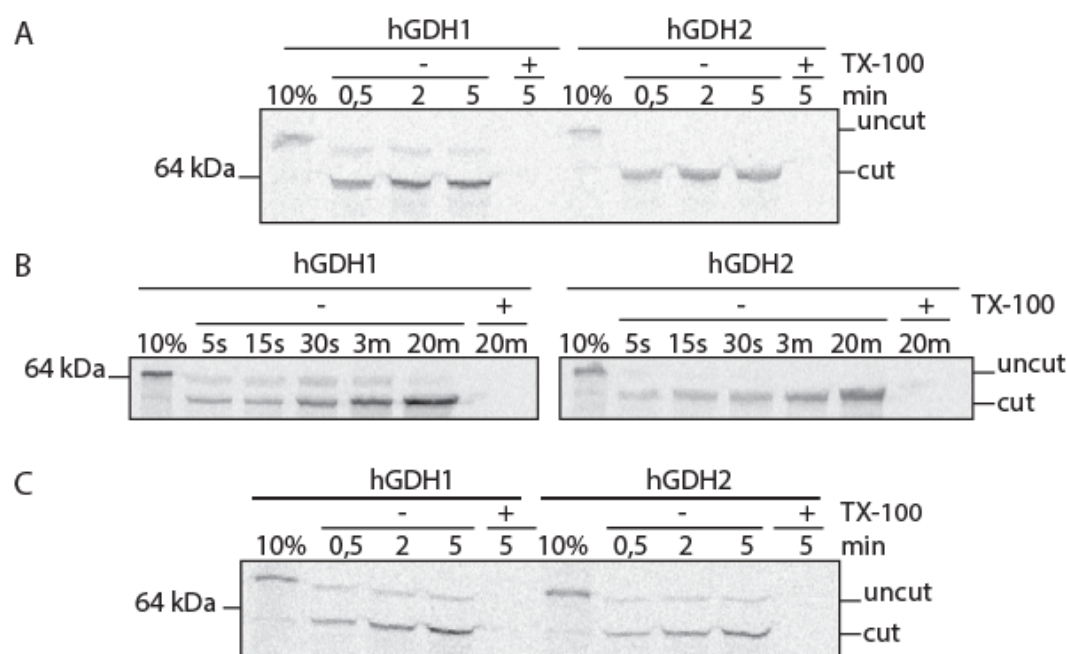
1.1 Οι hGDHs μπορούν να εισέλθουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα

Πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων για να ερευνήσουμε αν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το σύστημα *in vitro* εισόδου ραδιενεργά συντιθέμενων πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα στη μελέτη εισόδου των ανθρώπινων ισομορφών της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Βρέθηκε ότι οι ραδιενεργά σεσημασμένες ανθρώπινες πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2 που έχουν παραχθεί με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής-μετάφρασης, μπορούν να μπουν και να κοπούν, ώστε να πάρουν την ώριμη μορφή τους σε ήδη απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (**Εικόνα 4.1**). Το ραδιενεργό σήμα είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που είναι αποκλειστικά μέσα στα μιτοχόνδρια, όπως φαίνεται με το απορρυπαντικό TX-100, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας της διαδικασίας (**Εικόνα 4.1, δείγματα +TX-100**).

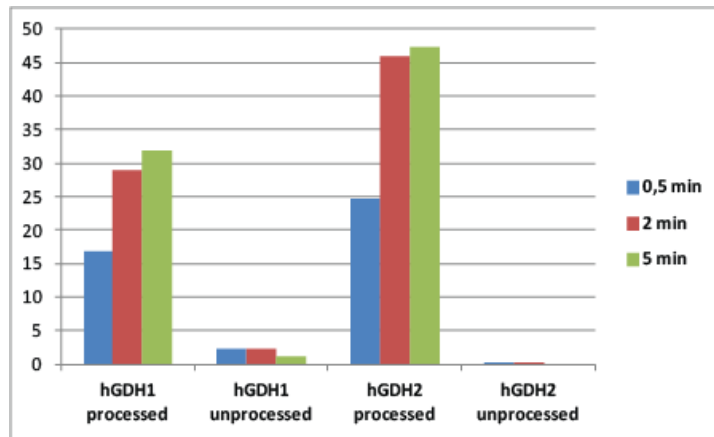
Αν και τα οδηγία πεπτιδία των hGDH1 και hGDH2 διαφέρουν μόνο σε 9 από τα 53 αμινοξέα τους, βρέθηκε ότι η είσοδος ή η ωρίμανση της hGDH2 γίνεται λίγο ταχύτερα από ότι στην περίπτωση της hGDH1, καθώς ακόμα και σε χρόνο 30s σε θερμοκρασία 30°C (συνήθης θερμοκρασία για πειράματα *in vitro* εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα) η hGDH2 βρίσκεται σχεδόν όλη στην ώριμη μορφή της, ενώ η hGDH1 εμφανίζει μία μπάντα, που αντιστοιχεί στην άκοπη μορφή της (**Εικόνα 4.2**). Εναλλακτικά, η

πάνω αχνή μπάντα στα δείγματα εισόδου στα μιτοχόνδρια μπορεί να αντιπροσωπεύει μια μικρή ποσότητα της συντιθέμενης hGDH1 από την οποία λείπουν 3 αμινοτελικά αμινοξέα, όπως έχει βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες αλληλούχισης της hGDH σε ανθρώπινους ιστούς (*Shashidharan & Plaitakis, 2014, Hussain et al, 1989*), η οποία ίσως αποκόπτεται λίγο πιο αργά σε σχέση με σε σχέση με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη.

Βρέθηκε ότι οι ραδιενεργά συντιθέμενες hGDHs μπορούν να μπουν στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από τους 30°C, όπως στους 25°C και στους 16°C, με ίσως λίγο μικρότερη ταχύτητα, παρέχοντας όμως τα ίδια ευρήματα (**Εικόνες 4.1.B & 4.1.C**, αντίστοιχα).



Εικόνα 4.1 Είσοδος των *in vitro* συντιθέμενων ραδιενεργά σεσημασμένων hGDH1 και hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα στους (A) 30°C (B) 25°C και (C) 16°C, κατεργασία με τρυψίνη, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία. (cut: ώριμη μορφή, uncut: ανώριμη μορφή), TX-100: κατεργασία των δειγμάτων με Triton-X100 (αρνητικός μαρτυρας ελέγχου της δοκιμασίας εισόδου στα μιτοχόνδρα), 10%: το 10% της συνολικής ποσότητας της *in vitro* παραγώμενης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για κάθε δοκιμασία εισόδου.



Εικόνα 4.2 Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της Εικόνας 4.1.A χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Image Quant και το Microsoft Excel.

Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Image Quant δείχνει ότι η hGDH2 έχει ελαφρώς περισσότερη ικανότητα εισόδου στα μιτοχόνδρια σε σχέση με τη hGDH1 (**Εικόνα 4.2**).

Αν και οι δύο hGDHs έχουν την ίδια θέση αναγνώρισης για την πρωτεάση MPP, η χρονική διαφορά στην αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης μπορεί να σχετίζεται με την αναγνώρισή τους από άλλες πρωτεάσες της μιτοχονδριακής μήτρας όπως για παράδειγμα της Icp55 (Vögtle *et al*, 2009; Teixeira and Glaser, 2013). Στην περίπτωση που η ομόλογη της Icp55 στο άνθρωπο αναγνωρίζει το ίδιο πρωτεϊνικό μοτίβο σε σχέση με αυτή του σακχαρομύκητα, η παρουσία της λευκίνης στη θέση +3 του ώριμου τμήματος της hGDH2 σε σχέση (αλανίνη στην θέση +3 στην hGDH1) μπορεί να διευκολύνει την αναγνώριση και την αποκοπή της από την Icp55 έτσι, ώστε τελικά η hGDH2 να παίρνει την ώριμη μορφή της ταχύτερα σε σχέση με την hGDH1. Όποια και εάν είναι η αιτία, το παραπάνω εύρημα συμφωνεί με την *in silico* μιτοχονδριακή πρόβλεψη, που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη με τη χρήση των προγραμμάτων πρόβλεψης ενδοκυτταρικής στόχευσης (MitoP, TargetP, Predotar, MitoFates), ότι η μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2 είναι ισχυρότερη αυτής της hGDH1 (**Πίνακας 4.1**). Άλλες ερευνητικές ομάδες πραγματοποίησαν πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών και βρήκαν παρόμοια μιτοχονδριακή στόχευση για τις hGDHs (Mastorodemos *et al*, 2009). Αντίθετα, άλλες ομάδες πραγματοποιώντας πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού παρατήρησαν ότι η πρωτεΐνη hGDH2 εμφανίζει υψηλότερη

ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης σε σχέση με την hGDH1 (Rosso *et al*, 2008).

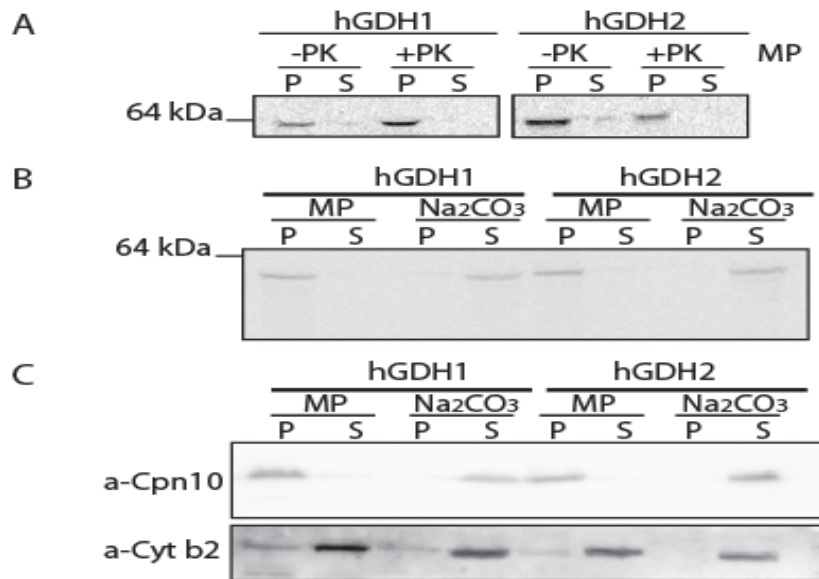
Πίνακας 4.1 Πρόβλεψη μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDH1 και hGDH2

Protein	MitoProt II	Target P	Predotar	MitoFates
hGDH1	2,17	0,38	0,30	0,965
hGDH2	3,00	0,92	0,92	0,983

1.2 Οι hGDHs διαμερισματοποιούνται στην μιτοχονδριακή μήτρα

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα εισόδου των *in vitro* συντιθέμενων hGDHs σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα σε συνδυασμό με υπο-μιτοχονδριακή κλασμάτωση, για τον εντοπισμό της θέσης των hGDHs στα μιτοχόνδρια. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα εισόδου ραδιοσημασμένων GDH πρωτεϊνών σε συνδυασμό με δημιουργία μιτοπλαστών (mitoplasting) έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες hGDHs βρίσκονται στον μιτοπλάστη (IM και matrix) και προστατεύονται από την κατεργασία εξωτερικά των μιτοπλαστών με πρωτεάση (**Εικόνες 4.3.A & 4.3.B**). Επομένως, παρέχονται ενδείξεις ότι οι hGDHs εντοπίζονται στην μιτοχονδριακή μήτρα ή στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Πειράματα αλκαλικής λύσης (χρησιμοποιώντας Na_2CO_3 pH 11 το οποίο μπορεί να ξεχωρίσει τις μεμβράνες από τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες) έδειξαν ότι οι hGDHs βρίσκονται στο υδατοδιαλυτό (μη μεμβρανικό) τμήμα των μιτοχονδρίων (**Εικόνα 4.3.B**). Η υπο-μιτοχονδριακή κλασμάτωση ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Crn10 και Cytb2 που διαμερισματοποιούνται στο matrix και στο IMS, αντίστοιχα (**Εικόνα 4.3.C**). Επομένως ο συνδυασμός των εν λόγω αποτελεσμάτων δείχνει ότι οι hGDHs όταν εισέλθουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, εντοπίζονται στην μιτοχονδριακή μήτρα.

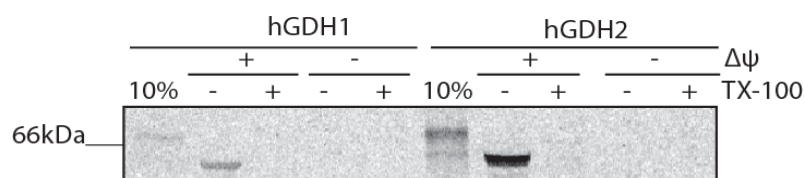
Σημειώνεται ότι άλλες ερευνητικές ομάδες πραγματοποιώντας ανισοϊστοχημικές μελέτες στον αρουραίο έχουν δείξει ότι η γλουταμική αφυδρογονάση βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μήτρα στους ιστούς που μελετήθηκαν (Rothe *et al*, 1994; Aoki *et al*, 1987).



Εικόνα 4.3 Οι hGDHs διαμερισματοποιούνται στην μιτοχονδριακή μήτρα. (Α). Είσοδος των hGDHs σε μιτοχόνδρια, δημιουργία μιτοπλαστών, κατεργασία ή μη των μιτοπλαστών με PK και αυτοραδιογραφία. (Β). Είσοδος των hGDHs σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σε συνδυασμό με δημιουργία μιτοπλαστών ή με αλκαλική λύση και αυτοραδιογραφία. (Γ). Ανάλυση κατά Western με αντισώματα a-Cpn10 και a-Cyt b2 των μιτοχονδριακών κλασμάτων μετά τη δημιουργία μιτοπλαστών και την αλκαλική λύση. MP: δημιουργία μιτοπλαστών (mitoplasting), Na₂CO₃: αλκαλική λύση, P: ίζημα (pellet), S: υπερκείμενο (supernatant).

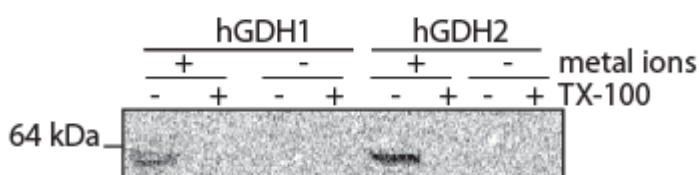
1.3 Η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από το Δψ και τη συγκέντρωση δισθενών μεταλλικών ιόντων

Πειράματα στόχευσης των hGDHs σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα με διαταραγμένο το ηλεκτροχημικό δυναμικό Δψ της εσωτερικής μεμβράνης με χρήση του CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone - εμποδίζει την υποχρεωτική σύνδεση μεταξύ της αναπνευστικής αλυσίδας και του συστήματος φωσφορυλίωσης) έδειξαν ότι η είσοδος των hGDHs εξαρτάται από το Δψ (**Εικόνα 4.4**). Αυτό είναι αναμενόμενο για τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που στοχεύονται στην εσωτερική μεμβράνη και στην μήτρα των μιτοχονδρίων (*Nelson & Schatz, 1979*).



Εικόνα 4.4 Η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Δψ).

Επίσης, μελετήθηκε αν η συγκέντρωση των δισθενών μεταλλικών ιόντων επηρεάζει την ικανότητα εισόδου των hGDHs στα μιτοχόνδρια. Μελετήθηκε η είσοδος ραδιενεργά σσημασμένων hGDHs σε απομονωμένα μιτοχόνδρια στα οποία έχει προστεθεί ο χηλικός παράγοντας EDTA σε διάλυμα χωρίς προσθήκη δισθενών μεταλλικών ιόντων καθώς και σε μιτοχόνδρια σε σύνηθες διάλυμα εισόδου (βλέπε «Υλικά & Μέθοδοι»). Βρέθηκε ότι οι hGDHs χάνουν την ικανότητά τους να μπαίνουν στα μιτοχόνδρια απουσία δισθενών μεταλλικών ιόντων (**Εικόνα 4.5**). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι η δράση της πρωτεάσης MPP στην μιτοχονδριακή μήτρα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων (*Luciano et al, 1998*) ή από την εξάρτηση σε μεταλλικά ιόντα άλλων πρωτεϊνών, που σχετίζονται με το μονοπάτι εισόδου πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στην μιτοχονδριακή μήτρα.



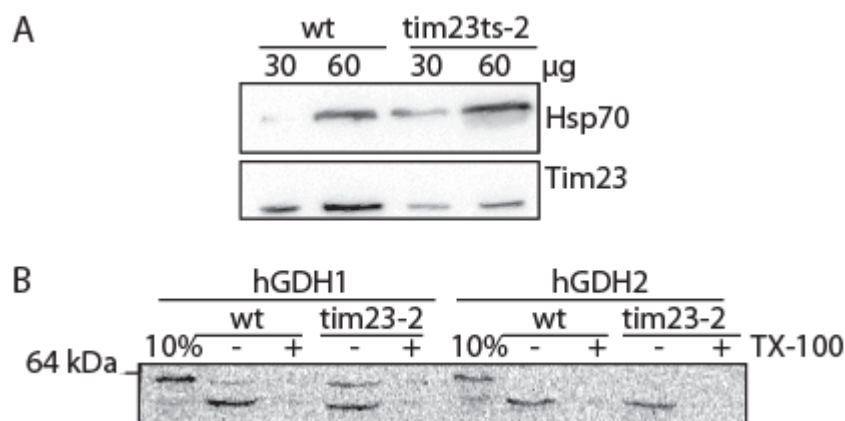
Εικόνα 4.5 Η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δισθενών μεταλλικών ιόντων.

1.4 Οι hGDHs μπαίνουν στην μιτοχονδριακή μήτρα μέσω του καναλιού TIM23

Για να διερευνήσουμε αν οι πρωτεΐνες hGDHs χρησιμοποιούν το κανάλι TIM23 της εσωτερικής μεμβράνης το οποίο είναι απαραίτητο για την είσοδο των πρωτεϊνών στην μιτοχονδριακή μήτρα, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος σακχαρομύκητα *tim23-2*, το οποίο έχει μία σημειακή μεταλλαγή στην πρωτεΐνη *tim23-2* (G112E) που το κάνει θερμοευαίσθητο (*Dekker et al, 1997*). Τα μιτοχόνδρια από τα στέλεχος αυτό παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα εισόδου των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν το κανάλι TIM23 (*Dekker et al, 1997*). Έτσι, απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή μιτοχόνδρια από το στέλεχος σακχαρομύκητα *tim23-2* και τα μιτοχόνδρια αξιολογήθηκαν με ανάλυση κατά Western (**Εικόνα 4.6.A**).

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής της εισόδου των hGDHs σε άγριου τύπου και *tim23-2* μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (**Εικόνα 4.6.B**) και

ποσοτικοποίηση των σημάτων χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα Image Quant (τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις των ποσοτικοποιήσεων για κάθε αποτέλεσμα αυτοραδιογραφίας). Βρέθηκε μειωμένη ικανότητα εισόδου των πρωτεϊνών hGDHs στα απομονωμένα *tim23-2* σε σχέση με τα αγρίου τύπου (~25%). Ως εκ τούτου, θεωρούμε ότι οι hGDHs έχουν πολύ υψηλή πιθανότητα να διαμερισματοποιούνται στα μιτοχόνδρια μέσω του καναλιού TIM23.

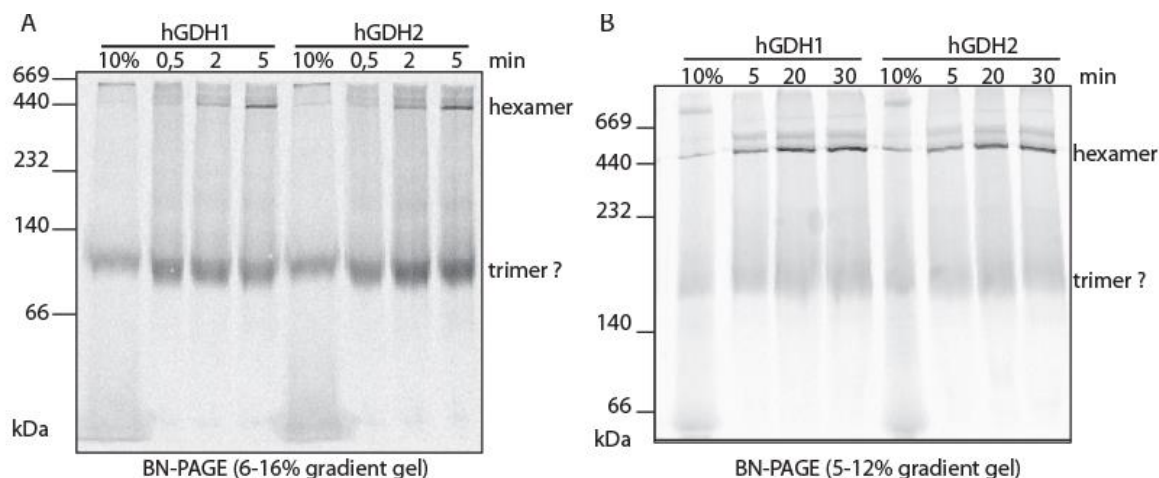


Εικόνα 4.6 Οι hGDHs μπαίνουν στα μιτοχόνδρια μέσω του καναλιού TIM23 της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. (A). Ανάλυση κατά Western των αγρίου τύπου και *tim23-2* μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα με α-Hsp70 και α-Tim23. (B). Είσοδος των *in vitro* ραδιενεργά συντιθέμενων πρωτεϊνών hGDH1 και hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από αγρίου τύπου και *tim23-2* στελέχη σακχαρομύκητα, ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

1.5 Οι hGDHs μπορούν να σχηματίσουν εξαμερή, όταν εισέλθουν στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα

Πειράματα εισόδου των hGDHs σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα σε συνδυασμό με μη αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση, έδειξαν ότι οι γλουταμικές αφυδρογονάσες όταν μπουν στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα, σχηματίζουν εξαμερή με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (**Εικόνα 4.7**). Η δημιουργία εξαμερούς εντός των μιτοχονδρίων είναι αναμενόμενο, καθώς από την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι GDHs έχουν την τάση να σχηματίζουν εξαμερή (*Smith et al, 2002*). Επίσης παρατηρήθηκε η δημιουργία μιας άλλης μπάντας, η οποία πιθανώς αντιστοιχεί στην δημιουργία ενός πιθανού ομο-τριμερούς ή στην δημιουργία κάποιου συμπλόκου των hGDHs με πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων (**Εικόνα 4.7**). Τέλος, παρατηρείται η

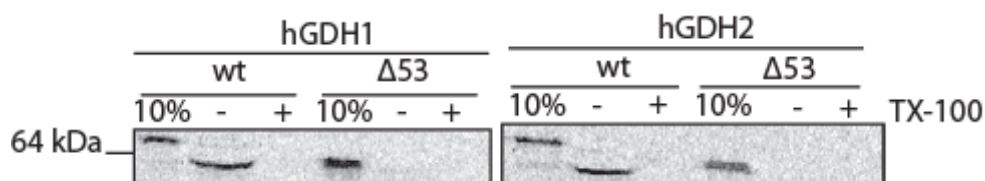
δημιουργία διάφορων πολυμερών με μέγεθος μεγαλύτερο των 440 kDa
(**Εικόνα 4.7.B**).



Εικόνα 4.7 Οι hGDHs όταν μπουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, σχηματίζουν εξαμερή με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Είσοδος της hGDH1 και hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, μη αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. (A). 6-16% BN-PAGE (B).5-12% BN-PAGE.

2. Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs είναι απαραίτητο για να μπουν οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες στα μιτοχόνδρια

Πειράματα απαλοιφής του πεπτιδίου N53 έδειξαν ότι το ώριμο τμήμα των hGDH1 και hGDH2 ($\Delta 53$ hGDH1 και $\Delta 53$ hGDH2, αντίστοιχα) δεν είναι ικανά από μόνα τους να εισέλθουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.8**). Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν και οι συνεργάτες μας από το Εργαστήριο Νευρολογίας πραγματοποιώντας πειράματα διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών θηλαστικών σε συνδυασμό με μικροσκοπία φθορισμού και μελέτες απομόνωσης μιτοχονδρίων (*Mastorodemos et al, 2009; Kotzamani et al, 2012*). Άρα, το N53 λειτουργεί σαν ένα απαραίτητο οδηγό πεπτίδιο για τις πρωτεΐνες αυτές, ώστε να έχουν την μιτοχονδριακή τους διαμερισματοποίηση.



Εικόνα 4.8 Το N53 είναι απαραίτητο για την μιτοχονδριακή στόχευση των hGDHs. Είσοδος των hGDHs (wt και $\Delta 53$ hGDH) σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 5min, ανάλυση με αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

3. Η α1 έλικα της hGDH2 είναι απαραίτητη για να διαμερισματοποιηθεί η hGDH2 στα μιτοχόνδρια

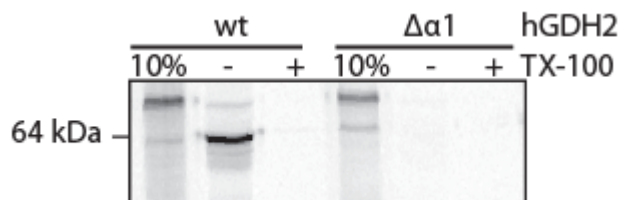
Χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα πρόβλεψης της ενδοκυτταρικής διαμερισματοποίησης των αγρίου τύπου hGDHs και των μεταλλαγμάτων τους, τα οποία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.2**. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα που προβλέπουν: (1) την μιτοχονδριακή στόχευση και την πιθανότητα ύπαρξης MTS (MitoFates, TargetP, Predotar), (2) την ενδοκυτταρική στόχευση γενικά (SubLoc) και (3) τη στόχευση στον πυρήνα και την παρουσία NLS (Nuclear Localization Signal) (cNLS Mapper, NucPred, NLStradamus). Τα προγράμματα προτείνουν ότι η α1 έλικα του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDH1 και hGDH2 έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην μιτοχονδριακή τους στόχευση, ενώ δεν προβλέπουν την ύπαρξη κάποιου πιθανού NLS στις hGDHs.

Πίνακας 4.2 Πρόβλεψη κυτταρικής διαμερισματοποίησης των hGDH1 και hGDH2.
(C: κυτταρόπλασμα, M: μιτοχόνδρια)

Protein GDH	MitoFates (mitos)	TargetP (mTP)	Predotar (mitos)	SubLoc v1.0	cNLS Mapper	NucPred	NLStradamus
hGDH1 wt	0.965	0.385	0.30	M	x	0.12	x
hGDH2 wt	0.983	0.918	0.92	M	x	0.11	x
Δ10hGDH1	0.251	0.657	0.22	M	x	0.12	x
Δ32hGDH1	0.126	0.732	0.07	C	x	0.11	x
Δ53hGDH1	0.000	0.084	0.01	C	x	0.04	x
Δα1hGDH2	0.273	0.928	0.35	M	x	0.12	x
Δ32hGDH2	0.115	0.711	0.04	C	x	0.08	x
Δ53hGDH2	0.000	0.078	0.00	C	x	0.05	x

Πειράματα συν-διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών θηλαστικών σε συνδυασμό με μικροσκοπία φθορισμού, καθώς και πειράματα διαμόλυνσης ανθρώπινων κυτταρικών σειρών σε συνδυασμό με απομόνωση μιτοχονδρίων που πραγματοποίησαν οι συνεργάτες μας στο Εργαστήριο Νευρολογίας, έδειξαν ότι όταν λείπει έστω και η πρώτη α-έλικα του οδηγού πεπτιδίου της hGDH2 (Δα1hGDH2 ή εναλλακτικά Δ38GLUD2), η πρωτεΐνη χάνει την ικανότητά της να στοχεύσει το EGFP στα μιτοχόνδρια (Kotzamani et al, 2012). Συμπληρωματικά, πειράματα εισόδου της ραδιενεργά συντιθέμενης

Δα1hGDH2 έδειξαν ότι η Δα1hGDH2 χάνει την ικανότητά της να μπαίνει σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (**Εικόνα 4.9**). Επομένως, η α1 έλικα της hGDH2 είναι απαραίτητη για τη στόχευση της hGDH2 στα μιτοχόνδρια.



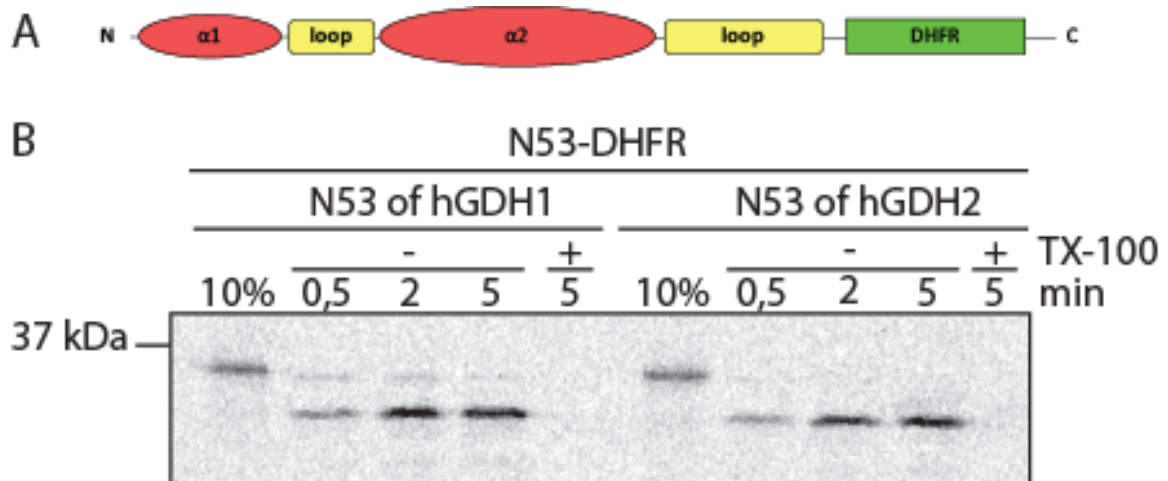
Εικόνα 4.9 Η α1 έλικα του N53 της hGDH2 είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή της στόχευση. Πείραμα εισόδου της *in vitro* ραδιενεργά συντιθέμενης αγρίου τύπου hGDH2 και Δα1hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

Βρέθηκε ότι το *in organello* σύστημα των απομονωμένων μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα δίνει αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά που προκύπτουν από από πειράματα σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών για τις ανθρώπινες γλουταμικές αφυδρογονάσεις. Επομένως, το σύστημα των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα, αν και ετερόλογο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ευρύτερη μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο οι hGDHs μπαίνουν στα μιτοχόνδρια.

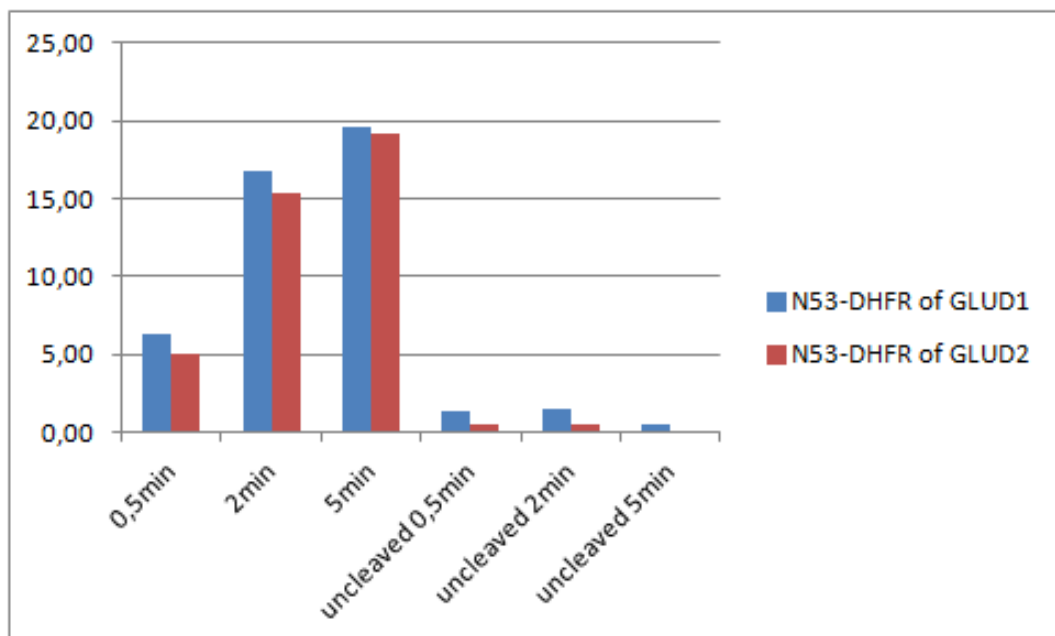
4. Το N53 των hGDHs είναι ικανό να στοχεύσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια

Μελετήθηκε αν το N53 των hGDH1 και hGDH2 είναι ικανό από μόνο του να οδηγήσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια. Για το σκοπό αυτό έγιναν οι αντίστοιχες κλωνοποιήσεις σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, ώστε να μπορούν να εκφράζονται τα πεπτιδία N53 (του hGDH1 ή του hGDH2) συζευγμένα στο C-τελικό τους άκρο με την μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη DHFR (Dihydrofolate reductase) με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής-μετάφρασης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα εισόδου των πεπτιδίων N53-DHFR σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, όπου παρατηρήθηκε ότι το N53-DHFR και από τις δύο hGDHs είναι ικανό να μπει και να αποκοπεί σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.10**). Σημειώνεται ότι το DHFR από μόνο του δεν είναι ικανό να μπει στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.14.B**). Επίσης, τα πειράματα δίνουν ενδείξεις ότι

το N53 της hGDH2 εισέρχεται ή αποκόπτεται λίγο ταχύτερα σε σχέση με το N53 της hGDH1 (Εικόνα 4.11). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι η hGDH2 μπαίνει ή κόβεται πιο γρήγορα σε σχέση με την hGDH1.

