

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΟΥΛΦΥΔΡΙΛΟΞΕΙΔΑΣΗΣ Erv1 ΣΤΟ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ *S. cerevisiae*»**

ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ Γ. ΚΑΛΛΕΡΓΗ

Υπεύθυνος ερευνητής: Κ. ΤΟΚΑΤΛΙΔΗΣ
Υπεύθυνος καθηγητής: Δ. ΚΑΡΔΑΣΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ, 2010

Αφιερωμένο στον πατέρα μου...

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κ. Τοκατλίδη που με δέχτηκε στο εργαστήριό του δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον βιολογικό ερώτημα καθώς και με τις πολλές διαφορετικές βιοχημικές μεθόδους που παρέχει αυτό σε ένα φοιτητή. Είμαι ευγνώμων για την αμέριστη υποστήριξη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής αλλά και για τις συμβουλές του κατά την διάρκεια των πειραμάτων με σκοπό να υιοθετήσω επιστημονική σκέψη. Τον ευχαριστώ πολύ για όλα.

Πολλά ευχαριστώ θέλω να πω και στην κυρία Νίτσα Κατρακύλη για το ενδιαφέρον της και την προθυμία της να μου δώσει απάντηση σε κάθε εύλογη ή μη ερώτηση κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Ευχαριστώ για την συνεργασία που είχαμε στην εκπόνηση πολλών πειραμάτων. Οι συμβουλές της πάνω στα πειράματα αλλά και πέρα από αυτά ήταν πολύτιμες για μένα.

Από καρδιάς ευχαριστώ την Ειρήνη Λιονάκη για τις όμορφες συζητήσεις που είχαμε αυτό τον ένα χρόνο στο εργαστήριο αλλά και την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου παρείχε σχετικά με τα πειράματα και τα ερωτήματα μου για τον επιστημονικό αυτό χώρο. Μου συμπαραστάθηκε πολύ και μου στάθηκε πραγματική φίλη πρόθυμη να συζητήσει μαζί μου κάθε προβληματισμό μου. Δεν θα ξεχάσω ποτέ πόση υπομονή και καλοσύνη μου έδειξε σε κάθε επαφή που είχαμε.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την φίλη μου Χατζή Αφροδίτη που ήταν ο συνοδοιπόρος μου όλο αυτόν τον καιρό. Εκτός από την πειραματική βοήθεια που μου έδωσε όποτε της ζήτησα ήταν πρόθυμη να με ακούσει και να με συμβουλευτεί σε κάθε άλλο προβληματισμό μου και να ανεχθεί την υποτονικότητά μου τις πρωινές ώρες μέχρι να ξεκινήσει η ημέρα. Πολλά πράγματα που είδαμε και ακούσαμε μαζί θα μου θυμίζουν πάντα αυτόν τον όμορφο ένα χρόνο στο εργαστήριο. Είμαι πολύ τυχερή που τη γνώρισα, δεν θα μπορούσα να έχω καλύτερη παρέα!

Πολλά ευχαριστώ και στις φίλες μου Κριτσιλίγκου Παρή, Γαλανού Εύη και Ανδρεαδάκη Μαρία αλλά και τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Τζένη και Νίκο για όλη τους τη βοήθεια, υποστήριξη και συμπράσταση όταν πραγματικά το είχα ανάγκη. Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα παιδιά από τα «διπλανά» εργαστήρια που με έκαναν από την πρώτη στιγμή να νιώσω άνετα μαζί τους και που με βοήθησαν πειραματικά είτε με διευκολύνσεις τεχνικές είτε με συμβουλές.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου Αναστασία, Άρτεμις, Ιωάννα, Μακρίνα, Μαρία, Μανού, Μαίρη και Σοφία που με στηρίζουν και με εμπυχώνουν σε ό, τι και αν κάνω, τη θεία μου Μαρία που πάντα πιστεύει σε μένα και κυρίως τους γονείς μου Γιώργη και Μαρίνα και τις αδερφές μου Μαρία και Αλεξία, που χωρίς την δική τους συμπαράσταση ψυχολογική και μη δεν θα μπορούσα να καταφέρω το ελάχιστο από αυτά που έχω καταφέρει μέχρι τώρα. Προσπαθούν συνεχώς για ό, τι καλύτερο και για αυτό θα τους είμαι πάντα ευγνώμων.

Σας ευχαριστώ όλους για όλα.....:)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ix
ABSTRACT.....	xi
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. ΟΙ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΙ ΔΕΣΜΟΙ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ.....	2
1.1 Εισαγωγή.....	2
1.2 Σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών και παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται.....	2
1.3 Ο ρόλος των δισουλφιδικών δεσμών.....	3
2. ΟΙ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΙ ΔΕΣΜΟΙ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ (IMS) ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ.....	4
2.1 Εισαγωγή.....	4
2.2 Μονοπάτια εισαγωγής και μεταφοράς πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο.....	5
2.2.1 Εισαγωγή.....	5
2.2.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών στη μήτρα του μιτοχονδρίου.....	6
2.2.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου.....	7
2.2.4 Μεταφορά των πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.....	7
2.2.5 Μεταφορά πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.....	8
2.3 Η FAD-εξαρτώμενη σουλφιδρυλοξειδάση Erv1.....	9
2.4 Η οξειδορεδοκτάση Mia40/Tim40.....	10
2.5 Το Mia40-Erv1 μονοπάτι οξείδωσης πρωτεϊνών.....	11
3. ΟΙ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΙ ΔΕΣΜΟΙ ΣΕ ΆΛΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	13
3.1 Εισαγωγή.....	13
3.2 Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο περίπλασμα των βακτηρίων.....	13
3.3 Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο ενδοπλασματικό δίκτυο.....	14
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΟΠΟΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	15
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας.....	19

1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA.....	19
1.2 Κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακούς φορείς.....	19
1.3 Μεταλλαξιγένεση γονιδίων.....	20
2. In organello τεχνικές (Χειρισμός μιτοχονδρίων).....	21
2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από τα στελέχη του σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, GalErn1 και Ern1His.....	21
2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια.....	22
2.3. Είσοδος ραδιοσημασμένου πρόδρομου μορίου σε GalErn1 μιτοχόνδρια σε δύο στάδια.....	23
3. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών.....	24
3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	24
3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE).....	24
3.3 Πέψη των πρωτεϊνών των απομονωμένων ζωνών αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	25
3.4 Ανάλυση μιτοχονδριακών συμπλόκων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης.....	26
3.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.....	27
3.6 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ανοσοαποτύπωση (Western blot).....	28
3.7 Διαλυτοποίηση μιτοχονδρίων και πρόσδεση του Ern1His συμπλόκου σε σφαιρίδια νικελίου Ni-NTA beads (Qiagen).....	29
3.8 Έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια.....	29
3.9 Καθαρισμός πρωτεϊνών.....	30
3.10 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size exclusion chromatography).....	31
3.11 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών Mia40, Ern1 και κυτοχρώματος c σε μιτοχόνδρια αγρίου τύπου	31
3.12 Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών με το in vitro σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης (Coupled Transcription / Translation, T _N T).....	32
4. Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη σακχαρομύκητα.....	33
ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34

1. ΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗΝ ΣΟΥΛΦΥΔΡΙΛΟΞΕΙΔΑΣΗ <i>Ern1</i> ΣΕ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	35
1.1 Εισαγωγή.....	35
1.2 Παραγωγή καθαρών <i>Ern1His</i> μιτοχονδρίων και έλεγχος της έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.....	35
1.3 Δοκιμασία διαφόρων συνθηκών διαλυτοποίησης των μιτοχονδρίων.....	37
1.4 Η πρωτεΐνη <i>Ern1His</i> προσδέεται σε σφαιρίδια νικελίου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.....	40
1.5 Εύρεση συμπλόκου της <i>Ern1His</i> πρωτεΐνης <i>in organello</i> και απομόνωσή του.....	41
1.6 Δοκιμασία διαφόρων ποσοτήτων απορρυπαντικού <i>Triton</i> για την καλύτερη παρατήρηση και απομόνωση του <i>Ern1His</i> συμπλόκου.....	43
1.7 Κοπή ζωνών και ανάλυση αυτών με φασματοσκοπία μάζας.....	44
1.8 Η <i>Mia40</i> και το κυτόχρωμα <i>c</i> δεν εκλούνται από τα σφαιρίδια νικελίου μαζί με της <i>Ern1His</i>	47
1.9 Απομόνωση του <i>Ern1His</i> συμπλόκου με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και πρόσδεσή του σε σφαιρίδια νικελίου.....	48
1.10 Η απομόνωση του συμπλόκου της πρωτεΐνης <i>Ern1</i> φαίνεται να εξαρτάται από τον τύπο του απορρυπαντικού κατά την διαλυτοποίηση των <i>Ern1His</i> μιτοχονδρίων.....	50
2. ΣΧΕΤΙΚΗ ΣΤΟΙΧΕΙΟΜΕΤΡΙΑ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ <i>Ern1</i>, <i>Mia40</i> ΚΑΙ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ C ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ	52
2. 1 Εισαγωγή.....	52
2.2 Η οξειδάση σουλφυδριλίων <i>Ern1</i> εντοπίζεται σε υποστοιχειομετρική ποσότητα συγκριτικά με την οξειδοοδουκτάση <i>Mia40</i> , <i>in vivo</i>	53
3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ <i>Ern1</i> ΚΑΙ <i>Mia40</i> ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ	55
3.1 Εισαγωγή.....	55
3.2 Παραγωγή, υπερέκφραση και καθαρισμός των <i>Ern1</i> και <i>hALR-If C154/165A</i> μεταλλαγμάτων.....	56

3.3 Η αλληλεπίδραση των <i>Ern1</i> και <i>Mia40</i> επηρεάζεται <i>in organello</i> μετά από μεταλλαγή συγκεκριμένων αμινοξέων καθοδικά του CRSC μοτίβου της <i>Ern1</i> ..57	
3.4 Η είσοδος της πρωτεΐνης <i>Ern1</i> δεν επηρεάζεται <i>in organello</i> μετά από μεταλλαγή συγκεκριμένων αμινοξέων καθοδικά του CRSC μοτίβου της <i>Ern1</i> ..59	
4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ hALR-lf C154/176A ΚΑΙ hALR-sf C154/165A ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	61
4.1 Εισαγωγή.....	61
4.2 Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων <i>hALR-lf C154/165A</i> και της <i>hALR-sf C74/85A</i> πρωτεΐνης.....	61
ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το διαμέρισμα μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων που ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος (IMS) φέρει πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς στη δομή τους. Πρόσφατα, ένα σύστημα οξειδοαναγωγής δισουλφιδίων στον διαμεμβρανικό χώρο έχει ταυτοποιηθεί στο οποίο παίζουν σημαντικό ρόλο δύο ζωτικής σημασίας πρωτεΐνες, η σουλφυδριλοξειδάση Erv1 και ο υποδοχέας εισόδου πρωτεϊνών-υποστρωμάτων που ρυθμίζεται οξειδοαναγωγικά, Mia40/Tim40. Αυτό το σύστημα οξειδοαναγωγής, που ονομάζεται Mia40-Erv1 μονοπάτι, οδηγεί την είσοδο πλούσιων σε κυστεΐνες πρωτεϊνών στο IMS των μιτοχονδρίων μέσω ενός μηχανισμού οξειδωτικής αναδίπλωσης.