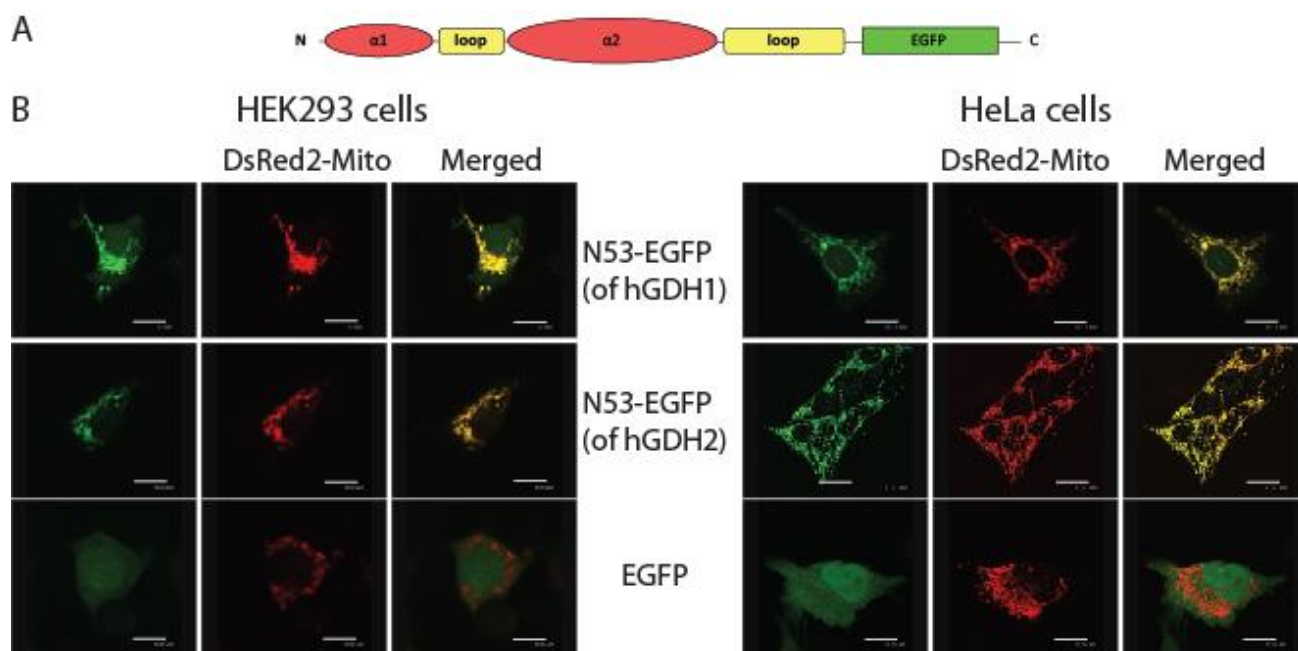


Εικόνα 4.10 Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs από μόνο του είναι ικανό να οδηγήσει την μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη DHFR στα μιτοχόνδρια. (A). Διαγραμματική απεικόνιση του N53-DHFR. (B). Είσοδος των N53 (N53 των hGDH1 και hGDH2) συζευγμένων στο καρβοξυτελικό τους άκρο με το DHFR (N53-DHFR) για 0,5, 2 και 5 min σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.



Εικόνα 4.11 Διαγραμματική απεικόνιση της ποσοτικοποίησης της Εικόνας 4.10.B χρησιμοποιώντας τα λογισμικά προγράμματα Image Quant και το Microsoft Excel.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν κλωνοποιήσεις σε πλασμίδιο pEGFP-N3 ώστε να μπορούν να εκφραστούν σε κυτταρικές θηλαστικών τα N53 (του hGDH1 ή του hGDH2) συζευγμένα στο C-τελικό τους άκρο με την μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Στη συνέχεια, οι συνεργάτες μας από το Εργαστήριο Νευρολογίας πραγματοποίησαν πειράματα συν-διαμόλυνσης των N53-EGFP (N53 του hGDH1 ή hGDH2) με το μιτοχονδριακό μάρτυρα DsRed2-Mito στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HEK293 και HeLa. Τα πειράματα συν-διαμόλυνσης κυττάρων HEK293 και HeLa έδειξαν ότι το N53 της hGDH2 οδηγεί το EGFP σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, το N53-EGFP της hGDH1 εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια, αλλά εντοπίζεται και σε μικρότερο ποσοστό στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα όπου δίνει μία διάχυτη χρώση (**Εικόνα 4.12**).



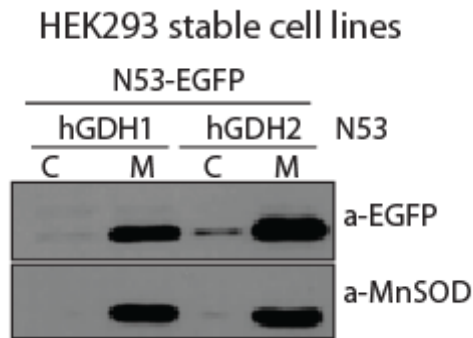
Εικόνα 4.12. Το N53 των hGDHs μπορεί να στοχεύσει το EGFP στα μιτοχόνδρια σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. (A). Διαγραμματική απεικόνιση του N53-EGFP (B). Παρατήρηση κυττάρων HEK293 (αριστερά) και HeLa (δεξιά) με συνεστιακή μικροσκοπία κυτταρικές σειρές μετά από συν-διαμόλυνση με τα πλασμίδια N53-EGFP είτε από hGDH1 (1η γραμμή) είτε από hGDH2 (2η γραμμή) ή με το EGFP (αρνητικός μάρτυρας, 3η γραμμή) και με το πλασμίδιο DsRed2-Mito. αριστερή στήλη: EGFP, μεσαία στήλη DsRed2-Mito, δεξιά στήλη ένωση των δύο εικόνων. Κλίμακα: Κύτταρα HEK293 1η γραμμή: 12 μm, 2η γραμμή: 9.9 μm, 3η γραμμή: 9.4μm; Κύτταρα HeLa, 1η γραμμή: 18.8μm, 2η γραμμή: 27.8μm, 3η γραμμή: 15.5μm. (Δ. Κοτσαμάνη)

Η ερευνητική ομάδα των Rosso και συν. πραγματοποίησε πειράματα διαμόλυνσης των N53-EGFP (N53 της hGDH1 ή της hGDH2) σε συνδυασμό με χρώση των μιτοχονδρίων με Mito-tracker σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, όπως σε κύτταρα LN229 (ανθρώπινα αστροκυττάρων), HeLa και COS7 (Rosso et al, 2008). Παρατήρησαν ότι σε αυτές τις κυτταρικές σειρές το πεπίδιο N53-EGFP της hGDH2 εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια, ενώ αντίθετα το πεπίδιο N53-EGFP της hGDH1 κατανέμεται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (Rosso et al, 2008). Οι Rosso και συν. θεωρούν ότι αυτό οφείλεται στην αντικατάσταση του γλουταμικού στη θέση 7 στην hGDH1 με λυσίνη στην hGDH2 (Rosso et al, 2008).

Η διαφορά των αποτελεσμάτων από τις δύο ερευνητικές ομάδες μπορεί να οφείλεται στην ακρίβεια της χρώσης των μιτοχονδρίων με τη χρήση του Mito-tracker (Rosso et al, 2008) σε σχέση με τη διαμόλυνση με το πλασμίδιο DsRed2-Mito (Mastorodemos et al, 2009).

Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα και των δύο ερευνητικών ομάδων συγκλίνουν στο ότι το N53 της hGDH2 έχει εξελιχθεί έτσι, ώστε να έχει μεγαλύτερη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης σε σχέση με το N53 της hGDH1.

Για να επιβεβαιωθεί το εν λόγω εύρημα δημιουργήθηκαν από τους συνεργάτες μας σταθερές κυτταρικές σειρές (stable cell lines) που υπερεκφράζουν σταθερά το N53-EGFP (N53 της hGDH1 ή της hGDH2). Στη συνέχεια, απομονώθηκαν από τα κύτταρα τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα και πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα α-EGFP. Το ανοσοαποτύπωμα κατά Western έδειξε ότι το N53-EGFP και των δύο hGDHs εντοπίζεται κυρίως στο μιτοχονδριακό κλάσμα (**Εικόνα 4.13**). Επίσης πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα α-MnSOD (Manganese-dependent Superoxide Dismutase), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για να δειχθεί ότι έγινε σωστά η απομόνωση των μιτοχονδρίων από το κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 4.13**).

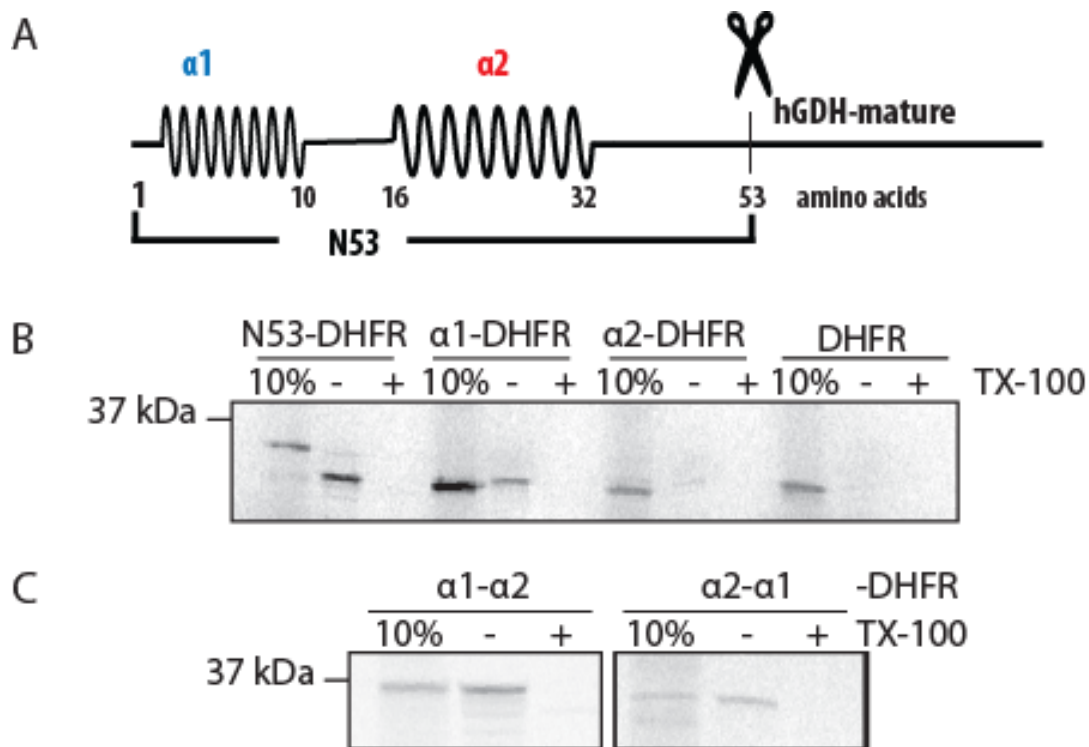


Εικόνα 4.13 Τα N53 των hGDHs όταν συζευχθούν στο αμινοτελικό άκρο του EGFP (N53-EGFP), μπορούν να μπουν στα μιτοχόνδρια και να ανιχνευτούν στα μιτοχονδριακά κλάσματα. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με a-EGFP και a-MnSOD (μιτοχονδριακός μάρτυρας) σταθερών κυτταρικών σειρών HEK293 που υπερεκφράζουν το N53-EGFP (από hGDH1 και hGDH2). C: κυτταρόπλασμα (cytosol), M: μιτοχόνδρια (mitochondria). (Δ. Κοτζαμάνη)

5. Η α1 έλικα παίζει κυρίαρχο ρόλο, ενώ η α2 έχει βοηθητικό ρόλο στην μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2

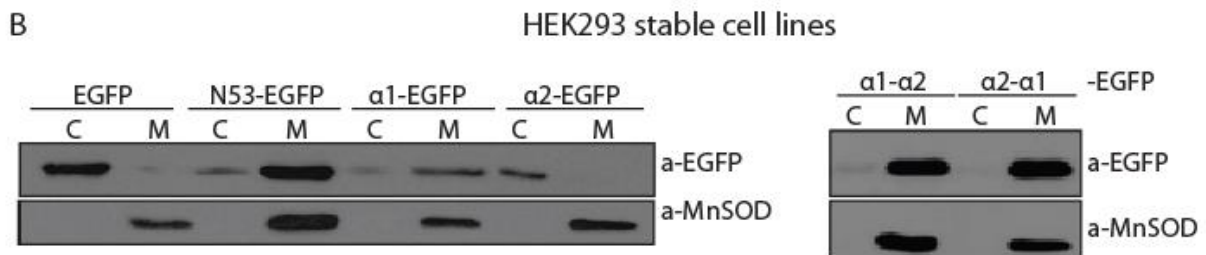
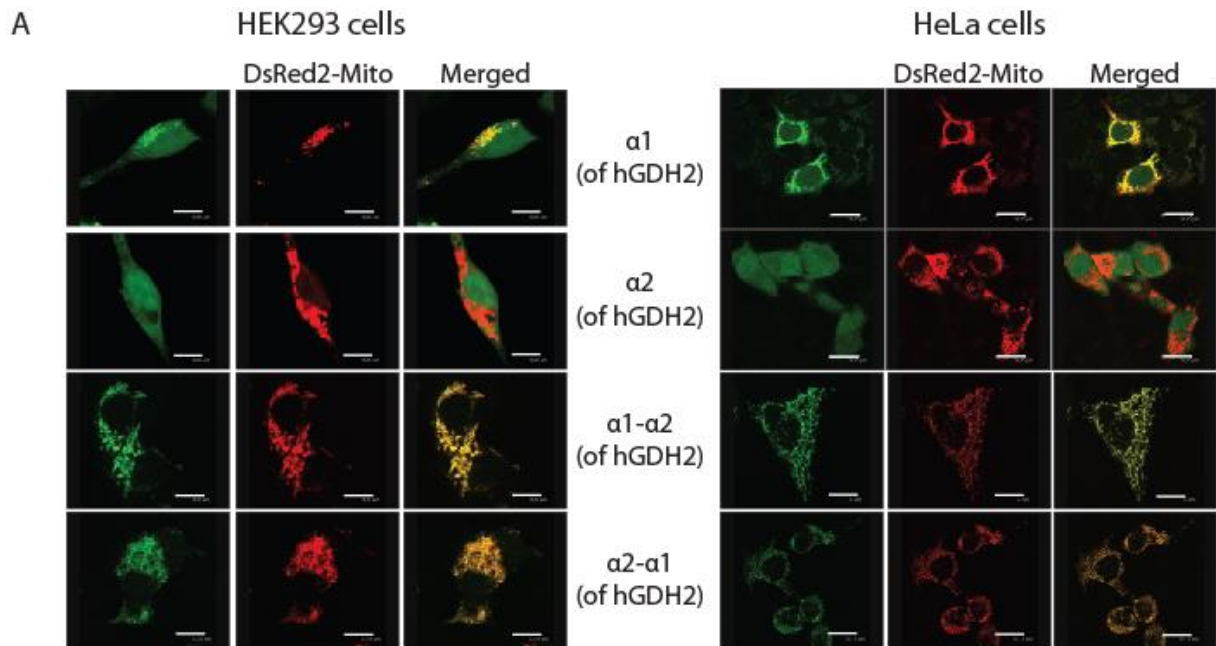
Μελετήθηκε αν οι προβλεπόμενες α-έλικες του πεπτιδίου N53 της hGDH2, δηλαδή οι έλικες α1 (αμινοξέα 1-10) και α2 (αμινοξέα 16-32) (**Εικόνα 4.14.A**), είναι ικανές από μόνες τους να οδηγήσουν μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά κλωνοποιήσεων των πεπτιδίων (α1, α2, α1α2, α2α1 της hGDH2) συζευγμένα με το DHFR (πλασμίδια pSP65:DHFR) και το EGFP (πλασμίδια pEGFP-N3:EGFP) όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”, ώστε να πραγματοποιηθούν *in organello* και *in vivo* πειράματα, αντίστοιχα.

Έγιναν πειράματα εισόδου των υβριδικών πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (**Εικόνα 4.14.B & 4.14.C**). Τα πειράματα εισόδου των α1 και α2 πεπτιδίων της hGDH2 συζευγμένα στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης DHFR (α1-DHFR & α2-DHFR) σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, έδειξαν ότι η α1 είναι ικανή από μόνη της να οδηγήσει το DHFR στα μιτοχόνδρια, αλλά λιγότερο σε σχέση με ολόκληρο το οδηγό πεπτίδιο N53 της hGDH2 (**Εικόνα 4.14.B**). Επίσης έδειξαν ότι το α2 δεν είναι ικανό από μόνο του να οδηγήσει το DHFR στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.14.B**).



Εικόνα 4.14 Είσοδος του N53 της hGDH2 και των επιμέρους τμημάτων του σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. (A). Σχηματική απεικόνιση των δομικών χαρακτηριστικών του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs (N53). Το N53 των hGDHs προβλέπεται να έχει την τάση σχηματισμού 2 αμφιπαθών α -ελίκων, της $\alpha 1$ (αμινοξέα 1-10, μπλε χρώμα) και της $\alpha 2$ (αμινοξέα 16-32, κόκκινο χρώμα). Το ψαλίδι αντιπροσωπεύει τη θέση κοπής των hGDHs μέσα στα μιτοχόνδρια. (B). Είσοδος των ραδιενεργά σημασμένων N53-DHFR, $\alpha 1$ -DHFR, $\alpha 2$ -DHFR σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 5min και κατεργασία ή όχι με TX-100. (C). Είσοδος των ραδιενεργά σημασμένων $\alpha 1\alpha 2$ -DHFR, $\alpha 2\alpha 1$ -DHFR σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 5min και κατεργασία ή όχι με TX-100.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα συν-διαμόλυνσης σε κυτταρικές σειρές HEK293 και HeLa σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία από τους συνεργάτες μας στο Εργαστήριο Νευρολογίας (**Εικόνα 4.15.A**). Βρέθηκε ότι όταν ενωθεί η $\alpha 1$ στο N-τελικό άκρο του EGFP, το πεπτίδιο $\alpha 1$ -EGFP συνεντοπίζεται με τον μιτοχονδριακό μάρτυρα DsRed2-Mito (**Εικόνα 4.15.A**). Αντίθετα, το πεπτίδιο $\alpha 2$ -EGFP δεν καταφέρνει να διαμερισματοποιηθεί στα μιτοχόνδρια και το φθορίζον EGFP σήμα κατανέμεται διάχυτο στο κυτταρόπλασμα και στον κυτταρικό πυρήνα, δίνοντας σήμα που θυμίζει το EGFP μόνο του (**Εικόνα 4.15.A**). Επομένως το $\alpha 2$ δε φαίνεται να έχει αυτόνομη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης.



Εικόνα 4.15 Το $\alpha 1$ πεπτίδιο του N53 της hGDH2, αλλά όχι το $\alpha 2$, είναι ικανό από μόνο του να οδηγήσει το EGFP στα μιτοχόνδρια από τις κυτταρικές σειρές HEK293 και HeLa. (A). Συνδιαμόλυνση σε κύτταρα HEK293 (αριστερά) ή HeLa (δεξιά) των πλασμιδίων EGFP ($\alpha 1$ -EGFP, $\alpha 2$ -EGFP, $\alpha 1\alpha 2$ -EGFP, $\alpha 2\alpha 1$ -EGFP) με το πλασμίδιο dsRed2-Mito (μιτοχονδριακός μάρτυρας) σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία. Κλίμακα: Κύτταρα HEK293: 9.4 μ m, Κύτταρα HeLa: 12-19 μ m. (B). Ανάλυση κατά Western με a-EGFP και a-MnSOD των κυτταρικών εκχυλισμάτων μετά από υποκυτταρική κλασμάτωση κυττάρων HEK293 που υπερεκφράζουν σταθερά τα πεπτίδια EGFP, N53-EGFP, $\alpha 1$ -EGFP, $\alpha 2$ -EGFP (αριστερά) και τα πεπτίδια $\alpha 1\alpha 2$ -EGFP, $\alpha 2\alpha 1$ -EGFP (δεξιά). C: κυτταρόπλασμα, M: μιτοχόνδρια. (Δ. Κοτζαμάνη)

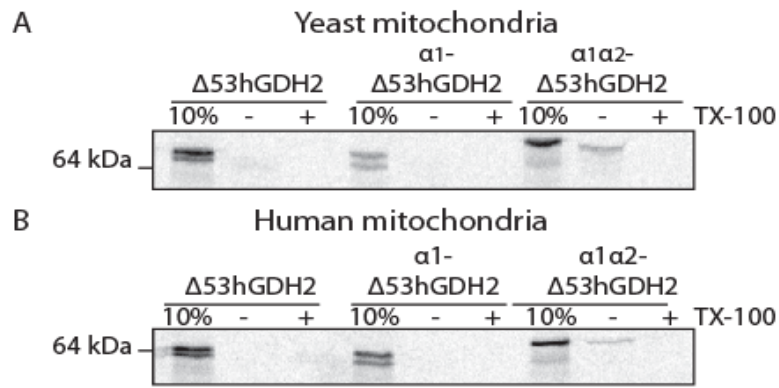
Δημιουργήθηκαν από τους συνεργάτες μας από το Εργαστήριο Νευρολογίας σταθερές κυτταρικές σειρές HEK293 οι οποίες υπερεκφράζουν τις υβριδικές πρωτεΐνες με το EGFP και πραγματοποιήθηκε απομόνωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων τους σε συνδυασμό με ενδοκυτταρική κλασμάτωση. Τα πειράματα επιβεβαίωσαν τα παραπάνω ευρήματα (**Εικόνα 4.15.B**).

Ελέγχθηκε ο ρόλος των μη ελικοειδών τμημάτων του N53 της hGDH2 (ενδιάμεση στροφή: αμινοξέα 11-15 και το N-τελικό τμήμα: αμινοξέα 33-53), που περιλαμβάνουν μεταξύ των άλλων και την πιθανή θέση αναγνώρισης από την MPP (αμινοξέα 50-51) και τη θέση κοπής (αμινοξέα 53-54) στην μιτοχονδριακή στόχευση. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα

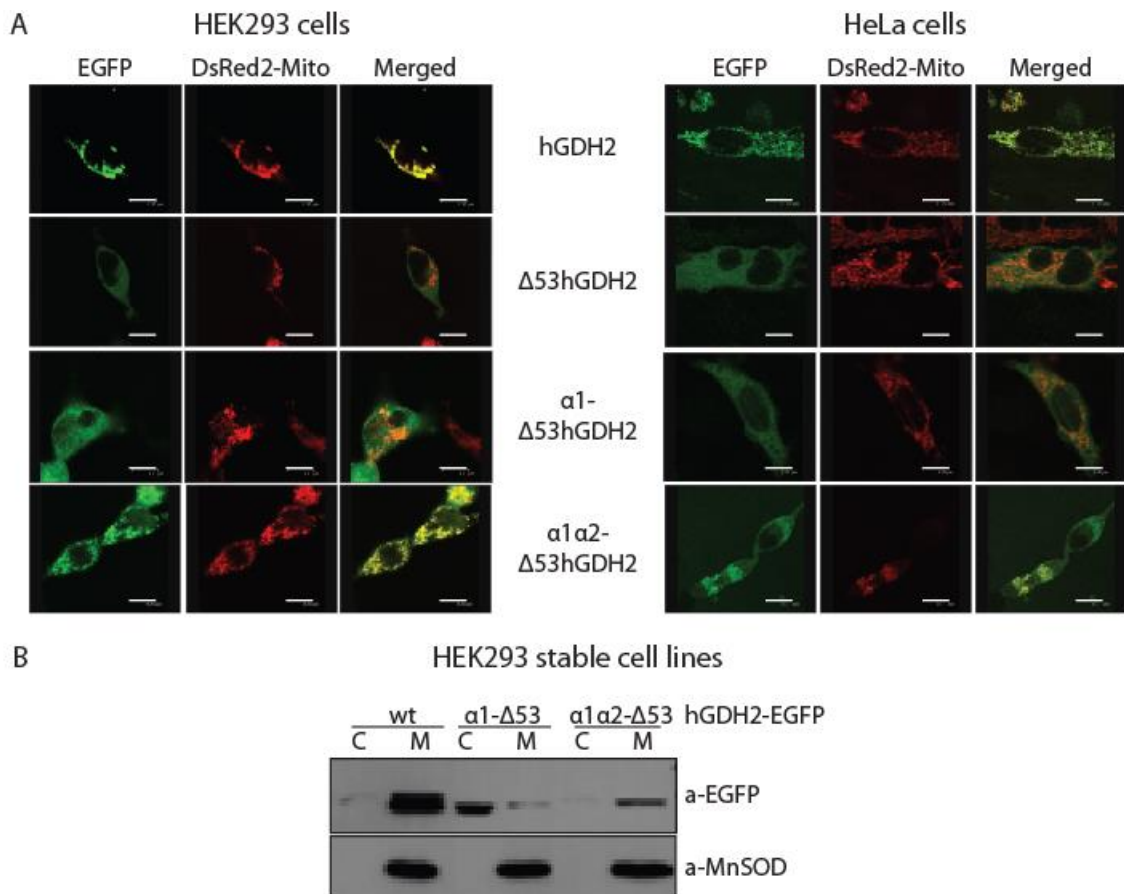
μιτοχονδριακής στόχευσης του πεπτιδίου α1α2 της hGDH2 (α1α2: υβριδικό πεπτίδιο που περιλαμβάνει τις ελικοειδείς δομές α1 και α2, χωρίς την ενδιάμεση μεταξύ τους στροφή). Πραγματοποιήθηκαν *in organello* πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, καθώς και πειράματα σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (**Εικόνες 4.14.C & 4.15**). Τα πειράματα έδειξαν ότι το υβριδικό πεπτίδιο α1α2 έχει παρόμοια ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης με ολόκληρο το N53 της hGDH2 (**Εικόνες 4.14.C & 4.15**).

Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης του πεπτιδίου α2α1 συζευγμένο με το DHFR ή το EGFP. Βρέθηκε ότι το πεπτίδιο α2α1 δίνει παρόμοια αποτελέσματα με το α1α2 (**Εικόνες 4.14.C & 4.15**). Επομένως, η σειρά με την οποία βρίσκονται οι α-έλικες φαίνεται να μην έχει κυρίαρχη σημασία ως προς την ικανότητα μιτοχονδριακής τους στόχευσης. Τα υβριδικά πεπτίδια α1α2 και α2α1 φαίνεται να μην κόβονται όταν μπουν στα μιτοχόνδρια (**Εικόνες 4.14B & 4.15.B**). Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς απουσιάζει από τα πεπτίδια α1α2 και α2α1 η πιθανή θέση αναγνώρισης από την MPP πρωτεάση (R50,R51) και η θέση κοπής (Y53, S54).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν η α1 της hGDH2 είναι ικανή από μόνη της να οδηγήσει την ώριμη hGDH2 στα μιτοχόνδρια. Πειράματα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από κύτταρα σακχαρομύκητα (**Εικόνα 4.16.A**) καθώς και HEK293 (**Εικόνα 4.16.B**), έδειξαν ότι το πεπτίδιο α1 από μόνο του είναι λίγο έως καθόλου ικανό να οδηγήσει την ώριμη hGDH2 πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια. Επίσης, πειράματα που πραγματοποίησαν οι συνεργάτες μας διαμόλυνσης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών (HEK293 και HeLa) σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία ή με υποκυτταρική κλασμάτωση επιβεβαίωσαν το εν λόγω εύρημα (**Εικόνα 4.17**).



Εικόνα 4.16 Χρειάζεται η ύπαρξη και των δύο ελίκων της hGDH2 για να στοχευθεί το ώριμο τμήμα της hGDH2 πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια. Είσοδος των ραδιενεργά σημασμένων πεπτιδίων $\Delta 53hGDH2$, $\alpha 1-\Delta 53hGDH2$ και $\alpha 1\alpha 2-\Delta 53hGDH2$ και κατεργασία ή όχι με TX-100 σε μιτοχόνδρια (A). σακχαρομύκητα. (B). κυττάρων HEK293. (Συνεργασία με Δ. Κοτζαμάνη)



Εικόνα 4.17 Υποκυτταρική διαμερισματοποίηση των υβριδικών πεπτιδίων $\Delta 53hGDH2$ -EGFP, $\alpha 1-\Delta 53hGDH2$ -EGFP και $\alpha 1\alpha 2-\Delta 53hGDH2$ -EGFP. (A). Συνεστιακή μικροσκοπία κυττάρων HEK293 (αριστερά) και κυττάρων HeLa (δεξιά) που έχουν διαμολυνθεί ταυτόχρονα με πλασμίδια EGFP και dsRed2-Mito. Κλίμακα: 9-15 μ m. (B). Ανάλυση κατά Western με a-EGFP και a-MnSOD των κυτταρικών εκχυλισμάτων μετά από υποκυτταρική κλασμάτωση κυττάρων HEK293 που υπερεκφράζουν σταθερά τα υπό μελέτη πεπτιδία. C: κυτταρόπλασμα, M: μιτοχόνδρια. (Δ. Κοτζαμάνη)

Το γεγονός ότι η α1 μπορεί να οδηγήσει στα μιτοχόνδρια το DHFR και το EGFP, αλλά όχι την ώριμη hGDH2, μπορεί να οφείλεται στο ότι οι πρωτεΐνες DHFR και EGFP έχουν μικρότερο μέγεθος (190 και 241 αμινοξέα αντίστοιχα) σε σχέση με την ώριμη hGDH2 (505 αμινοξέα). Επίσης, μπορεί να συσχετίζεται και με την αμινοξική σύσταση των πρώτων αμινοξέων στα πεπτίδια DHFR, EGFP, Δ53hGDH2.

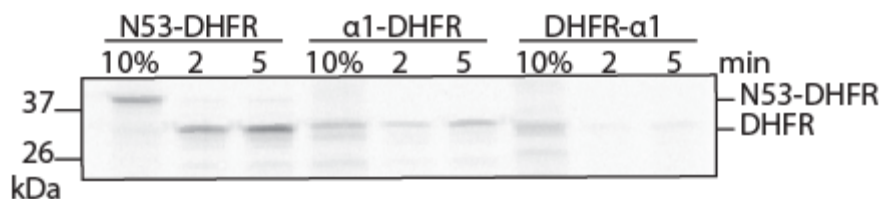
Παρατηρήθηκε ότι το πεπτίδιο α1α2 συζευγμένο στο N-τελικό άκρο του ώριμου τμήματος της hGDH2 (α1α2-Δ53hGDH2) είναι ικανό να μπει στα μιτοχόνδρια, αλλά δεν αποκόπτεται όταν μπει μέσα σε αυτά (**Εικόνες 4.16 & 4.17**).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι για την μιτοχονδριακή στόχευση της ανθρώπινης γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι απαραίτητη η ύπαρξη και των δύο α-ελίκων και ότι οι α-έλικες δρουν συνεργατικά. Παρόλα αυτά, η α1 έλικα φαίνεται να διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία. Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι τα πεπτίδια α1, α1α2 και α2α1 έχουν την ικανότητα να στοχεύσουν τις μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες DHFR και EGFP στα μιτοχόνδρια, παρόλο που φαίνεται να απουσιάζει από αυτά κάποια πιθανή θέση κοπής.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία το N-τελικό άκρο του MTS δεν φαίνεται να έχει πρωταγωνιστικό ρόλο για όλες τις πρωτεΐνες που στοχεύονται στην μιτοχονδριακή μήτρα. Για παράδειγμα το MTS της ανθρώπινης πρωτεΐνης OTC (ornithine transcarbamylase) δεν βασίζεται στο N-τελικό του άκρο, αλλά στο μεσαίο τμήμα (N8-22) του MTS (N32) (*Horwich et al, 1987*). Επίσης, η πρωτεΐνη ALDH (aldehyde dehydrogenase) του αρουραίου έχει ένα μικρό MTS (N19) το οποίο προβλέπεται να σχηματίζει δύο α-έλικες (4-10 & 14-19) οι οποίες χωρίζονται από ένα τριπεπτίδιο (*Thornton et al, 1993*). Έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία και των δύο α-ελίκων είναι απαραίτητη για τη στόχευση της ALDH στα μιτοχόνδρια (*Wang & Weiner, 1993*). Όμως, αν αφαιρεθεί το ενδιάμεσο τριπεπτίδιο, σχηματίζεται μία περισσότερο δομημένη α-έλικα η οποία έχει αυξημένη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης σε σχέση με το αρχικό N19 (*Thornton et al, 1993*).

6. Η $\alpha 1$ έλικα της hGDH2 όταν συζευχθεί στο καρβοξυτελικό άκρο του DHFR, αποτυγχάνει να το οδηγήσει στα μιτοχόνδρια

Παρατηρήθηκε ότι το $\alpha 1$ πεπτιδίο όταν είναι ενωμένο στο N-τελικό άκρο του DHFR ($\alpha 1$ -DHFR), μπορεί να το οδηγήσει το DHFR στα μιτοχόνδρια, ενώ όταν είναι ενωμένο στο C-τελικό άκρο του (DHFR- $\alpha 1$), έχει μικρή έως καθόλου ικανότητα να το οδηγήσει στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.18**). Επομένως, η θέση του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της hGDH2 φαίνεται να είναι πολύ σημαντική. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με το αποτέλεσμα των Folsch και συν., οι οποίοι παρατήρησαν ότι το πεπτιδίο Su9 (N45 της υπομονάδας 9 της F_1F_0 -ATPase του *N. crassa*) μπαίνει στα μιτοχόνδρια και κόβεται πιο γρήγορα από την πρωτεάση MPP, όταν είναι συζευγμένο στο N-τελικό του άκρο του DHFR (Su9-DHFR), παρά στο C-τελικό του άκρο (DHFR-Su9) (Folsch et al, 1998).

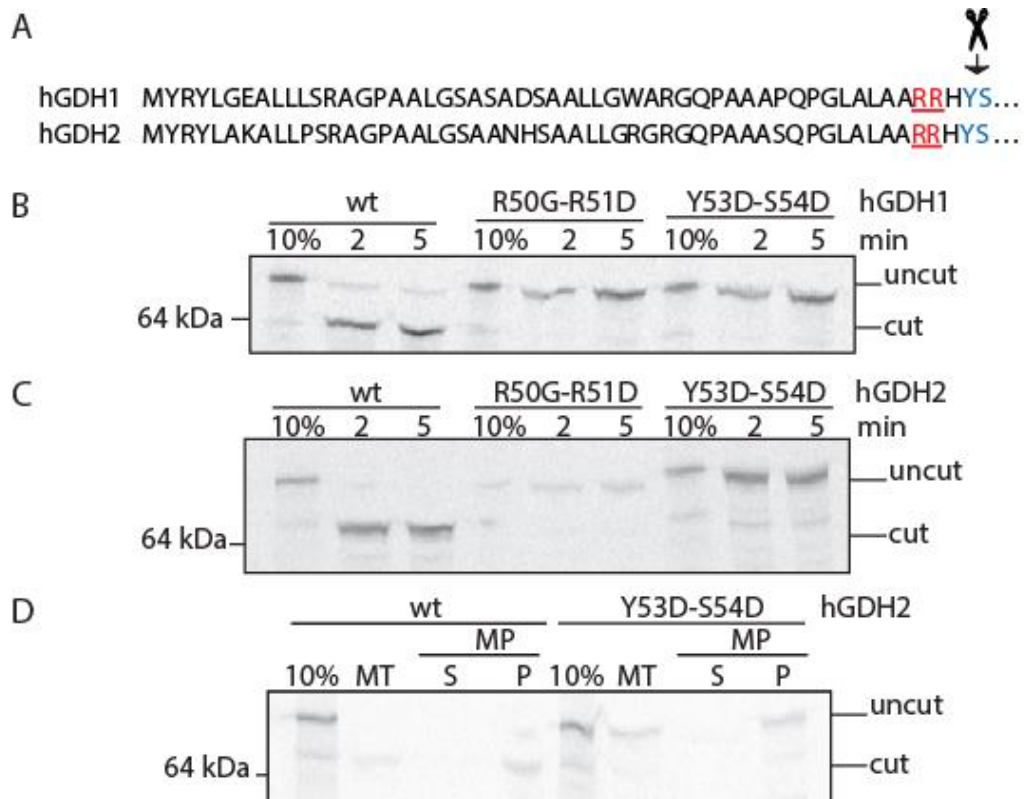


Εικόνα 4.18 Η $\alpha 1$ της hGDH2 μπορεί να στοχεύσει το DHFR στα μιτοχόνδρια όταν βρίσκεται συζευγμένο με το αμινοτελικό τμήμα του, αλλά όχι στο καρβοξυτελικό τμήμα του DHFR. Είσοδος των ραδιενεργά σημασμένων πεπτιδίων N53-DHFR, $\alpha 1$ -DHFR και $\alpha 2$ -DHFR για 2 ή 5 min στους 30°C σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, ανάλυση με την αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση Tricine SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

7. Η αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης δεν είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή στόχευση των hGDHs

Μελετήθηκε η σημασία της αποκοπής του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs στη σωστή διαμερισματοποίησή τους. Πειράματα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα έδειξαν ότι οι ραδιενεργά συντιθέμενες πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2, που είναι μεταλλαγμένες στην πιθανή θέση αναγνώρισης από την πρωτεάση MPP (R50G-R51D) ή στην θέση κοπής (Y53D-S54D) (**Εικόνα 4.19.A**), εξακολουθούν να έχουν την ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης παρόλο

που, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες χάνουν την ικανότητά τους να κόβονται, όταν μπουν στα μιτοχόνδρια (**Εικόνες 4.19.B & 4.19.C**).



Εικόνα 4.19 Η αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs δεν είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή τους στόχευση. (A). Σχηματική απεικόνιση των αμινοξέων του N53 της hGDH1 και της hGDH2. Η θέση αναγνώρισης από την MPP (R50-R51) και η θέση κοπής (Y53-S54) επισημαίνονται με κόκκινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. Το ψαλίδι δείχνει τη θέση κοπής των hGDHs. (B). Είσοδος της αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένων μορφών (R50G-R51DD, Y53D-S54D) της hGDH1 σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 2 και 5min και αυτοραδιογραφία. (C). Είσοδος της wt και μεταλλαγμένων μορφών (R50G-R51DD, Y53D-S54D) της hGDH2 όπως στην εικόνα 4.19.B. (D). Είσοδος της hGDH2 (wt, Y53D-S54D) για 5min σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα δημιουργία μιτοπλαστών, φυγοκέντρηση και αυτοραδιογραφία. MT: μιτοχόνδρια, MP: δημιουργία μιτοπλαστών, P: ίζημα, S: υπερκείμενο. (cut: ώριμη μορφή, uncut: ανώριμη μορφή)

Πειράματα εισόδου της hGDH2-Y53D-S54D σε μιτοχόνδρια σε συνδυασμό με δημιουργία μιτοπλαστών έδειξαν ότι η πρωτεΐνη hGDH2-Y53D-S54D διαμερισματοποιείται στο ίζημα του μιτοπλάστη όπως και η αγρίου τύπου hGDH2 (**Εικόνα 4.19.D**).

Τα πειράματα αυτά δείχνουν ότι η αποκοπή του N53 των hGDHs δεν είναι απαραίτητη για την μιτοχονδριακή στόχευση των hGDHs. Αυτό το εύρημα δεν ήταν αναμενόμενο, καθώς η αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης για τις πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μήτρας που έχουν σινιάλο

στόχευσης, θεωρείται αναγκαία για τη σωστή κυτταρική τους διαμερισματοποίηση, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της πρωτεΐνης glutaredoxin 2 στον σακχαρομύκητα (*Porras et al, 2010*). Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστό αν η πρωτεολυτική διάσπαση του N53 είναι απαραίτητη για την κατάλληλη διαμόρφωση και ενεργότητα του ενζύμου. Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί ότι η GDH του φυτού *A. thaliana* έχει ένα μη αποκοπτόμενο MTS στο N-τελικό της άκρο και διαμερισματοποιείται στα μιτοχόνδρια (*Huang et al, 2009*). Η σημασία της αποκοπής ή όχι των MTS δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Μάλιστα έχουν αναφερθεί ορισμένες πρωτεΐνες των θηλαστικών οι οποίες έχουν μη αποκοπτόμενο MTS, όπως η σαπερόνη-1 (chaperonin-1) του αρουραίου και η αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού (aspartate aminotransferase) στο χοίρο (*Ryan et al, 1994; Nishi et al, 1989*).

8. Πρωτεάσες της μιτοχονδριακής μήτρας που είναι υπεύθυνες για την αποκοπή του N53 των hGDHs

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί πολλές πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μήτρας του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* και του φυτού *A. thaliana* στις οποίες το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης κόβεται από την πρωτεάση MPP και σε δεύτερο βήμα κόβεται συμπληρωματικά από την πρωτεάση Icp55 ή την Oct1. Οι πρωτεΐνες που κόβονται από τις πρωτεάσες MPP και Icp55 στο σακχαρομύκητα έχουν συνήθως τα μοτίβα -2R ή -3R και -2R, -1Y/L/P, +1S/A/T, +3L, αντίστοιχα (*Vögtle et al, 2009; Teixeira & Glaser, 2013*). Σημειώνεται ότι αν και έχουν μελετηθεί αρκετές ομόλογες πρωτεΐνες της Icp55 του σακχαρομύκητα, προς το παρόν δεν είναι ξεκάθαρο στη βιβλιογραφία εάν η ομόλογη/ορθόλογη της Icp55 στον άνθρωπο αναγνωρίζει τα ίδια αμινοξικά μοτίβα με αυτή του σακχαρομύκητα.

Παρατηρώντας τις αμινοξικές αλληλουχίες των hGDHs σχετικά με τα παραπάνω μοτίβα, φαίνεται να είναι παρόντα τα μοτίβα -3R, -2R, -1Y, +1S στις hGDHs, και το μοτίβο +3L μόνο στην hGDH2. Αντίθετα, η πεπτιδάση Oct1 αναγνωρίζει κυρίως τη θέση -10R, η οποία απουσιάζει από τις hGDHs. Επομένως, υποθέτουμε ότι το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs μπορεί να αποκόπτεται από τις πεπτιδάσες MPP και Icp55 (**Εικόνα 4.20**).

hGDH1

MYRYLGEALLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPGLALAAARRHYSEAV..

MPP|Icp55



hGDH2

MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAANHSAALLGRGRGQPAAASQPGLALAAARRHYSELV ...

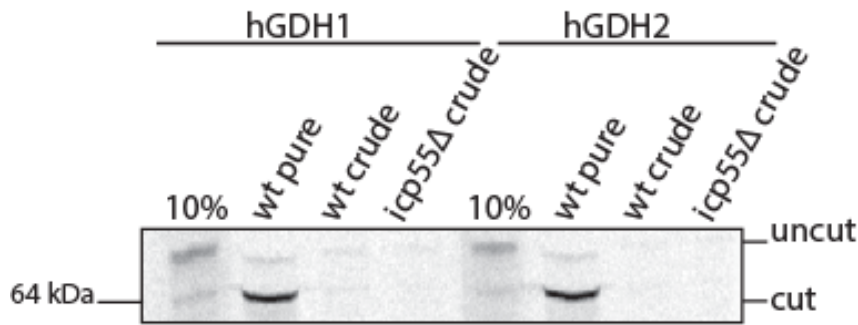
MPP|Icp55



Εικόνα 4.20 Διαγραμματική απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας του οδηγού πεπτιδίου των hGDHs και οι προτεινόμενες θέσεις κοπής τους από τις πρωτεάσες MPP και Icp55 σύμφωνα με τα συνήθη μοτίβα που αυτές αναγνωρίζουν (MPP: μωβ χρώμα, Icp55: πράσινο και μπλε χρώμα). Το ψαλίδι δείχνει τη θέση από την οποία ξεκινάει το ώριμο τμήμα των hGDHs.

Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν πραγματοποιήσει πειράματα εισόδου των ραδιενεργά σεσημασμένων πρωτεϊνών Mge1 και Nfs1 (γνωστά υποστρώματα της Icp55) σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από wt και icp55Δ (απουσιάζει η icp55 πρωτεάση) στελέχη σακχαρομύκητα και βρήκαν ότι οι πρωτεΐνες Mge1 και Nfs1 μπορούν να μπουν στα icp55Δ μιτοχόνδρια και το ώριμο τμήμα τους εμφανίζει μία μικρή διαφορά στην κινητικότητά του σε σχέση με αυτές στα wt μιτοχόνδρια (Vögtle *et al*, 2009). Δεδομένου της παρατήρησης ότι οι hGDHs μπορούν να μπουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια ακόμα και αν χάσουν την ικανότητα αποκοπής τους μέσα σε αυτά και της πιθανής αποκοπής τους από την Icp55 πρωτεάση (αν υπάρχει ομόλογη/ορθολογή της στον άνθρωπο), μελετήθηκε η ικανότητά των αγρίου τύπου hGDHs να εισέλθουν σε μιτοχόνδρια από wt και icp55Δ στελέχη σακχαρομύκητα.

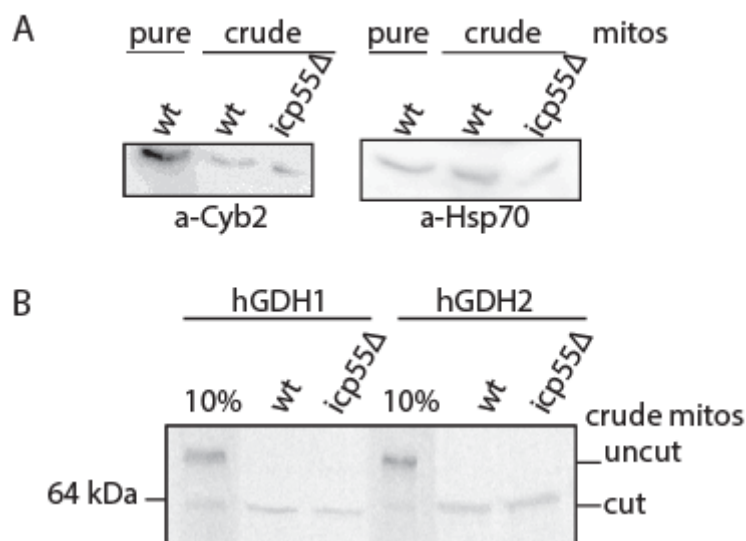
Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση μιτοχονδρίων μέτριας καθαρότητας από αγρίου τύπου και icp55Δ στελέχη σακχαρομύκητα (βλέπε «Υλικά & Μέθοδοι»). Βρέθηκε ότι οι hGDHs μπορούν να εισέλθουν στα wt μιτοχόνδρια που έχουν παραχθεί από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια σακχαρομύκητα σε θρεπτικό μέσο YPLactate, αλλά όχι στα wt και icp55Δ μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο YPD (**Εικόνα 4.21**).



Εικόνα 4.21 Οι hGDHs δεν μπορούν να εισέλθουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια που έχουν παραχθεί σε θρεπτικό μέσο YPD. Είσοδος των *in vitro* ραδιενεργά συντιθέμενων πρωτεϊνών hGDH1 και hGDH2 σε απομονωμένα αγρίου τύπου (wt) και *icp55Δ* μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. pure: υψηλής καθαρότητας μιτοχόνδρια από σακχαρομύκητα που έχει καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο YPLactate, crude: μέτριας καθαρότητας μιτοχόνδρια από σακχαρομύκητα που έχει καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο YPD. (cut: ώριμη μορφή, uncut: ανώριμη μορφή)

Στη συνέχεια, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια μέτριας καθαρότητας από αγρίου τύπου και *icp55Δ* στελέχη σακχαρομύκητα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο YPLactate. Τα μιτοχόνδρια αξιολογήθηκαν με ανάλυση κατά Western σε σχέση με τα υψηλής καθαρότητας αγρίου τύπου μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.22.A**) και βρέθηκε ότι και οι δύο hGDHs μπορούν να μπουν και να κοπούν στα *icp55Δ* μιτοχόνδρια με παρόμοιο ρυθμό, όπως στα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.22.B**).

Τα πειράματα αυτά δεν δίνουν σαφείς ενδείξεις για ύπαρξη αλληλεπίδρασης των hGDHs με την Icp55, αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται στην ακρίβεια της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, οι hGDHs μπορεί να μπαίνουν μιτοχόνδρια και να κόβονται από την MPP στη θέση ανάμεσα στην ιστιδίνη και τη τυροσίνη (θέση -1, **Εικόνα 4.20**) και επομένως οι ώριμες GDHs να έχουν ένα μόνο αμινοξύ παραπάνω σε σχέση με αυτές που μπαίνουν στα wt μιτοχόνδρια. Η διαφορά αυτή πιθανώς θα μπορούσε να ανιχνευτεί καλύτερα με άλλες μεθόδους, όπως η είσοδος καθαρών μη ραδιενεργών απομονωμένων πρωτεϊνών σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.



Εικόνα 4.22 Μελέτη της πιθανής συσχέτισης εισόδου των hGDHs με την πρωτεάση της μιτοχονδριακής μήτρας Icp55Δ. (A). Ανάλυση κατά Western των αγρίου τύπου και tim23-2 μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα με a-Cyb2 και a-Hsp70. (B). Είσοδος των *in vitro* ραδιενεργά συντιθέμενων πρωτεϊνών hGDH1 και hGDH2 σε απομονωμένα αγρίου τύπου και icp55Δ μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα, αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. (cut: ώριμη μορφή, uncut: ανώριμη μορφή)

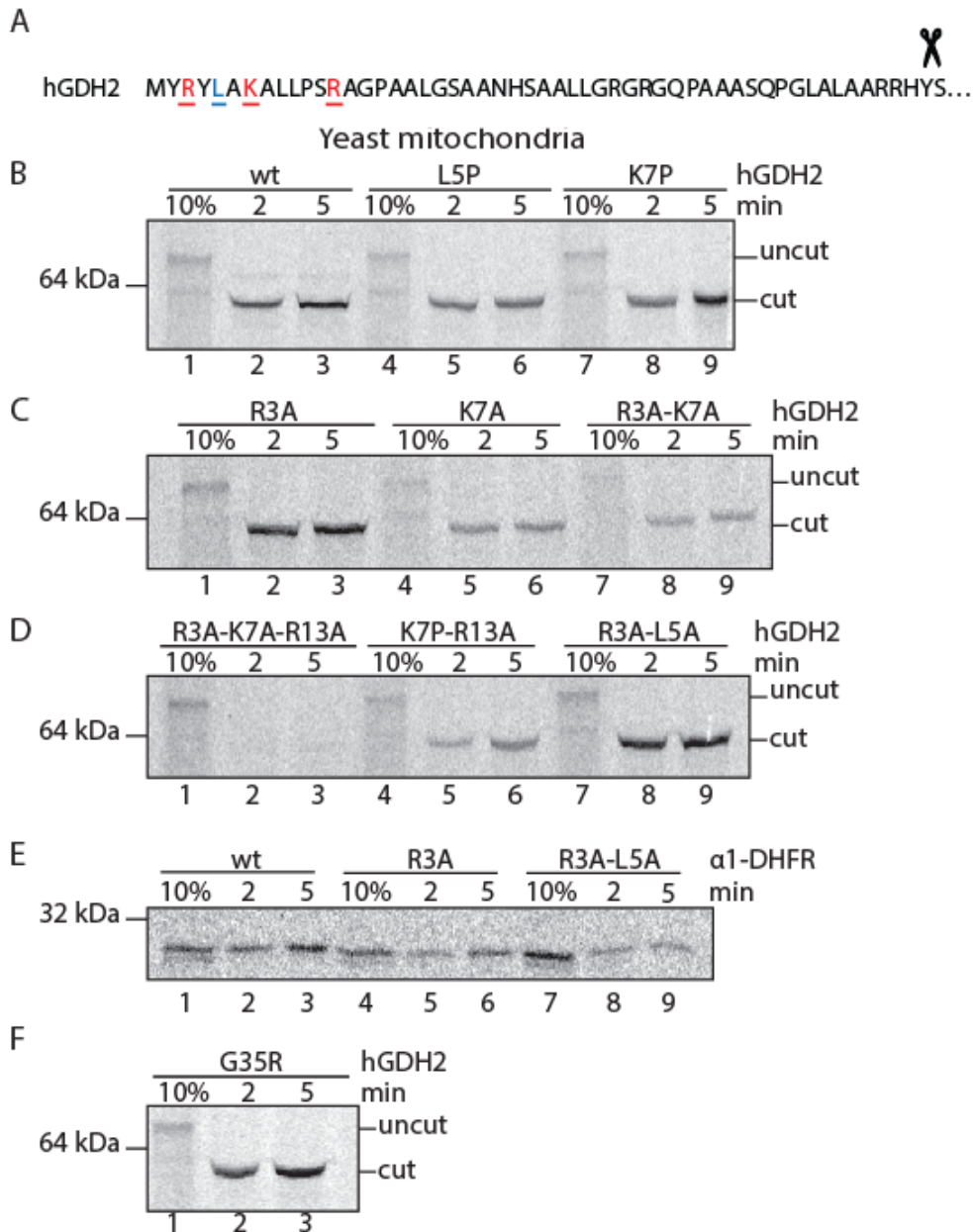
9. Το θετικό φορτίο παίζει πιο σημαντικό ρόλο σε σχέση με την αμφιπαθικότητα στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης της hGDH2

Επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε ποια αμινοξέα του N53 της hGDH2 παίζουν πιο σημαντικό ρόλο στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης. Πιο συγκεκριμένα, αναρωτηθήκαμε αν στη διαδικασία της στόχευσης πρωτεϊνών στην μιτοχονδριακή μήτρα έχει πιο σημαντικό ρόλο, η αμφιπαθικότητα, η ελικοειδής δομή ή το ηλεκτρικό φορτίο. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μία σειρά μεταλλάξεων σε πλασμίδια που εκφράζουν την hGDH2 κατάλληλα για το σύστημα *in vitro* αντιγραφής-μετάφρασης με σκοπό: 1) να διαταραχτεί η ελικοειδής διαμόρφωση της α1 έλικας, 2) να μειωθεί το θετικό φορτίο του αμινοτελικού τμήματος του πεπτιδίου N53 και 3) να αλλοιωθεί ο αμφιπαθής χαρακτήρας της α1 έλικας, δεδομένου ότι η αμφιπαθικότητα είναι σημαντική για την μιτοχονδριακή στόχευση (Pfanner & Geissler, 2001). Στην **Εικόνα 4.23.A** παρουσιάζεται η αμινοξική αλληλουχία της hGDH2 και επισημαίνονται οι αμινοξικές θέσεις στις οποίες έχουν γίνει μεταλλαγές (**Εικόνα 4.23.A**). Σημειώνεται ότι όλα τα πειράματα αυτού του κεφαλαίου επαναλήφθηκαν

τουλάχιστον τρεις φορές και το δε σήμα της αυτοραδιογραφίας ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα Image Quant.

Η διατάραξη της ελικοειδούς διαμόρφωσης της hGDH2 πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή προλίνης, καθώς είναι γνωστό ότι όταν η προλίνη βρίσκεται στην μέση μιας διαμόρφωσης (ελικοειδής ή β-πτυχωτής δομής), έχει την τάση να τη διαταράσσει. Πραγματοποιήθηκαν κλωνοποιήσεις έτσι, ώστε να διαταραχθεί η α1 έλικα με την αντικατάσταση αμινοξέων σε προλίνη που βρίσκονται στη μέση της έλικας, δεδομένου ότι προηγούμενα ευρήματα έδειξαν ότι η α1 έλικα έχει ισχυρότερο ρόλο σε σχέση με την α2 στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης της hGDH2. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάχθηκε η λευκίνη στη θέση 5 ή η λυσίνη στη θέση 7 σε προλίνη (hGDH2-L5P & hGDH2-K7P, αντίστοιχα). Τα πειράματα εισόδου της hGDH2 αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες hGDH2-L5P και hGDH2-K7P μπαίνουν στα μιτοχόνδρια με παρόμοιο ρυθμό σε σχέση με την wt hGDH2 στους 30°C (**Εικόνα 4.23.B**).

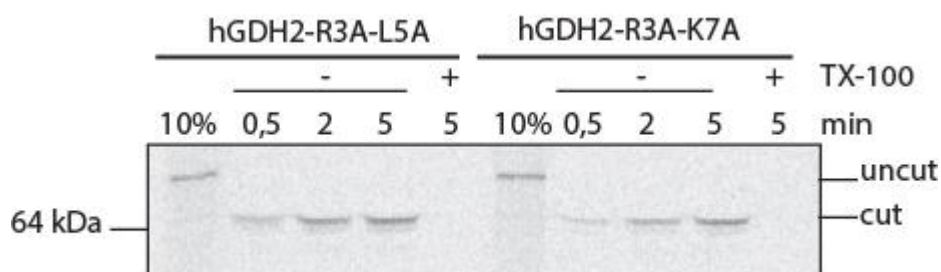
Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές μεταλλάξεις με στόχο να μειωθεί το θετικό φορτίο του αμινοτελικού τμήματος του N53 της hGDH2. Έτσι, αντικαταστάθηκε η αργινίνη στη θέση 3 σε αλανίνη (hGDH2-R3A) και η λυσίνη στη θέση 7 σε αλανίνη (hGDH2-K7A). Βρέθηκε ότι και τα δύο μονά μεταλλάγματα είναι ικανά να μπουν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.23.C γραμμές 1-7**). Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα διπλά μεταλλάγματα hGDH-R3A-K7A και hGDH2-K7P-R13A. Και στις δύο περιπτώσεις, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες μπαίνουν με παρόμοιο ρυθμό σε σχέση με την αγρίου τύπου hGDH2 στους 30°C (**Εικόνα 4.23.C γραμμές 7-9 & 4.23.D γραμμές 4-6**). Αντιθέτως, η hGDH2 με την τριπλή μεταλλαγή R3A-K7A-R13A (hGDH-R3A-K7A-R13A) δεν κατάφερε να μπει στα μιτοχόνδρια στους 30°C (**Εικόνα 4.23.D γραμμές 1-3**), δείχνοντας ότι το συνολικό θετικό φορτίο του αμινοτελικού τμήματος του N53 της hGDH2 είναι κρίσιμο για την ικανότητα μιτοχονδριακής του στόχευσης. Επιπλέον, η διατάραξη της αμφιπαθικότητας της α1 έλικας της hGDH2 από την αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση 3 και της λευκίνης στη θέση 5 σε αλανίνη (hGDH2-R3A-L5A), δεν επηρέασε την ικανότητα της hGDH2 να στοχεύεται στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα (**Εικόνα 4.23.D. γραμμές 7-9**).



Εικόνα 4.23 Πειράματα κινητικής της εισόδου αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένων μορφών της hGDH2 για 2 ή 5min στους 30°C. (A). Διαγραμματική απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας του N53 της hGDH2. Τα αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν επισημαίνονται με κόκκινο και μπλε χρώμα (θετικά φορτισμένα και ουδέτερα, αντίστοιχα). Το ψαλίδι δείχνει τη θέση κοπής της hGDH2. (B-D). Πειράματα εισόδου της αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένων μορφών της hGDH2 (L5P, K7P, R3A, K7A, R3A-K7A, R3A-K7A-R13A, K7P, R13A, R3A-L5A) για 2 ή 5min σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. Όλες οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες μπορούν να μπουν και να κοπούν στα μιτοχόνδρια εκτός από την hGDH2 με την τριπλή μεταλλαγή R3A-K7A-R13A (D, γραμμές 2,3). (cut: ώριμη μορφή, uncut: ανώριμη μορφή).

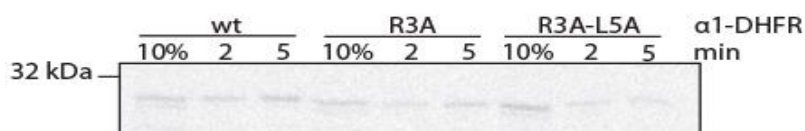
Για μεγαλύτερη ακρίβεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης κινητικής της εισόδου σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα στους 16°C (θερμοκρασία στην οποία οι πρωτεΐνες μπαίνουν πιο δύσκολα στα

μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα) με ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Βρέθηκε ότι οι μεταλλαγμένες hGDH2 (R3A, K7A, R3A-K7A, R3A-K7A) μπαίνουν με παρόμοιο ρυθμό στα μιτοχόνδρια σε σχέση με την wt hGDH2, ακόμα και στους 16°C (**Εικόνες 4.24 & 4.1**).



Εικόνα 4.24 Πειράματα κινητικής των μεταλλαγμένων μορφών της hGDH2 (R3A-L5A και R3A-K7A) για 0,5, 2 και 5min στους 16°C (cut: ώριμη μορφή, uncut: ανώριμη μορφή).

Πειράματα σχετικά με το πεπτιδίο $\alpha 1$ συζευγμένο με το DHFR ($\alpha 1$ -DHFR), έδειξαν ότι τα μεταλλάγματα $\alpha 1$ -R3A-DHFR και $\alpha 1$ -R3A-L5A-DHFR εξακολουθούν να μπορούν να εισέλθουν σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα αν και με μειωμένη αποδοτικότητα σε σχέση με το πεπτιδίο $\alpha 1$ -DHFR (**Εικόνα 4.25**).



Εικόνα 4.25 Πειράματα κινητικής της εισόδου αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένων μορφών του υβριδικού πεπτιδίου $\alpha 1$ -DHFR για 2 ή 5min στους 30°C σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.

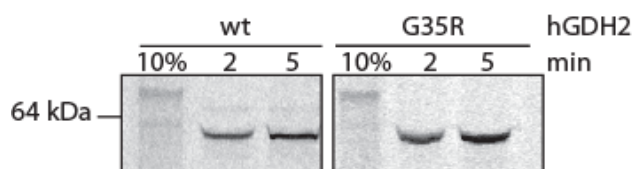
Συμπερασματικά, τα πειράματα που έγιναν, δείχνουν ότι το σημαντικότερο ρόλο στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης της hGDH2 έχει το συνολικό θετικό φορτίο του MTS και όχι η αμφιπαθικότητα ή η ελικοειδής δομή του. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και για άλλες πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μήτρας των θηλαστικών όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης OTC και της ALDH (*Horwich et al, 1987; Sztul et al, 1987; Nishi et al, 1989; Hammen 1996*). Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι στην περίπτωση της πρωτεΐνης της β -υπομονάδας της F1-ATP συνθετάσης στα

φυτά, τα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα έχουν τον πιο σημαντικό ρόλο στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης.

10. Ανάλυση της ικανότητας μιτοχονδριακής στόχευσης του κοινού πολυμορφισμού G35R της hGDH2

Αν και μέχρι σήμερα δεν έχει παρατηρηθεί συσχετισμός των γνωστών μεταλλαγών στο N53 των hGDHs με ασθένειες, έχει βρεθεί η ύπαρξη ενός αρκετά συχνού πολυμορφισμού στο γονίδιο *GLUD2* (c.G103A), ο οποίος οδηγεί σε αντικατάσταση p.G35R, με άγνωστη μέχρι τώρα βιολογική και κλινική σημασία (*Plaitakis et al, 2010*). Η ύπαρξη του εν λόγω πολυμορφισμού έχει παρατηρηθεί και σε προκαταρκτικές μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη από τους συνεργάτες μας στο Εργαστήριο Νευρολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης σχετικά με την αλληλούχιση των συνολικών εξωνίων 56 ασθενών με νευρολογικά νοσήματα αγνώστου αιτιολογίας. Αυτός ο πολυμορφισμός θεωρείται αρκετά συχνός και έχει βρεθεί σε ορισμένους ασθενείς με τη νόσο του Πάρκινσον (16,7%) καθώς και σε ορισμένα υγιή άτομα (18,3%), ενώ οι μέχρι τώρα μελέτες δε δίνουν ενδείξεις ότι επηρεάζει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου του Πάρκινσον (*Plaitakis et al, 2010*).

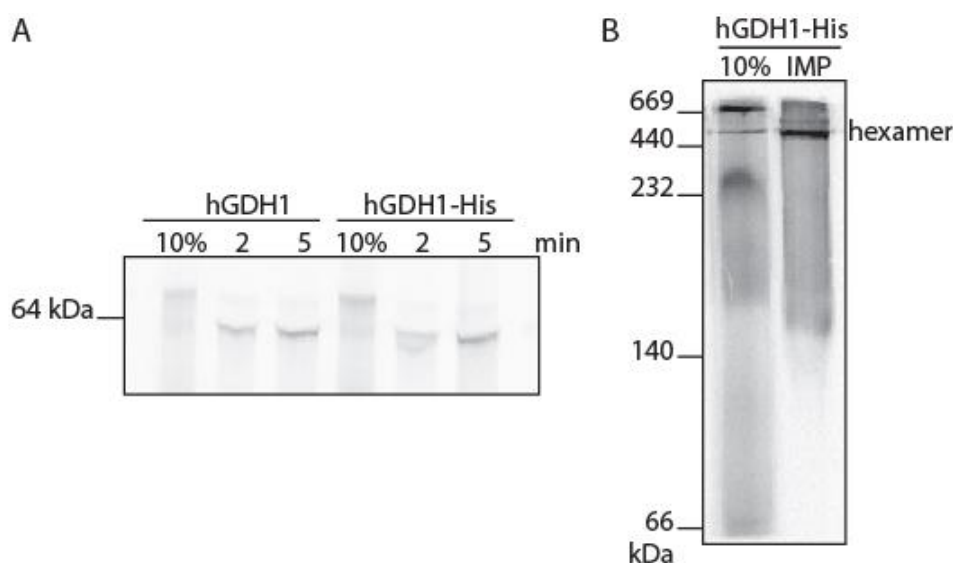
Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η εν λόγω μεταλλαγή σε πλασμίδια κατάλληλα για το *in vitro* σύστημα μεταγραφής/μετάφρασης. Πειράματα εισόδου της ραδιενεργά συντιθέμενης hGDH2-G35R έδειξαν ότι η πρωτεΐνη που φέρει αυτό τον πολυμορφισμό μπορεί να μπει σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα με παρόμοιο ρυθμό με αυτό της wt hGDH2 (**Εικόνα 4.26**). Επομένως, υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις ότι οι άνθρωποι που φέρουν τον εν λόγω πολυμορφισμό, δεν εμφανίζουν πρόβλημα στην μιτοχονδριακή εντόπιση της hGDH2.