Στην παρούσα εργασία, στόχος ήταν η εύρεση πιθανών νέων υποστρωμάτων της οξειδάσης σουλφυδριλίων Erv1, η οποία όπως προαναφέρθηκε βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Με την πραγματοποίηση βιοχημικών πειραμάτων, όπως χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και πρόσδεσης της πρωτεΐνης αυτής ως σημασμένη με ιστιδίνες στο καρβοξυτελικό της άκρο, σε σφαιρίδια νικελίου, δείχνουμε ότι το σύμπλοκο το οποίο φαίνεται να απομονώνεται από τα μιτοχόνδρια του στελέχους Erv1His του σακχαρομύκητα είναι μοριακού βάρους περίπου 70kDa. Αυτό το μοριακό βάρος είναι πιθανό να αφορά το διμερές της Erv1 ή κάποιο σύμπλοκο αυτής με μια πρωτεΐνη παρόμοιου μοριακού μεγέθους καθώς από τα πειραματικά δεδομένα δεν φαίνεται να περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Mia40 και κυτόχρωμα c (cytc), δύο πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με την Erv1 πρωτεΐνη. Παράλληλα, έγινε μια προσπάθεια ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών Erv1, Mia40 και κυτόχρωμα c σε μιτοχόνδρια αγρίου τύπου του σακχαρομύκητα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι ενώ το κυτόχρωμα c φαίνεται να βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα ανά mg μιτοχονδρίων συγκριτικά με τις άλλες δύο πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη Mia40 φαίνεται να υπάρχει σε υποστοιχειομετρική ποσότητα συγκριτικά με την πρωτεΐνη Erv1, η οποία είναι γνωστό ότι οξειδώνει την Mia40 ανακυκλώνοντάς την με αυτόν τον τρόπο. Ακόμα, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Erv1 και Mia40 σε δύο στάδια: κατά την είσοδο της πρωτεΐνης Erv1 ως υπόστρωμα της πρωτεΐνης Mia40 και σε ένα δεύτερο στάδιο την αλληλεπίδρασή τους από τη στιγμή

που η Ern1 αναδιπλωθεί στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου και γίνει λειτουργική. Φαίνεται ότι κάποια υδρόφοβα αμινοξέα στη καρβοξυτελική πλευρά του κυστεϊνικού μοτίβου CRSC της αγρίου τύπου Ern1 του σακχαρομύκητα (γ Ern1) είναι σημαντικά για το σχηματισμό του “Mia40-Ern1” μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου ενώ δεν είναι σημαντικά για την είσοδο της πρωτεΐνης αυτής ως υπόστρωμα στο διαμεμβρανικό χώρο και επομένως την αναγνώρισή της από την πρωτεΐνη Mia40. Τέλος, προσπαθήσαμε να δουλέψουμε με το ανθρώπινο ορθόλογο της Ern1, την πρωτεΐνη hALR, η οποία έχει δύο ισομορφές την μεγάλου μήκους (long form, lf) και τη μικρού μήκους (short form, sf). Πολλά από τα εργαλεία δουλειάς για τη μελέτη των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα έχουν στηθεί για την απάντηση πολλών και σημαντικών ερωτημάτων σε αυτό το ετερόλογο σύστημα.

ABSTRACT

The space between the inner and outer membrane of mitochondria, which is called intermembrane space (IMS), possess a number of many and different proteins that have disulfide bonds in their structure. Recently, a disulfide oxidative system in the intermembrane space has been identified in which two proteins, sulfhydryl oxidase Erv1 and the import receptor of proteins-substrates that is redox regulated, Mia40/Tim40 have a crucial role. This redox system, which is called Mia40-Erv1 pathway, drives the import of proteins that are rich in cysteines into IMS of mitochondria through a mechanism of oxidative folding.

In the present study, the aim was the finding of possibly new substrates of sulfhydryl oxidase Erv1, which is located in the intermembrane space of mitochondria of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. By biochemical experiments, like gel filtration and binding of this protein as histidin-tagged at its carboxyl terminal end, on nickel beads, we show that the complex that is appeared to be isolated from the mitochondria of Erv1His strain of yeast has approximately 70kDa molecular weight. This molecular weight may refers to the Erv1 dimer or a complex between Erv1 and a similar molecular weight protein with, as from the experimental data it does not seem to conclude the proteins Mia40 and cytochrome c (cytc), two proteins that interact with Erv1 protein. In parallel, an effort to quantify the proteins Erv1, Mia40 and cytochrome c in wild type mitochondria took place under steady state conditions. The result showed that while cytochrome c seems to appear in a bigger quantity per mg of mitochondria compared to the other two proteins, the protein Mia40 seems to exist in substoichiometric amounts of Erv1, which is known to oxidize Mia40 and therefore recycling it. Moreover, we studied the interaction of the Erv1 and Mia40 in two steps: during the import of Erv1 protein as a substrate of Mia40 protein and in a second way the interaction between them when Erv1 has been folded into the intermembrane space of yeast mitochondria and has been functional. It seems like some hydrophobic residues that are downstream of the cysteine motif CRSC of wild type Erv1 (yErv1) are very important for the formation of the “Mia40-Erv1” mixed disulfide bonded intermediate while they are not important for the import of this protein as a substrate and therefore for its recognition by Mia40 protein. In the end, we tried to work on human ortholog of Erv1, the protein hALR, that has two isoforms: the long form (lf)

and short form (sf). Many of the tools for the study of these specific proteins in yeast mitochondria are ready to answer many and important questions in this heterologous system.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΟΙ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΙ ΔΕΣΜΟΙ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ

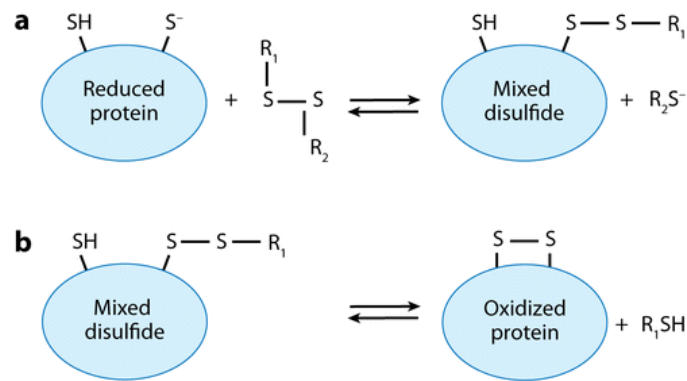
1.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες συντίθενται ως γραμμικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες από τα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και στη συνέχεια αναδιπλώνονται ραγδαία στις μοναδικές τριτοταγής δομές τους. Η πληροφορία που κάνει την εκάστοτε πρωτεΐνη να αποκτά τη σωστή τριτοταγή δομή της, περιέχεται στην πρωτοταγή της δομή, δηλαδή στην αλληλουχία των αμινοξέων της που είναι και μοναδική για κάθε πρωτεΐνη.

Οι περισσότερες εκκρινόμενες πρωτεΐνες τροποποιούνται ομοιοπολικά με το σχηματισμό των σωστών δισουλφιδικών δεσμών στη δομή τους οι οποίοι συμβαίνουν μετα-μεταφραστικά κατά την διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Σε περίπτωση που ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών είναι λανθασμένος, είναι πιθανό να οδηγήσει στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών μορίων από τη δράση κυτταρικών πρωτεασών (Mamathambika & Bardwell, 2008).

1.2 Σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών και παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται

Ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών *in vitro*, συμβαίνει μέσω δύο αντιδράσεων ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίου. Κατά την πρώτη αντίδραση, ένα μικτό δισουλφίδιο σχηματίζεται μεταξύ της πρωτεΐνης που φέρει κυστεΐνες και του εκάστοτε οξειδοαναγωγικού παράγοντα, ενώ στην συνέχεια ακολουθεί η δεύτερη αντίδραση κατά την οποία ενδομοριακά μία δεύτερη θειόλη κυστεΐνης προσβάλλει το μικτό δισουλφίδιο (Εικόνα 1). Δισουλφιδικοί δεσμοί μπορούν να σχηματιστούν και ενδομοριακά όταν μία θειολική ρίζα προσβάλλει ένα δισουλφιδικό δεσμό στην ίδια πρωτεΐνη με αποτέλεσμα να συμβεί ανακατάταξη των δισουλφιδικών δεσμών (disulfide reshuffling). Όμως, ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών εκτός από την παρουσία κυστεϊνικών καταλοίπων εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως είναι: η συγκέντρωση της θειολικής ρίζας στο χώρο, η προσβασιμότητα, η γειτνίαση και η αντιδραστικότητα μεταξύ των θειολομάδων και των δισουλφιδικών δεσμών.



Εικόνα 1: Ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου μεταξύ μιας πρωτεΐνης και ενός οξειδοαναγωγικού παράγοντα. α. Σε πρώτο στάδιο το θειολικό ανιόν (S^-), που σχηματίζεται από αποπρωτονίωση μιας ελεύθερης θειόλης της πρωτεΐνης, σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με τον οξειδοαναγωγικό παράγοντα. β. Σε δεύτερο στάδιο ακολουθεί ο σχηματισμός του δισουλφιδικού δεσμού στην πρωτεΐνη με αποτέλεσμα αυτή να οξειδωθεί (Mamathambika & Bardwell, 2008).

1.3 Ο ρόλος των δισουλφιδικών δεσμών

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι πολύ σημαντικοί καθώς ευθύνονται, εκτός από την διαδικασία σωστής πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, για την σταθερότητά και τη σωστή λειτουργία των πρωτεϊνικών μορίων. Συγκεκριμένα, βοηθούν την σταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης, καθώς μειώνουν την εντροπία της μη αναδιπλωμένης μορφής της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να ευνοείται η αναδιπλωμένη μορφή (Thornton, 1981). Πέρα όμως από το γεγονός ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί σταθεροποιούν τη δομή των πρωτεϊνών, κάποιοι δισουλφιδικοί δεσμοί έχουν και έναν επιπρόσθετο λειτουργικό ρόλο. Με αυτόν τον τρόπο, τα δισουλφίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε καταλυτικά δισουλφίδια, που μπορούν να βρεθούν στο ενεργό κέντρο ενζύμων και να υποκινήσουν ανταλλαγή δισουλφιδίων και αλλοστερικά δισουλφίδια, τα οποία ρυθμίζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης χωρίς ενζυμική μεσολάβηση, αλλάζοντας την πρωτεϊνική δομή (Hogg, 2003; Schmidt *et al.*, 2006).

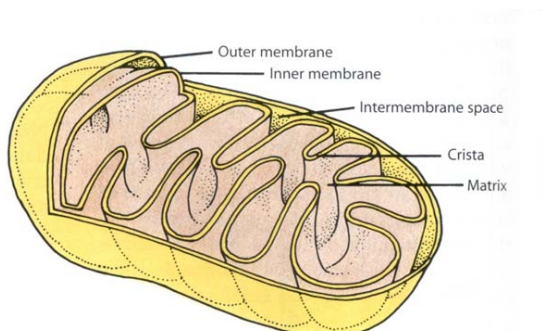
2. ΟΙ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΙ ΔΕΣΜΟΙ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ (IMS) ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντικά κυτταρικά οργανίδια, καθώς όντας μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα, είναι οι μηχανές παραγωγής ενέργειας και είναι υπεύθυνα για την διεκπεραίωση πολύ σημαντικών διεργασιών μέσα στο κύτταρο. Ένζυμα των μιτοχονδρίων λαμβάνουν μέρος σε πολύ σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού τα οποία αποδίδουν ενέργεια.