Εικόνα 4.26 Η hGDH2-G35R μπορεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια με παρόμοιο ρυθμό σε σχέση με την wt hGDH2. Είσοδος των hGDH2 (wt και G35R) για 2 ή 5min στους 30°C σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

11. Η hGDH1 όταν συζευχθεί στο καρβοξυτελικό της άκρο με τον επίτοπο His, εξακολουθεί να μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και να σχηματίζει εξαμερή

Για την μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιούνται συχνά πρωτεΐνες συζευγμένες με επιτόπους, υπό την προϋπόθεση ότι η χρήση τους δεν επηρεάζει τη λειτουργία τους και την κυτταρική τους διαμερισματοποίηση. Για να διερευνηθεί αν η χρήση του επιτόπου His (πεπτιδίο που αποτελείται από 6 ιστιδίνες, 6xHis) επηρεάζει την ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs, πραγματοποιήθηκε μια πλασμιδιακή κατασκευή σε πλασμίδιο κατάλληλο για το *in vitro* σύστημα μεταγραφής-μετάφρασης έτσι, ώστε να μπορεί να εκφράζεται η hGDH1 συζευγμένη στο C-τελικό της άκρο με τον επίτοπο His. Πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα έδειξαν ότι όταν η hGDH1 είναι συζευγμένη στο C-τελικό της άκρο με τον επίτοπο His, εξακολουθεί να έχει την ικανότητα να μπαίνει στα μιτοχόνδρια με παρόμοιο ρυθμό σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και μπορεί να σχηματίσει εξαμερή μέσα στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.27**).



Εικόνα 4.27 Η πρωτεΐνη hGDH1-His μπορεί να εισέλθει σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και να σχηματίσει εξαμερή. (A). Είσοδος της wt hGDH1 και της hGDH1-His για 2 ή 5min στους 30°C σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. (B). Είσοδος της hGDH1-His για 5min στους 30°C σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, μη αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

Προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί από τους συνεργάτες μας έδειξαν ότι όταν προστεθεί ο επίτοπος His ανάμεσα στο N53 και το ώριμο κομμάτι των hGDHs (N53-His-Δ53hGDH1 και N53-His-Δ53hGDH2), οι

πρωτεΐνες εξακολουθούν να έχουν την ικανότητα να διαμερισματοποιηθούν στα μιτοχόνδρια και να είναι ενζυμικά δραστικές (*Pajacka et al, 2013*). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη του επιτόπου FLAG στο N-τελικό άκρο (ανάμεσα στο N53 και στην ώριμο τμήμα) ή στο C-τελικό άκρο της GDH του ποντικού (mGDH), δεν επηρεάζει την ικανότητά της για μιτοχονδριακή στόχευση (*Pajacka et al, 2013*). Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη του επιτόπου FLAG στο C-άκρο, αλλά όχι στο N-τελικό, της GDH του ποντικού διαταράζει την αλλοστερική της ρύθμιση (*Pajacka et al, 2013*).

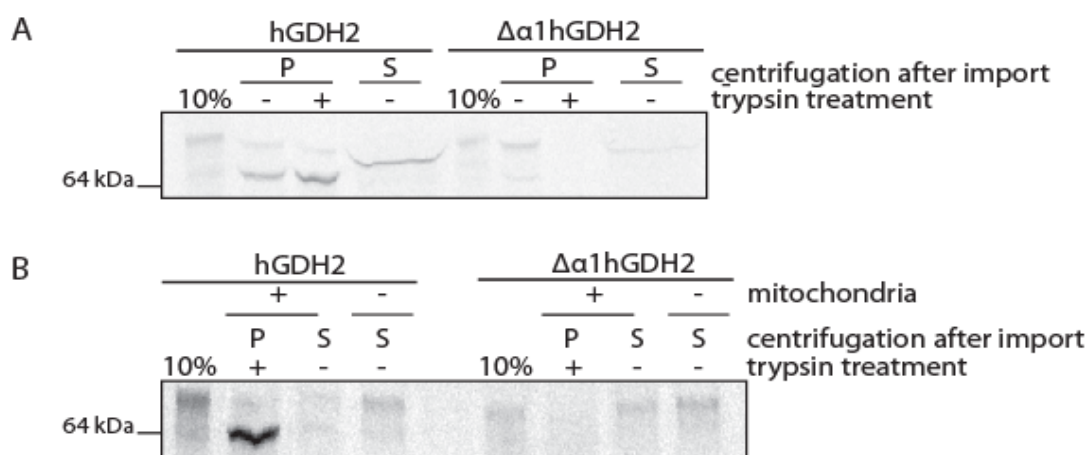
12. Μελέτη πιθανής εξόδου των hGDHs από τα μιτοχόνδρια μετά την είσοδό τους και την αποκοπή του σινιάλου μιτοχονδριακής τους στόχευσης σε αυτά

Η διπλή διαμερισματοποίηση είναι ένα σχετικά συχνό φαινόμενο το οποίο μπορεί να επιτευχθεί από διαφορετικά μοριακά μονοπάτια (*βλέπε «Εισαγωγή»*). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί αρκετές πρωτεΐνες με διπλή διαμερισματοποίηση, όπως η Aconitase (μιτοχόνδρια & κυτταρόπλασμα) και η Nfs1 (μιτοχόνδρια & κυτταρικός πυρήνας) (*Regev-Rudzki et al, 2005; Naamati et al, 2009*). Η πρωτεΐνη φουμαράση (fumarase) του σακχαρομύκητα έχει την ικανότητα παλίνδρομης κίνησης (retrograde movement) μετά την είσοδό της στα μιτοχόνδρια. Πιο συγκεκριμένα, οι εν λόγω πρωτεΐνες μπαίνουν και κόβονται στα μιτοχόνδρια, ενώ στη συνέχεια ορισμένη ποσότητα από αυτές βγαίνουν από τα μιτοχόνδρια και απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα (*Knox et al, 1998*). Επίσης, πολύ πρόσφατα μάλιστα αναφέρθηκε η ύπαρξη παλίνδρομης κίνησης για την αφυδρογονάση του πυρουβικού (pyruvate dehydrogenase) (*Sutendra et al, 2014*).

Η γλουταμική αφυδρογονάση έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον ως πρωτεΐνη μάρτυρας των μιτοχονδρίων. Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί ότι η γλουταμική αφυδρογονάση φαίνεται να έχει, επίσης, ρόλο πεπτιδάσης της ιστόνης 3 (H3ase) στον κυτταρικό πυρήνα κυττάτος ήπατος στα πτηνά και στα βοοειδή, παρόλο που δεν προβλέπεται η ύπαρξη πιθανούς αλληλουχίας NLS στις αλληλουχίες αυτές (*Purohit et al, 2013*). Σημειώνεται ότι η GDH του κοτόπουλου και του ανθρώπου έχουν ομολογία ~91%. Επιπλέον,

ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρόλο που πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών δεν έχουν δώσει ενδείξεις για την ύπαρξη ανθρώπινης GDH στον κυτταρικό πυρήνα (*Mastorodemos et al, 2009*), πολύ πρόσφατες μελέτες ανοσοϊστοχημείας έδειξαν σε ορισμένους ιστούς στον ανθρώπινο εγκέφαλο (ολιγοδενδροκύτταρα και πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα) οι hGDHs εκτός από τα μιτοχόνδρια εντοπίζονται και στον κυτταρικό πυρήνα (*Spanaki et al, 2015*).

Δεδομένου των ανωτέρων παρατηρήσεων για να μελετηθεί αν οι hGDHs έχουν κάποια πιθανή παλίνδρομη κίνηση μετά την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εισόδου των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών hGDH2 και Δα1hGDH2 και μελετήθηκε το διάλυμα των μιτοχονδρίων στο οποίο έγινε η δοκιμασία εισόδου (**Εικόνα 4.28**).



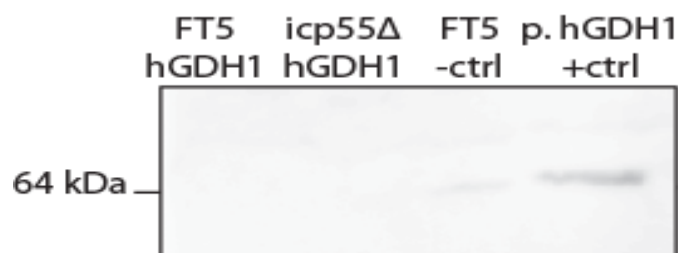
Εικόνα 4.28 Μελέτη πιθανής παλίνδρομης κίνησης των hGDHs. Είσοδος ραδιενεργά σημασμένης hGDH2 και Δα1hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα ή σε ιστονικό διάλυμα εισόδου χωρίς μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια διαχωρίστηκαν από το διάλυμα εισόδου και τις πρωτεΐνες που δεν μπήκαν σε αυτά με φυγοκέντρηση. Τα μιτοχόνδρια κατεργάστηκαν ή όχι με τρυψίνη (trypsin treatment). Στη συνέχεια, (A) οι πρωτεΐνες του υπερκείμενου κατακρημνίστηκαν με TCA ή (B) φορτώθηκε το 1/20 του υποκειμένου χωρίς να έχει υποστεί κατεργασία με TCA. Τα δείγματα αναλύθηκαν με αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. P: ίζημα, S: υπερκείμενο

Τα πειράματα αυτά δεν έδωσαν σαφείς ενδείξεις για την ύπαρξη παλίνδρομης κίνησης των hGDHs από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Η ύπαρξη ραδιενεργού σήματος στο υπερκείμενο (S) μετά την είσοδο της hGDH2 με μέγεθος ανάμεσα σε αυτό της κομμένης (ώριμη) και της άκοπης (ανώριμης) hGDH2 (**Εικόνα 4.28.A**), μπορεί να οφείλεται στο ότι το δείγμα έχει υποστεί κατεργασία με TCA. Εναλλακτικά, μπορεί να υπάρχει πράγματι

παλίνδρομη κίνηση εξόδου των hGDHs από τα μιτοχόνδρια, αλλά αυτή να γίνεται σε τόσο μικρό ποσοστό ώστε να μην είναι ανιχνεύσιμα με αυτή την μέθοδο. Τέλος, μπορεί να υπάρχει παλίνδρομη κίνηση των hGDHs η οποία να εμφανίζεται αποκλειστικά σε ορισμένους ιστούς ή υπό μη φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες όπως για παράδειγμα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Πραγματοποιήθηκε μία προσπάθεια *in vivo* έκφρασης της ανθρώπινης GDH σε κύτταρα σακχαρομύκητα, ώστε να μελετηθεί ο πιθανός εντοπισμός ή όχι, της hGDH στον κυτταρικό πυρήνα και στα μιτοχόνδρια με υποκυτταρική κλασμάτωση και με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-GDH. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν κλωνοποιήσεις σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, ώστε να εκφράζεται *in vivo* σε κύτταρα σακχαρομύκητα η αγρίου τύπου hGDH1 και η hGDH1 μεταλλαγμένη στη θέση κοπής υπό τον ενδογενή υποκινητή της πρωτεΐνης Mia40 του σακχαρομύκητα (pRS316up40-hGDH1, pRS316up40-hGDH1-R50G-R51D, pRS316up40-hGDH1-Y53D-S54D).

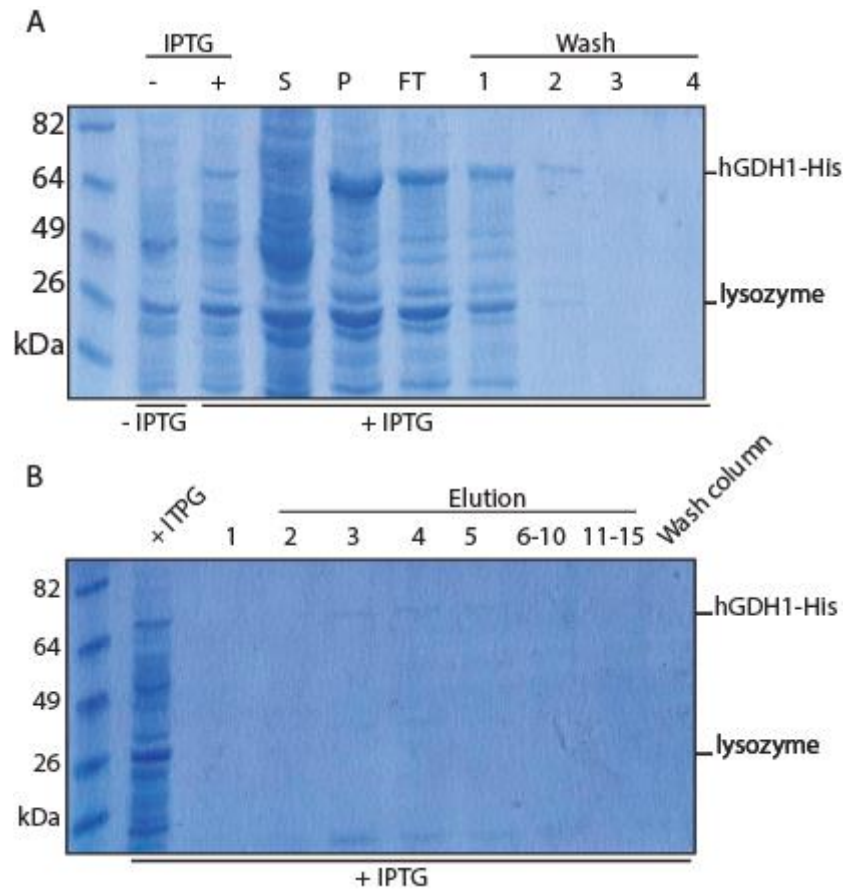
Η προσπάθεια μετασχηματισμού αγρίου τύπου (FT5) και icp55Δ κυττάρων σακχαρομύκητα σε συνδυασμό με ανοσοαποτύπωση κατά Western δεν έδειξε ενδείξεις ετερόλογης έκφρασης στα υπό μελέτη κύτταρα, παρόλο που το αντίσωμα α-GDH, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ελέγχου, έδωσε σήμα σε δείγμα καθαρής ώριμης hGDH1 πρωτεΐνης (**Εικόνα 4.29**). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολύ χαμηλή έκφραση της hGDH1 με αυτό το πλασμιδιακό σύστημα που να την καθιστά μην ανιχνεύσιμη από το πολυκλωνικό αντίσωμα α-GDH και προτείνεται να πραγματοποιηθεί η ετερόλογη έκφραση κάτω από τον έλεγχο διαφορετικού υποκινητή και διαφορετικά στελέχη σακχαρομύκητα. Εναλλακτικά, αυτό μπορεί να οφείλεται σε πιθανή θνησιγενή δράση της hGDH1 στο σακχαρομύκητα.



Εικόνα 4.29 Η hGDH1 δεν φαίνεται να μπορεί να εκφραστεί στα κύτταρα σακχαρομύκητα (FT5 και *icp55Δ*). Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-GDH πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα σακχαρομύκητα (FT5 και *icp55Δ*) τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pRS316ur40-GLUD1. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μη μετασχηματισμένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα FT5 και ως θετικός μάρτυρας καθαρή ώριμη πρωτεΐνη hGDH1 εκφρασμένη από κύτταρα εντόμου (ο καθαρισμός hGDH1 πραγματοποιήθηκε από την Χριστίνα Δημοβασιλή).

Μελετήσαμε την πιθανότητα παλίνδρομης κίνησης των hGDHs, έστω και σε πολύ μικρό ποσοστό (eclipsed distribution). Για το σκοπό αυτό προσπαθήσαμε να εκφράσουμε την hGDH1 και να την απομονώσουμε σε καθαρή μορφή έτσι, ώστε να γίνουν πειράματα εισόδου καθαρής, μη ραδιενεργής, hGDH1 πρωτεΐνης σε μιτοχόνδρια επαναδιαλυτοποιημένα σε ισοτονικό διάλυμα και στη συνέχεια ανάλυση των μιτοχονδρίων και του ισοτονικού διαλύματος με ανοσοαποτύπωση κατά Western και φασματομετρία μάζας. Πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες κλωνοποιήσεις έτσι, ώστε να μπορεί να εκφραστεί η hGDH1 (μαζί με το N53) συζευγμένη με τον επίτοπο His στο C-τελικό άκρο της hGDH1 (βλέπε «Υλικά & Μέθοδοι»). Παρατηρήθηκε ότι η hGDH1-His μπορεί να εκφραστεί σε κύτταρα *E. coli* (DE3), αλλά η εν λόγω πρωτεΐνη δεσμεύεται ελάχιστα έως καθόλου στα σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (**Εικόνα 4.30**). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η hGDH1-His μπορεί να έχει τέτοια διαμόρφωση που να δυσκολεύει την πρόσδεση του επιτόπου His στη στήλη νικελίου. Επομένως, προτείνεται να γίνει ο καθαρισμός της με άλλη μέθοδο.

Για την περαιτέρω μελέτη της πιθανότητας παλίνδρομης κίνησης των hGDHs ή όχι, προτείνεται να γίνουν μελέτες υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που να προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς που να υπερεκφράζουν σταθερά ή όχι τις hGDHs.



Εικόνα 4.30 Η πρωτεΐνη hGDH1-His εκφράζεται σε βακτήρια *E. coli* (DE3), αλλά αδυνατεί να προσδεθεί στη στήλη νικελίου. Αποδιατακτικού τύπου ηλεκτροφόρηση και χρώση του πηκτώματος με Coomassie Blue. (A). Πρωτεϊνικό δείγμα από κύτταρα DE3 μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο rET24α-hGDH1-His παρουσία ή απουσία του IPTG, τα πρωτεϊνικά κλάσματα του υπερκειμένου (S) και του ιζήματος (P) μετά το σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους και τα κλάσματα μετά τα ξεπλύματα της στήλης νικελίου. (B) Δείγμα του πρωτεϊνικού κλάσματος των βακτηρίων μετά την επαγωγή της έκφρασης της His-hGDH1 με IPTG και πρωτεϊνικά κλάσματα μετά την έκλουση της στήλης νικελίου.

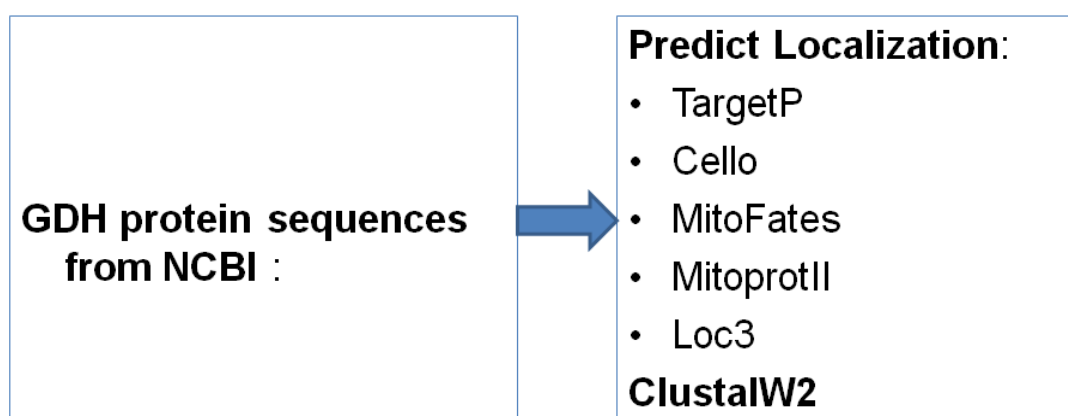
B. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΣΙΝΙΑΛΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ

Η γλουταμική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς, για τους οποίους έχει μελετηθεί και εξελίχθηκε από ένα μη ρυθμιζόμενο ένζυμο στα βακτήρια σε ένα υψηλά ρυθμιζόμενο μιτοχονδριακό ένζυμο στους ζωικούς οργανισμούς. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε το πώς δημιουργήθηκε και το πώς εξελίχθηκε το MTS της GDH μεταξύ των οργανισμών, χρησιμοποιώντας διαδικτυακές προβλέψεις παράλληλα με *in vivo* και *in organello* μελέτες.

1. Προβλέψεις με τη χρήση προγραμμάτων Βιοπληροφορικής

1.1 Η μιτοχονδριακή στόχευση της GDH πιθανώς συν-εξελίχθηκε με την αλλοστερική της ρύθμιση

Μελετήσαμε τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες της GDH από διάφορους οργανισμούς οι οποίες έχουν καταχωρηθεί στο NCBI (συνολικά 170 αλληλουχίες GDH). Χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα πρόβλεψης της κυτταρικής τους στόχευσης παράλληλα με προγράμματα πολλαπλής στοίχισης (multiple alignments) ανά κατηγορίες οργανισμών (**Εικόνα 4.31**) (βλέπε «Υλικά & Μέθοδοι»).



Εικόνα 4.31 Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της κυτταρικής διαμερισματοποίησης της γλουταμικής αφυδρογονάσης διαφορετικών οργανισμών.

Οι *in silico* μελέτες παρέχουν ενδείξεις εμφάνισης στόχευσης στα μιτοχόνδρια της γλουταμικής αφυδρογονάσης από το φύλο Ciliophora (βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα, **Πίνακας 4.3**). Σημειώνεται ότι τα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα θεωρείται ότι έχουν πιο εξειδικευμένα οργανίδια και είναι περισσότερο πολύπλοκα σε σχέση με τα άλλα πρωτόζωα. Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η αρχική εμφάνιση της περιοχής αλλοστερικής ρύθμισης της GDH (antenna domain, 401-448aa στις hGDHs) ξεκίνησε από τα Ciliophora (Allen et al, 2004). Επομένως, οι παρατηρήσεις μας συγκλίνουν στην υπόθεση ότι η μιτοχονδριακή διαμερισματοποίηση και η αλλοστερική ρύθμιση των hGDHs πιθανώς συν-εξελίχθηκαν από τα Ciliophora και μετά.

Πίνακας 4.3 Συνοπτική παρουσίαση των *in silico* προβλέψεων για την μιτοχονδριακή στόχευση της GDH από διαφορετικούς οργανισμούς, χρησιμοποιώντας τα λογισμικά προγράμματα MitoFates, TargetP και Mitoprot II. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι οργανισμοί που έχουν εξέχοντα ρόλο σχετικά με την εξέλιξη της μιτοχονδριακής στόχευσης στην GDH.

Organisms	No of proteins studied	MitoFates	MitoFates	TargetP	MitoprotII
		preseq	proteases	Mitos	Mitos
Bacteria	12	0	x	no	
Fungi	16	0	x	0	0
Plants	18	3	MPP	18	0
Protozoa w/o Ciliophora	6	1	MPP	2	2
Ciliophora	5	4	MPP	4	4
Nematodes	6	4	MPP+Icp55	5	5
Arthropoda	11	6	MPP+Icp55	3	8
Fish	7	7	MPP+Icp55	5	7
Amphibia	2	2	MPP+Icp55	0	2
Reptilia	8	2	MPP+Icp55 ?	1	3
Aves	28	7	MPP+Icp55 ?	4	5
Mammals	32	32	MPP+Icp55	25	32

Evolution
↓

1.2 Οι GDHs παρουσιάζουν διττή διαμερισματοποίηση μεταξύ των οργανισμών

Από τις *in silico* μελέτες δε διαφαίνεται να προϋπήρχε κάποιο τμήμα παρόμοιο των MTS στις GDH των βακτηρίων που μελετήθηκαν (Πίνακας 5). Επομένως, το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης πιθανώς να δημιουργήθηκε μετά την δημιουργία των ευκαρυωτικών οργανισμών, αλλά δεν μπορούμε να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα γιατί μελετήθηκε πολύ μικρός αριθμός από βακτηριακές GDHs (12 αλληλουχίες). Από τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν, δεν παρέχονται ενδείξεις για την ύπαρξη αποκοπτόμενου σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης των GDHs στα φυτά και στους μύκητες (Πίνακας 4.3). Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί διαμερισματοποίηση στα μιτοχόνδρια ορισμένων GDHs των μυκήτων (Lee et al, 2012), χωρίς όμως να έχει μελετηθεί εκτενώς μέχρι σήμερα το πώς μπαίνουν στα μιτοχόνδρια οι GDHs του σακχαρομύκητα. Σημειώνεται, ότι μερικά από τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν, όπως το πρόγραμμα MitoFates, αναζητούν την ύπαρξη μόνο των αποκοπτόμενων σινιάλων μιτοχονδριακής στόχευσης και ότι η GDH στο *A. thaliana* και στο ρύζι μπαίνει στα μιτοχόνδρια έχοντας μη αποκοπτόμενο σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης (Huang et al, 2009).

Παρόλο που οι περισσότερες GDHs στους ζωικούς οργανισμούς προβλέπεται να είναι μιτοχονδριακές με αρκετά ισχυρό σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης στο N-τελικό τους άκρο, οι GDHs στα πτηνά και στα αμφίβια προβλέπεται να έχουν αρκετά χαμηλότερη έως καθόλου ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης. Μάλιστα, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η ύπαρξη της GDH του κοτόπουλου, εκτός από τα μιτοχόνδρια και στον κυτταρικό πυρήνα, όπου φαίνεται να έχει δράση ειδικής πεπτιδάσης της ιστόνης H3 (Purohit et al, 2013), ενώ πρόσφατες μελέτες δεν έδωσαν ενδείξεις για πυρηνικό εντοπισμό της GDH στη δροσόφιλα (Tiwari et al, 2014). Όλα τα παραπάνω παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η γλουταμική αφυδρογονάση εμφανίζει διττή διαμερισματοποίηση μεταξύ των οργανισμών.

1.3 Οι GDHs από τους νηματώδεις μέχρι τον άνθρωπο έχουν θέση αναγνώρισης για την πρωτεάση Icp55

Προβλέπεται ότι οι GDHs των βλεφαριδοφόρων κόβονται μόνο από την πρωτεάση MPP. Αντίθετα, οι GDHs στους ζωικούς οργανισμούς από τους νηματώδεις και μετά, προβλέπεται να έχουν θέσεις αναγνώρισης για τις πρωτεάσες MPP και Icp55 (**Πίνακας 4.3**). Επομένως, εάν υπάρχει ομολογη της Icp55 πρωτεάσης στους οργανισμούς αυτούς, προτείνεται ότι οι εν λόγω GDHs κόβονται στην μιτοχονδριακή μήτρα από την πρωτεάση MPP και στη συνέχεια από την Icp55 έτσι, ώστε να πάρουν την ώριμη μορφή της στην μιτοχονδριακή μήτρα.

1.4 Η γλουταμική αφυδρογονάση δεν βρέθηκε να έχει κάποιο ευδιάκριτο σινιάλο πυρηνικής στόχευσης, αλλά έχει σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς

Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα προγράμματα πρόβλεψης ενδοκυτταρικής διαμερισματοποίησης (βλέπε «Υλικά & Μέθοδοι») για τη GDH από διαφορετικούς οργανισμούς. Στον **Πίνακα 4.4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *in silico* ανάλυσης της GDH από τον άνθρωπο (*H. sapiens*, GI: 4885281 & 31377775), το ποντίκι (*M. musculus*, GI: 34785735), την αγελάδα (*B. Taurus*, GI: 930425286), το βάτραχο (*X. laevis*, GI: 148230659), την μύγα (*D. melanogaster*, GI: 45553475), το σκουλήκι (*C. elegans*, GI: 3881823) και από ένα βλεφαριδοφόρο πρωτόζωο (*T. Thermophila*, GI: 118377975).

Σημειώνεται ότι από τις τρεις διαφορετικές GDHs της *T. Thermophila* στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε μόνο την αλληλουχία GDH με GI: 118377975 η οποία προβλέπεται να έχει υψηλότερη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης σε σχέση με τις άλλες δύο (GI: 829195465 & 118384733) σύμφωνα με τα προγράμματα MitoFates, TargetP και Mitoprot II.

Σημειώνεται, επίσης, ότι το βλεφαριδοφόρο πρωτόζωο *T. thermophila* εκφράζει μία λιγότερο εξειδικευμένη αφυδρογονάση (glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase) έναντι της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Από την *in silico* ανάλυση δεν παρέχονται

ενδείξεις για την ύπαρξη σινιάλου πυρηνικής στόχευσης στις παραπάνω GDHs, αλλά προβλέπεται να διαμερισματοποιούνται όλες στα μιτοχόνδρια (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4. Πρόβλεψη κυτταρικής διαμερισματοποίησης των GDHs από διαφορετικούς οργανισμούς (M: μιτοχόνδρια, C: κυτταρόπλασμα).

Protein GDH	MitoFates (mitos)	MitoFates (MTS size)	TargetP (mTP)	Predotar (mitos)	SubLoc v1.0	cNLS Mapper	Nuc Pred	NL Strad amus
<i>H. sapiens</i> (GDH2)	0.983	53	0.918	0.92	M	x	x	x
<i>H. sapiens</i> (GDH1)	0.965	53	0.385	0.30	M	x	x	x
<i>M. musculus</i>	0.989	53	0.647	0.76	M	x	x	x
<i>B. taurus</i>	0.975	53	0.378	0.30	M	x	x	x
<i>X. laevis</i>	0.552	36	0.294	0.13	C	x	x	x
<i>D. melanogaster</i>	0.996	36	0.851	0.64	M	x	x	x
<i>C. elegans</i>	0.984	17	0.841	0.68	C	x	x	x
<i>T. thermophila</i> *	0.985	21	0.577	0.43	C	x	x	x

* *T. thermophila*: glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase

1.5 Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των GDHs είναι περισσότερο συντηρημένο σε σχέση με το ώριμο τμήμα τους

Χρησιμοποιήθηκε το ανοιχτής πρόσβασης διαδικτυακό πρόγραμμα MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation) για την ποσοτική μέτρηση της ομοιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας της GDH μεταξύ των ζωικών οργανισμών. Παρατηρήθηκε ότι το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης είναι λιγότερο συντηρημένο σε σχέση με το ώριμο τμήμα της γλουταμικής αφυδρογονάσης στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς (Πίνακας 4.5).

Πίνακας 4.5 Υπολογισμός ομολογίας της αμινοξικής σύστασης μεταξύ των ζωικών οργανισμών του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης και του ώριμου τμήματος της GDH (MTS / ώριμο τμήμα).

GDH	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>X. laevis</i>	<i>H. sapiens 1</i>	<i>H. sapiens 2</i>
<i>T. thermophila</i> *	47 / 40	13 / 44	19 / 41	20 / 40	20 / 41
<i>C. elegans</i>	x	35 / 63	29 / 63	47 / 64	41 / 63
<i>D. melanogaster</i>	x	x	25 / 72	25 / 72	25 / 72
<i>X. laevis</i>	x	x	x	56 / 92	44 / 89
<i>H. sapiens 1</i>	x	x	x	x	83 / 97

*glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase

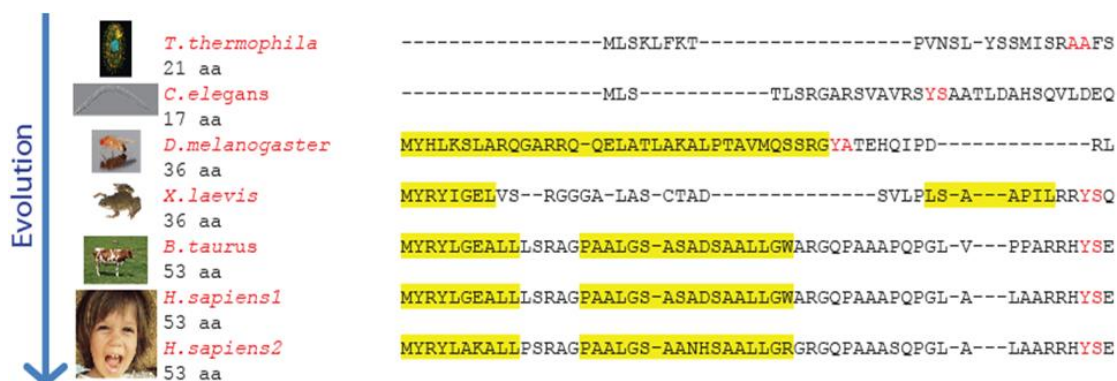
Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο, καθώς γενικά το MTS μιας πρωτεΐνης είναι λιγότερο συντηρημένο σε σχέση με το ώριμο τμήμα της, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της οικογένειας πρωτεϊνών PRDXs (peroxiredoxins) (Leyens et al, 2003).

1.6 Το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης των GDHs στους ζωικούς οργανισμούς γίνεται μεγαλύτερο, περισσότερο θετικά φορτισμένο και ισχυρότερο με την εξέλιξη των οργανισμών, με πιθανή εξαίρεση την GDH στα πτηνά και στα ερπετά

Η πολλαπλή στοίχιση των διαφόρων GDHs από διαφορετικούς ζωικούς οργανισμούς σε συνδυασμό με τα στοιχεία σχετικά με το μέγεθος του πιθανούς MTS των GDHs, προσφέρει αρκετές ενδείξεις ότι η προβλεπόμενη αλληλουχία μιτοχονδριακής στόχευσης είναι μεγαλύτερη στους εξελικτικά ανώτερους οργανισμούς σε σχέση με τους εξελικτικά κατώτερους οργανισμούς (Πίνακας 4.4, Εικόνα 4.32).

Μαζί με τους συνεργάτες μας από το Εργαστήριο Νευρολογίας συνδυάσαμε το εν λόγω εύρημα με αυτά από τη χρήση λογισμικού προγράμματος πρόβλεψης δομής (PredictProtein). Βρέθηκε ότι το MTS στους εξελικτικά κατώτερους οργανισμούς, όπως είναι τα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα και το σκουλήκι, δεν προβλέπεται να σχηματίζει κάποια ελικοειδή διαμόρφωση (Εικόνα 4.32). Αντίθετα, το MTS της GDH της μύγας προβλέπεται να σχηματίζει ολόκληρο μια α-έλικα, ενώ το MTS της GDH στα χορδωτά, προβλέπεται να σχηματίζει δυο αμφιπαθείς α-έλικες (Εικόνα 4.32).

Επίσης, στα θηλαστικά φαίνεται να υπάρχει επιπλέον ένα αμινοξικό τμήμα στο C-τελικό άκρο του MTS των GDHs πριν τη θέση κοπής το οποίο φαίνεται να απουσιάζει στους εξελικτικά κατώτερους οργανισμούς (**Εικόνα 4.32**). Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην αύξηση των βιοχημικών απαιτήσεων και στην εξέλιξη του εγκεφάλου στα θηλαστικά σε σχέση με τους εξελικτικά κατώτερους οργανισμούς.



Εικόνα 4.32 Η εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης στους ζωικούς οργανισμούς. Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της πολλαπλής στοίχισης (πρόγραμμα Clustal Omega) του MTS της γλουταμικής αφυδρογονάσης από τα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα μέχρι τον άνθρωπο. Με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται οι ελικοειδείς δομές που προκύπτουν από τις προβλέψεις δομής (πρόγραμμα PredictProtein), ενώ με κόκκινο χρώμα τα αμινοξέα στην προβλεπόμενη θέση κοπής (προγράμματα MitoFates, MitoProt II, TargetP). Στο αριστερό τμήμα της εικόνας αναφέρεται το μέγεθος του MTS της GDH. (Συνεργασία με Δήμητρα Κοτζαμάνη)

Αναρωτηθήκαμε για την εξέλιξη του φορτίου του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της GDH μεταξύ των οργανισμών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό πρόγραμμα Protein calculator v3.4 το οποίο υπολογίζει διάφορες παραμέτρους ενός πεπτιδίου όπως το μοριακό του μέγεθος, το ισοηλεκτρικό του σημείο (pI) και τον υπολογισμό του φορτίου του σε διαφορετικές τιμές pH. Παρατηρήθηκε ότι το MTS της GDH εξελίχθηκε σταδιακά ώστε να έχει υψηλότερο φορτίο στο pH 7.0. Σημειώνεται ότι το κυτταρόπλασμα έχει pH περίπου 7.0-7.4 (**Πίνακας 4.6**).

Πίνακας 4.6. Πρόβλεψη φορτίου του MTS των GDHs από διαφορετικούς οργανισμούς (PROTEIN CALCULATOR v3.4).

MTS (GDH)	Estimated pI	Estimated charge at pH 7.00
<i>H. sapiens</i> (GDH2)	11.73	7.4
<i>H. sapiens</i> (GDH1)	10.23	3.2
<i>M. musculus</i>	11.36	4.2
<i>B. taurus</i>	10.23	3.2
<i>X. laevis</i>	9.06	1.9
<i>D. melanogaster</i>	11.03	5.1
<i>C. elegans</i>	11.69	2.9
<i>T. thermophila</i> *	10.28	2.9

thermophila:glutamyl/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase

*T.

1.7 Στο MTS της GDH των θηλαστικών η α1 έλικα είναι πιο συντηρημένη σε σχέση με την α2

Μελετήθηκε σε μεγαλύτερο βάθος η εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης των θηλαστικών. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν 24 αλληλουχίες GDH θηλαστικών χρησιμοποιώντας *in silico* μεθόδους για να προβλεφθεί η ικανότητα μιτοχονδριακής τους στόχευσης, το δυνητικό σημείο κοπής τους και η ομολογία μεταξύ των πιθανών σινιάλων μιτοχονδριακής τους πρόβλεψης. Προβλέφθηκε ότι οι περισσότερες από τις αλληλουχίες που μελετήθηκαν έχουν πολύ ισχυρή ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης και ότι οι GDHs των θηλαστικών διαμερισματοποιούνται πρωτίστως στα μιτοχόνδρια. Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα MitoFates προβλέπει ότι όλες οι GDH αλληλουχίες των θηλαστικών που μελετήθηκαν έχουν ένα αποκοπτόμενο σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης μεγέθους περίπου 53 αμινοξέων, το οποίο μπορεί να αναγνωρίζεται από τις πρωτεάσες της μιτοχονδριακής μήτρας MPP και Icp55 (**Εικόνα 4.33**), με την προϋπόθεση ότι υπάρχει ομόλογη της Icp55 στους υπό μελέτη οργανισμούς.

Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ClustalW για μελέτες πολλαπλής στοίχισης των GDHs στα θηλαστικά. Παρόλο που το ώριμο τμήμα των GDHs εμφανίζει υψηλή ομολογία (89%), το MTS τους εμφανίζει σαφώς μικρότερη ομολογία (30%). Βρέθηκε ότι τα αμινοξέα που απαρτίζουν την α1 έλικα στις hGDHs, εμφανίζουν περισσότερη ομολογία (50%) σε σχέση με αυτά της α2 (31%) (**Εικόνα 4.33**).

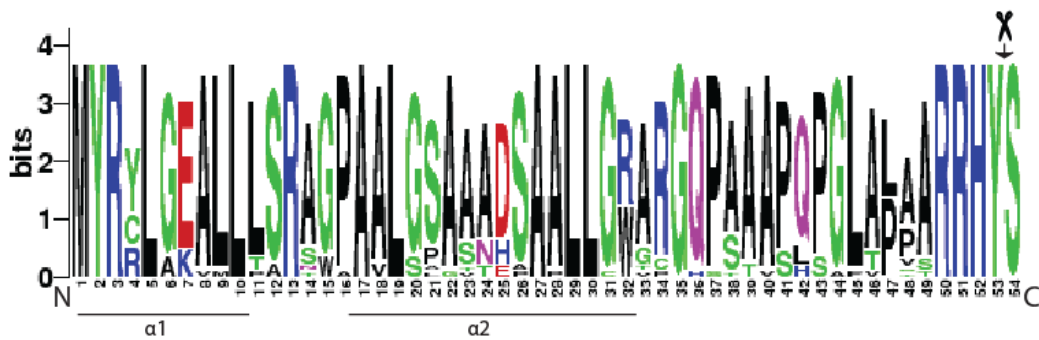
A

```

Mus_musculus_1 MYRRLGEALLLSRAGPAALGSAAADSAAALGWARGQPSAAPQPGLTPVARRHYS
Rattus_norvegicus_1 MYRRLGEVLLLSRAGPAALGSAAADSAAALGWARGQPSAVPQPGLTPVARRHYS
Peromyscus_maniculatus_bairdii MYRRLGEALLLSRSGPAALGSAAADSAAALGWARGQPSAAPLSGLAPAARRHYS
Microtus_ochrogaster_1 MYRRLGEALLLSRSGPAALGSAAADSAAALGWARGHPSAAPHSGLALAARRHYS
Mesocricetus_auratus_1 MYRRLGEALLLARNGPAALGSAAADPAALGWARGQPSAAPHSGLAPTSRRHYS
Nannospalax_galili_1 MYRRLGEALLLSRSGPAALGSAAADSAAALCWVRGQPSAAPLPGLTPAARRHYS
Bos_Taurus_1 MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAAALGWARGQPAAPQPGLVFPARRHYS
Homo_sapiens_1 MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAAALGWARGQPAAPQPGLALAARRHYS
Pan_troglodytes_1 MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAAALGWARGQPAAPQPGLALAARRHYS
Pongo_abelii_1 MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAAALGRARGQPAAPQPGLALAARRHYS
Macaca_fascicularis_1 MYRYLGEALLLSRAWPAALGSATADSAAALGRARGQPAAPQPGLALAARRHYS
Papio_Anubis_1 MYRYLGEALLLSRAWPAALGSAAADSAAALGRARGQPAAPQPGLALAARRHYS
Chlorocebus_sabaeus_1 MYRYLGEALLLSRAWPAALGSAAADSAAALGRARGQPAAPQPGLALAARRHYS
Pan_troglodytes_2 MYRYLAKALLTSRAGPAALGSAAADSAAALGRGPGQPAAPQPGLALAARRHYS
Pan_paniscus_2 MYRYLAKALLTSRAGPAALGSAAADSAAALGRGPGQPAAPQPGLALAARRHYS
Homo_sapiens_2 MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAAADSAAALGRGPGQPAAPQPGLALAARRHYS
Pongo_abelii_2 MYRYLAKALLPSRAGPAALGSAAADSAAALGRGPGQPAAPQPGLALASRRHYS
Otolemur_garnettii_1 MYRYLGEALLLSRTGPAALGLAAADSAPLLGRARGQPAAPQPGLAPAARRHYS
Condylura_cristata_1 MYRCLGEALLLSRAGPAALGSAAADSAAALGRACGQPAAPLPGLALPARRHYS
Sus_scrofa_1 MYRCLGEALLLSRAGPAALGSAAADSAAALGRTRGQPAATAPQGLAPPARRHYS
Ceratotherium_simum_simum_1 MYRCLGEAMLLSRAGPAALGSAAADSAAALGRACGQPAAPQPGFAPPARRHYS
Orycteropus_afer_afer_1 MYRCLGEALLLSRAGPAALGSAAADSAAALGWARGQSATAPQGLAPPARRHYS
Loxodonta_Africana_1 MYRCLGEALLLARAGPAALGSAAADSAAALGWARGQPTAAPQGLAPPARRHYS
Chrysochloris_asiatica_1 MYRCLGEALLLSRAGAAALSPGATESAAALGWARGQPAAPQPALAPCTRRHYS
*** *.:.*:* *.*.*. .*.** *.:... .:.. :*****

```

B



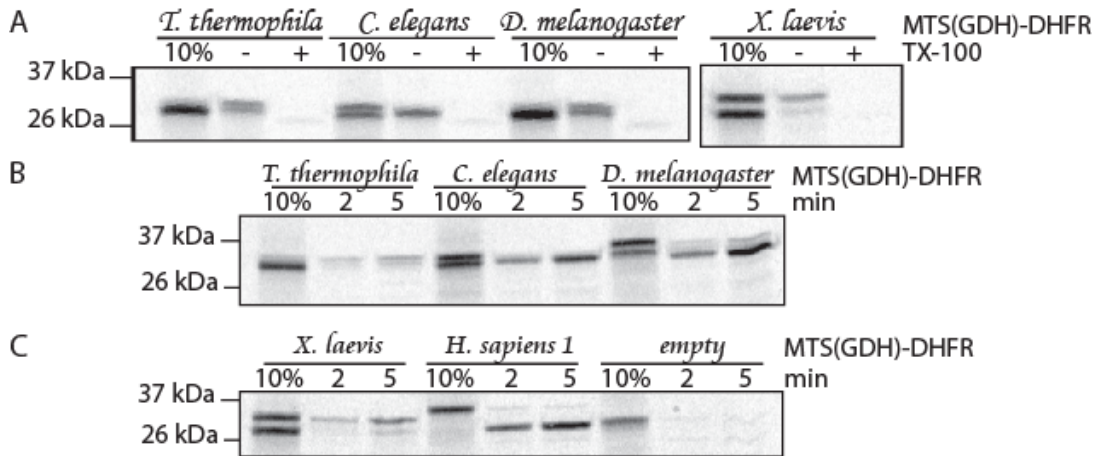
Εικόνα 4.33 Στα θηλαστικά, το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης (MTS) της γλουταμικής αφυδρογονάσης είναι αρκετά συντηρημένο. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν την α1 έλικα είναι πιο συντηρημένα από αυτά της α2. (Α). Πολλαπλή στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του MTS της GDH από διαφορετικούς οργανισμούς θηλαστικών. (*) πολύ συντηρημένα, (:) μέτρια συντηρημένα, και (.) λιγότερο συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα. (Β) Γραφική παρουσίαση της πολλαπλής στοίχισης των πρώτων 54 αμινοξέων της γλουταμικής αφυδρογονάσης με χρήση του λογισμικού WebLogo. Παρουσιάζονται οι αμινοξικές θέσεις του MTS από το αμινοτελικό (N) προς το καρβοξυτελικό (C) άκρο. Το μέγεθος των αμινοξέων αντικατοπτρίζει τη συχνότητα εμφάνισής τους σε κάθε θέση και το ψαλίδι δείχνει τη θέση κοπής.

2. Πειραματικά ευρήματα σχετικά με την εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης

2.1 Το MTS της GDH από τα βλεφαριδοφόρα μέχρι τον άνθρωπο φαίνεται να είναι ικανό να στοχεύσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω *in silico* ευρήματα σχετικά με την εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακούς φορείς. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν κατάλληλες κλωνοποιήσεις έτσι, ώστε να μπορούν να εκφραστούν τα προβλεπόμενα MTS της GDH των οργανισμών *T. Thermophila*, *C. elegans*, *D. melanogaster* και *X. laevis* συζευγμένα με τις μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες DHFR (πλασμίδια pSP65-MTS-DHFR) και EGFP (pEGFP-N3-MTS-EFFP) και να γίνουν *in organello* και *in vivo* πειράματα, αντίστοιχα. Στις μελέτες χρησιμοποιήθηκε το N53 της hGDH1 συζευγμένο με το DHFR (N53-DHFR) και το πεπτίδιο DHFR (μόνο του) ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας, αντίστοιχα (**Εικόνα 4.34.B**).

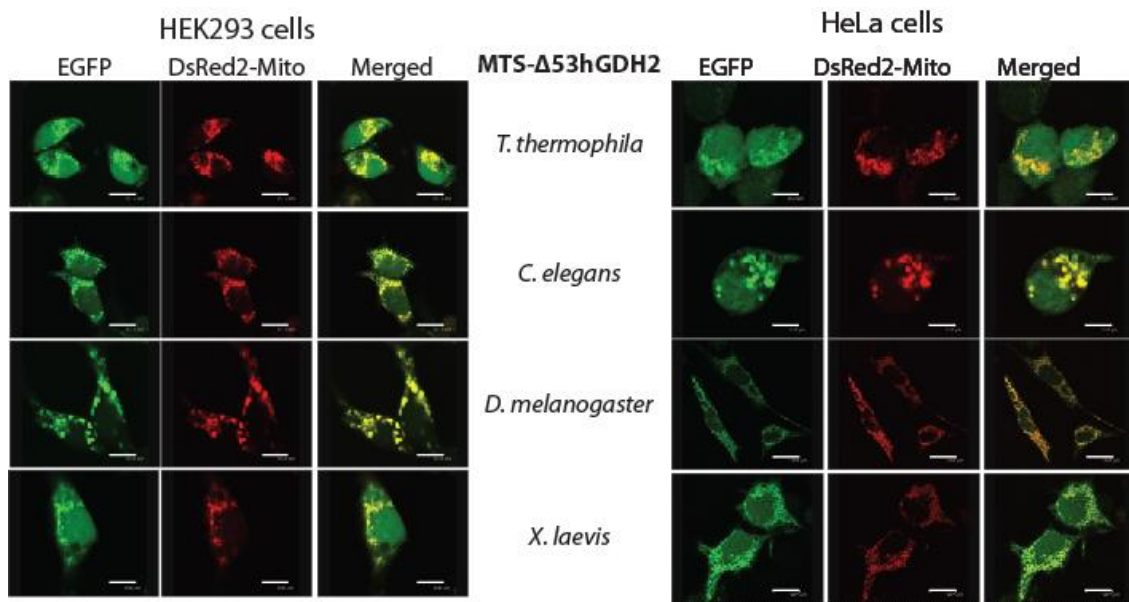
Τα πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα έδειξαν ότι τα MTS της GDH όλων των υπό μελέτη οργανισμών έχουν την ικανότητα να στοχεύσουν την πρωτεΐνη DHFR στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.34**) και το σήμα εισόδου τους είναι ειδικό, όπως φαίνεται από τη χρήση των δειγμάτων έλεγχου με το απορρυπαντικό TX-100 (**Εικόνα 4.34.A**). Παρατηρήθηκε ότι το MTS της *T. thermophila* έχει μικρότερη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης σε σχέση με το MTS των εξελικτικά ανώτερων οργανισμών με εξαίρεση το MTS του *X. laevis* (**Εικόνα 4.34**). Παρατηρήθηκε επίσης ότι το MTS της *D. melanogaster* και του *C. elegans* αποκόπτονται όταν εισέλθουν στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.34.B**). Αντίθετα, από την εν λόγω μελέτη δεν παρέχονται ενδείξεις για αποκοπή του MTS των οργανισμών *T. Thermophila* και *X. laevis* στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.34.B**).



Εικόνα 4.34 Τα σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης της GDH των οργανισμών *T. thermophila*, *C. elegans*, *D. melanogaster* και *X. laevis* είναι ικανά από μόνα τους να στοχεύσουν το DHFR σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. (A). Είσοδος των ραδιενεργά σημασμένων MTS(GDH)-DHFR σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 5min, κατεργασία με τρυψίνη και με ή χωρίς με TX-100, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 12% Tricine SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. (B). Είσοδος των ραδιενεργά σημασμένων MTS(GDH)-DHFR σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 2 ή 5min, κατεργασία με τρυψίνη, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 14% Tricine SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

Παράλληλα, οι συνεργάτες μας πραγματοποίησαν πειράματα συνδιαμόλυνσης στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HEK293 και HeLa χρησιμοποιώντας ως μιτοχονδριακό μάρτυρα το πλασμίδιο DsRed2-Mito. Τα πειράματα έδειξαν ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές τα MTS της GDH των οργανισμών *T. thermophila*, *C. elegans*, *D. melanogaster* και *X. laevis* μπορούν να οδηγήσουν το EGFP στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 4.35**). Επίσης, έδειξαν την ύπαρξη ενός μικρότερου σήματος εντοπισμού των υβριδικών πεπτιδίων στον κυτταρικό πυρήνα, με εξαίρεση το πεπτίδιο MTS-EGFP της *D. melanogaster* (**Εικόνα 4.35**). Μάλιστα, παρατηρήθηκε υψηλότερος πυρηνικός εντοπισμός του πεπτιδίου του *X. laevis* σε σχέση με τους άλλους οργανισμούς (**Εικόνα 4.35**).

Επομένως οι *in organello* και *in vivo* μελέτες, στο σακχαρομύκητα και στον άνθρωπο, αντίστοιχα, δείχνουν ότι τα MTS της GDH από τα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα μέχρι τον άνθρωπο έχουν αυτόνομη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης.

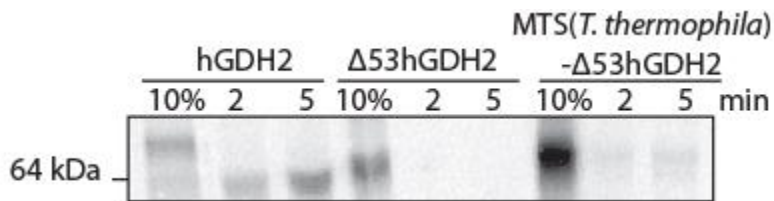


Εικόνα 4.35 Τα MTS της GDH των οργανισμών *T. thermophila*, *C. elegans*, *D. melanogaster* και *X. laevis* είναι ικανά από μόνα τους να οδηγήσουν το EGFP στα μιτοχόνδρια σε κύτταρα HEK293 (αριστερά) και σε κύτταρα HeLa (δεξιά). (Δ. Κοτζαμάνη)

2.2 Το MTS της GDH της *T. thermophila* αδυνατεί να στοχεύσει την ώριμη hGDH2 στα μιτοχόνδρια

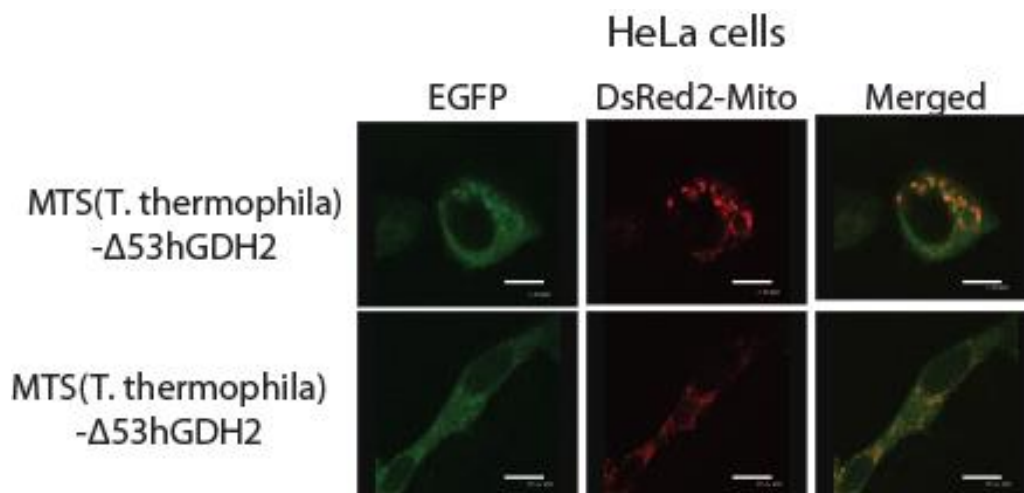
Σε επόμενο βήμα αναρωτηθήκαμε αν το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης από εξελικτικά κατώτερους οργανισμούς είναι ικανό να οδηγήσει την ώριμη ανθρώπινη GDH2 στα μιτοχόνδρια. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν κατάλληλες κλωνοποιήσεις έτσι, ώστε να μπορούν να εκφραστούν τα υβριδικά πεπτιδία MTS(*T.thermophila*)-Δ53hGDH2 και MTS(*T.thermophila*)-Δ53hGDH2-EGFP με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής-μετάφρασης και *in vivo* σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πεππίδιο MTS(*T.thermophila*)-Δ53hGDH2 μπορεί να εισέλθει λίγο έως καθόλου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (**Εικόνα 4.36**). Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με την αποτελεσματική ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης της wt hGDH2 (**Εικόνα 4.36**).

Πειράματα συν-διαμόλυνσης σε κύτταρα HEK293 σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία που πραγματοποιήθηκαν από τους συνεργάτες μας στο Εργαστήριο Νευρολογίας δείχνουν της ύπαρξη μιας μικρής, αλλά όχι ανύπαρκτης ικανότητας μιτοχονδριακής στόχευσης του πεπτιδίου MTS(*T.thermophila*)-Δ53hGDH2-EGFP (**Εικόνα 4.37**).



Εικόνα 4.36 Το MTS της GDH της *T. thermophila* αδυνατεί να αντικαταστήσει πλήρως το MTS της hGDH2. Είσοδος των ραδιενεργά σημασμένων hGDH2, Δ53hGDH2 και MTS (*T. thermophila*)-Δ53hGDH σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 2 ή 5min, κατεργασία με τρυψίνη, ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

Επομένως, από όλα τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι με την πάροδο της εξέλιξης της γλουταμικής αφυδρογονάσης το σινιάλο μιτοχονδριακής της στόχευσης αυξήθηκε σε μέγεθος, σε θετικό φορτίο και σε ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης. Τα πειράματα αυτά δείχνουν, επίσης, ότι τα μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή μήτρα είναι πολύ συντηρημένα από τον μύκητα μέχρι τον άνθρωπο καθώς τα πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα συμφωνούν με τα αποτελέσματα από τις μελέτες σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών.



Εικόνα 4.37 Το MTS της GDH της *T. thermophila* μπορεί να στοχεύσει σε μικρό βαθμό την ώριμη hGDH2 συζευγμένη με το EGFP στα μιτοχόνδρια σε κύτταρα HeLa. (Δ. Κοτζαμάνη)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH) είναι ένα ένζυμο που εμφανίζεται σε όλους τους οργανισμούς στους οποίους έχει μελετηθεί. Εξελίχθηκε από ένα μη ρυθμιζόμενο ένζυμο στα βακτήρια σε ένα υψηλά ρυθμιζόμενο μιτοχονδριακό ένζυμο στα θηλαστικά. Η GDH συσσωρεύεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε ορισμένα κύτταρα των θηλαστικών και έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό. Στον άνθρωπο η GDH εμφανίζεται σε δύο πολύ συντηρημένες ισομορφές (hGDHs), την hGDH1 και hGDH2, οι οποίες έχουν ένα ασυνήθιστα μεγάλο αποκοπτόμενο σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης στο N-τελικό τους άκρο, το οποίο αποτελείται από 53 αμινοξέα (N53) (*Mavrothalassitis et al, 1998; Shashidharan, et al, 1994*). Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στην αποσαφήνιση του μηχανισμού διαμερισματοποίησης των hGDHs και στην εξέλιξη του σινιάλου μιτοχονδριακής στόχευσης της GDH μεταξύ των οργανισμών.

Στην παρούσα διατριβή αρχικά μελετήθηκε αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύστημα εισόδου των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για την μελέτη των ανθρώπινων ισομορφών της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Τα πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα έδειξαν ότι, πράγματι, οι hGDHs μπορούν να εισέλθουν στην μιτοχονδριακή μήτρα και να κοπούν έτσι, ώστε να πάρουν την τελική ώριμη μορφή τους, σχηματίζοντας εξαμερή και πιθανά τριμερή. Το σήμα εισόδου ήταν ειδικό όπως παρατηρήθηκε από τα δείγματα που είχαν κατεργαστεί με το απορρυπαντικό TX-100, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι οι hGDHs μπορούν να μπουν στα μιτοχόνδρια ακόμα και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τις συνήθεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ικανότητα μιτοχονδριακής τους στόχευσης είναι πάρα πολύ υψηλή. Δεδομένου ότι οι χαμηλότερες θερμοκρασίες επηρεάζουν τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αλλά όχι σημαντικά τις ιοντικές, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις παίζουν σημαντικότερο ρόλο στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης των hGDHs σε σχέση με τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Βρέθηκε ότι η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δισθενών

μεταλλικών ιόντων, από το μεμβρανικό δυναμικό και από το κανάλι TIM23 της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επομένως το *in organello* σύστημα του σακχαρομύκητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την περαιτέρω μελέτη μιτοχονδριακής στόχευσης της γλουταμικής αφυδρογονάσης. Τα πειράματα αυτά επιβεβαιώνουν την υψηλή συντήρηση των μονοπατιών μιτοχονδριακής στόχευσης μεταξύ των οργανισμών.

Η ποσοτικοποίηση των πειραμάτων εισόδου έδειξε ότι, παρόλο που τα οδηγά πεπτίδια των hGDHs διαφέρουν μόνο σε 9 από τα 53 αμινοξέα τους, η είσοδος ή/και η ωρίμανση της hGDH2 πιθανώς να γίνεται λίγο πιο γρήγορα από ότι στην περίπτωση της hGDH1. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το N53 της hGDH1 και της hGDH2 είναι ικανό από μόνο του να οδηγήσει τις μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες DHFR και EGFP σε πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, καθώς και σε *in vivo* πειράματα των συνεργατών μας σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, αντίστοιχα. Μάλιστα παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση ότι το N53 της ισομορφής hGDH2 φαίνεται για έχει ταχύτερη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης ή/και αποκοπής στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα σε σχέση με το N53 της hGDH1. Η αυξημένη ικανότητα εισόδου/αποκοπής στα μιτοχόνδρια μπορεί να αποτελεί εξελικτικό πλεονέκτημα της hGDH2, καθώς η hGDH2 εκφράζεται και στα αστροκύτταρα τα οποία έχουν χαμηλότερη διαφορά δυναμικού στην εσωτερική τους μιτοχονδριακή μεμβράνη σε σχέση με άλλα κύτταρα, όπως για παράδειγμα τα ηπατοκύτταρα (*Matthews et al, 2010*) και επομένως χρειάζεται ένα πολύ ισχυρό σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης.

Είναι γνωστό από την υπάρχουσα βιβλιογραφία ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μήτρας προβλέπεται να έχουν την τάση σχηματισμού μιας αμφιπαθούς α-έλικας. Αντίθετα, παρατηρήσαμε ότι το N53 των hGDHs προβλέπεται να έχει την τάση σχηματισμού δύο ξεχωριστών αμφιπαθών α-ελικών, της α1 (αμινοξέα 1-10) και της α2 (αμινοξέα 16-32). Προηγούμενες μελέτες σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, που πραγματοποιήθηκαν από τους συνεργάτες μας στο Εργαστήριο Νευρολογίας, έδειξαν ότι το N53 είναι απαραίτητο για τη σωστή κυτταρική διαμερισματοποίηση της hGDH1 και της hGDH2 (*Mastorodemos et al, 2009; Kotzamani and Plaitakis, 2012*). Παρατηρήθηκε, μάλιστα, ότι όταν απουσιάζει η α1 έλικα, η hGDH2 χάνει την ικανότητά της να στοχευθεί στα μιτοχόνδρια

(Kotzamani et al, 2012). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στην παρούσα μελέτη με *in organello* πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά αν οι επιμέρους α-έλικες του N53 της hGDH έχουν αυτόνομη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης ή όχι. Πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σε συνδυασμό με *in vivo* πειράματα των συνεργατών μας από το Εργαστήριο Νευρολογίας, έδειξαν ότι η α1 έλικα της hGDH2 είναι ικανή από μόνη της να οδηγήσει αποδοτικά τις πρωτεΐνες DHFR και EGFP, αλλά όχι την ώριμη hGDH2, στα μιτοχόνδρια. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μέγεθος των πεπτιδίων (DHFR: 190 αμινοξέα, EGFP: 241 αμινοξέα, Δ53hGDH2: 505 αμινοξέα) ή στην αμινοξική σύσταση των πρώτων αμινοξέων στο N-τελικό άκρο του DHFR, του EGFP, και του Δ53hGDH2. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι η α2 έλικα της hGDH2 δεν έχει αυτόνομη ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης. Αντίθετα, το υβριδικό πεπτίδιο α1α2 (χωρίς τις ενδιάμεσες στροφές και τη θέση κοπής) είναι ικανό να οδηγήσει από μόνο του την ώριμη hGDH2 στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, τα πειράματα έδειξαν ότι η α1 είναι ικανή να στοχεύσει το DHFR στα μιτοχόνδρια, όταν συζευχθεί στο N-τελικό, αλλά όχι στο C-τελικό άκρο του DHFR. Συμπερασματικά, η είσοδος των hGDHs στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την συνεργατική δράση των δύο α-ελίκων του σινιάλου μιτοχονδριακής τους στόχευσης και η α1 έλικα έχει πρωταγωνιστικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν αποκοπτόμενο MTS, η δε αποκοπή του θεωρείται ότι ενισχύει την σταθερότητα των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, αλλά η λεπτομερής σχέση της αποκοπής του πεπτιδίου σε σχέση με τη δυνατότητα μιτοχονδριακής στόχευσης παραμένει ασαφής. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε για πρώτη φορά αν η πρωτεολυτική αποκοπή των hGDHs είναι απαραίτητη για την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια. Πειράματα εισόδου ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2, που είναι μεταλλαγμένες στην πιθανή θέση αναγνώρισης από την πρωτεάση MPP (R50G-R51D) ή στην θέση κοπής (Y53D-S54D), αν και χάνουν την ικανότητά τους να κόβονται στα μιτοχόνδρια, εξακολουθούν να έχουν την ικανότητα εισόδου σε αυτά. Ωστόσο, από την παρούσα μελέτη δεν είναι σαφές αν οι ανώριμες hGDHs (δεν έχει αποκοπεί το

N53) μπορούν να διαμορφώσουν την «κατάλληλη» εξαμερή δομή και εάν είναι ενζυμικά ενεργές. Επίσης, δεν έχει διευκρινιστεί εάν αυτές οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται *in vivo* γρηγορότερα σε σχέση με αυτές που αποκόπτονται κανονικά. Θα ήταν σκόπιμο να γίνουν παρόμοιες μελέτες και για άλλες πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μήτρας, ώστε να διευκρινιστεί καλύτερα ο ρόλος της αποκοπής των σινιάλων μιτοχονδριακής στόχευσης στα μιτοχόνδρια ή της μη αποκοπής τους. Προτείνεται ακόμα να μελετηθεί αν υπάρχει συσχέτιση της αποκοπής των σινιάλων μιτοχονδριακής στόχευσης σε σχέση με τη στόχευση των πρωτεϊνών σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα ή με την πιθανή ικανότητά τους για παλίνδρομη κίνηση.

Δεδομένου ότι πολύ πρόσφατα αναφέρθηκε εντοπισμός της hGDH1 στον κυτταρικό πυρήνα σε ανθρώπινα ολιγοδενδροκύτταρα και πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα (*Spanaki et al, 2015*) διερευνήθηκε αν οι hGDHs εμφανίζουν παλίνδρομη κίνηση, όπως στην περίπτωση της φουμαράσης στο σακχαρομύκητα (*Knox et al, 1998*). Πειράματα εισόδου των ραδιενεργά σημασμένων hGDHs σε συνδυασμό με απομόνωση του διαλύματος μετά την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια, δεν έδωσαν σαφείς ενδείξεις για την ύπαρξη παλίνδρομης κίνησης εξόδου των hGDHs από τα μιτοχόνδρια. Προτείνεται να επαναληφθούν οι μελέτες με *in vivo* και *in organello* μεθόδους και με υποκυτταρική κλασμάτωση από ανθρώπινα ολιγοδενδροκύτταρα δεδομένου ότι μπορεί να υπάρχει πράγματι παλίνδρομη κίνηση των hGDHs σε πολύ μικρή ποσότητα, η οποία να μην είναι ανιχνεύσιμη με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης, η ικανότητα παλίνδρομης κίνησης των hGDHs μπορεί να εμφανίζεται αποκλειστικά σε ορισμένους ιστούς ή κάτω από ορισμένες μη «φυσιολογικές» συνθήκες.

Προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε ποιες πρωτεάσες της μιτοχονδριακής μήτρας είναι υπεύθυνες για την αποκοπή του N53 των hGDHs. Δεδομένου ότι η αλληλουχία κοντά στη θέση κοπής μοιάζει με τη θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης Icp55, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε αν οι hGDHs κόβονται από αυτήν. Πειράματα εισόδου ραδιενεργών hGDHs σε αγρίου τύπου και icp55Δ μιτοχόνδρια δεν ανέδειξαν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης των hGDHs με την Icp55. Αυτό, όμως, μπορεί να οφείλεται στην ακρίβεια της μεθόδου, καθώς η πρωτεάση Icp55 συνήθως κόβει μόνο μία θέση μετά από τη θέση αποκοπής από την πρωτεάση MPP. Προτείνεται να πραγματοποιηθούν πειράματα

εισόδου καθαρών απομονωμένων πρωτεϊνών σε μιτοχόνδρια και ανάλυση των πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας. Επίσης προτείνεται να γίνουν *in vitro* μελέτες με καθарές πρωτεΐνες hGDH1 και hGDH2 και την ομόλογη της Icr55 ανθρώπινη πρωτεΐνη ΧΡΕΡ3. Τέλος, προτείνεται να μελετηθεί η εξέλιξη των πρωτεασών της μιτοχονδριακής μήτρας μεταξύ των οργανισμών.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης για την μιτοχονδριακή μήτρα δεν έχουν κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία, αλλά είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα και χαρακτηρίζονται από αμφιπαθικότητα και τάση για δημιουργία α-έλικας. Για να προσδιορίσουμε τα στοιχεία του N53 των hGDHs που έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης πραγματοποιήσαμε μια σειρά μεταλλάξεων στην hGDH2 και μελετήσαμε την ικανότητα εισόδου της αγρίου τύπου σε σχέση με τις μεταλλαγμένες μορφές της hGDH2 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Από τα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η διατάραξη της ελικοειδούς διαμόρφωσης της α1 έλικας στην hGDH2, με την εισαγωγή προλίνης στο μέσο της (L5P, K7P), δεν επηρεάζει την ικανότητά της για μιτοχονδριακή στόχευση. Επομένως η ελικοειδής διαμόρφωση της α1 δεν φαίνεται να έχει πρωταγωνιστικό ρόλο, παρόλο που είναι απαραίτητη η παρουσία των αμινοξέων της για την μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τον ρόλο της αμφιπαθικότητας και του θετικού φορτίου στην μιτοχονδριακή στόχευση της hGDH2. Παρατηρήσαμε ότι η αμφιπαθικότητα της α1 έλικας δεν έχει κυρίαρχο ρόλο στην διαμερισματοποίηση της hGDH2, καθώς η hGDH2-R3A-L5A εξακολουθεί να έχει ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης. Παρατηρήσαμε, επίσης, ότι οι μονές και οι διπλές μεταλλαγές στο N-τελικό άκρο της hGDH2 (R3A, K7A, R3A-K7A, K7P-R13A) και στο C-άκρο της hGDH2 (R50G-R51D, Y53D-S54D) εξακολουθούν να μπορούν να εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, βρέθηκε ότι η hGDH2 που φέρει τη τριπλή μεταλλαγή στο N-τελικό άκρο της άκρο (R3A-K7A-R13A) αδυνατεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια. Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά τονίζουν τη σημασία του θετικού φορτίου στο N-τελικό άκρο της hGDH2 και δείχνουν ότι αυτό είναι πιο σημαντικό για την μιτοχονδριακή της στόχευση σε σχέση με την αμφιπαθικότητα, την ελικοειδή διαμόρφωση και το φορτίο της στο C-τελικό της άκρο.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχει ένας αρκετά συχνός

πολυμορφισμός (~20%) στο γονίδιο *GLUD2* (c.G103A), ο οποίος οδηγεί σε αντικατάσταση p.G35R, με άγνωστη μέχρι τώρα βιολογική και κλινική σημασία (*Plaitakis et al, 2010*). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι η εν λόγω μεταλλαγή δεν επηρεάζει την είσοδο της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια. Δεδομένου ότι ο πολυμορφισμός οδηγεί σε μία σημειακή μετάλλαξη στο N53 της hGDH2 πριν τη θέση κοπής, προβλέπεται ότι πιθανώς οι άνθρωποι που φέρουν αυτό τον πολυμορφισμό δεν θα αντιμετωπίζουν κάποιο πρόβλημα στην υγεία τους από αυτό.

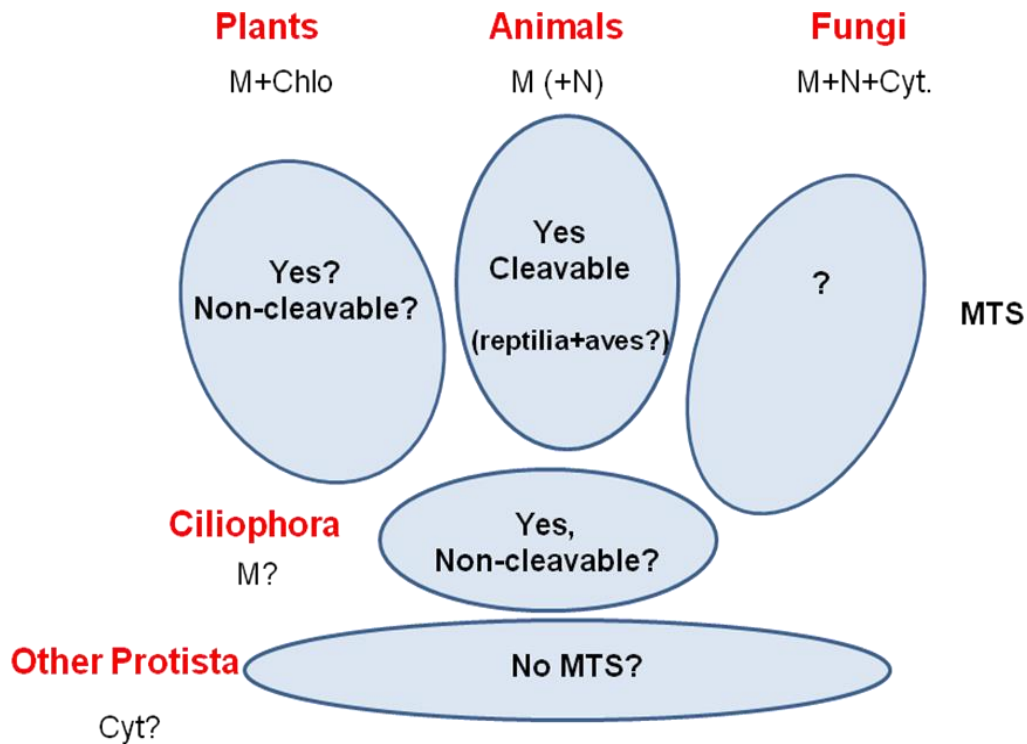
Παρατηρήσαμε ότι όταν ο επίτοπος His συζευχθεί στο C-τελικό άκρο της hGDH1, δεν επηρεάζει την ικανότητά της για μιτοχονδριακή στόχευση και για δημιουργία εξαμερών στα μιτοχόνδρια. Προτείνεται να μελετηθεί αν η ώριμη πρωτεΐνη hGDH1-His είναι λειτουργικά ενεργή. Εάν ισχύει το παραπάνω, η εν λόγω πρωτεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση πιθανών νέων μοριακών συνοδών.

Στην παρούσα μελέτη, αναρωτηθήκαμε για το πώς η GDH εξελίχθηκε από ένα βακτηριακό ένζυμο σε ένα μιτοχονδριακό ένζυμο το οποίο έχει ένα ιδιαίτερα αποδοτικό και περίπλοκο σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης στα θηλαστικά. Επίσης, προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε την υποκυτταρική στόχευση της GDH μεταξύ των οργανισμών και τότε εμφανίστηκε για πρώτη φορά η μιτοχονδριακή της στόχευση. Αναρωτηθήκαμε, επίσης, αν το ασυνήθιστα μεγάλο MTS των ανθρώπινων GDHs αποτελεί εξελικτικό κατάλοιπο ή αν του παρέχει εξελικτικό πλεονέκτημα. Για να προσεγγίσουμε αυτά τα ερωτήματα πραγματοποιήσαμε *in silico* μελέτες για ~170 αμινοξικές αλληλουχίες γλουταμικής αφυδρογονάσης από διαφορετικούς οργανισμούς που έχουν καταχωρηθεί στο NCBI.

Από τις 12 βακτηριακές GDHs που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη κάποιας αλληλουχίας που να μοιάζει με MTS. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον μικρό αριθμό των πρωτεϊνικών αλληλουχιών που μελετήθηκαν ή στο γεγονός ότι η αλληλουχία του MTS της GDH δεν προϋπήρχε στα βακτήρια, αλλά δημιουργήθηκε στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, οι *in silico* μελέτες που έγιναν προτείνουν ότι η μιτοχονδριακή στόχευση της GDH πρωτοεμφανίστηκε στα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα. Σημειώνεται ότι τα βλεφαριδοφόρα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί οι οποίοι θεωρείται ότι έχουν περισσότερο εξειδικευμένα

μιτοχόνδρια σε σχέση με τα άλλα πρωτόζωα. Επιπλέον, είναι γνωστό από την υπάρχουσα βιβλιογραφία ότι η αλλοστερική ρύθμιση της GDH πρωτοεμφανίστηκε στα βλεφαριδοφόρα (*Allen et al, 2004*). Από όλα τα παραπάνω συνάγουμε το συμπέρασμα ότι η μιτοχονδριακή στόχευση και η αλλοστερική ρύθμιση της GDH πρωτοεμφανίστηκαν στα βλεφαριδοφόρα και πιθανώς εξελίχθηκαν παράλληλα.

Τα προγράμματα πρόβλεψης υποκυτταρικού εντοπισμού προβλέπουν διπλή στόχευση της GDH μεταξύ των οργανισμών. Από τις *in silico* μελέτες δεν προβλέφθηκε η ύπαρξη αποκτώμενου MTS στα φυτά και στους μύκητες. Μάλιστα, στους μύκητες η GDH προβλέπεται να έχει πολλαπλή διαμερισματοποίηση σε διαφορετικές υποκυτταρικές θέσεις. Στα φυτά αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη ενός μη αποκοπτόμενου MTS στη GDH. Μάλιστα είναι γνωστό από την υπάρχουσα βιβλιογραφία ότι η GDH στο ρύζι και στο φυτό *A. thaliana* στοχεύεται στα μιτοχόνδρια έχοντας ένα μη αποκοπτόμενο MTS (*Huang et al, 2009*). Αντίθετα, σύμφωνα με την *in silico* μελέτη, οι περισσότεροι ζωικοί οργανισμοί προβλέπεται να έχουν αποκοπτόμενο MTS στην GDH τους, με πιθανή εξαίρεση τα ερπετά και τα πτηνά. Οι *in silico* μελέτες δεν προβλέπουν την ύπαρξη NLS στις GDHs των ζωικών οργανισμών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με τις *in silico* προβλέψεις για την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση της GDH μεταξύ των οργανισμών συνοψίζονται στην **Εικόνα 5.1**.



Εικόνα 5.1 Διαμερισματοποίηση της GDH μεταξύ των οργανισμών και το σινιάλο μιτοχονδριακής της στόχευσης.

Σύμφωνα με το πρόγραμμα MitoFates, η GDH στα βλεφαριδοφόρα έχει θέση κοπής μόνο για την πρωτεάση MPP, ενώ από τους νηματώδεις μέχρι τον άνθρωπο η GDH έχει θέση κοπής για τις πρωτεάσες MPP και Icp55. Επομένως, εάν υπάρχει ομόλογη της Icp55 πρωτεάσης στους οργανισμούς αυτούς προβλέπεται ότι η GDH υφίσταται διπλή πέψη στην μιτοχονδριακή μήτρα.

Βρέθηκε ότι το MTS στους ζωικούς οργανισμούς είναι λιγότερο συντηρημένο σε σχέση με το ώριμο τμήμα τους. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι κατά την εξέλιξη των ζωικών οργανισμών το MTS της GDH αυξήθηκε σταδιακά σε μέγεθος, σε θετικό φορτίο και έγινε ισχυρότερο με πιθανή εξαίρεση των GDHs στα πτηνά, στα ερπετά και ίσως στα αμφίβια. Στα θηλαστικά, παρατηρείται ότι το MTS της GDH έχει την τάση σχηματισμού δύο αμφιπαθών α-ελίκων, όπου η πρώτη α-έλικα είναι πιο συντηρημένη μεταξύ των οργανισμών σε σχέση με τη δεύτερη.

Για να ελεγχθούν τα *in silico* ευρήματα, μελετήσαμε πειραματικά την ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης του MTS της GDH από μερικούς ενδεικτικούς ζωικούς οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, σε συνεργασία με τους

συνεργάτες μας από το Εργαστήριο Νευρολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης πραγματοποιήσαμε *in vivo* και *in organello* μελέτες των MTS της GDH των οργανισμών *T. thermophila* (Βλεφαριδοφόρο πρωτόζωο, GI: 118377975), *C. elegans* (σκουλήκι, GI: 3881823), *D. melanogaster* (μύγα, GI: 45553475) και *X. laevis* (βατράχι, GI: 148230659) συζευγμένων με τις μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες EGFP ή DHFR, αντίστοιχα. Το N53 των hGDHs και οι μη υβριδικές πρωτεΐνες DHFR / EGFP χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες ελέγχου, αντίστοιχα. Παρατηρήσαμε ότι τα MTS της GDH όλων των υπό μελέτη οργανισμών είναι ικανά να οδηγήσουν τις πρωτεΐνες DHFR και EGFP στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα και από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Το σήμα εισόδου ήταν ειδικό όπως φαίνεται από τα δείγματα που κατεργάστηκαν με το απορρυπαντικό TX-100, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως ένας επιπλέον μάρτυρας ελέγχου.

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι το MTS της GDH ακόμα και στους πρώτους ζωικούς οργανισμούς, όπως τα βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα, έχει αρκετά υψηλή ικανότητα μιτοχονδριακής στόχευσης, ώστε να στοχεύσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια. Αυτό δεν οφείλεται σε κάποια ιδιότητα των πρωτεϊνών DHFR και EGFP, καθώς αυτές οι πρωτεΐνες από μόνες τους αδυνατούν να εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Τα αποτελέσματα από τα *in organello* πειράματα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα συμφωνούν με τα αποτελέσματα από τα πειράματα διαμόλυνσης ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Επομένως, η εν λόγω μελέτη τονίζει επίσης την υψηλή συντήρηση των μονοπατιών εισόδου των πυρηνικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια από το σακχαρομύκητα μέχρι τον άνθρωπο.

Τέλος, μελετήθηκε αν το MTS της GDH της *T. thermophila* είναι ικανό να στοχεύσει την ώριμη ανθρώπινη πρωτεΐνη GDH στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Μελέτες σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα καθώς και πειράματα διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία ή υποκυτταρική κλασμάτωση, έδειξαν ότι το MTS της GDH της *T. thermophila* μπορεί σε πολύ μικρό μόνο βαθμό να οδηγήσει την ώριμη hGDH2 στα μιτοχόνδρια. Επομένως η αύξηση του μεγέθους και της πολυπλοκότητας του MTS της GDH φαίνεται να μην αποτελεί εξελικτικό κατάλοιπο, αλλά να εξυπηρετεί στην αύξηση της ικανότητας μιτοχονδριακής στόχευσης.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης στοιχειοθετούν ένα σημαντικό πλαίσιο για την κατανόηση της εξέλιξης και των μοριακών μηχανισμών στόχευσης πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και γενικότερα της κυτταρικής διαμερισματοποίησης μιας πρωτεΐνης που κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και είναι ιδιαίτερα άφθονη στα κύτταρα των θηλαστικών.

Ωστόσο αρκετά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα και είναι σημαντικό να διερευνηθούν. Συγκεκριμένα, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το εν λόγω ένζυμο προβλέπεται να έχει διαφορετική κυτταρική διαμερισματοποίηση στα πτηνά και στα ερπετά με άγνωστη προς το παρόν αιτιολογία. Προτείνεται η εν λόγω πρόβλεψη να ελεγχθεί πειραματικά καθώς τα καλύτερα προγράμματα διαθέσιμα ενδοκυτταρικής πρόβλεψης που έχουν δημιουργηθεί μέχρι τώρα, έχουν ποσοστό σφάλματος ~30% (*Fukasawa et al, 2015*). Προτείνεται επίσης, να μελετηθεί ο εντοπισμός ολόκληρων των πρωτεϊνών της GDH των οργανισμών *T. thermophila*, *C. elegans*, *D. melanogaster* και *X. laevis* σε ομόλογα (στους ίδιους τους οργανισμούς) και σε ετερόλογα (σε διαφορετικούς οργανισμούς) συστήματα έκφρασης, ώστε να επιβεβαιωθούν ή όχι τα παραπάνω ευρήματα. Η κατανόηση του υποκυτταρικού εντοπισμού της GDH θα βοηθήσει στην βαθύτερη κατανόηση της κυτταρικής λειτουργίας και την ρύθμιση του μεταβολισμού των διαφόρων οργανισμών.

Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί η διπλή διαμερισματοποίηση της GDH, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της GDH στην όρνιθα (*Panda et al, 2011*) και στα ανθρώπινα γλοιοκύτταρα (*Spanaki et al, 2015*). Πρόσφατα βρέθηκε ότι σε συνθήκες οξειδωτικού στρες η GDH στο κοτόπουλο διαμερισματοποιείται στον κυτταρικό πυρήνα, όπου έχει δράση πεπτιδάσης της ιστόνης 3 (*Mandal et al, 2014*). Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί αν η GDH έχει ικανότητα επιγενετικής τροποποίησης και σε άλλους οργανισμούς, και εάν ναι, να διευκρινιστεί ο ρόλος της. Επίσης, θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί ο μοριακός μηχανισμός από τον οποίο προκύπτει η διπλή στόχευση της GDH σε αυτούς τους οργανισμούς.

Τέλος, προτείνεται να μελετηθεί η εξέλιξη του MTS του συνόλου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά των MTS από εξελικτικά «μακρινούς» οργανισμούς σχετικά με τα χαρακτηριστικά τους όπως το μέγεθος, το φορτίο, το αν αποκόπτονται ή όχι

στα μιτοχόνδρια, η τάση τους να σχηματίζουν μία ή περισσότερες ελικοειδείς δομές σε σχέση με την ικανότητα μιτοχονδριακής τους στόχευσης και την ύπαρξη πιθανής ιστο-ειδικής διπλής διαμερισματοποίησης. Οι εν λόγω προσεγγίσεις μπορούν να αναδείξουν σε βάθος την ιστορία των σινιάλων κυτταρικής στόχευσης και να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας και της εξέλιξής τους μεταξύ των οργανισμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία

1. Αλεξανδρή-Χατζηαντωνίου Ε. (2004) Βιολογία: η μελέτη της ζωής. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης. Β' Έκδοση. Σελ. 118-120

2. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Ahting U, Thun C, Hegerl R, Typke D, Nargang FE, Neupert W, Nussberger S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* **147**, 959–968
2. Alder NN, Jensen RE, Johnson AE. (2008) Fluorescence mapping of mitochondrial TIM23 complex reveals a water-facing, substrate-interacting helix surface. *Cell* **134**, 439–450
3. Allen A, Kwagh J, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. (2004) Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation. *Biochemistry* **43**, 14431-14443
4. Altmann K, Dürr M, Westermann B. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. *Methods Mol. Biol.* **372**, 81-90
5. Anagnou NP, Seuanez H, Modi W, O'Brien SJ, Papamatheakis J, Moschonas NK. (1993) Chromosomal mapping of two members of the human glutamate dehydrogenase (GLUD) gene family to chromosomes 10q22.3-q23 and Xq22-q23. *Hum. Hered.* **43**, 351—356
6. Andersson JO & Roger AJ. (2003) Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC Evol. Biol.* **3**, 14
7. Aoki C, Milner TA, Berger SB, Sheu KF, Blass JP, Pickel VM. (1987) Glial glutamate dehydrogenase: ultrastructural localization and regional distribution

in relation to the mitochondrial enzyme, cytochrome oxidase. *J. Neurosci. Res.* **18**, 305-318

8. Baker KP & Schatz G. (1991) Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria. *Nature.* **349**, 205-208

9. Banerjee S, Schmidt T, Fang J, Stanley CA, Smith TJ. (2003) Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation. *Biochemistry* **42**, 3446-3456

10. Bao X, Pal R, Hascup KN, Wang Y, Wang WT, Xu W, Hui D, Agbas A, Wang X, Michaelis ML, Choi IY, Belousov AB, Gerhardt GA, Michaelis EK. (2009) Transgenic expression of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) in neurons: *in vivo* model of enhanced glutamate release, altered synaptic plasticity, and selective neuronal vulnerability. *J. Neurosci.* **29**, 13929-13944

11. Becker T, Pfannschmidt S, Guiard B, Stojanovski D, Milenkovic D, Kutik S, Pfanner N, Meisinger C, Wiedemann N. (2008) Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *J. Biol. Chem.* **283**, 120–127

12. Ben-Menachem R, Tal M, Shadur T, Pines O. (2011) A third of the yeast mitochondrial proteome is dual localized: a question of evolution. *Proteomics* **11**, 4468-4476

13. Bihlmaier K, Mesecke N, Kloppel C, Herrmann JM. (2008) The disulfide relay of the intermembrane space of mitochondria: an oxygen-sensing system?. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1147**, 293-302

14. Bliss TV & Collingsridge GL. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39

15. Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N. (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* **9**, 42–49

16. Botstein D & Fink GR. (2011) Yeast: an experimental organism for 21st century biology. *Genetics* **189**, 695-704

17. Brameier M, Krings A, Maccallum RM. (2007) NucPred - Predicting Nuclear Localization of Proteins. *Bioinformatics* **23**, 1159-1560

18. Braun HP, Emmermann M, Krufft V, Schmitz UK. (1992) The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J.* **11**, 3219–3227

19. Brix J, Dietmeier K, Pfanner N. (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J. Biol. Chem.* **272**, 20730–20735
20. Brix J, Rüdiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J, Pfanner N. (1999) Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 16522-16530
21. Burki F & Kaessmann H. (2004) Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat. Genet.* **36**, 1061-1063
22. Carrie C & Small I. (2013) A reevaluation of dual-targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 253-259
23. Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Truscott KN, Guiard B, Pfanner N, Rehling P. (2005) Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* **120**, 817–829
24. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628–644
25. Chen R, Nishimura MC, Kharbanda S, Peale F, Deng Y, Daemen A, Forrest WF, Kwong M, Hedehus M, Hatzivassiliou G, Friedman LS, Phillips HS. (2014) Hominoid-specific enzyme GLUD2 promotes growth of IDH1R132H glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 14217-14222
26. Claros MG & Vincens P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241**, 779-786
27. Colon AD, Plaitakis A, Perakis A, Berl S, Clarke DD. (1986) Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.* **46**, 1811–1819
28. Daum G, Bohni PC, Schatz G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13028-13033

29. de Marcos-Lousa C, Sideris DP, Tokatlidis K. (2006) Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 259-267
30. Dekker PJ, Martin F, Maarse AC, Bömer U, Müller H, Guiard B, Meijer M, Rassow J, Pfanner N. (1997) The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *EMBO J.* **16**, 5408-5419
31. Deloukas P, Dauwerse JG, Moschonas NK, Van Ommen GJB, Van Loon AP. (1993) Three human glutamate dehydrogenase genes (GLUD1, GLUDP2, and GLUDP3) are located on chromosome 10q, but are not closely physically linked. *Genomics* **17**, 676–681
32. Dienhart MK & Stuart RA. (2008) The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome bc1-COX supercomplex and the TIM23 machinery. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3934–3943
33. DiPrisco G & Casola L. (1975). Detection of structural differences between nuclear and mitochondria1 glutamate dehydrogenase by the use of irnmunoadsorbents. *Biochemistry* **14**, 4679-4683
34. Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T. (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**, 314–318
35. Edgar RC. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* **5**, 113
36. Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids. Res.* **32**, 1792-1797
37. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol Biol.* **300**, 1005-1016
38. Ersahin C, Szpaderska AM, Orawski AT, Simmons WH. (2005) Aminopeptidase P isozyme expression in human tissues and peripheral blood mononuclear cell fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **435**, 303–310
39. Fölsch H, Gaume B, Brunner M, Neupert W, Stuart RA. (1998) C- to N-terminal translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J.* **17**, 6508-6515

40. Fonnum F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **42**, 1–11
41. Frigerio F, Karaca M, De Roo M, Mlynárik V, Skytt DM, Carobbio S, Pajęcka K, Waagepetersen HS, Gruetter R, Muller D, Maechler P. (2012) Deletion of glutamate dehydrogenase 1 (Glud1) in the central nervous system affects glutamate handling without altering synaptic transmission. *J. Neurochem.* **123**, 342-348
42. Fukasawa Y, Tsuji J, Fu SC, Tomii K, Horton P, Imai K. (2015) MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Molecular & Cellular Proteomics.* **14**, 1113-1126
43. Gakh O, Cavadini P, Isaya G. (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochem. Biophys. Acta* **2**, **1592**, 63-77
44. Glick BS. (1991) Protein import into isolated yeast mitochondria. *Methods Cell Biol.* **34**, 389-399
45. Gray MW, Burger G, Lang BF. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476–1481
46. Grivell LA. (1995) Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 121-164
47. Gylfe E. (1976) Comparison of the effects of leucine, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol. Lat.* **13**, 20 –24
48. Hammen PK, Waltner M, Hahnemann B, Heard TS, Weiner H. (1996) The role of positive charges and structural segments in the presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase in import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**, 21041–21048
49. Hanauer A, Mattei MG, Mandel JL. (1987) Presence of a Taq1 polymorphism in the human glutamate dehydrogenase (GLUD) gene on chromosome 10. *Nucleic Acids Res.* **15**, 6308
50. Heinicke S, Livstone MS, Lu C, Oughtred R, Kang F, Angiuoli SV, White O, Botstein D, Dolinski K. (2007) The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PLoS One* **2**, e766
51. Herrmann JM & Neupert W. (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life.* **55**, 219–225

52. Hogeboom GH & Schneider WC. (1953) Intracellular distribution of enzymes. XI. Glutamic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **204**, 233-538
53. Hoppins SC & Nargang FE. (2004) The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem.* **279**, 12396-12405
54. Horwich AL, Kalousek F, Fenton WA, Furtak K, Pollock RA, Rosenberg LE. (1987) The ornithine transcarbamylase leader peptide directs mitochondrial import through both its midportion structure and net positive charge. *J. Cell Biol.* **105**, 669-677
55. Hsu BY, Kelly A, Thornton PS, Greenberg CR, Dilling LA, Stanley CA. (2001) Protein-sensitive and fasting hypoglycemia in children with the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. *J. Pediatr.* **138**, 383-389
56. Huang S, Taylor NL, Whelan J, Millar AH. (2009) Refining the definition of plant mitochondrial presequences through analysis of sorting signals, N-terminal modifications, and cleavage motifs. *Plant Physiol.* **150**, 1272-1285
57. Huang S, Nelson CJ, Li L, Taylor NL, Ströher E, Peteriet J, Millar AH. (2015) Intermediate cleavage peptidase55 modifies enzyme amino termini and alters protein stability in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Physiol.* **168**, 415-427
58. Hulett JM, Lueder F, Chan NC, Perry AJ, Wolyne P, Likic VA, Gooley PR, Lithgow T. (2008) The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex. *J. Mol. Biol.* **376**, 694–704
59. Hussain MM, Zannis VI, Plaitakis A. (1989) Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines. *J. Biol. Chem.* **264**, 20730-20735
60. Isaya G, Kalousek F, Fenton WA, Rosenberg L. (1991) Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *J. Cell Biol.* **113**, 65–76
61. Julliard JH & Smith EL. (1979) Partial amino acid sequence of the glutamate dehydrogenase of human liver and a revision of the sequence of the bovine enzyme. *J. Biol. Chem.* **254**, 3427–3438

62. Kachroo AH, Laurent JM, Yellman CM, Meyer AG, Wilke CO, Marcotte EM. (2015) Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science* **348**, 921-925
63. Kallergi E, Kalef-Ezra E, Karagouni-Dalakoura K, Tokatlidis K. (2014) Common players in mitochondria biogenesis and neuronal protection against stress-induced apoptosis. *Neurochem Res.* **39**, 546-555
64. Kanavouras K, Mastorodemos V, Borompokas N, Spanaki C, Plaitakis A. (2007) Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3398-3406
65. Kellems RE, Allison VF, Butow RA. (1975) Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria IV: attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J. Cell Biol.* **65**, 1–14
66. Kelly A, Ng D, Ferry RJ Jr, Grimberg A, Koo-McCoy S, Thornton PS, Stanley CA. (2001) Acute insulin responses to leucine in children with the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 3724-3728
67. Kiebler M, Keil P, Schneider H, van der Klei IJ, Pfanner N, Neupert W. (1993) The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* **74**, 483–492
68. Knox C, Sass E, Neupert W, Pines O. (1998) Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarase in yeast. *J. Biol. Chem.* **273**, 25587-25593
69. Koehler CM, Jarosch E, Tokatlidis K, Schmid K, Schweyen RJ, Schatz G. (1998) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* **279**, 369-373
70. Kosugi S, Hasebe M, Entani T, Takayama S, Tomita M, and Yanagawa H. (2008) Design of peptide inhibitors for the importin α/β nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chem. Biol.* **15**, 940-949
71. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. (2009a) Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10171-10176

72. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, Yanagawa H. (2009b) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *J. Biol. Chem.* **284**, 478-485
73. Kotzamani D & Plaitakis A. (2012) Alpha helical structures in the leader sequence of human GLUD2 glutamate dehydrogenase responsible for mitochondrial import. *Neurochem. Int.* **61**, 463-469
74. Krebs HA & Gascoyne T. (1968) The redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotides in rat liver homogenates. *Biochem. J.* **108**, 513-520
75. Kuwana T & Newmeyer DD. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 691–699
76. Lai JC, Sheu KF, Kim YT, Clarke DD, Blass JP. (1986) The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): is GDH a marker for mitochondria in brain? *Neurochem. Res.* **11**, 733–744
77. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007) Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948
78. Lee W, Shin S, Cho SS, Park J. (1999) Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum. *J. Cell Biochem.* **76**, 244 –253
79. Lee YJ, Kim KJ, Kang HY, Kim HR, Maeng PJ. (2012) Involvement of GDH3-encoded NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase in yeast cell resistance to stress-induced apoptosis in stationary phase cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 44221-44233
80. Leyens G, Donnay I, Knoops B. (2003) Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **136**, 943-955
81. Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. (2011) The structure and allosteric regulation of glutamate dehydrogenase. *Neurochem. Int.* **59**, 445–455
82. Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. (2012) The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**, 69-80

83. Luciano P, Tokatlidis K, Chambre I, Germanique JC, Géli V. (1998) The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase. *J. Mol. Biol.* **280**, 193-199
84. Ma D. (2001) Applications of yeast in drug discovery. *Prog Drug Res.* **57**, 117-162
85. Mandal P, Chauhan S, Tomar RS. (2014) H3 clipping activity of glutamate dehydrogenase is regulated by stefin B and chromatin structure. *FEBS J.* **281**, 5292–5308
86. Mandic L, Miller MS, Coulter C, Munshaw B, Hertel L. (2009) Human cytomegalovirus US9 protein contains an N-terminal signal sequence and a C-terminal mitochondrial localization domain, and does not alter cellular sensitivity to apoptosis. *J. Gen. Virol.* **90**, 1172-1182
87. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, pp.545, *Cold Spring Harbor Laboratory*. ISBN 0-87969-136-0
88. Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. (1994) The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 278-283
89. Martin W, Dagan T, Koonin EV, Dipippo JL, Gogarten JP, Lake JA. (2007) The evolution of eukaryotes. *Science* **316**, 542–543
90. Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Bessa M, Plaitakis A. (2005) Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J Neurosci Res.* **79**, 65-73
91. Mastorodemos V, Kotzamani D, Zaganas I, Arianoglou G, Latsoudis H, Plaitakis A. (2009) Human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenase localize to mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 505-516
92. Matthews GD, Gur N, Koopman WJ, Pines O, Vardimon L. (2010) Weak mitochondrial targeting sequence determines tissue-specific subcellular localization of glutamine synthetase in liver and brain cells. *J. Cell Sci.* **123**, 351-359