Η υπόθεση σχετικά με την προέλευση των μιτοχονδρίων αναφέρει ότι τα μιτοχόνδρια προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, οργανισμούς δηλαδή που δε διαθέτουν πυρήνα, οι οποίοι στην πορεία της εξέλιξης ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά. Κατά την ενδοσυμβίωση αυτή, τα περισσότερα γονίδια από το πρόγονο μιτοχόνδριο μεταφέρθηκαν στον πυρήνα για αυτό και αναπτύχθηκαν πολλά μονοπάτια στόχευσης και μεταφοράς πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες περιοχές-διαμερίσματα μέσα στο μιτοχόνδριο (Koehler & Tienson, 2009).

Δομικά, τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη (outer membrane, OM) είναι “λεία” ενώ αντίθετα η εσωτερική μεμβράνη (inner membrane, IM) είναι αναδιπλωμένη σχηματίζοντας πολυάριθμες πτυχώσεις (cristae). Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος (intermembrane space, IMS) του μιτοχονδρίου ο οποίος χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών. Τέλος, το εσωτερικό μέρος των μιτοχονδρίων ονομάζεται μήτρα (matrix), και είναι και αυτό ένα υδάτινο διαμέρισμα, που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του μιτοχονδρίου και η διαμερισματοποίησή του (<http://www.tutorvista.com/biology/eukaryotic-cell-mitochondria>)

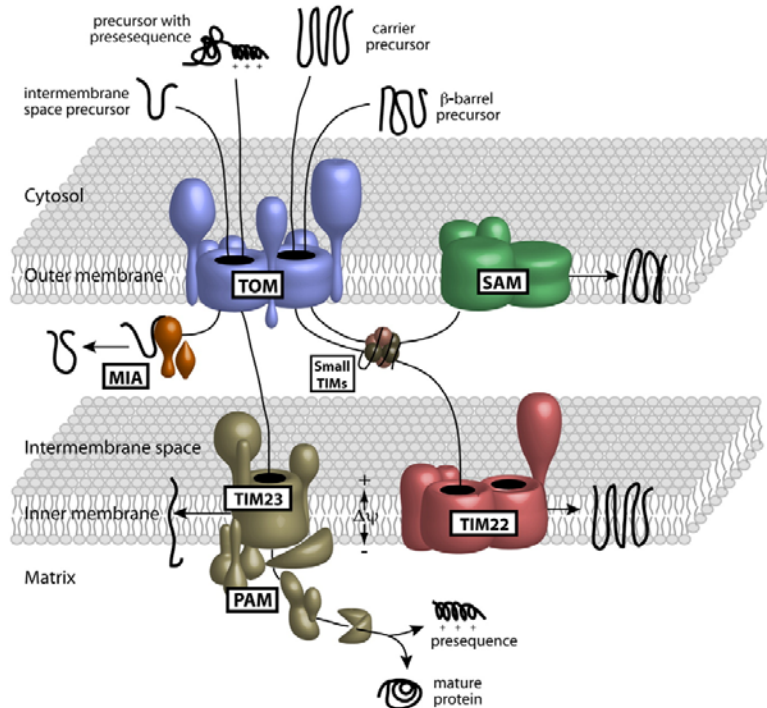
Η παρουσία δισουλφιδικών δεσμών στο IMS δεν ήταν αναμενόμενη επειδή αυτό βρίσκεται σε ισορροπία με το αναγωγικό κυτταρόπλασμα λόγω διάχυσης μορίων μοριακού βάρους μικρότερου των 5kDa μέσω των πορινών. Παρόλα αυτά, πολλά δεδομένα υποστηρίζουν πως οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες που έχει το IMS είναι διαφορετικές από αυτές του κυτταροπλάσματος και ότι ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών στο IMS είναι μια συνήθης αρχή (Stojanovski *et al.*, 2008). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι παρόντες σε πολλές πρωτεΐνες που εντοπίζονται μέσα ή προβάλλονται προς το IMS.

2.2 Μονοπάτια εισαγωγής και μεταφοράς πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο

2.2.1 Εισαγωγή

Στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα υπάρχουν περίπου 1000 πρωτεΐνες (Sickmann *et al.*, 2003) από τις οποίες μόνο λίγες κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου και συντίθενται στα ριβοσώματα της μήτρας των μιτοχονδρίων, ενώ αντίθετα περίπου το 99% των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από τα γονίδια του πυρήνα και συντίθενται ως πρόδρομα μόρια (precursors) σε ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος.

Για να διεκπεραιώσουν τις πολλαπλές τους λειτουργίες, τα διάφορα διαμερίσματα των μιτοχονδρίων περιέχουν ειδικές ομάδες πρωτεϊνών. Με αυτόν τον τρόπο, οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες πρέπει να μεταφερθούν από το σημείο παραγωγής τους στο σωστό διαμέρισμα όπου θα δράσουν ακολουθούμενες από αναδίπλωσή τους στις σωστές διαμορφώσεις τους. Από τη στιγμή όμως που το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί λίγες πρωτεΐνες, περίπου όλες οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως εισέρχονται στα διαφορετικά διαμερίσματα του μιτοχονδρίου. Οι εισαγμένες πλέον πρωτεΐνες περιέχουν διακριτά σήματα στόχευσης και χρησιμοποιούν ειδικά μονοπάτια μεταφοράς για να φτάσουν στο κατάλληλο διαμέρισμα μέσα στο μιτοχόνδριο.



Εικόνα 3: Είσοδος των πρωτεϊνών και ταξινόμησή τους μέσα στο μιτοχόνδριο. Τα πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν τελικά να στοχευθούν στην εσωτερική μεμβράνη, στην εξωτερική μεμβράνη, στο διαμεμβρανικό χώρο ή στην μιτοχονδριακή μήτρα (Becker *et al.*, 2008).

Τα πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια του κυτταροπλάσματος αναγνωρίζονται από υποδοχείς που υπάρχουν στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου και εισέρχονται από τη γενική πύλη εισόδου της εξωτερικής μεμβράνης, το σύμπλοκο TOM (Translocase of the Outer Membrane). Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα μονοπάτια εισαγωγής πρωτεϊνών (Εικόνα 3) που περιέχουν διακριτά σήματα στόχευσης, οι οποίες ακολουθώντας τελικά αυτά τα διαφορετικά μονοπάτια εισόδου καταλήγουν στην μήτρα, στην εσωτερική μεμβράνη, στην εξωτερική μεμβράνη ή στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, με μια πιο ειδική μηχανή ταξινόμησης των πρωτεϊνικών μορίων στο σωστό μιτοχονδριακό διαμέρισμα για κάθε διαφορετικό μονοπάτι.

2.2.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών στη μήτρα του μιτοχονδρίου

Οι περισσότερες πρωτεΐνες που στοχεύονται στην μήτρα του μιτοχονδρίου φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο ένα χαρακτηριστικό σινιάλο στόχευσης (presequence) που είναι θετικά φορτισμένο. Τα πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια αρχικά αναγνωρίζονται από την επιφάνεια του μιτοχονδρίου μέσω των υποδοχών του συμπλόκου TOM και στη συνέχεια μεταφέρονται στο σύμπλοκο TIM23 (Translocase of the Inner Membrane) που εδράζεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Από εκεί για την

μεταφορά των πρωτεϊνών διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης χρειάζεται η δράση του συμπλόκου PAM (Presequencetranslocase- Associated import-Motor) που βρίσκεται στην μήτρα, το οποίο απαιτεί την ύπαρξη μεμβρανικού δυναμικού και ATP. Το σύμπλοκο PAM και συγκεκριμένα η mtHsp70 χρησιμοποιεί την υδρόλυση του ATP σαν πηγή ενέργειας για να διευκολύνει την είσοδο των πρωτεϊνών στη μήτρα. Τελικά, το συγκεκριμένο μονοπάτι εισόδου ολοκληρώνεται με την μιτοχονδριακή μεταλλοπρωτεάση MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) η οποία αποκόπτει το σινιάλο στόχευσης από τις πρόδρομες πρωτεΐνες πριν την τελική τους αναδίπλωση στην μιτοχονδριακή μήτρα.

2.2.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου

Οι περισσότερες πρωτεΐνες με πολλαπλά διαμεμβρανικά τμήματα που προορίζονται να καταλήξουν στην εσωτερική μεμβράνη, συνήθως δε συντίθενται με κάποιο τυπικό σήμα στόχευσης που τελικά χρειάζεται να αποκοπεί αλλά η πληροφορία για τη στόχευση βρίσκεται σε διάφορα σημεία μέσα στην ώριμη μορφή της πρωτεΐνης (internal signals). Αυτές οι πρωτεΐνες, με τη βοήθεια των κυτοσολικών μοριακών συνοδών (σαπερονών) μεταφέρονται στο σύμπλοκο TOM από το οποίο περνούν με δομή λούπας και παραδίδονται τελικά στο σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης TIM22 για τη μεταφορά και είσοδό τους στην εσωτερική μεμβράνη. Για να φτάσουν στο σύμπλοκο αυτό και επομένως για τη διάσχιση του διαμεμβρανικού χώρου, προσδέονται στο Tim9-Tim10 σύμπλοκο το οποίο λειτουργεί ως μοριακός συνοδός στον διαμεμβρανικό χώρο. Αυτό το σύμπλοκο οδηγεί τα υδρόφοβα αυτά πρόδρομα μόρια στην εσωτερική μεμβράνη, όπου τελικά, με τη βοήθεια του δυναμικού της, εισάγονται σε αυτή.

2.2.4 Μεταφορά των πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων

Οι πρωτεΐνες που προορίζονται να ενσωματωθούν στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου έχουν συνήθως δομή β-βαρελιού. Αυτές αφού δεσμευτούν από τους υποδοχείς του συμπλόκου TOM εισέρχονται στην εξωτερική μεμβράνη με τη βοήθεια των μικρών Tim πρωτεϊνών οι οποίες οδηγούν τα πρόδρομα αυτά μόρια στο σύμπλοκο SAM (Sorting and Assembly Machinery) της εξωτερικής μεμβράνης. Το σύμπλοκο αυτό τελικά οδηγεί την ενσωμάτωση και τη συναρμολόγησή τους σε

λειτουργικά σύμπλοκα. Σημειώνεται ότι πρόσφατα βρέθηκε ότι τα πρόδρομα μόρια που στοχεύονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου περιέχουν μια συντηρημένη αλληλουχία στο καρβοξυτελικό τους άκρο που αποτελείται από ένα φορτισμένο αμινοξύ, μια γλυκίνη και δύο μεγάλα υδρόφοβα αμινοξέα (xxxRoxGxxHyxHyx) υπεύθυνο για την είσοδο και τοποθέτησή τους στην συγκεκριμένη μεμβράνη (Kutik *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2009).

2.2.5 Μεταφορά πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

Για τις περισσότερες πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου δεν υπάρχει συγκεκριμένη μηχανή εισόδου. Πολλές από αυτές είναι μικρές (~20kDa), περιέχουν κυστεϊνικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στην πρόσδεση συμπαραγόντων (ιόντα μετάλλων, αίμη) ή στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, δε περιέχουν σηματοδοτικές αλληλουχίες που κόβονται, και συντίθενται ως ώριμα πρωτεϊνικά μόρια με σήματα στόχευσης στο εσωτερικό τους (Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 και Tim13). Όλα τα πρόδρομα μόρια του μιτοχονδρίου χρησιμοποιούν το σύμπλοκο TOM για να κινηθούν μέσω της εξωτερικής μεμβράνης έχοντας μια χαλαρή ξεδίπλωτη διαμόρφωση. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι δεν δεσμεύονται από τις τρανσλοκάσες της εσωτερικής μεμβράνης και δεν εξαρτώνται από το μεμβρανικό δυναμικό ή το ATP για να γίνει η μεταφορά τους στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει το μοντέλο παγίδευσης που παγιδεύει και κρατά τις πρωτεΐνες στο συγκεκριμένο διαμέρισμα του μιτοχονδρίου (“trapping model”) μετά την αναδίπλωσή τους.

Τέλος, υπάρχουν πρωτεΐνες που περιέχουν μια αμφιμερή αλληλουχία στόχευσης (bipartite presequence) και εισάγονται μέσω του μονοπατιού διακοπής μεταφοράς (stop-transfer). Οι πρωτεΐνες αυτές, οι οποίες χρησιμοποιούν το μονοπάτι TIM23, υφίστανται δύο διαδοχικά πρωτεολυτικά στάδια ωρίμανσης το ένα στην πλευρά της μήτρας, όπου απομακρύνεται η θετικά φορτισμένη σηματοδοτική αλληλουχία μέσω της πεπτιδάσης της μήτρας MPP, και το άλλο στην πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου. Ως αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η απελευθέρωση της ώριμης μορφής της πρωτεΐνης ως διαλυτή μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο.

2.3 Η FAD-εξαρτώμενη σουλφιδρυλοξειδάση Ern1

Ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών αλλά και η αναγωγή αυτών πραγματοποιείται κυτταρικά από ένζυμα που ονομάζονται σουλφιδρυλοξειδάσες και αναγωγάσες δισουλφιδίων, αντίστοιχα, οι οποίες εμφανίζουν διαφορές στην αλληλουχία και τη δομή τους και γενικά λειτουργούν σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Συγκεκριμένα, όλες οι μέχρι τώρα γνωστές σουλφιδρυλοξειδάσες περιέχουν ένα φλαβινο αδενο δινουκλεοτίδιο (flavin adenine dinucleotide, FAD) ως σημαντικό συστατικό και έχουν ταυτοποιηθεί τόσο στα ζώα (Lisowsky *et al.*, 2001), στα φυτά (Levitan *et al.*, 2004), σε μύκητες (Lee *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2001) αλλά και σε γονιδιώματα ιών (Senkevich *et al.*, 2000). Η οικογένεια των Ern πρωτεϊνών πήρε το όνομά της από την πρωτεΐνη Ern1 (Essential for Respiration and Vegetative growth) η οποία είναι πολύ σημαντική για την βιογένεση των μιτοχονδρίων στο σακχαρομύκητα (Lisowsky, 1992).

Η οξειδάση σουλφιδρυλίων Ern1, είναι μια πολύ σημαντική πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 22kDa, η οποία ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* το 1992 και εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Lisowsky, 1992; Lange *et al.*, 2001). Η σημασία αυτής της πρωτεΐνης, φαίνεται από το γεγονός ότι κύτταρα τα οποία δεν περιέχουν ενεργή Ern1 πρωτεΐνη, εμφανίζουν απώλεια μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Lisowsky, 1994), προβλήματα στην αναπνοή και την ανάπτυξη του κυττάρου. Ακόμα, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν προβλήματα όσον αφορά τη μορφολογία των μιτοχονδρίων και την κατανομή τους στο κύτταρο (Becher *et al.*, 1999) καθώς και προβλήματα στην βιογένεση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που περιέχουν συμπλέγματα σιδήρου-θείου (iron-sulfur cluster) στη δομή τους (Lange *et al.*, 2001). Τέλος, τα κύτταρα όπου δεν φέρουν λειτουργική Ern1 έχουν μειωμένα επίπεδα μικρών πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων όπως είναι οι πρωτεΐνες Tim, Sod1 και Cox17 (Mesecke *et al.*, 2005; Rissler *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2005) επειδή επηρεάζεται η είσοδό τους στο μιτοχόνδριο και άρα ο εντοπισμός τους σε φυσιολογικά επίπεδα στο διαμεμβρανικό χώρο. Σημαντική, επίσης, πληροφορία αποτελεί ότι στα θηλαστικά, το ομόλογο της Ern1, η πρωτεΐνη ALR (Augmenter of Liver Regeneration) έχει περιγραφεί ως ένας παράγοντας που προωθεί την αναγέννηση του συκωτιού μέσω ενός αγνώστου μηχανισμού δράσης (Pawlowski & Jura, 2006) και εντοπίζεται σε δύο ισομορφές μεγάλου μήκους (long form, -lf) και μικρού μήκους (short form, -sf), οι

οποίες εντοπίζονται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, και στο κυτταρόπλασμα και εξωκυττάριο χώρο, αντίστοιχα (Pawlowski & Jura, 2006; Gatzidou *et al.*, 2006).

Η Ern1 πρωτεΐνη περιέχει έξι (6) κυστεϊνικά κατάλοιπα (C30, C33, C130, C133, C159 και C176), όπου τα τέσσερα από αυτά στο σακχαρομύκητα οργανώνονται σε δύο μοτίβα CX₂C (Hofhaus *et al.*, 2003). Τα κυστεϊνικά κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου της συντονίζονται με το μη ομοιοπολικά προσδεδεμένο FAD. Συγκεκριμένα, ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεϊνών C130 και C133 είναι μέρος του οξειδοαναγωγικού κέντρου, ενώ ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεϊνικών καταλοίπων C159 και C176 σταθεροποιεί το χώρο στον οποίο προσδέεται το FAD (FAD-binding domain). Από την άλλη πλευρά, το ζεύγος κυστεϊνών C30-C33 στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης λειτουργεί ως “ζεύγος κίνησης” όπου μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα στο ζεύγος C130-C133, πριν αυτά μεταφερθούν στο FAD (Fass, 2008)

Η δράση της Ern1 πρωτεΐνης ως οξειδάση θειολών έχει δειχθεί *in vitro* για ένα πλήθος τεχνητών υποστρωμάτων όπως λυσοζύμη (Lee, 2000). Παρόλα αυτά, υπάρχει περιορισμένη γνώση όσον αφορά τα φυσιολογικά της υποστρώματα. Επειδή στα στελέχη σακχαρομύκητα που περιέχουν μη λειτουργική Ern1 επηρεάζεται μία ποικιλία μιτοχονδριακών διαδικασιών, προκύπτει ότι η Ern1 ίσως δρα σε υποστρώματα που αφορούν κάθε μια από αυτές τις διαδικασίες και/ή δρα σε γενικότερους παράγοντες που επιδρούν σε πολλές διαδικασίες. Το πρώτο υπόστρωμα για την πρωτεΐνη Ern1 που ταυτοποιήθηκε, ήταν η πρωτεΐνη Mia40/Tim40, από τη στιγμή που είναι και ένας παράγοντας σημαντικός για τη βιογένεση μια ποικιλίας πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Mesecke *et al.*, 2005; Rissler *et al.*, 2005).

2.4 Η οξειδορεδοκτάση Mia40/Tim40

Ο υποδοχέας Mia40/Tim40 (Mitochondrial Import Assembly) είναι σημαντικός για την ζωτικότητα των κυττάρων στον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* (Chacinska *et al.*, 2004; Naoe *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005). Η σημαντικότητα της δράσης της αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι αυτή εντοπίζεται στους ευκαρυώτες από το μύκητα έως τα φυτά και τα ζώα.

Η Mia40, με μοριακό βάρος 40kDa, και τα ομόλογά της βρίσκονται στο διαμεμβρανικό χώρο, είτε ως διαλυτές πρωτεΐνες, είτε ως προσδεδεμένες μέσω του αμινοτελικού τους άκρου στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Hofmann *et al.*, 2005, Chacinska *et al.*, 2004; Naoe *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005). Στους μύκητες, οι πρωτεΐνες συντίθενται ως πρόδρομα μόρια με ένα σήμα στόχευσης στη μιτοχονδριακή μήτρα (MTS) το οποίο ακολουθείται από ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό κομμάτι. Με αυτόν τον τρόπο, οι πρωτεΐνες ακολουθούν το γενικό μονοπάτι μεταφοράς και εισέρχονται στα μιτοχόνδρια μέσω των συμπλόκων TOM και TIM23 εξαρτώμενες από το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης (Neupert & Herrmann, 2007). Το αμινοτελικό κομμάτι στη συνέχεια κόβεται και απομακρύνεται από την πεπτιδάση της μήτρας του μιτοχονδρίου και η πρωτεΐνη καταλήγει στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του υδρόφοβου κομματιού της. Τελικά, η πρωτεΐνη αγκυροβολείται στην εσωτερική μεμβράνη με το μεγαλύτερό της κομμάτι να προεξέχει προς τον διαμεμβρανικό χώρο (Naoe *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005). Παρόλα αυτά, αυτό το κομμάτι δεν είναι σημαντικό για την λειτουργία της Mia40 (Naoe *et al.*, 2004). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι ομόλογα της Mia40 στους ανώτερους ευκαρυώτες δεν έχουν σήματα στόχευσης και υδρόφοβα κομμάτια (Hofmann *et al.*, 2005).

2.5 Το Mia40-Erv1 μονοπάτι οξειδωσης πρωτεϊνών

Μέχρι πρόσφατα το μόνο γνωστό κυτταρικό διαμέρισμα στους ευκαρυώτες στο οποίο τα κυστεϊνικά κατάλοιπα οξειδώνονταν προς σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, ήταν το ενδοπλασματικό δίκτυο. Όμως, τα δεδομένα αυτά άλλαξαν όταν το 2005 ανακαλύφθηκε στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων μία μηχανή οξειδωσης υποστρωμάτων-πρωτεϊνών (Mesecke *et al.*, 2005) που περιλαμβάνει τουλάχιστον τις πρωτεΐνες Erv1 και Mia40 (Rissler *et al.*, 2005; Tokatlidis, 2005).

Τα μέχρι τώρα γνωστά υποστρώματα του Mia40-Erv1 μονοπατιού οξειδωσης πρωτεϊνών μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: α. πρωτεΐνες με διπλό CX₃C μοτίβο και β. πρωτεΐνες με διπλό CX₉C μοτίβο. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μικρές Tim πρωτεΐνες, Tim8, Tim9, Tim12 και Tim13, οι οποίες περιέχουν ένα διπλό CX₃C μοτίβο. Όπως ομολογεί και το όνομά τους, δύο κυστεϊνικά κατάλοιπα χωρίζονται μεταξύ τους από τρία αμινοξέα (Koehler *et al.*, 1999) και οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί στο IMS κατά τη διάρκεια της μεταφοράς

υδρόφοβων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Stojanovski *et al.*, 2008). Ομοίως, η δεύτερη κατηγορία πρωτεϊνών, περιλαμβάνει πρωτεΐνες με ένα διπλό CX₉C μοτίβο στο οποίο δύο κυστεϊνικά κατάλοιπα χωρίζονται το ένα από το άλλο από εννέα αμινοξέα. Η τελευταία αυτή κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως η Cox17, η οποία είναι απαραίτητη για την βιογένεση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Glerum *et al.*, 1996) αλλά και την πρωτεΐνη Mia40, η οποία φέρει στη δομή της ένα τέτοιο μοτίβο. Τα δύο CX_{3,9}C κομμάτια είναι γειτονικά σε αντι-παράλληλες α-έλικες και συνδέονται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς για να σχηματίσουν μια δομή που μοιάζει με φουρκέτα (hairpin-like).