93. Mavinakere MS & Colberg-Poley AM. (2004) Dual targeting of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 protein during permissive infection. *J. Gen. Virol.* **85**, 323-329
94. Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis V, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas N. (1988) Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3494–3498
95. McKenna MC, Sonennewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. (1996) Glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.* **66**, 386–393
96. Meinecke M, Wagner R, Kovermann P, Guiard B, Mick DU, Hutu DP, Voos W, Truscott KN, Chacinska A, Pfanner N, Rehling P. (2006) Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. *Science* **312**, 1523–1526
97. Meineke B, Engl G, Kemper C, Vasiljev-Neumeyer A, Paulitschke H, Rapaport D. (2008) The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. *FEBS Lett.* **582**, 855-860
98. Meisinger C, Ryan MT, Hill K, Model K, Lim JH, Sickmann A, Müller H, Meyer HE, Wagner R, Pfanner N. (2001) Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40–Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small Tom proteins, and import receptors. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2337–2348
99. Michaelidis TM, Tzimagiorgis G, Moschonas NK, Papamatheakis J. (1993) The human glutamate dehydrogenase gene family: gene organization and structural characterization. *Genomics* **16**, 150—160
100. Mihara K, Omura T, Harano T, Brenner S, Fleischer S, Rajagopalan KV, Blobel G. (1982) Rat liver L-glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, and sulfite oxidase are each synthesized as larger precursors by cytoplasmic free polysomes. *J. Biol. Chem.* **257**, 3355-3358
101. Milenkovic D, Ramming T, Müller JM, Wenz LS, Gebert N, Schulze-Specking A, Stojanovski D, Rospert S, Chacinska A. (2009) Identification of

the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* **20**, 2530-2539

102. Minambres B, Olivera ER, Jensen RA, Luengo JM. (2000) A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 39529-39542

103. Model K, Meisinger C, Kühlbrandt W. (2008) Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase. *J. Mol. Biol.* **383**, 1049–1057

104. Model K, Meisinger C, Prinz T, Wiedemann N, Truscott KN, Pfanner N, Ryan MT. (2001) Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 361–370

105. Mokranjac D, Paschen SA, Kozany C, Prokisch H, Hoppins SC, Nargang FE, Neupert W, Hell K. (2003) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein Translocase of mitochondria. *EMBO J.* **22**, 816–825

106. Mokranjac D, Sichtung M, Popov-Celeketic D, Mapa K, Gevorkyan-Airapetov L, Zohary K, Hell K, Azem A, Neupert W. (2009) Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1400–1407

107. Moon K, Piszkiwicz D, Smith EL. (1973) Amino acid sequence of chicken liver glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **248**, 3093–3107

108. Naamati A, Regev-Rudzki N, Galperin S, Lill R, Pines O. (2009) Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, Icp55. *J. Biol. Chem.* **284**, 30200–30208

109. Nelson N & Schatz G, (1979) Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4365-4369

110. Neupert W & Herrmann JM. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723–749

111. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. (2009) NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**, 202

112. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, Gunnar H. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6
113. Nishi T, Nagashima F, Tanase S, Fukumoto Y, Joh T, Shimada K, Matsukado Y, Ushio Y, Morino Y. (1989) Import and processing of precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase. Structure-function relationships of the presequence. *J. Biol. Chem.* **264**, 6044–6051
114. Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T. (2005) The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* **123**, 277–289
115. O'Toole JF, Liu Y, Davis EE, Westlake CJ, Attanasio M, Otto EA, Seelow D, Nurnberg G, Becker C, Nuutinen M, Kärppä M, Ignatius J, Uusimaa J, Pakanen S, Jaakkola E, van den Heuvel LP, Fehrenbach H, Wiggins R, Goyal M, Zhou W, Wolf MT, Wise E, Helou J, Allen SJ, Murga-Zamalloa CA, Ashraf S, Chaki M, Heeringa S, Chernin G, Hoskins BE, Chaib H, Gleeson J, Kusakabe T, Suzuki T, Isaac RE, Quarmby LM, Tennant B, Fujioka H, Tuominen H, Hassinen I, Lohi H, van Houten JL, Rotig A, Sayer JA, Rolinski B, Freisinger P, Madhavan SM, Herzer M, Madignier F, Prokisch H, Nurnberg P, Jackson PK, Khanna H, Katsanis N, Hildebrandt F. (2010) Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *J. Clin. Invest.* **120**, 791-802
116. Pajęcka K, Nielsen CW, Hauge A, Zaganas I, Bak LK, Schousboe A, Plaitakis A, Waagepetersen HS. (2013) Glutamate dehydrogenase isoforms with N-terminal (His)₆- or FLAG-tag retain their kinetic properties and cellular localization. *Neurochem. Res.* **39**, 487-499
117. Palmieri F, Agrimi G, Blanco E, Castegna A, Di Noia MA, Iacobazzi V, Lasorsa CM, Marobbio L, Palmieri P, Scarcia S, Todisco A, Voza J, Walker FM. (2006) Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1249–1262
118. Panda P, Suar M, Singh D, Pandey SM, Chaturvedi MM, Purohit JS. (2011) Characterization of nuclear glutamate dehydrogenase of chicken liver and brain. *Protein Pept. Lett.* **18**, 1194-1203

119. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. (1997) Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* **119**, 260-272
120. Peterson P & Smith TJ (1999) The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insight into the mechanism of allostery. *Structure* **7**, 769–782
121. Pfanner N & Geissler A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 339-349
122. Plaitakis A, Metaxari M, Shashidharan P. (2000) Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic function. *J. Neurochem.* **75**, 1862-1869
123. Plaitakis A & Zaganas I. (2001) Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. *J. Neurosci. Res.* **66**, 899–908
124. Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. (2003) Study of structure–function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochem. Int.* **43**, 401–410
125. Plaitakis A, Latsoudis H, Kanavouras K, Ritz B, Bronstein JM, Skoula I, Mastorodemos V, Papapetropoulos S, Borompokas N, Zaganas I, Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Spanaki C. (2010) Gain-of-function variant in GLUD2 glutamate dehydrogenase modifies Parkinson's disease onset. *Eur J Hum Genet.* **18**, 336-341
126. Plaitakis A, Latsoudis H, Spanaki C. (2011) The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease. *Neurochem. Int.* **59**, 495-509
127. Popov-Celeketic J, Waizenegger T, Rapaport D. (2008) Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J. Mol. Biol.* **376**, 671–680
128. Porras P, McDonagh B, Pedrajas JR, Bárcena JA, Padilla CA. (2010) Structure and function of yeast glutaredoxin 2 depend on postranslational

processing and are related to subcellular distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 839-845

129. Purohit JS, Tomar RS, Panigrahi AK, Pandey SM, Singh D, Chaturvedi MM. (2013) Chicken liver glutamate dehydrogenase (GDH) demonstrates a histone H3 specific protease (H3ase) activity in vitro. *Biochimie* **95**, 1999-2009

130. Rajas F & Rousset B. (1993) A membrane-bound form of glutamate dehydrogenase possesses an ATP-dependent high-affinity microtubule binding activity. *Biochem. J.* **295**, 447– 455

131. Rao S, Gerbeth C, Harbauer A, Mikropoulou D, Meisinger C, Schmidt O. (2011) Signaling at the gate: phosphorylation of the mitochondrial protein import machinery. *Cell Cycle* **10**, 2083–2090

132. Rao S, Schmidt O, Harbauer AB, Schonfisch B, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C. (2012) Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1618–1627

133. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **36**, 320–325

134. Regev-Rudzki N, Karniely S, Ben-Haim NN, Pines O. (2005) Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 4163-4171

135. Reichert AS & Neupert W. (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **1592**, 41-49

136. Roise D & Schatz G. (1988) Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.* **263**, 4509-4511

137. Rosso L, Marques AC, Reichert AS, Kaessmann H. (2008) Mitochondrial targeting adaptation of the hominoid-specific glutamate dehydrogenase driven by positive Darwinian selection. *PLoS Genet.* **4**, e1000150

138. Rothe F, Brosz M, Storm-Mathisen J. (1994) Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience.* **62**, 1133-1146

139. Ryan MT, Hoogenraad NJ, Høj PB. (1994) Isolation of a cDNA clone specifying rat chaperonin 10, a stress-inducible mitochondrial matrix protein synthesized without a cleavable presequence. *FEBS Lett.* **337**, 152-156
140. Saitoh T, Igura M, Obita T, Ose T, Kojima R, Maenaka K, Endo T, Kohda D. (2007) Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* **26**, 4777–4787
141. Salganicoff L & De Robertis E. (1963) Subcellular distribution of glutamic decarboxylase and gamma-aminobutyric alpha-ketoglutaric transaminase. *Life Sci.* **2**, 85-91
142. Salganicoff L & De Robertis E. (1965) Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid glutamine and gamma-aminobutyric acid cycles in rat brain. *J. Neurochem.* **12**, 287–309
143. Sass E, Karniely S, Pines O. (2003) Folding of fumarase during mitochondrial import determines its dual targeting in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 45109-45116
144. Schagger H & von Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231
145. Schmitt A & Kugler P. (1999) Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* **92**, 293–308
146. Schmidt E & Schmidt FW. (1963) Distribution pattern of several enzymes in human liver and its variations during cell damage. III: on the methodology of enzyme determination in human organ extracts and serum. *Enzymol. Biol. Clin.* **35**, 73–79
147. Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, Eyrich B, Zahedi RP, Stojanovski D, Schonfisch B, Guiard B, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* **144**, 227–239
148. Schmitt S, Ahting U, Eichacker L, Granvogel B, Go NE, Nargang FE, Neupert W, Nussberger S. (2005) Role of Tom5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 14499–14506

149. Sener A & Malaise WJ. (1980) L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* **288**, 187–189
150. Sener A, Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ. (1981) Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a non-metabolizable amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5460–5464
151. Shashidharan P, Michaelidis TM, Robakis NK, Kresovali A, Papamatheakis J, Plaitakis A. (1994) Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 16971-6976
152. Shashidharan P, Clarke DD, Ahmed N, Moschonas N, Plaitakis A. (1997) Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J. Neurochem.* **68**, 1804-1811
153. Shashidharan P & Plaitakis A. (2014) The discovery of human of GLUD2 glutamate dehydrogenase and its implications for cell function in health and disease. *Neurochem. Res.* **39**, 460-470
154. Sherman EL, Go NE, Nargang FE. (2005) Functions of the small proteins in the TOM complex of *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4172–4182
155. Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, Mikropoulou D, Gallo A, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Tokatlidis K. (2009) A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J. Cell Biol.* **187**, 1007-1022
156. Sideris DP & Tokatlidis K. (2010) Trapping oxidative folding intermediates during translocation to the intermembrane space of mitochondria: in vivo and in vitro studies. *Methods Mol Biol.* **619**, 411-423
157. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539
158. Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G. (2005) Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3477-3492

159. Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*. **384**, 582-385
160. Smith EL, Austin BM, Blumenthal KM, Nyc JF. (1975) Glutamate Dehydrogenase. The Enzymes (Boyer PD editor), 11 *Academic Press*, New York. pp. 293-367
161. Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley C. (2001) Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J. Mol. Biol.* **307**, 707–720
162. Smith TJ, Schmidt T, Fang J, Wu J, Siuzdak G, Stanley CA. (2002) The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery. *J. Mol. Biol.* **318**, 765-777
163. Spanaki C, Zaganas I, Kleopa KA, Plaitakis A. (2010) Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in neural and testicular supporting cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 16748-16756
164. Spanaki C & Plaitakis A. (2012) The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. *Neurotox. Res.* **21**, 117–127
165. Spanaki C, Kotzamani D, Kleopa K, Plaitakis A. (2015) Evolution of GLUD2 Glutamate Dehydrogenase Allows Expression in Human Cortical Neurons. *Mol. Neurobiol.* 10.1007/s12035-015-9429-2
166. Stames EM & O'Toole JF. (2013) Mitochondrial aminopeptidase deletion increases chronological lifespan and oxidative stress resistance while decreasing respiratory metabolism in *S. cerevisiae*. *PLoS One*. **8**, e77234
167. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BYL, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E, Poncz M. (1998) Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1352–1357
168. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274–276
169. Sutendra G, Kinnaird A, Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Hashimoto K, Zhang N, Flaim E, Michelakis ED. (2014) A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell*. **158**, 84-97

170. Sztul ES, Hendrick JP, Kraus JP, Wall D, Kalousek F, Rosenberg LE. (1987) Import of rat ornithine transcarbamylase precursor into mitochondria: two-step processing of the leader peptide. *J. Cell Biol.* **105**, 2631–2640
171. Tamura Y, Harada Y, Shiota T, Yamano K, Watanabe K, Yokota M, Yamamoto H, Sesaki H, Endo T. (2009) Tim23–Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *J. Cell Biol.* **184**, 129–141
172. Taylor AB, Smith BS, Kitada S, Kojima K, Miyaura H, Otwinowski Z, Ito A, Deisenhofer J. (2001) Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* **9**, 615–625
173. Teixeira PF & Glaser E. (2013) Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 360-370
174. Thornton K, Wang Y, Weiner H, Gorenstein DG. (1993) Import, processing, and two-dimensional NMR structure of a linker-deleted signal peptide of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 19906-19914
175. Tiwari AK, Panda P, Purohit JS. (2014) Evaluation of sub-cellular distribution of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Drosophila melanogaster* larvae. *Acta Histochem.* **116**, 297-303
176. Tokatlidis K, Vial S, Luciano P, Vergnolle M, Clemence, S. (2000) Membrane protein import in yeast mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 495–499
177. Van der Laan M, Wiedemann N, Mick DU, Guiard B, Rehling P, Pfanner N. (2006) A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria. *Curr. Biol.* **16**, 2271–2276
178. van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJ, Moczko M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Hönlinger A, Pfanner N. (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* **401**, 485–489
179. Varki A. (2004) How to make an ape brain. *Nat Genet.* **36**, 1034–1036
180. Vögtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W,

Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processingpeptidase critical for protein stability. *Cell* **139**, 428–439

181. Vögtle FN, Prinz C, Kellermann J, Lottspeich F, Pfanner N, Meisinger C. (2011) Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 2135–2143

182. Wang Y & Weiner H. (1993) The presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase requires the presence of an alpha-helix at its N-terminal region which is stabilized by the helix at its C termini. *J. Biol. Chem.* **268**, 4759-65

183. Wenthold RJ, Altschuler RA, Skaggs KK, Reeks KA. (1987) Immunocytochemical characterization of glutamate dehydrogenase in the cerebellum of the rat. *Neurochem.* **48**, 636-643

184. Werner P, Pitt D, Raine CS. (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann. Neurol.* **50**, 169-180

185. Wiedemann N, van der Laan M, Hutu DP, Rehling P, Pfanner N. (2007) Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain. *J. Cell Biol.* **179**, 1115–1122

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

187. Yachdav G, Kloppmann E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, Hamp T, Hönigschmid P, Schafferhans A, Roos M, Bernhofer M, Richter L, Ashkenazy H, Punta M, Schlessinger A, Bromberg Y, Schneider R, Vriend G, Sander C, Ben-Tal N, Rost B. (2014) PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Research* **42**, W337-343

188. Yogev O, Karniely S, Pines O. (2007) Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria in vivo. *J. Biol. Chem.* **28**, 29222–29229

189. Yogev O & Pines O. (2011) Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim. Biophys Acta.* **1808**, 1012-1020

190. Yu CS, Lin CJ, Hwang JK. (2004) Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science* **13**, 1402-1406
191. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* **64**, 643-651
192. Zaganas I & Plaitakis A. (2002) Single amino acid substitution (G456A) in the vicinity of the GTP binding domain of human housekeeping glutamate dehydrogenase markedly attenuates GTP inhibition and abolishes the cooperative behavior of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 26422-26428
193. Zaganas I, Spanaki C, Karpusas M, Plaitakis A. (2002) Substitution of Ser for Arg-443 in the regulatory domain of human housekeeping (GLUD1) glutamate dehydrogenase virtually abolishes basal activity and markedly alters the activation of the enzyme by ADP and L-leucine. *J. Biol. Chem.* **277**, 46552-46558
194. Zaganas I, Spanaki C, Plaitakis A. (2012) Expression of human GLUD2 glutamate dehydrogenase in human tissues: functional implications. *Neurochem. Int.* **61**, 455–462
195. Zaganas I, Kanavouras K, Borompokas N, Arianoglou G, Dimovasili C, Latsoudis H, Vlassi M, Mastorodemos V. (2014) The odyssey of a young gene: structure-function studies in human glutamate dehydrogenases reveal evolutionary-acquired complex allosteric regulation mechanisms. *Neurochem. Res.* **39**, 471-478

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Οργανισμοί στους οποίους μελετήθηκε η GDH

Βακτήρια

C. glomerans
C. aponinum
M. hydrothermalis
P. asaccharolytica
P. aeruginosa
R. argasii
R. hoogstraalii
S. coccoides (443, 453αα)
S. acidophilus
T. lienii
T. succinifaciens

Μύκητες

A. melanogenum
A. pullulans
A. pullulans
C. cinerea
C. neoformans
F. velutipes
G. candidum
M. verticillata
M. robertsii
M. verticillata
P. chrysogenum
S. cerevisiae (GDH1, 2, 3)
S. hirsutum
X. dendrorhous

Φυτά

A. tauschii
A. thaliana (GDH1, 2, 3)
B. napus
G. max (GDH1, 2)
M. truncatula
N. tabacum
O. sativa Japonica (GDH1, 2, 3)
P. persica

S. m lycopersicum

T. aestivum

T. urartu

V. vinifera

Πρωτόζωα

D. discoideum (NAD, NADP)
P. cynomolgi (470, 511, 1243αα)
S. lemnae (509, 522αα)
T. thermophila (499, 500, 606αα)
T. gondii

Κνιδόζωα

H. vulgaris
N. vectensis (455, 550αα)

Πλατυέλμινθες

C. sinensis
E. multilocularis (274, 423, 522αα)
H. microstoma (495, 524αα)

Νηματώδεις

B. malayi (529, 543αα)
C. elegans
H. contortus
T. circumcincta
T. trichiura

Μαλάκια

A. californica
C. gigas (444, 542, 516αα)

Δακτυλιοσκώληκες

H. robusta (216, 522αα)

Αρθρόποδα

D. melanogaster (D, D, F)

B. mori
D. plexippus (527, 552, 556αα)
E.r sinensis
F. chinensis
L. vannamei (437, 552αα)

Εχινόδερμα

S. purpuratus

Χορδωτά

- Χονδροιχθύες

C. milii

- Ακτινοπτερύγια

D. rerio (542, 544αα)

M. albus

M. anguillicaudatus

S. salar (gdh2, gdh3)

- Σαυρόψιδα

P. sinensis (GDH1, 2)

- Ερπετά

A. mississippiensis (547, 565αα)

A. sinensis (416, 490αα)

C. mydas (410, 414αα)

C. picta (GDH1-X1, 3, GDH2-X1, 3)

- Πτηνά

A. chloris

A. platyrhynchos (X1,2,3, 497αα)

A. chrysaetos

C. anna (436, 506αα)

C. livia (484, 509αα)

C. brachyrhynchos (351, 421αα)

F. peregrinus

F. albicollis

G. gallus

M. vitellinus

M. undulatus

P. pubescens

P. humilis

S. canaria (351, 422αα)

T. guttata

Z. albicollis (421, 424αα)

- Θηλαστικά

B.s Taurus (GDH1)

C. simum (GDH1)

C. sabaeus (GDH1)

C asiatica (GDH1)

C. cristata (GDH1)

E. edwardii (GDH1)

G. gorilla (GDH1)

H. sapiens (GDH1, 2)

J. jaculus (GDH1)

L. vexillifer (GDH1)

L. africana (GDH1)

M. fascicularis (GDH1)

M. ochrogaster (GDH1)

M. musculus (GDH1)

N. galili (GDH1)

N. leucogenys (GDH2)

O. princeps (GDH1)

O. afer (GDH1)

O. cuniculus (GDH1)

P. paniscus (GDH2)

P. troglodytes (GDH1, 2)

P. anubis (GDH1)

P. maniculatus (GDH1)

P. abelii (GDH1, 2)

R. norvegicus (GDH1)

S. scrofa (GDH1)

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

- Kallergi E, Kalef-Ezra E, Karagouni-Dalakoura K, Tokatlidis K. (2014) Common players in mitochondria biogenesis and neuronal protection against stress induced apoptosis. *Neurochemical Research*, **39**, 546-55 (doi: 10.1007/s11064-013-1109-x)

➤

Common Players in Mitochondria Biogenesis and Neuronal Protection Against Stress-Induced Apoptosis

Emmanouela Kallergi · Ester Kalef-Ezra ·
Katerina Karagouni-Dalakoura · Kostas Tokatlidis

Received: 22 May 2013 / Revised: 1 July 2013 / Accepted: 8 July 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Mitochondria biogenesis is a fundamental process for the organization and normal function of all cells. Since the majority of mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol, protein import is the major mechanism for mitochondria biogenesis. We describe the different pathways that ensure correct targeting and intra mitochondrial sorting of mitochondrial proteins. The import process of several proteins of the mitochondrial intermembrane space relies on the Mitochondrial Import and Assembly 40 and Essential for respiration and vegetative growth 1 (Erv1) proteins that together constitute the oxidative folding machinery of the mitochondrial intermembrane space. Recent work has implicated the FAD-oxidase protein Erv1 (ad its human homolog Augmenter of Liver Regeneration) as an anti-apoptotic factor in mammalian cells (including neuronal cells) that undergo Reactive Oxygen Species-triggered apoptosis. The different roles of this protein as a key factor in mitochondria biogenesis, iron-sulfur cluster biogenesis and in neuronal protection against apoptosis are discussed.

Keywords Mitochondria biogenesis · Intermembrane space · Apoptosis · Erv1 · ALR · Mia40 · Protein import · Oxidative folding · Redox stress signaling

Protein Import Pathways Determine Mitochondrial Biogenesis

Mitochondria, which are proposed to have derived endosymbiotically 1.5–2 billion years ago [1–4], are essential organelles for eukaryotic cell life as they play a central role in a variety of different biological processes like oxidative phosphorylation, citric acid (Krebs) cycle and programmed cell death (apoptosis). Mitochondrial proteins of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* are approximately one thousand and are estimated to constitute 15–20 % of the total cellular proteome [5]. However, only eight proteins are encoded by the small mitochondrial genome whilst the vast majority of mitochondrial proteins (~99 %) are encoded by nuclear DNA [6–9] and are translated in free cytosolic ribosomes [10, 11].

Thus, it is obvious that the nuclear-encoded mitochondrial proteins must be imported [10, 12] into mitochondria following appropriate import pathways that involve specific translocation machineries (Fig. 1). For this purpose, newly synthesized mitochondrial precursors, called preproteins, usually possess specific Mitochondrial Targeting Signals (MTSs) that guide the appropriate preprotein targeting [13, 14]. This crucial and non-trivial procedure that maintains the organelle's entity and the cellular viability, has recently been extensively investigated [14–16] for all four of the organelle's subcompartments, namely the *outer membrane* (OM), the *inner membrane* (IM), the *intermembrane space* (IMS) and the *matrix*.

E. Kallergi · E. Kalef-Ezra · K. Karagouni-Dalakoura
Institute of Molecular Biology and Biotechnology-Foundation
for Research and Technology (IMBB-FORTH), Nikolaou
Plastira 100, 70013 Heraklion, Crete, Greece

E. Kallergi · E. Kalef-Ezra · K. Karagouni-Dalakoura
Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion,
Crete, Greece

K. Tokatlidis (✉)
Department of Materials Science and Technology, University of
Crete, 71003 Heraklion, Crete, Greece
e-mail: Kostas.Tokatlidis@glasgow.ac.uk

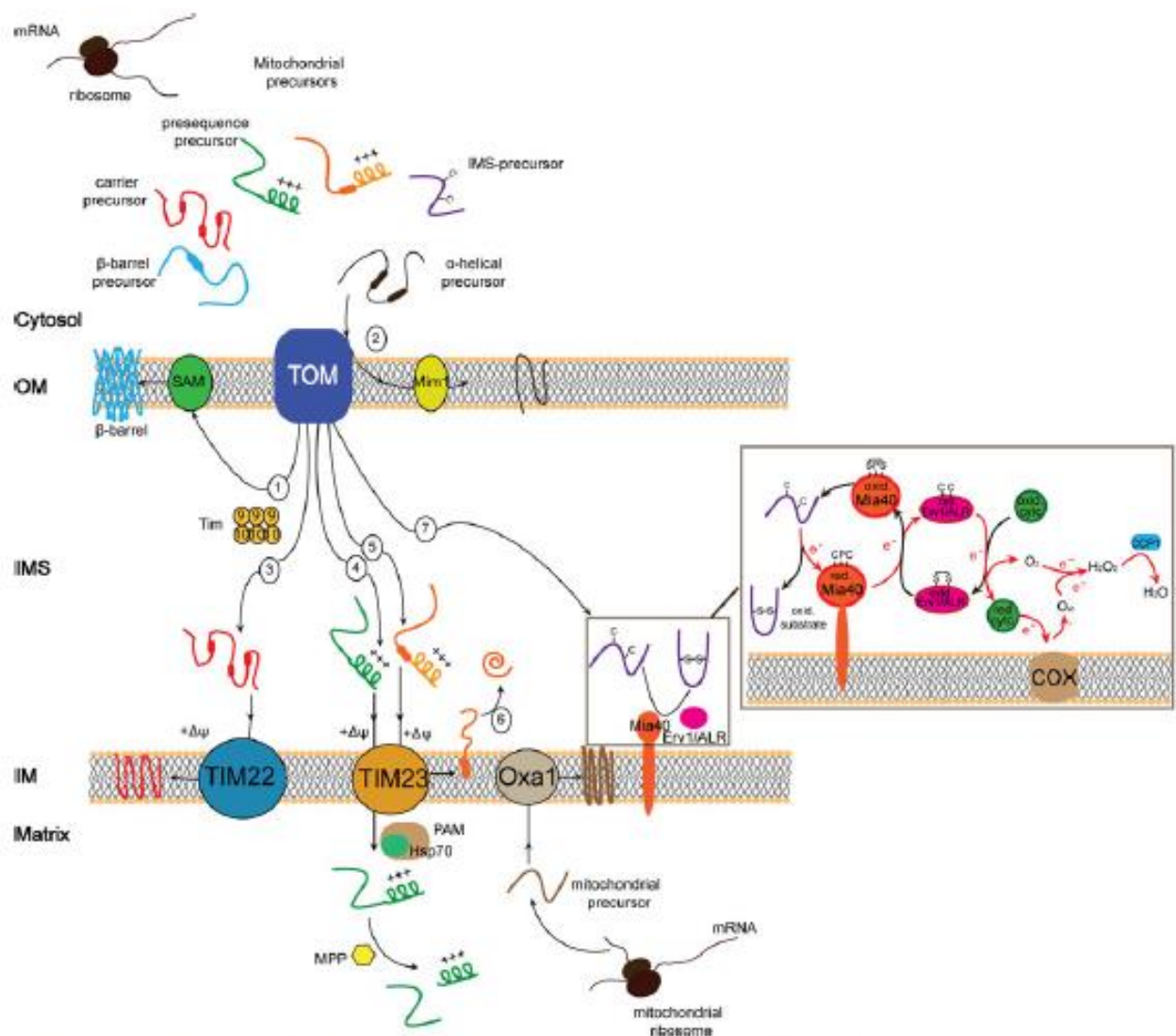


Fig. 1 Mitochondrial import pathways of mitochondrial targeted precursors, highlighted with *different colors*, and their translocons. *Numbers 1–7* depict the different import pathways that precursors

follow for their submitochondrial localization i.e. *OM* (outer membrane), *IM* (inner membrane), *IMS* (intermembrane space) and matrix (Color figure online)

Targeting into the OM

Mitochondria possess a general entry gate called Translocase of the Outer mitochondrial Membrane (TOM) [17] (that is the main protein complex through which all mitochondrial precursors pass, in order to be appropriately sorted either into the OM, IMS, IM or matrix. For targeting into the OM, preproteins are synthesized in the cytosol, stay in an import-competent structure through interactions with cytosolic chaperones and targeting factors, and get imported mainly post-translationally passing directly through the TOM channel. OM precursors can follow two import pathways: (1) the β -barrel pathway driven by TOM and the Sorting and Assembly Machinery (SAM)

complexes via a specific targeting signal called β -signal and engaging the chaperone activity of small Tim proteins (Tim9–Tim10 and Tim8–Tim13 complexes) that are located in IMS [18–20]; (2) the sorting pathway of α -helical proteins implicating the TOM complex and the Mitochondrial Import 1 (Mim1) OM protein [21–23]. Precursors of this latter pathway possess hydrophobic transmembrane segments as targeting signals [23–26]. Recently, it was found that the TOM complex as well as the Mim1 protein can be phosphorylated by specific cytosolic kinases as Casein Kinase 2 (CK2) and Protein Kinase A (PKA). This post-translational modification, shows that regulation of TOM function can be critical for its role in each of the import pathways it participates [27–29].

Targeting into the IM

Targeting into the IM involves mainly the Translocase of the Inner Membrane 22 (TIM22) complex for precursors targeted from the cytosol, but also the Oxal protein for mitochondrially-encoded precursors that are inserted from the matrix [15, 30]. Preproteins following the TIM22 pathway contain Internal Targeting Signals (ITSs) that are recognized by specific receptors of the TOM complex (primarily the Tom70 protein) [31, 32]. They cross the OM and reach the TIM22 complex via transient interactions with the small Tim proteins in the IMS. They are then inserted into the IM in a membrane potential ($\Delta\psi$)-dependent, but ATP-independent manner [5, 13, 33]. Other preproteins (not belonging to the carrier family of substrates for the TIM22 complex) can be incorporated into the IM via the Translocase of the Inner Membrane 23 (TIM23) (see below).

Targeting into the Matrix

The matrix-targeted precursors, which make up 2/3 of the mitochondrial proteins [34], use the TIM23 to cross the IM [35]. Most of these precursors have specific N-terminal, positively charged targeting signals that are specifically recognized by the Tom20 and Tom22 receptor proteins [36]. Their specific MTS sequence has a length of approximately 10–60 amino acids that finally gets cleaved in the matrix by the Matrix Processing Peptidase (MPP) [37]. In this pathway $\Delta\psi$ and ATP are also required [38] for powering the Presequence translocase-Associated Motor (PAM) in which mitochondrial Heat shock protein 70 (mtHsp70) of the matrix plays a central role in the final step of targeting. Hence, precursors following this so-called *presequence pathway*, finally adopt their mature structure after cleavage of their presequence [14].

Targeting into the IMS

All mitochondrial proteins residing in the IMS are encoded by the nuclear genome [15, 39, 40] and their sub-mitochondrial localization is achieved following two main pathways: the TIM23 *stop-transfer* pathway or the more recently described MIA (Mitochondrial Import and Assembly) pathway [41]. According to the *stop-transfer* pathway, precursors get imported firstly through TOM complex, are then recognized and arrested by the TIM23 complex of the IM, and finally get released laterally into the lipid bilayer of the IM. Their targeting signal is cleaved by a specific Inner Membrane Peptidase (IMP) that resides on the outer surface of the inner mitochondrial membrane, releasing thus the finally processed mature protein into the IMS [42, 43]. On the other hand, the MIA pathway was

originally discovered for guiding the import of preproteins with specific cysteine motifs that undergo oxidative folding and will be discussed in detail in the following paragraphs.

Erv1/ALR Is a Pivotal Key Player in Two Essential Pathways in the IMS: Mitochondria Biogenesis and Fe/S Cluster Biogenesis

In the MIA pathway there are two key players: Mia40 (Mitochondrial Import and Assembly 40) and Erv1 (Essential for respiration and vegetative growth 1). Both proteins are essential for viability in yeast [41, 44–46]. The MIA pathway is conserved in most eukaryotes, while some protists lack a homologous Mia40 protein but still maintain an Erv1 protein [47]. The protein Mia40 has a conserved domain of 66 amino acids which contains a catalytic CPC motif and a structural twin Cx9C motif [48].

All substrates of the MIA pathway are imported independently of ATP and $\Delta\psi$. Moreover, they have a non-cleavable ITS, also called Mitochondrial Intermembrane Space Sorting (MISS) signal [49, 50]. The substrates for the MIA pathway fall into three basic classes depending on the presence of certain motifs in their sequence: (1) these with a twin Cx3C motif, such as small Tims [41, 44, 51], (2) these with a twin Cx9C motif, such as proteins of the Cox protein family, Mdm35, Mic14, Mic17, Som1, CMC2, CMC3, CMC4, Sco1 [52–54], and (3) these with other cysteine motifs like Erv1, CCS1 and Cmc1 [52, 55–57]. Recently it was found that the protein ChChd3, which is anchored in the IM and carries a twin Cx9C motif in its IMS domain, also interacts with Mia40 [58].

Erv1 has homologues in all eukaryotes. The mammalian homologue protein of yeast Erv1 is called Augmenter of Liver Regeneration (ALR), Growth Factor Erv1-like (GFER), Hepatic Stimulator Substance (HSS) or Hepatopoietin (HPO) and had originally been discovered as a protein factor responsible for improved regeneration of liver after damage [59]. Yeast cells lacking a functional Erv1 exhibit mitochondrial genome and membrane potential loss, problematic respiration, reduction of cell growth and abnormal mitochondrial morphology and distribution [60–62]. Recently Sztolsztener et al. suggested that the mutated human Erv1-R194H, which is present in a rare type of myopathy [63, 64], may affect the stability of human Mia40–Erv1 complexes [65].

The three-dimensional structure of the Erv1/ALR protein has been solved for the homologues of *R. norvegicus* [66], *A. thaliana* [67], *H. sapiens* [64, 68] and *S. cerevisiae* [69]. Erv1 has three cysteine pairs organized as (1) a shuttle motif in the flexible N-terminal domain, (2) an active site pair close to the FAD-moiety in the central core of the enzyme and (3) a structural cysteine pair in its

C-terminus that does not directly participate in the redox reaction, and it forms a homodimer arranged in a head-to-tail dimerization manner. The structural cysteine pair stabilizes the structure of Erv1 [70] and is related to its ability to bind a FAD molecule non-covalently in its monomer [71]. The Erv1 protein has an intrinsically disordered N-terminal domain (N72 in yeast, N80 in human; [72]), which interacts with the C-terminal domain of the other monomer in the dimer. Erv1 can oxidize lysozyme, thioredoxin, TCEP and DTT *in vitro* [67, 70, 71, 73–75].