Το σύστημα Mia40-Erv1 λειτουργεί μέσω ανταλλαγής διθειολών-δισουλφιδίων. Η μεταφορά των παραπάνω πλούσιων σε κυστεΐνες πρωτεϊνών κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων γίνεται με τις πρωτεΐνες αυτές να βρίσκονται σε ανηγμένη και ξεδίπλωτη μορφή. Η οξειδωμένη μορφή της Mia40, αναγνωρίζει με ειδικό τρόπο τις πρωτεΐνες-υποστρώματα και τις οξειδώνει με αποτέλεσμα η δομή της από οξειδωμένη να γίνεται τελικά ανηγμένη. Η μεταφορά δισουλφιδικών δεσμών στα υποστρώματα υποκινεί την οξειδωτική αναδίπλωση των πρωτεϊνών αυτών, όπου τα υποστρώματα αυτά όντας οξειδωμένα δεν μπορούν να περάσουν από το σύμπλοκο TOM και να γυρίσουν πίσω στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να παγιδεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο (Tokatlidis, 2005). Για να ξαναγίνει λειτουργική η Mia40 πρέπει να οξειδωθεί ξανά. Αυτή η οξείδωση πραγματοποιείται μέσω της διμερούς Erv1, που όπως προαναφέρθηκε περιέχει FAD. Τα ηλεκτρόνια περνούν στην οξειδωμένη μορφή της πρωτεΐνης αυτής η οποία αφορά το μοτίβο του “ζεύγους κίνησης” κυστεϊνών της, ανάγοντάς την. Από το ζεύγος κίνησης περνούν στο μοτίβο κυστεϊνών του ενεργού κέντρου του άλλου μονομερούς και από εκεί στο γειτονικό FAD του ζεύγους αυτού. Τέλος, τα ηλεκτρόνια περνούν στο οξυγόνο, αφήνοντας την Erv1 σε οξειδωμένη μορφή, προς σχηματισμό H₂O₂ ή εναλλακτικά στο κυτόχρωμα c της αναπνευστικής αλυσίδας προς σχηματισμό νερού. Στην τελευταία περίπτωση, το Mia40-Erv1 μονοπάτι συνδέεται με την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια (Bihlmaier *et al.*, 2007).

3. ΟΙ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟΙ ΔΕΣΜΟΙ ΣΕ ΆΛΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι απαραίτητοι για τη σωστή αναδίπλωση και σταθεροποίηση της δομής πολλών εκκρινόμενων πρωτεϊνών και για αυτό το σκοπό τα κύτταρα διαθέτουν ένζυμα-καταλύτες τα οποία αναλαμβάνουν αυτόν τον ρόλο. Ανεξάρτητα από το ποιο είναι το κυτταρικό διαμέρισμα, η αναγωγή και η οξειδωση δισουλφιδικών δεσμών μεσολαβείται από μια ποικιλία ενζύμων οξειδοαναγωγής θειολομάδων, τα οποία επιτρέπουν τη γρήγορη και αναστρέψιμη ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδικού δεσμού (Collet & Bardwell, 2002; Kadokura *et al.*, 2003; Sevier *et al.*, 2006). Τέτοια ενζυμικά συστήματα υπάρχουν, εκτός από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, τόσο στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτών αλλά και στο περίπλασμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Η βασική αρχή που ισχύει και στα τρία αυτά κυτταρικά διαμερίσματα, περίπλασμα βακτηρίων, ενδοπλασματικό δίκτυο και διαμεμβρανικός χώρος μιτοχονδρίων ευκαρυωτών, περιλαμβάνει ένα ένζυμο που δημιουργεί το δισουλφιδικό δεσμό, ένα μεταφορέα του δισουλφιδικού αυτού δεσμού και πρωτεΐνες υποστρώματα. Σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικό να υπάρχει ένα σύστημα αποδοχής των ηλεκτρονίων όπως είναι η αναπνευστική αλυσίδα και το οξυγόνο (Chacinska *et al.*, 2009).

3.2 Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο περίπλασμα των βακτηρίων

Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως είναι η *E.coli*, πολλές πρωτεΐνες που φέρουν κυστεΐνες μεταφέρονται στο περίπλασμα, στο χώρο που σχηματίζεται μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης των προκαρυωτικών αυτών κυττάρων, όπου η εισαγωγή δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες συμβαίνει μέσω των πρωτεϊνών Dsb (disulfide bond formation). Στο συγκεκριμένο διαμέρισμα των βακτηρίων, συνυπάρχουν δύο μονοπάτια δισουλφιδίων: το οξειδωτικό μονοπάτι των DsbA-DsbB που εισάγει δισουλφιδικούς δεσμούς σε πρωτεϊνικά μόρια και το μονοπάτι ισομερίωσης DsbC-DsbD που ισομεριώνει τους λανθασμένα σχηματιζόμενους δισουλφιδικούς δεσμούς (Bardwell *et al.*, 1991)

Το οξειδωτικό μονοπάτι DsbA-DsbB περιλαμβάνει τις δύο πρωτεΐνες DsbA και DsbB, όπου και οι δύο συμμετέχουν στην δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες-υποστρώματα. Η πρώτη, DsbA, είναι μια διαλυτή περιπλαστική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 21kDa, η οποία εισάγει δισουλφιδικούς δεσμούς στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες-υποστρώματα στο περιπλαστικό χώρο (Bardwell *et al.*, 1991). Η αντίδραση της DsbA με τα υποστρώματά της είναι πολύ ραγδαία με το υπόστρωμα να οξειδώνεται αμέσως αφήνοντας την DsbA σε ανηγμένη μορφή. Η DsbA για να ξαναγίνει λειτουργική και να δράσει ξανά στα υποστρώματά της θα πρέπει να οξειδωθεί ξανά και αυτό συμβαίνει μέσω της δράσης της DsbB πάνω στη DsbA πρωτεΐνη. Το σύστημα ισομερίωσης: DsbC και DsbD. Η ισομερίωση των δισουλφιδικών δεσμών, από την άλλη, γίνεται από τις πρωτεΐνες DsbC και DsbG που είναι διαλυτές. Η πρωτεΐνη DsbC φαίνεται να είναι η πιο σημαντική για την ισομερίωση, αλλά τουλάχιστον για μερικά πρωτεϊνικά υποστρώματα ο ρόλος της DsbC μπορεί να συμπληρωθεί από αυτόν της DsbG (Hiniker & Bardwell, 2004; Bessette *et al.*, 1999) Τέλος, οι DsbC και DsbG πρωτεΐνες δέχονται τα ηλεκτρόνια τους από τη μεμβρανική πρωτεΐνη DsbD, η οποία αλληλεπιδρά με το σύστημα θειορεδοξίνης που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα.

3.3 Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Στο σακχαρομόκητα, εκτός από το σύστημα οξείδωσης Mia40-Erv1, που όπως προαναφέρθηκε λειτουργεί στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, υπάρχει και ένα δεύτερο μονοπάτι οξείδωσης πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στο μονοπάτι αυτό, η πρωτεΐνη PDI (Protein Disulfide Isomerase) εισάγει δισουλφιδικούς δεσμούς σε υποστρώματά της και οξειδώνεται ξανά από την συνδεδεμένη στην μεμβράνη πρωτεΐνη FAD-εξαρτώμενη Ero1 (ER oxidoreductin 1) η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια από τα υποστρώματα στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αν και η Ero1 δεν δείχνει κάποια ομολογία με την πρωτεΐνη Ero1 του ενδοπλασματικού δικτύου και την πρωτεΐνη DsbB των βακτηρίων, υπάρχει η ομόλογη πρωτεΐνη Ero2 που εδρεύει επίσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο η οποία μπορεί να οξειδώνει την πρωτεΐνη PDI (Protein Disulfide Isomerase) (Gerber *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2002). Ακόμα, η Mia40 δεν δείχνει να έχει κάποια ομολογία με τους μεταφορείς δισουλφιδίων PDI του ενδοπλασματικού δικτύου και DsbA των βακτηρίων.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΟΠΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη της πρωτεΐνης Egn1 όσον αφορά την λειτουργία της στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. Συγκεκριμένα, η διατριβή αυτή ξεδιπλώνεται σε τρία πλαίσια: (1) την εύρεση νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν και βρίσκονται σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Egn1 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στο μιτοχόνδριο, (2) τη σχετική στοιχειομετρία των πρωτεϊνών Egn1, Mia40 και κυτοχρώματος c, η οποία καθορίζει την αλληλεπίδραση τους και (3) την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Egn1 και Mia40, κατά την είσοδο αλλά και μετά την είσοδο και αναδίπλωση της πρωτεΐνης Egn1 στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου.

(1) Για την εύρεση νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Egn1 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, εστίασαμε στην απομόνωση της πρωτεΐνης αυτής ως σύμπλοκο με τους πιθανούς νέους παράγοντες που αλληλεπιδρά χρησιμοποιώντας καθαρά μιτοχόνδρια του στελέχους σακχαρομύκητα Egn1His. Για τον εντοπισμό του συμπλόκου Egn1His έγινε διαλυτοποίηση των μιτοχονδρίων αυτών και ηλεκτροφόρηση του υπερκειμένου που προέκυψε σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση του συμπλόκου μετά από πρόσδεσή του σε σφαιρίδια νικελίου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καθώς και μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Επίσης, ελέγχθηκε κατά πόσον αυτό το σύμπλοκο επηρεάζεται από το διαφορετικό ποσοστό και τύπο απορρυπαντικού και τέλος ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες ζωνών που προέκυψαν από ηλεκτροφόρηση υλικού έκλυσης, μετά την πρόσδεση του Egn1His και Egn1 συμπλόκου σε σφαιρίδια νικελίου, κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, με φασματοσκοπία μάζας.

(2) Σε δεύτερο στάδιο υπολογίσαμε στοιχειομετρικά με ημιποσοτική ανοσοαποτύπωση την ποσότητα, ανά mg αγρίου τύπου μιτοχονδρίων, των πρωτεϊνών Egn1, Mia40 και κυτοχρώματος c που συμμετέχουν στο ίδιο οξειδωτικό μονοπάτι Egn1-Mia40 στο διαμεμβρανικό χώρο. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση ειδικών αντισωμάτων για τις συγκεκριμένες τρεις πρωτεΐνες όπου στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageQuant 5.2, καταλήξαμε σε μια πρότυπη καμπύλη των ποσοτήτων των καθαρών αυτών πρωτεϊνών σύμφωνα με τις τιμές των εντάσεων των ζωνών που μας έδωσε το πρόγραμμα. Σύμφωνα με αυτήν την πρότυπη καμπύλη προχωρήσαμε στον υπολογισμό των ποσοτήτων των συγκεκριμένων πρωτεϊνών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες *in vivo* γνωρίζοντας τις τιμές των

εντάσεων των ζωνών που έδωσαν συγκεκριμένες ποσότητες μιτοχονδρίων αγρίου τύπου.

(3) Τέλος, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Ern1 και Mia40 στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου κατά το στάδιο εισόδου της Ern1 σε αυτόν και κατά το στάδιο αλληλεπίδρασής της με τη Mia40 αφού η πρώτη έχει αναδιπλωθεί και είναι λειτουργική στο χώρο αυτό. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε στοχευμένη μεταλλαξιγένεση καθοδικά του CRSC μοτίβου της αγρίου τύπου Ern1 πρωτεΐνης του σακχαρομύκητα το οποίο περιλαμβάνει το κυστεϊνικό ζεύγος κίνησης C30 και C33. Για να ελεγχθεί το αν αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την αναγνώριση της Ern1 από τη Mia40 πραγματοποιήθηκε είσοδος των ραδιενεργών μεταλλαγμάτων καθοδικά του CRSC μοτίβου Ern1 LLQ/A, LLFQ/A και LLF/E σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για τον εντοπισμό του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου “Ern1-Mia40”. Για να ελεγχθεί κατά πόσον αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της Ern1 με τη Mia40, αφού η Ern1 έχει εισαχθεί και αναδιπλωθεί στο διαμεμβρανικό χώρο αρχικά εκφράστηκαν και καθαρίστηκαν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ως ανασυνδυασμένες από βακτήρια για την είσοδό τους σε GalErn1 μιτοχόνδρια. Ακολούθησε η είσοδος ραδιενεργής Mia40 σε αυτά τα μιτοχόνδρια, για το εντοπισμό του παραπάνω μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου “Mia40-Ern1”. Τέλος, ετοιμάσαμε τα εργαλεία με τα οποία το παραπάνω μπορεί να δείχθει και για την hALR-If, μεταλλαγμένη στα αμινοξέα φαινυλαλανίνη (F), τρυπτοφάνη (W) και μεθειονίνη (M) σε γλουταμικό οξύ (E) καθοδικά του CRAC μοτίβου (αντίστοιχου του CRSC της Ern1) σε ένα ετερόλογο σύστημα που είναι αυτό του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας

1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Στην παρούσα εργασία, οι μοριακές τεχνικές έλαβαν χώρα με βάση τα εγχειρίδια του εργαστηρίου: 'Molecular Cloning' (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis) και 'Current Protocols in Molecular Biology' (F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, K. Struhl). Επίσης, για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιήθηκαν επιδεκτικά βακτήρια στελέχους DH5α και κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς, για τις κλωνοποιήσεις των εκάστοτε γονιδίων, της Novagen (pET24, pET16bHisMBPTEV) και Promega (pSP64). Όλες οι κλωνοποιήσεις ελέγχθηκαν είτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είτε με περιοριστική κοπή χρησιμοποιώντας κατάλληλα για αυτό το σκοπό ένζυμα και τελικά με αλληλούχιση του DNA.

1.2 Κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακούς φορείς

Οι κατασκευές των πλασμιδιακών φορέων με το εκάστοτε γονίδιο που έγιναν ήταν οι παρακάτω (Πίνακας 1):

1. Η πλήρους μήκους (long form, -lf) ισομορφή της ανθρώπινης ALR (hALR-lf), αρχικά, πολλαπλασιάστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ως μήτρα την κατασκευή pEGFP-N1 hALR-GFP (δώρο από τον Lisowski) για την κλωνοποίηση του γονιδίου αυτού στον φορέα pET24a(+), με περιοριστικές θέσεις NdeI/XhoI.
2. Η μικρού μήκους (short form, -sf) ισομορφή της ανθρώπινης ALR (hALR-sf) ήταν δωρεά από τον Lisowski κλωνοποιημένη στον φορέα pET24a(+).
3. Για την κλωνοποίηση της hALR-lf στον φορέα pSP64 χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και EcoRI τόσο για το ένθεμα όσο και για το φορέα pSP64 και κατάλληλοι εμπρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές με τις περιοριστικές θέσεις για τα δύο αυτά περιοριστικά ένζυμα.

1.3 Μεταλλαξιγένεση γονιδίων

Οι σημειακές μεταλλάξεις που επιτεύχθηκαν σε οποιοδήποτε γονίδιο της παρούσας εργασίας, δηλαδή ο σχεδιασμός των εκκινητών και οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, έγιναν με βάση το πρωτόκολλο QuikChange site-directed mutagenesis και τις οδηγίες του κατασκευαστή (Stratagene) και συνοψίζονται στις παρακάτω:

1. Η διπλή μετάλλαξη C154/165A για την ανθρώπινη hALR-If έγινε στο πλασμίδιο pET24a(+) που περιείχε το γονίδιο *hALR-If* και τελικά το μεταλλαγμένο γονίδιο *hALR-If* εισήχθη στον φορέα έκφρασης pET16bHisMBPTEV με περιοριστικές θέσεις NdeI/EcoRI.
2. Η διπλή μετάλλαξη C74/85A στην hALR-sf έγινε, όπως και για την μετάλλαξη C154/165A για το γονίδιο *hALR-If*, στον φορέα έκφρασης pET24a(+).
3. Τα *Erv1* μεταλλάγματα: LLFQ/A, LLQ/A και LLF/E έγιναν στο αγρίου τύπου *Erv1* γονίδιο του σακχαρομύκητα που βρίσκονταν στους φορείς pSP64 και pET24a(+).

Όνομα γονιδίου	Τύπος φορέα	Προέλευση
<i>Erv1wt</i>	pET24a(+)	από προηγούμενη μελέτη
<i>Erv1wt</i>	pSP64	από προηγούμενη μελέτη
<i>Erv1LLQ/A</i>	pET24a(+)	παρούσα εργασία
<i>Erv1LLQ/A</i>	pSP64	παρούσα εργασία
<i>Erv1LLFQ/A</i>	pET24a(+)	παρούσα εργασία
<i>Erv1LLFQ/A</i>	pSP64	παρούσα εργασία
<i>Erv1LLF/E</i>	pET24a(+)	παρούσα εργασία
<i>Erv1LLF/E</i>	pSP64	παρούσα εργασία
<i>hALR-If</i>	pET24a(+)	παρούσα εργασία
<i>hALR-If C154/165A FWM/E</i>	pET16bHisMBPTEV	παρούσα εργασία
<i>hALR-If C154/165A FWM/E</i>	pSP64	παρούσα εργασία
<i>hALR-If</i>	pET16bHisMBPTEV	παρούσα εργασία
<i>hALR-If C154/165A</i>	pET24a(+)	παρούσα εργασία
<i>hALR-If C154/165A</i>	pET16bHisMBPTEV	παρούσα εργασία
<i>hALR-sf</i>	pET24a(+)	δώρο Lisowski
<i>hALR-sf C74/85A</i>	pET24a(+)	παρούσα εργασία
<i>hALR-If</i>	pSP64	παρούσα εργασία

Πίνακας 1: Πίνακας των πλασμιδίων που υπήρχαν και χρησιμοποιήθηκαν αλλά και αυτών που προέκυψαν από την παρούσα εργασία.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταλλάξεις του <i>Erv1</i> γονιδίου	
Εκκινητές	Αλληλουχίες
<i>FOR Erv1 LLQ/A</i>	5'-GCCGATCATGTAACACCGCAGCAGACTTTGCGTACGTGACCGGG-3'
<i>REV Erv1 LLQ/A</i>	5'-CCCGGTCACGTACGCAAAGTCTGCTGCGGTGTTACATGATCGGC-3'
<i>FOR Erv1 LLFQ/A</i>	5'-GCCGATCATGTAACACCGCAGCAGACGCTGCGTACGTGACCGGG - 3'
<i>REV Erv1 LLFQ/A</i>	5'-CCCGGTCACGTACGCAAGCAGCTGCTGCTGCGGTGTTACATGATCGGC - 3'
<i>FOR Erv1 LLF/E</i>	5'-GCCGATCATGTAACACCGAAGAAGACGAACAGTACGTGACCGGG -3'
<i>REV Erv1 LLF/E</i>	5'-CCCGGTCACGTACTGTTCTGCTCTTCTTCGGTGTACATGATCGGC -3'
Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταλλάξεις του <i>hALR-lf</i> γονιδίου	
<i>FOR hALR-lf C154A</i>	5' CTAAGAAAAAGGTTGGCCAGGAACCACCCAG 3'
<i>REV hALR-lf C154A</i>	5' CTGGGTGGTTCCTGGCCAACCTTTTTCTTAG 3'
<i>FOR hALR-lf C165A</i>	5' CGCACCCGGGCAGCCTTCACACAGTG 3'
<i>REV hALR-lf C165A</i>	5' CACTGTGTGAAGGCTGCCCCGGGTGCG 3'
Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταλλάξεις του <i>hALR-lf C154/165A</i> γονιδίου	
<i>FOR hALR-lf C154/165A FWM/E</i>	5'-TGCCTCGACGAGAAGACGGAGGAGCGGACGCAG - 3'
<i>REV hALR-lf C154/165A FWM/E</i>	5'-CTGCGTCCGCTCCTCCGTCTTCTCGTTCGACGCA -3'
Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταλλάξεις του <i>hALR-sf</i> γονιδίου	
<i>FOR hALR-sf C74A</i>	5' CTAAGAAAAAGGTTGGCCAGGAACCACCCAG 3'
<i>REV hALR-sf C74A</i>	5' CTGGGTGGTTCCTGGCCAACCTTTTTCTTAG 3'
<i>FOR hALR-sf C85A</i>	5' CGCACCCGGGCAGCCTTCACACAGTG 3'
<i>REV hALR-sf C85A</i>	5' CACTGTGTGAAGGCTGCCCCGGGTGCG 3'

Πίνακας 2: Πίνακας των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταλλαξογένεση των γονιδίων *Erv1*, *hALR-lf* και *hALR-sf* στην παρούσα εργασία.

2. *In organello* τεχνικές (Χειρισμός μιτοχονδρίων)

2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από τα στελέχη του σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, *GalErv1* και *Erv1His*.

Για τα πειράματα εισόδου ραδιενεργής πρόδρομης πρωτεΐνης, τα μιτοχόνδρια που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκαν από το αγρίου τύπου στέλεχος του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, D273-10B, το οποίο αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γαλακτικό οξύ (YPLactate) σε θερμοκρασία 30°C. Η συγκεκριμένη πηγή άνθρακα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ενέργειας μέσω γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα του σακχαρομύκητα αλλά μόνο από τα μιτοχόνδρια. Μόνο τα κύτταρα που διαθέτουν λειτουργικά μιτοχόνδρια επιβιώνουν και δίνουν ένα μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων. Η διαδικασία απομόνωσης των μιτοχονδρίων γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των (Daum *et al.*, 1982) όπου τελικά, μέσω της χρήσης του χημικού Nycodenz, τα καθαρά από άλλα μεμβρανώδη οργανίδια μιτοχόνδρια αποθηκεύονται και κρατιούνται λειτουργικά στους -80°C. Συγκεκριμένα, για την

απομόνωση των μιτοχονδρίων από τα στελέχη GalErv1 και Erv1His στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης τους προστέθηκε επιπλέον 0.2% (κ.ο) γλυκόζη, (για 30 ώρες στο GalErv1 και 24 ώρες για Erv1His), για να επιτευχθεί η πλήρης καταστολή έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *Erv1*.