The Erv1 protein is also a substrate of the MIA pathway [55]. The core of Erv1 in yeast lacking its N-terminal natively disordered domain is crucial for the biogenesis of Erv1: the structural C-terminal cysteines of the core make intermolecular disulfide bond with Mia40 during import [76]; on the other hand, the N72 peptide of Erv1 also has additional targeting information that can independently drive import of non-mitochondrial proteins to mitochondria [72]. In the MIA pathway, the newly synthesized IMS proteins are directed to mitochondria and imported in a reduced form via TOM complex. The family of small Tim proteins may have a preference for import via Tom5 [77], but the exact targeting mechanism in the cytosol is not clear yet. The MIA substrates are recognized by the CPC motif of Mia40 [78, 79] and oxidized by Mia40 via formation of transient mixed disulfides [41, 80]. It remains unclear whether Mia40 interacts during or after translocation with its substrates [81]. The substrates fold into their appropriate structure and thereby get trapped in the IMS as they cannot be exported through the TOM complex [51, 82]. During this process Mia40 becomes reduced and gets re-oxidized by the N-terminal shuttle cysteine pair of Erv1 [70, 80]. Banci et al. [68] presented the mechanistic basis of the human Mia40–Erv1 interaction in this pathway. In the final steps of the electron transfer process from the substrate to Mia40 and then to Erv1, the shuttle cysteine pair of Erv1 binds to the active site of the other monomer of the dimer [54, 75, 83]. Finally, Erv1 transfers e^- from its FAD moiety to cytochrome *c* (cyt *c*) [84, 85] forming a complex with cyt *c* in a ratio 1:1 [86] or to oxygen (O_2) [74] generating hydrogen peroxide (H_2O_2). In fungi, Cytochrome *c* peroxidase (Ccp1) transforms H_2O_2 to H_2O [86]. In humans cyt *c* is a 100-fold stronger e^- acceptor than O_2 for Erv1 [85]. The final e^- acceptor depends on the growth conditions [86] and the e^- transfer from Erv1 to cyt *c* may be prevented by a high cyt *c* turnover rate [87]. Through this mechanism, the MIA machinery is linked to the respiratory chain [84], the $\Delta\psi$ of IM and ATP production [88]. Moreover, Jezek et al. [89] suggested that Erv1 may have a role in sensing of the respiration rate via electron transfer to cyt *c*, sensing Reactive Oxygen Species (ROS) concentrations and retrograde signaling pathways.

It is not clear yet how the second disulfide bond of the substrate is generated. It could be generated directly by Erv1, by O_2 [79] or by Mia40 [80]. A transient ternary complex has been suggested where Erv1 is suggested to promote disulfide transfer to the precursor, while both oxidase and precursor are associated with Mia40 in a complex [90] and it was found that Erv1 transiently associates with the Mia40-substrate intermediate [91]. Bottlinger et al. [91] suggest that Erv1 functions in the specific context of the ternary complex to assure that two disulfide bonds are transferred to the substrate without dissociation of the single disulfide-bonded intermediate forms of the substrate from Mia40.

Many years before the discovery of the Erv1 involvement in mitochondrial protein import, Lange et al. [61] had shown that yeast Erv1 has an important role in cellular iron homeostasis and acts as an essential component for the maturation of cytosolic Fe/S proteins. They claimed that Erv1 functionally interacts with the ABC transporter Atm1, which is localized in the IM and facilitates the export of Fe/S proteins from mitochondria [61]. The way in which Erv1 is involved in this process is not clear yet.

The human homologue of Erv1 is called ALR and has two isoforms, a long form (lf-ALR, 23 kDa) and a shorter (sf-ALR, 15 kDa) isoform [92]. lf-ALR is exclusively located in mitochondria and has crucial role in the mitochondrial protein biogenesis and in the maturation of cytosolic Fe/S proteins much like its yeast homologue as previously described. On the other hand, the sf-ALR isoform is not limited to one compartment but is instead found in the cytosol, in the nucleus but also secreted in the extracellular space where it acts as a cytokine. Moreover, the sf-ALR isoform is involved in liver and pancreas regeneration [93], spermatogenesis [94], carcinogenesis [95, 96] and apoptosis. Additionally, the sf-ALR plays a major role in apoptosis particularly of neuronal cells as discussed below.

Erv1/ALR and Its Role in Apoptosis and Neurodegenerative Diseases

Oxidative stress and ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical (OH) [97, 98], are some of the most common causes of cellular destruction. The changes caused by such a stress are manifested as lipid peroxidation, protein carbonylation and DNA damage. All of these parameters induce the process of apoptosis [99].

Apoptosis is an ATP-driven process characterized by distinctive cellular structural alterations. Specifically, the cell condenses and shrinks in size, mitochondria and ribosomes aggregate, chromosomal DNA is enzymatically

digested into specific fragments, mitochondrial membrane potential collapses and chromatin is packaged into uniformly dense masses [100]. Our current understanding of the molecular control of apoptosis in cells relies largely on the identification of several genes that regulate apoptosis, including the Bcl-2 family [101, 102] and caspases [103], p53 [104], the cell surface death receptors, and several mitochondrial proteins like cyt *c* [105], AIF (apoptosis inducing factor) [106], Smac (second mitochondrial activator of caspases), IAP (the inhibitor of apoptosis protein) [105] and HtrA2/Omi [107]. So far, many signaling pathways have been identified that lead to apoptosis but three of them are caspase-related. First, the *extrinsic* pathway which is triggered by the presence of transmembrane death receptors, including the tumor necrosis factor (TNF) and Fas which form the death-inducing signaling complex (DISC) and activate caspase-8. The activation of this cysteine protease in turn cleaves and activates downstream caspases-3 and -7. Second, the *intrinsic* pathway which is mitochondrial-mediated and is controlled by the Bcl-2 family proteins. The regulation of this pathway depends on cyt *c* release from mitochondria, leading to the activation of caspase-9 and caspase-3. Third, the pathway that involves the activation of caspase-2 and is caused by DNA damage or ER stress [108].

Many of the proteins above are developmentally regulated and they show different subcellular localization and tissue distribution. On the other hand, there is substantial evidence for an involvement of mitochondrial dysfunction in various human neurodegenerative disorders [99, 109–114]. A common characteristic of many neuronal diseases (including brain trauma, stroke, spinal cord injury, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), is the apoptosis of neuronal cells, which is frequently induced by oxidative stress. However, the molecular mechanisms involved in such stress-induced neuronal apoptosis are not yet clearly understood [115–117]. Recently, several molecules with apparent protective effects against ROS-induced neuronal cell death have been discovered. Such examples involve salidroside [118], melatonin [119] and esculin [120] in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells treated with H₂O₂.

The only known intracellular protein that can form de novo disulfides in mammalian cells is the FAD-oxidoreductase ALR. As outlined above it has a major role in both protein biogenesis in the IMS of mitochondria but also in the Fe/S cluster biogenesis process. Intriguingly, this unique FAD oxidoreductase with these significant roles in biogenesis but also in differentiation has additionally been pinpointed as a key protective factor for cellular growth. ALR was originally discovered, as a survival factor for hepatocytes in the regenerating liver [121]. The production

and secretion of the short form of ALR (sf-ALR) by hepatocytes of liver, triggers the synthesis of TNF- α , interleukin 6 (IL-6) and nitric oxide in Kupffer cells [122]. More recent studies [123–125] focused on investigating a direct anti-apoptotic effect of sf-ALR on neuronal cells. This was studied by assessing the influence of ALR on (1) the gene expression of markers that are known to induce or inhibit the apoptotic process, (2) the percentage of cells undergoing apoptosis in the tested cell population, (3) the morphological/structural characteristics of the nucleus and mitochondria, and (4) the release of essential factors from nucleus or mitochondria into the cytosol.

Using a reliable experimental model like the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line [123], Polimeno et al. [123], demonstrated a measurable and beneficial effect of ALR on cell undergoing H₂O₂-induced apoptosis. Using different concentrations of H₂O₂ and by extracellular addition of ALR in the cell medium it was observed that cell viability increased to more than 80 % in a dose-dependent manner, without any effect on untreated cells. Additionally, in a separate study [124] using hepatocytes derived from liver samples after partial hepatectomy, the effect of ALR on the proliferative/apoptotic status of the cells (and hence cell viability) was assessed. It was found that the number of viable cells significantly increased after ALR-treatment and the apoptotic process was consistently reduced at any time point after the surgery (as detected via BrdU-treatment and the TUNEL assay). Finally, siRNA treatment specific for ALR in human-derived glioma cells [125] demonstrated an elevation of the number of apoptotic cells measured by cytofluorimetric analysis. The analysis of the effects of ALR in the three different cell systems (neuroblastoma cells, hepatocytes and glioma cells) pointed to the direction of a significant anti-apoptotic role of ALR in all cases.

Further analysis aimed at a more detailed molecular understanding of this phenomenon. Specifically, the mRNA levels of inducer/inhibitor molecules of the apoptotic process were measured. As it was already known that the ratio of the expression levels of *bcl2* and *bax* genes triggers apoptosis after H₂O₂ treatment these levels were examined in SHSY-5Y cells upon incubation with ALR [123]. The result was that these levels were restored back to their physiological values. However, a different result was obtained in the case of siRNA/ALR-treated glioma cells: in this case, *bcl2* expression was down-regulated, without any concomitant measurable variation of the expression of *bax* gene. In parallel, an activation of caspase-3 and caspase-9 gene was reported [125]. In the third cellular model (hepatocytes), a decreased expression of apoptotic genes was observed upon Alrp treatment of cells for 24 and 48 h after hepatectomy in rats, with an observed increase of *bcl2* expression [124].

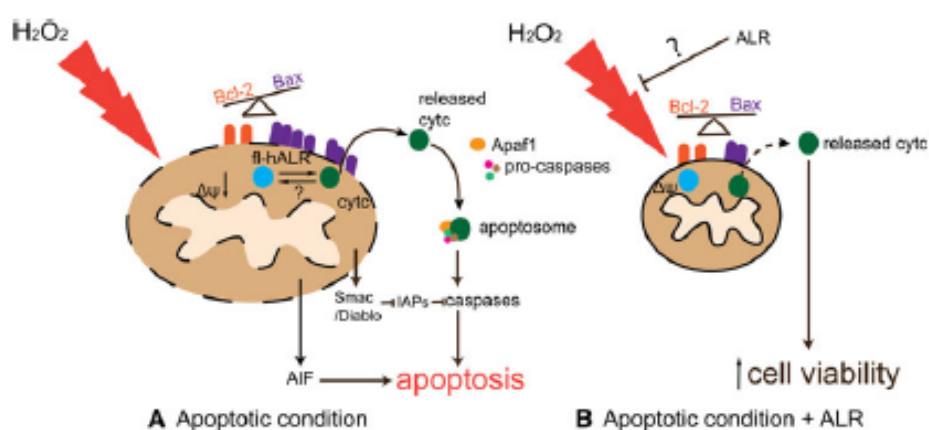


Fig. 2 Schematic representation of a mitochondrion from a neuronal cell under apoptotic conditions (H_2O_2 treatment), in the presence or absence of ALR. **a** Treatment of neuronal cells with hydrogen peroxide leads to Bcl-2 downregulation, mitochondrial membrane potential reduction and release in the cytosol of cyt *c*, Smac/Diablo and AIF (all of them proteins involved in apoptosis). The role of ALR

and its interaction with cyt *c* in this scenario (apoptosis) is not yet understood. **b** Mitochondrion of neuronal cell after H_2O_2 treatment and ALR administration extracellularly. Cyt *c* release is decreased, Bcl-2 and Bax ratio and mitochondrial membrane potential are restored and viable cells are increased in number

As a further independent measure of apoptotic behavior the mitochondrial ultrastructure was examined using electron microscopy. A very significant recovery of the normal mitochondria ultrastructure, integrity and network was observed upon addition of ALR in SHSY-5Y cells suggesting a clear protective effect of ALR on mitochondrial swelling as well [123].

Finally, the release of cyt *c* is a landmark event for the intrinsic apoptotic pathway and is related to the integrity of the mitochondrial membranes [105]. It would therefore be conceivable that ALR would also affect the release of cyt *c*. This was in fact assessed directly by measuring the amounts of cyt *c* release in the medium of SHSY-5Y cells undergoing oxidative stress either in the presence or absence of ALR [123]. The result was a decrease in the order of 30 % in the amount of cyt *c* released in the medium when the cells were incubated with ALR. This evidence corroborated the concept that ALR may have an important anti-apoptotic role in cells undergoing oxidative stress. In this respect, the previously reported results on the molecular and physical interactions between ALR and cyt *c* in the IMS of mitochondria are of particular relevance. In more general terms, the links between ALR and mitochondria function have been observed also in rat liver where ALR administration resulted to increased oxygen consumption and ATP production (Fig. 2).

Future Outlook

Rapid progress in the last several years has identified a stunning variety of different translocation machineries that

are required for the correct targeting and sorting of the vast majority of mitochondrial proteins. The discovery of the redox-controlled MIA/Erv1 pathway in the mitochondrial intermembrane space (the only one that is linked to a covalent chemical modification of the translocated precursor via the formation of intramolecular disulfide bridges) has opened up the possibility that this pathway may be affected by the redox state of the cell. This is particularly important in mammalian cells where redox homeostasis is tightly controlled and redox imbalance has been linked to cell damage and apoptosis. The emerging role of ALR as an important protective factor under conditions of oxidative stress suggests there may be unexplored links between the process of mitochondria biogenesis and protection against oxidative stress. In more general terms, fine tuning of redox homeostasis may involve a dynamic interplay (and/or different compartmentalisation upon different conditions) between mitochondrial and cytosolic factors. The process of mitochondrial biogenesis itself, particularly in neuronal cells, may turn out to be tightly integrated with several metabolic and redox signaling cues. Future work in this direction will provide important new insight in dissecting the molecular mechanisms of neuronal degeneration and apoptosis.

Acknowledgments This work was supported by funds from IMBB-FORTH, the University of Crete, the European Union (European Social Fund—ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF)—Research Funding Program: THALES and the Greek General Secretariat for Research and Technology Program ARISTEIA.

References

- Margulis L (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol* 29:21–38
- Margulis L, Bermudes D (1985) Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* 1:101–124
- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283(5407):1476–1481
- Martin W, Dagan T, Koonin EV, Dipippo JL, Gogarten JP, Lake JA (2007) The evolution of eukaryotes. *Science* 316(5824):542–543. doi:10.1126/science.316.5824.542c (author reply 542–543)
- Pfanner N, Geissler A (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(5):339–349. doi:10.1038/35073006
- Attardi G, Schatz G (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4:289–333. doi:10.1146/annurev.cb.04.110188.001445
- Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W (1989) Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 988(1):1–45
- Schatz G, Mason TL (1974) The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Annu Rev Biochem* 43:51–87. doi:10.1146/annurev.bi.43.070174.000411
- Neupert W, Schatz G (1981) How proteins are transported into mitochondria. *Trends Biochem Sci* 6:1–4. doi:10.1016/0968-0004(81)90002-5
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66:863–917. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.863
- Hoogenraad NJ, Ryan MT (2001) Translocation of proteins into mitochondria. *IUBMB Life* 51(6):345–350. doi:10.1080/152165401753366096
- Leonard JV, Schapira AH (2000) Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* 355(9201):389–394
- Herrmann JM, Neupert W (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* 55(4–5):219–225. doi:10.1080/1521654031000123349
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138(4):628–644. doi:10.1016/j.cell.2009.08.005
- Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:723–749. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409
- Lill R, Muhlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77:669–700. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.162653
- Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, Pfanner N (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395(6701):516–521. doi:10.1038/26780
- Wiedemann N, Truscott KN, Pfannschmidt S, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N (2004) Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J Biol Chem* 279(18):18188–18194. doi:10.1074/jbc.M400050200
- Becker T, Vogtle FN, Stojanovski D, Meisinger C (2008) Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1777(7–8):557–563. doi:10.1016/j.bbabi.2008.03.017
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9(1):42–49. doi:10.1038/sj.embor.7401126
- Popov-Celeketic J, Waizenegger T, Rapaport D (2008) Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* 376(3):671–680. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.006
- Becker T, Pfannschmidt S, Guiard B, Stojanovski D, Milenkovic D, Kutik S, Pfanner N, Meisinger C, Wiedemann N (2008) Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *J Biol Chem* 283(1):120–127. doi:10.1074/jbc.M706997200
- Hulett JM, Laeder F, Chan NC, Perry AJ, Wolyneec P, Likic VA, Gooley PR, Lithgow T (2008) The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex. *J Mol Biol* 376(3):694–704. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.021
- Becker T, Wenz LS, Kruger V, Lehmann W, Muller JM, Goroncy L, Zufall N, Lithgow T, Guiard B, Chacinska A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N (2011) The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. *J Cell Biol* 194(3):387–395. doi:10.1083/jcb.201102044
- Papic D, Krumpal K, Dukanovic J, Dimmer KS, Rapaport D (2011) Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugol follows a unique Mim1-dependent import pathway. *J Cell Biol* 194(3):397–405. doi:10.1083/jcb.201102041
- Becker T, Bottinger L, Pfanner N (2012) Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem Sci* 37(3):85–91. doi:10.1016/j.tibs.2011.11.004
- Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, Eyrich B, Zahedi RP, Stojanovski D, Schonfisch B, Guiard B, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* 144(2):227–239. doi:10.1016/j.cell.2010.12.015
- Rao S, Gerbeth C, Harbauer A, Mikropoulou D, Meisinger C, Schmidt O (2011) Signaling at the gate: phosphorylation of the mitochondrial protein import machinery. *Cell Cycle* 10(13):2083–2090
- Rao S, Schmidt O, Harbauer AB, Schonfisch B, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C (2012) Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import. *Mol Biol Cell* 23(9):1618–1627. doi:10.1091/mbc.E11-11-0933
- Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313(5785):314–318. doi:10.1126/science.1127895
- Brix J, Rudiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J, Pfanner N (1999) Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem* 274(23):16522–16530
- Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112(1):41–50
- Paschen SA, Neupert W (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* 52(3–5):101–112. doi:10.1080/15216540152845894
- Tokatlidis K, Vial S, Luciano P, Vergnolle M, Clemence S (2000) Membrane protein import in yeast mitochondria. *Biochem Soc Trans* 28(4):495–499
- Alder NN, Jensen RE, Johnson AE (2008) Fluorescence mapping of mitochondrial TIM23 complex reveals a water-facing, substrate-interacting helix surface. *Cell* 134(3):439–450. doi:10.1016/j.cell.2008.06.007

36. Abe Y, Shodai T, Muto T, Mihara K, Torii H, Nishikawa S, Endo T, Kohda D (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100(5):551–560
37. Hawlitschek G, Schneider H, Schmidt B, Tropschug M, Hartl FU, Neupert W (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53(5):795–806
38. Nelson N, Schatz G (1979) Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4365–4369
39. de Marcos-Lousa C, Sideris DP, Tokatlidis K (2006) Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem Sci* 31(5):259–267. doi:10.1016/j.tibs.2006.03.006
40. Koehler CM, Tienson HL (2009) Redox regulation of protein folding in the mitochondrial intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* 1793(1):139–145. doi:10.1016/j.bbamer.2008.08.002
41. Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuan Szklarczyk LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J* 23(19):3735–3746. doi:10.1038/sj.emboj.7600389
42. Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S, Hallberg RL, Schatz G (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69(5):809–822
43. Galh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592(1):63–77
44. Naoe M, Ohwa Y, Ishikawa D, Ohshima C, Nishikawa S, Yamamoto H, Endo T (2004) Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 279(46):47815–47821. doi:10.1074/jbc.M410272200
45. Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Molranjac D, Mesecke N, Neupert W, Herrmann JM, Hell K (2005) Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett* 579(1):179–184. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.072
46. Lisowsky T (1992) Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 232(1):58–64
47. Allen JW, Ferguson SJ, Ginger ML (2008) Distinctive biochemistry in the trypanosome mitochondrial intermembrane space suggests a model for stepwise evolution of the MIA pathway for import of cysteine-rich proteins. *FEBS Lett* 582(19):2817–2825. doi:10.1016/j.febslet.2008.07.015
48. Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Martinelli M, Sideris DP, Katrakili N, Tokatlidis K (2009) MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol* 16(2):198–206. doi:10.1038/nsm.1553
49. Milenkovic D, Ramming T, Muller JM, Wenz LS, Gebert N, Schulze-Specking A, Stojanovski D, Rospert S, Chacinska A (2009) Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell* 20(10):2530–2539. doi:10.1091/mbc.E08-11-1108
50. Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, Mikropoulou D, Gallo A, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Tokatlidis K (2009) A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol* 187(7):1007–1022. doi:10.1083/jcb.200905134
51. Lu H, Allen S, Wardleworth L, Savory P, Tokatlidis K (2004) Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J Biol Chem* 279(18):18952–18958. doi:10.1074/jbc.M313045200
52. Gabriel K, Milenkovic D, Chacinska A, Muller J, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C (2007) Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol* 365(3):612–620. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.038
53. Longen S, Bien M, Bihlmaier K, Kloeppe C, Kauff F, Hammermeister M, Westermann B, Herrmann JM, Riemer J (2009) Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *J Mol Biol* 393(2):356–368. doi:10.1016/j.jmb.2009.08.041
54. Bien M, Longen S, Wagener N, Chwalla I, Herrmann JM, Riemer J (2010) Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Mol Cell* 37(4):516–528. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.017
55. Terziyska N, Grumt B, Bien M, Neupert W, Herrmann JM, Hell K (2007) The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett* 581(6):1098–1102. doi:10.1016/j.febslet.2007.02.014
56. Kawamata H, Manfredi G (2008) Different regulation of wild-type and mutant Cu, Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria. *Hum Mol Genet* 17(21):3303–3317. doi:10.1093/hmg/ddn226
57. Horn D, Al-Ali H, Barrientos A (2008) Cmc1p is a conserved mitochondrial twin CX9C protein involved in cytochrome c oxidase biogenesis. *Mol Cell Biol* 28(13):4354–4364. doi:10.1128/MCB.01920-07
58. Darshi M, Trinh KN, Murphy AN, Taylor SS (2012) Targeting and import mechanism of coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 (ChChd3) into the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 287(47):39480–39491. doi:10.1074/jbc.M112.387696
59. Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, Shimonishi M, Porter KA, Starzl TE (1994) Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17):8142–8146
60. Lisowsky T (1994) ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 26(1):15–20
61. Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* 2(8):715–720. doi:10.1093/embo-reports/kve161
62. Becher D, Kricke J, Stein G, Lisowsky T (1999) A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast* 15(12):1171–1181. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199909)15:12<1171::AID-YEA443>3.0.CO;2-T
63. Di Fonzo A, Ronchi D, Lodi T, Fassone E, Tigano M, Lamperti C, Corti S, Bordini A, Fortunato F, Nizzardo M, Napoli L, Donadoni C, Salani S, Saladino F, Moggio M, Bresolin N, Ferrero I, Comi GP (2009) The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency. *Am J Hum Genet* 84(5):594–604. doi:10.1016/j.ajhg.2009.04.004
64. Daitankar VN, Schaefer SA, Dong M, Bahnson BJ, Thorpe C (2010) Structure of the human sulfhydryl oxidase augmentin of liver regeneration and characterization of a human mutation causing an autosomal recessive myopathy. *Biochemistry* 49(31):6737–6745. doi:10.1021/bi100912m
65. Stolzsteiner ME, Dobryzn A, Pikula S, Tylki-Szymanska A, Bandorowicz-Pikula J (2012) Impaired dynamics of the late endosome/lysosome compartment in human Niemann-Pick type

- C skin fibroblasts carrying mutation in NPC1 gene. *Mol Biosyst* 8(4):1197–1205. doi:10.1039/c2mb05447g
66. Wu CK, Dailey TA, Dailey HA, Wang BC, Rose JP (2003) The crystal structure of augmenter of liver regeneration: a mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase. *Protein Sci* 12(5):1109–1118. doi:10.1110/ps.0238103
 67. Vitu E, Bentzur M, Lisowsky T, Kaiser CA, Fass D (2006) Gain of function in an ERV/ALR sulfhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide. *J Mol Biol* 362(1):89–101. doi:10.1016/j.jmb.2006.06.070
 68. Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Kallergi E, Lionaki E, Pozidis C, Tokatlidis K (2011) Molecular recognition and substrate mimicry drive the electron-transfer process between Mia40 and ALR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12):4811–4816. doi:10.1073/pnas.1014542108
 69. Guo PC, Ma JD, Jiang YL, Wang SJ, Bao ZZ, Yu XI, Chen Y, Zhou CZ (2012) Structure of yeast sulfhydryl oxidase erv1 reveals electron transfer of the disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 287(42):34961–34969. doi:10.1074/jbc.M112.394759
 70. Ang SK, Lu H (2009) Deciphering structural and functional roles of individual disulfide bonds of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p. *J Biol Chem* 284(42):28754–28761. doi:10.1074/jbc.M109.021113
 71. Hofhaus G, Lee JE, Tews I, Rosenberg B, Lisowsky T (2003) The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre. *Eur J Biochem* 270(7):1528–1535
 72. Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Felli IC, Gallo A, Pavelkova A, Kallergi E, Andreadaki M, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K (2013) An intrinsically disordered domain has a dual function coupled to compartment-dependent redox control. *J Mol Biol* 425(3):594–608. doi:10.1016/j.jmb.2012.11.032
 73. Levitan A, Danon A, Lisowsky T (2004) Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *J Biol Chem* 279(19):20002–20008. doi:10.1074/jbc.M312877200
 74. Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T (2000) Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett* 477(1–2):62–66
 75. Tienson HL, Dabir DV, Neal SE, Loo R, Hasson SA, Boontheung P, Kim SK, Loo JA, Koehler CM (2009) Reconstitution of the mia40–erv1 oxidative folding pathway for the small tim proteins. *Mol Biol Cell* 20(15):3481–3490. doi:10.1091/mbc.E08-10-1062
 76. Kallergi E, Andreadaki M, Kritsiligkou P, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K, Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Peruzzini R (2012) Targeting and maturation of Erv1/ALR in the mitochondrial intermembrane space. *ACS Chem Biol* 7(4):707–714. doi:10.1021/ct200485b
 77. Kurz M, Martin H, Rassow J, Pfanner N, Ryan MT (1999) Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol Biol Cell* 10(7):2461–2474
 78. Milenkovic D, Gabriel K, Guiard B, Schulze-Specking A, Pfanner N, Chacinska A (2007) Biogenesis of the essential Tim9–Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem* 282(31):22472–22480. doi:10.1074/jbc.M703294200
 79. Sideris DP, Tokatlidis K (2007) Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. *Mol Microbiol* 65(5):1360–1373. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05880.x
 80. Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121(7):1059–1069. doi:10.1016/j.cell.2005.04.011
 81. Riemer J, Fischer M, Herrmann JM (2011) Oxidation-driven protein import into mitochondria: insights and blind spots. *Biochim Biophys Acta* 1808(3):981–989. doi:10.1016/j.bbame.2010.06.003
 82. Lutz T, Neupert W, Herrmann JM (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J* 22(17):4400–4408. doi:10.1093/emboj/cdg421
 83. Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Tokatlidis K (2012) An electron-transfer path through an extended disulfide relay system: the case of the redox protein ALR. *J Am Chem Soc* 134(3):1442–1445. doi:10.1021/ja209881f
 84. Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, Tokatlidis K (2005) Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol* 353(5):937–944. doi:10.1016/j.jmb.2005.08.049
 85. Farrell SR, Thorpe C (2005) Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry* 44(5):1532–1541. doi:10.1021/b0479555
 86. Dabir DV, Leverich EP, Kim SK, Tsai FD, Hirasawa M, Kraff DB, Koehler CM (2007) A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *EMBO J* 26(23):4801–4811. doi:10.1038/sj.emboj.7601909
 87. Jezek P, Plecita-Hlavata L (2009) Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int J Biochem Cell Biol* 41(10):1790–1804. doi:10.1016/j.biocel.2009.02.014
 88. Herrmann JM, Riemer J (2012) Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space. *J Biol Chem* 287(7):4426–4433. doi:10.1074/jbc.R111.270678
 89. Jezek P, Plecita-Hlavata L, Smolkova K, Rossignol R (2010) Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. *Int J Biochem Cell Biol* 42(5):604–622. doi:10.1016/j.biocel.2009.11.008
 90. Stojanovski D, Milenkovic D, Müller JM, Gabriel K, Schulze-Specking A, Baker MJ, Ryan MT, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A (2008) Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase. *J Cell Biol* 183(2):195–202. doi:10.1083/jcb.200804095
 91. Bottinger L, Gornicka A, Czerwik T, Bragoszewski P, Loniowska-Lwowska A, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Milenkovic D, Chacinska A (2012) In vivo evidence for cooperation of Mia40 and Erv1 in the oxidation of mitochondrial proteins. *Mol Biol Cell* 23(20):3957–3969. doi:10.1091/mbc.E12-05-0358
 92. Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S (2006) Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function. *World J Gastroenterol* 12(31):4951–4958
 93. LaBrecque DR, Pesch LA (1975) Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. *J Physiol* 248(2):273–284
 94. Chen X, Zhang DY, Liu X, Wei GH (2007) Expression of augmenter of liver regeneration in cryptorchidism spermatogenic cells and its implication. *Zhonghua Nan Ke Xue* 13(8):700–705
 95. Yu HY, Xiang DR, Huang HJ, Li J, Sheng JF (2010) Expression level of augmenter of liver regeneration in patients with hepatic failure and hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 9(5):492–498
 96. Todd LR, Damin MN, Gomathinayagam R, Horn SR, Means AR, Sankar U (2010) Growth factor erv1-like modulates Drp1 to

- preserve mitochondrial dynamics and function in mouse embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 21(7):1225–1236. doi:10.1091/mbc.E09-11-0937
97. Chan PH (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27(6):1124–1129
 98. Zhang L, Zhao B, Yew DT, Kusiak JW, Roth GS (1997) Processing of Alzheimer's amyloid precursor protein during H₂O₂-induced apoptosis in human neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 235(3):845–848. doi:10.1006/bbrc.1997.6698
 99. Cassarino DS, Bennett JP Jr (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 29(1):1–25
 100. Martin LJ (2010) Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 3(4):839–915. doi:10.3390/ph3040839
 101. Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2(9):647–656. doi:10.1038/nrc883
 102. Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1):47–59. doi:10.1038/nrm2308
 103. Wolf BB, Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274(29):20049–20052
 104. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G (2000) The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 113(Pt 10):1661–1670
 105. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1):147–157
 106. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379(6563):349–353. doi:10.1038/379349a0
 107. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277(1):432–438. doi:10.1074/jbc.M109721200
 108. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770–776. doi:10.1038/35037710
 109. Martin LJ (2006) Mitochondriopathy in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(12):1103–1110. doi:10.1097/01.jnen.0000248541.05552.e4
 110. Beal MF (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366(1–2):211–223
 111. Schapira AH (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta* 1366(1–2):225–233
 112. Emerit I, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58(1):39–46
 113. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E (2012) Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci* 322(1–2):254–262. doi:10.1016/j.jns.2012.05.030
 114. Koopman WI, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH (2013) OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J* 32(1):9–29. doi:10.1038/emboj.2012.300
 115. Perez-Pinzon MA, Stetler RA, Fiskum G (2012) Novel mitochondrial targets for neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(7):1362–1376. doi:10.1038/jcbfm.2012.32
 116. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14(8):1505–1517. doi:10.1089/ars.2010.3576
 117. Greco T, Fiskum G (2010) Neuroprotection through stimulation of mitochondrial antioxidant protein expression. *J Alzheimers Dis* 20(Suppl 2):S427–S437. doi:10.3233/JAD-2010-100519
 118. Zhang L, Yu H, Sun Y, Lin X, Chen B, Tan C, Cao G, Wang Z (2007) Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol* 564(1–3):18–25. doi:10.1016/j.ejphar.2007.01.089
 119. Chetsawang B, Putthaprasart C, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P (2006) Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *J Pineal Res* 41(2):116–123. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00335.x
 120. Zhao DL, Zou LB, Lin S, Shi JG, Zhu HB (2007) Anti-apoptotic effect of esculin on dopamine-induced cytotoxicity in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neuropharmacology* 53(6):724–732. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.07.017
 121. Thirunavukkarasu C, Wang LF, Harvey SA, Watkins SC, Chaillet JR, Prelich J, Starzl TE, Gandhi CR (2008) Augmenter of liver regeneration: an important intracellular survival factor for hepatocytes. *J Hepatol* 48(4):578–588. doi:10.1016/j.jhep.2007.12.010
 122. Gandhi CR (2012) Augmenter of liver regeneration. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5(1):10. doi:10.1186/1755-1536-5-10
 123. Polimeno L, Pesetti B, Lisowsky T, Iannone F, Resta L, Giorgio F, Mallamaci R, Buttiglione M, Santovito D, Vitiello F, Mancini ME, Francavilla A (2009) Protective effect of augmenter of liver regeneration on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Free Radic Res* 43(9):865–875. doi:10.1080/10715760903100125
 124. Polimeno L, Pesetti B, Annoscia E, Giorgio F, Francavilla R, Lisowsky T, Gentile A, Rossi R, Bucci A, Francavilla A (2011) Alrp, a survival factor that controls the apoptotic process of regenerating liver after partial hepatectomy in rats. *Free Radic Res* 45(5):534–549. doi:10.3109/10715762.2011.555482
 125. Polimeno L, Pesetti B, De Santis F, Resta L, Rossi R, De Palma A, Girardi B, Amoroso A, Francavilla A (2012) Decreased expression of the augmenter of liver regeneration results in increased apoptosis and oxidative damage in human-derived glioma cells. *Cell Death Dis* 3:e289. doi:10.1038/cddis.2012.25