2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια

Για την είσοδο ^{35}S ραδιοσημασμένου πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου στα μιτοχόνδρια, αρχικά αυτά επαναδιαλύονται σε import buffer σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml και εξισορροπούνται στους 30°C. Στην συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του ραδιενεργού πρόδρομου υποστρώματος και η επώαση στους 30°C, η οποία συνεχίζεται για τόσο χρόνο όσο έχει καθοριστεί για το εκάστοτε πείραμα. Σε πειράματα κινητικής τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές με την προσθήκη τελικής συγκέντρωσης 25mM NEM. Ο αλκυλιωτικός παράγοντας NEM (N-ethylmaleimide) δεσμεύει τις ελεύθερες σουλφιδρυλομάδες και παγώνει τα πρωτεϊνικά ενδιάμεσα. Αφού προηγηθούν τα παραπάνω, ακολουθεί η απομόνωση των μιτοχονδρίων με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 16100 g στους 4°C, όπου το πρόδρομο μόριο που δεν εισήχθη απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε ισοτονικό διάλυμα, 1.2M sorbitol and 20mM Hepes, pH 7,4, παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης πρωτεΐνης K (0.1 mg/ml ή 20μg/ml) για την απομάκρυνση της μη εισαγμένης πρωτεΐνης και αφήνεται στους 4°C για 30 λεπτά. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη PMSF τελικής συγκέντρωσης 4mM, για 10 λεπτά στους 4°C και τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με τις παραπάνω ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης, όπου το ίζημα επαναδιαλύεται σε 15 μl 2x Laemmli sample buffer με ή χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη, ανάλογα με το πείραμα, ενώ το υπερκείμενο απομακρύνεται. Τα δείγματα βράζονται σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε 12% Tris-Tricine πήκτωμα ακρυλαμίδης. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης βάφονται με Coomassie blue και μετά στεγνώνονται. Τα στεγνά πάνω σε χαρτί whatmann πηκτώματα μπαίνουν σε κασέτα για έκθεση για 24 ώρες και το αποτέλεσμα εμφανίζεται στο phospho-imager με αυτοραδιογραφία. Τα διαλύματα της παραπάνω διαδικασίας είναι:

Import buffer (2x)

100 mM Hepes, pH 7.1, 1.2 M sorbitol, 4 mM KH_2PO_4 , 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 5 mM Na_2EDTA , 10 mM L-Methionine, 2 mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), 2 mM ATP, 2.5 mM NADH

Ισοτονικό διάλυμα επαναδιάλυσης μιτοχονδρίων (Breaking Buffer)

0.6 M sorbitol, 20 mM K+MES pH 7.4

10 x Laemmli sample buffer (SB)

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

2.3. Είσοδος ραδιοσημασμένου πρόδρομου μορίου σε GalErv1 μιτοχόνδρια σε δύο στάδια

Για την εισαγωγή των Erv1 μεταλλαγμάτων: LLFQ/A και LLF/E σε απομονωμένα GalErv1 μιτοχόνδρια τα οποία είναι εμπλουτισμένα με τις πρωτεΐνες Erv1 wt, Erv1 LLFQ/A και Erv1 LLF/E ή όχι, χρησιμοποιήθηκαν καθαρές πρωτεΐνες οι οποίες διαλύθηκαν τρεις φορές σε κορεσμένο διάλυμα θειϊκού αμμωνίου και επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Οι κατακρημνισμένες πρωτεΐνες στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 30 λεπτά στις 25000g σε θερμοκρασία δωματίου και οι πελέτες που προκύπτουν επαναδιαλύονται σε αποδιατακτικό διάλυμα (8M urea, 50mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 20mM DTT). Για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C και τα πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια εισάγονται σε GalErv1 μιτοχόνδρια παρουσία 2 mM ATP και 2.5 mM NADH για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 30°C. Μετά από αυτή την πρώτη αντίδραση εισαγωγής των πρόδρομων μορίων στα μιτοχόνδρια, αυτά απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση σε φρέσκο import buffer για την εισαγωγή της ραδιενεργής πρόδρομης πρωτεΐνης Mia40SPC. Η πρόδρομη ^{35}S -σημασμένη Mia40SPC πρωτεΐνη συντίθεται και στη συνέχεια εισάγεται σε GalErv1 μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα στους 30°C. Η αντίδραση της εισαγωγής μπλοκάρεται προσθέτοντας 25mM NEM και το υλικό που δεν εισήχθη πέπτει με επώαση των μιτοχονδρίων με πρωτεϊνάση K (0,1 mg/ml) για 30 λεπτά στον πάγο. Η πρωτεϊνάση K μπλοκάρεται, στη συνέχεια, με τη χρήση 4mM PMSF για να σταματήσει η αντίδραση και τα μιτοχόνδρια επανασυλλέγονται με φυγοκέντρηση όπου τελικά επαναδιαλύονται σε Laemmli sample buffer με ή χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα

δείγματα τελικά βράζονται στους 95°C για 5 λεπτά και φορτώνονται στο πήκτωμα ακρυλαμίδης.

3. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών

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

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνικών δειγμάτων με βάση το μέγεθός τους. Το πήκτωμα αυτό αποτελείται από το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα επιστοιβαξης όπου τα δείγματα των πρωτεϊνών που φορτώνονται προηγουμένως εμπλουτίζονται με διάλυμα που περιέχει SDS το οποίο προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο ανά δύο αμινοξικά κατάλοιπα κρατώντας τα παράλληλα αποδιαταγμένα. Το πήκτωμα επιστοιβαξης εναποτίθεται αμέσως μετά το πήκτωμα διαχωρισμού πριν αυτό πολυμεριστεί ή αφού το πρώτο έχει πήξει με 100% ισοπροπανόλη από πάνω του έτσι ώστε τα πρωτεϊνικά δείγματα τελικά να ευθυγραμμίζονται και να αποκτούν κοινή αφετηρία στο πήκτωμα διαχωρισμού. Τα υλικά της παραπάνω διαδικασίας είναι:

12% πήκτωμα διαχωρισμού (Separating)

12 ml 30% acrylamide / 0.8% bis-acrylamide, 1 ml 2.2% bis-acrylamide, 10 ml 3 M Tris / 0.3% SDS pH 8.45, 4 ml dH₂O, 3 ml 87% glycerol

5% πήκτωμα επιστοιβαξης (Stacking)

1.5 ml 30% acrylamide / 0.8% bis-acrylamide, 0.06 ml 2.2% bis-acrylamide, 3.1 ml 3 M Tris / 0.3%, SDS pH 8.45, 7.9 ml dH₂O

Cathode buffer

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

Anode buffer

0.2 M Tris pH 8.9

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

Η ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης, δηλαδή απουσία SDS, χρησιμοποιείται ως τεχνική για την μελέτη μη ομοιοπολικών πρωτεϊνικών

συμπλόκων. Με τη συγκεκριμένη τεχνική, η μετατόπιση των πρωτεϊνικών συμπλόκων εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος και όχι από το ενδογενές τους φορτίο, επειδή με την προσθήκη της ανιονικής χρώσης Coomassie blue G250 που προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές της εκάστοτε διαλυτοποιημένης πρωτεΐνης εξουδετερώνεται το ενδογενές της φορτίο. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για πήκτωμα ακρυλαμίδης βαθμίδωσης 6-16% φαίνονται παρακάτω. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.001% TEMED και 0.1% APS. Η μετατόπιση των πρωτεϊνών στην εγγενή ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για 12 ώρες στα 100V, και συνεχίζεται για 3 ώρες στα 400V στους 4°C μέχρι να φύγει το μπλε μέτωπο της ηλεκτροφόρησης. Τα υλικά της παραπάνω διαδικασίας είναι:

6% Separating gel

3,5 ml 48% acrylamide / 1.5% bis-acrylamide, 14 ml Gel Buffer (0,1M Bis-Tris/HCl pH 7,0 / 1M 6-aminocaproic acid) και 10,62 ml dH₂O

16% Separating gel

9,33 ml 48% acrylamide / 1.5% bis-acrylamide, 14 ml Gel Buffer (0,1M BisTris-HCl pH 7.0 / 1 M 6-aminocaproic acid) και 4,67 ml 87% Glycerol

Stacking gel

0,86 ml 48% acrylamide / 1.5% bis-acrylamide, 5,25 ml 0,1 M BisTris-HCl pH 7.0 / 1 M 6-aminocaproic acid και 4,37 ml dH₂O

Blue cathode buffer

50 mM Tris-Tricine, 15 mM BisTris-HCl pH 7,0 και 0.02% Coomassie Blue G-250

Colourless cathode buffer

50 mM Tris-Tricine, 15 mM BisTris-HCl pH 7,0

Anode buffer

50 mM BisTris-HCl pH 7.0

3.3 Πέψη των πρωτεϊνών των απομονωμένων ζωνών αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Για εύρεση και ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας, την πρώτη μέρα οι ζώνες που μας ενδιαφέρουν κόβονται με νυστέρι από το πήκτωμα και στη συνέχεια σε μικρότερα κομμάτια. Στη συνέχεια, τα κομμάτια των ζωνών επωάζονται

με 100 µl 50% Acetonitril σε νερό (DestSol) με ανακίνηση για 15 λεπτά. Το διάλυμα αυτό αφαιρείται και προστίθενται 100 µl διαλύματος 50 mM ammonium bicarbonate (ABS) με ανακίνηση για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, αφαιρείται το διάλυμα ABS και η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές σε θερμοκρασία δωματίου. Τρίτο βήμα της διαδικασίας, αποτελεί η αναγωγή και η αποδιάταξη των πρωτεϊνών μετά από αφαίρεση του διαλύματος ABS και ακόλουθης προσθήκης 100 µl 10 mM DTT σε 50mM ABS) με ανακίνηση για 45 λεπτά στους 56°C. Το DTT ακολούθως απομακρύνεται και στα κομμάτια του πηκτώματος προστίθενται 100 µl 55 mM Iodacetamide (IAA) διαλυμένου σε 50 mM ABS με ανακίνηση για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το IAA αφαιρείται και προστίθενται 100 µl DestSol με ανακίνηση των κομματιών του πηκτώματος για 15 λεπτά, όπου τελικά το DestSol αφαιρείται και προστίθενται 100 µl 50 mM ABS με ανακίνηση για 15 λεπτά. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές πάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, η πέψη γίνεται με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης 25-30µl με επώαση σε θερμοκρασία 37°C O/N.

Τη δεύτερη μέρα, απομονώνεται το υπερκείμενο των δειγμάτων και αφού τα κομμάτια του πηκτώματος ξεπλένονται με προσθήκη 50µl νερού και ανακίνηση για 20 λεπτά, καλύπτονται με 50µl 50% acetonitril (ACN) και ανακινούνται πάλι για 20 λεπτά. Το διάλυμα αυτό απομονώνεται σε νέα LoBind Eppendorf vials, που χρησιμοποιούνται σε όλη την παραπάνω διαδικασία, και προστίθενται 50 µl 0.1% TFA σε 50% ACN/νερό με ακόλουθη ανακίνηση για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο απομονώνεται ξανά και τα κομμάτια του πηκτώματος απομακρύνονται. Τα δείγματα στεγνώνουν με φυγοκέντρηση υπό κενό (speed vacuum) και αναλύονται με φασματοσκοπία μάζας nLC-MS/MS.

3.4 Ανάλυση μιτοχονδριακών συμπλόκων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης

Για την ανάλυση μιτοχονδριακών συμπλόκων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης τα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα επαναδιαλύονται σε ισοτονικό διάλυμα (BB) και ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C για 5 λεπτά στις 16100g. Η επαναδιάλυση της εκάστοτε πελέτας μιτοχονδρίων γίνεται με 1ml διαλύματος διαλυτοποίησης (solubilization buffer) ανά 2,5mg μιτοχονδρίων με ήπιο απορρυπαντικό (DDM, Triton X-100 και digitonin) και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στον πάγο. Η συγκέντρωση του εκάστοτε απορρυπαντικού διαφοροποιείται

ανάλογα με το πείραμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στους 4°C στις 16100g και το υπερκείμενο αναλύεται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE). Στην συνέχεια, ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF και έπειτα γίνεται ανοσοαποτύπωση της εκάστοτε πρωτεΐνης με το ειδικό για αυτήν αντίσωμα. Εναλλακτικά, το πήκτωμα χρωματίζεται με Coomassie R-250 για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

0.1% Triton

0,1% Triton, 150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 10% γλυκερόλη και 2mM PMSF

0.16% DDM

20mM HEPES KOH pH 7.4, 1% DDM (*Fluka*), 50mM NaCl, 10% γλυκερόλη και 1mM PMSF

1% Digitonin

20mM HEPES KOH pH 7.4, 1% Digitonin, 50mM NaCl, 10% γλυκερόλη και 1mM PMSF

3.5 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης γίνεται με χρώση κυανού του Coomassie, Coomassie brilliant blue (R-250), η οποία βάφει μπλε τις πρωτεϊνικές ζώνες και έχει ευαισθησία μέχρι 0.1μg ποσότητα πρωτεΐνης. Στην περίπτωση που τα πρωτεϊνικά δείγματα είναι ραδιενεργά τότε οι σημάνσεις μπορούν να φανούν με αυτοραδιογραφία μετά από την τοποθέτηση ενός φιλμ ακτινογραφίας επάνω από την πηκτή. Πιο συγκεκριμένα, το πήκτωμα βάφεται με διάλυμα χρώσης το οποίο περιέχει και οξικό οξύ για την μονιμοποίηση των πρωτεϊνών πάνω στο πήκτωμα. Τέλος, η περίσσεια Coomassie απομακρύνεται επωάζοντας το πήκτωμα σε διάλυμα αποχρωματισμού και το πήκτωμα στεγνώνεται σε συσκευή Biorad Gel Dryer όπου στη συνέχεια τοποθετείται σε κασέτα για έκθεση O/N.

Coomassie

30% methanol, 10% acetic acid & 0,2% R-250

Destaining buffer

15% methanol, 10% acetic acid

3.6 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ανοσοαποτύπωση (*Western blot*)

Για την συγκεκριμένη τεχνική ανίχνευσης μικρής ποσότητας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα από ένα πρωτεϊνικό πλήθος, τα δείγματα αρχικά διαχωρίζονται σε αποδιατακτικό ή μη πήκτωμα ακρυλαμίδης και στη συνέχεια μεταφέρονται με ηλεκτροαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF στη συσκευή Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell Biorad σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για 25 λεπτά σε σταθερά 20 V με το σύστημα semi-dry transfer. Η μεμβράνη επωάζεται με το εκάστοτε ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα σε 1% γάλα διαλυμένο σε 1x TBST, σε τέτοια συγκέντρωση και ποσοστό γαλακτος η οποία μπορεί να αλλάζει ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος, ενώ οι μη-ειδικές για τα πρώτα αντισώματα θέσεις στην μεμβράνη μπλοκάρονται με 5% γάλα διαλυμένο σε 1x TBST για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C με ανάδευση. Όλα τα αντισώματα της παρούσης εργασίας είναι πολυκλωνικά παραγμένα σε κουνέλια. Το δεύτερο αντίσωμα είναι αντι-rabbit (Sigma) 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), με αποτέλεσμα το φιλμ να μαυρίζει και οι πρωτεΐνες να ανιχνεύονται ως μαύρες ζώνες.

Σε περίπτωση που είναι αναγκαίο η ίδια μεμβράνη να επωαστεί μετά την εμφάνισή της ξανά με ένα άλλο αντίσωμα, γίνεται έκδυση (stripping) της μεμβράνης για να φύγει το προηγούμενο αντίσωμα με συγκεκριμένο διάλυμα που περιέχει: 2% SDS και 62,5mM Tris pH 6.8 και 350μl βMe ανά 50ml διαλύματος. Η εκάστοτε μεμβράνη επωάζεται με το παραπάνω διάλυμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 50°C με ανακίνηση του δοχείου που την περιέχει ανά 10 λεπτά και ακολουθούν τρία πλυσίματα των 10 λεπτών με ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου πριν από το μπλοκάρισμα των μη ειδικών για το αντίσωμα θέσεων με 5% γάλα και πριν την επώαση με το πρώτο νέο αντίσωμα.

3.7 Διαλυτοποίηση μιτοχονδρίων και πρόσδεση του *Ern1His* συμπλόκου σε σφαιρίδια νικελίου *Ni-NTA beads* (Qiagen)

Για την πρόσδεση του *Ern1His* συμπλόκου, χρησιμοποιήθηκαν 250μg από το *Ern1His* και αγρίου τύπου μιτοχονδρίων και η επώαση με το διάλυμα διαλυτοποίησης 2,5mg ανά ml διαλύματος έγινε για 30 λεπτά στον πάγο. Μετά από φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 4°C έγινε διαχωρισμός του υπερκείμενου από την πελέτα με παράλληλη εξισορρόπηση των σφαιριδίων με διάλυμα διαλυτοποίησης που περιείχε 10mM ιμιδαζόλιο, το οποίο μπορεί να συναγωνίζεται την δομή της ιστιδίνης και σε αυξημένη συγκέντρωση να βοηθά στην έκλυση της His-tagged πρωτεΐνης με αποκόλλησή της από τα σφαιρίδια νικελίου. Η επώαση της πρωτεΐνης και των σφαιριδίων έγινε με ανάδευση μιας ώρας σε θερμοκρασία 4°C και στη συνέχεια ακολούθησαν πλυσίματα των σφαιριδίων με δέκα όγκους κολώνας διαλύματος διαλυτοποίησης που περιείχε 10mM ιμιδαζόλιο και 20mM ιμιδαζόλιο κάνοντας ενδιάμεσα αυτών των βημάτων φυγοκέντρηση στα 4000g για 30 δευτερόλεπτα και σε θερμοκρασία 4°C. Η έκλυση της *Ern1His* έγινε τελικά με 300mM ιμιδαζόλιο (EL1) με μία επιπλέον φυγοκέντρηση στις παραπάνω ίδιες συνθήκες. Τέλος, στα σφαιρίδια προστέθηκε 1x SB με β-merc και ακολούθησε βρασμός τους για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 95°C. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο κρατήθηκε ως υλικό έκλυσης 2 (EL2).

Διάλυμα διαλυτοποίησης

(0.1% Triton, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM PMSF και 10% γλυκερόλη)

3.8 Έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια

Η έκφραση των πρωτεϊνών της συγκεκριμένης εργασίας έγινε είτε από το φορέα pET24a(+) ή pET16BHisMBPTEV οι οποίοι περιέχουν τον υποκινητή της RNA πολυμεράσης του ιού T7, σε θέση ανοδικά του εκάστοτε κλωνοποιημένου γονιδίου. Το κλωνοποιημένο γονίδιο δεν εκφράζεται απουσία της T7 RNA πολυμεράσης. Γι' αυτό, αυτή η πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* BL21 (DE3 rare) όπου το στέλεχος αυτό έχει ενσωματωμένο στο γενετικό υλικό του, το γονίδιο για την T7 RNA πολυμεράση κάτω από τον υποκινητή *lac* (*lac promoter*) και τον χειριστή *lac* (*lac operator*). Μόνο παρουσία IPTG (ανάλογο

της λακτόζης) το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης ενεργοποιείται και ξεκινάει η μεταγραφή του προς μελέτη γονιδίου. Όλες οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εκφράστηκαν στο στέλεχος κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3 rare). Αρχικά, μοναδιαίες αποικίες που φέρουν την κατάλληλη κατασκευή έκφρασης εμβολιάζονται σε μικρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό LB (Luria-Bertani) εμπλουτισμένου με τα κατάλληλα αντιβιοτικά στα οποία τα βακτήρια φέρουν αντίσταση. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επωάζονται O/N στους 37°C και αραιώνονται 1/50 σε φρέσκο θρεπτικό ανάπτυξης το οποίο πάλι φέρει τα κατάλληλα αντιβιοτικά και οι καλλιέργειες αφήνονται να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα (optical density, O.D) να φτάσει στην τιμή 0.4 - 0.7. Τότε, προστίθενται 0,4 mM IPTG, για την έκφραση της hALR-If C154/165A και hALR-If C154/165A FWM/E), ή 0,1mM IPTG (για την έκφραση της αγρίου τύπου hALR-If και των μεταλλαγμάτων Erv1 LLQ/A, LLFQ/A και LLF/E, καθώς και της πρωτεΐνης hALR-If C74/85A με 0,4mM IPTG και τα κύτταρα αφήνονται για επώαση 4 ώρες στους 30°C ή O/N στους 18°C, αντίστοιχα. Τέλος, ακολουθεί φυγοκέντρωση των καλλιεργειών για 15 λεπτά στις 5000g και σε θερμοκρασία 4°C όπου οι πελέτες των κυττάρων συλλέγονται και φυλάγονται στους -20°C μέχρι την ημέρα καθαρισμού της πρωτεΐνης που περιέχουν. Να σημειωθεί ότι κάθε πρωτεΐνη και μετάλλαγμα αυτής για τα δύο ομόλογα γονίδια της Erv1, hALR-If και hALR-sf, και τα μεταλλάγματα αυτών ελέγχθησαν για έκφραση πρώτα σε μία μικρής κλίμακας καλλιέργεια και κατόπιν επιχειρήθηκε η μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια τηρώντας τις ίδιες συνθήκες έκφρασης και στις δύο περιπτώσεις.

3.9 Καθαρισμός πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες Erv1 LLF/E, LLQ/A και LLFQ/A καθώς και η hALR-If C154/165A FWM/E απομονώθηκαν από 4 λίτρα καλλιέργειας βακτηρίων *E. coli* BL21 (DE3 rare) που έφεραν τα αντίστοιχα πλασμίδια σε pET24a(+) φορέα. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (50mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο και 10% γλυκερόλη) με επιπλέον 0.5M NaCl και 30μM FAD και έπειτα έσπασαν με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 25000rpm για μία ώρα στους 4°C. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το υπερκείμενο το οποίο πέρασε σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads, Qiagen), τα οποία είχαν εξισορροπηθεί με διάλυμα A και 0.5M NaCl, ώστε να προσδεθεί σε αυτά στη

συνέχεια η πρωτεΐνη. Κατόπιν, τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A και 0.5M NaCl δύο φορές και ακολούθησε ένα τρίτο ξέπλυμα με διάλυμα A και 50mM NaCl. Τελικά, οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια με διάλυμα A και 300 mM ιμιδαζόλιο.

3.10 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (*Size exclusion chromatography*)

Για την καλύτερη απομόνωση του συμπλόκου της Ern1His όσο ήταν δυνατό σε πιο καθαρό από άλλα σύμπλοκα διάλυμα αλλά και για τις εκλουσμένες πρωτεΐνες από στήλες νικελίου, χρησιμοποιήθηκε και ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Συγκεκριμένα, για το υπερκείμενο μετά την διαλυτοποίηση των Ern1His μιτοχονδρίων σε συγκέντρωση 5mg/ml και πριν την πρόσδεση στα σφαιρίδια νικελίου χρησιμοποιήθηκε η στήλη Superdex 200 HR 10/30.

3.11 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών Mia40, Ern1 και κυτοχρώματος c σε μιτοχόνδρια αγρίου τύπου

Για την ποσοτικοποίηση των Mia40, Ern1 και κυτοχρώματος c σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται οι καθαρές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες: ΔN67SPCMia40, Ern1 αγρίου τύπου και η πρωτεΐνη cytc αγρίου τύπου (από το στέλεχος *S. cerevisiae*, Sigma). Σχετικές ποσότητες αυτών των πρωτεϊνών φορτώνονται και αναλύονται με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας το κατάλληλο κάθε φορά πρώτο αντίσωμα: αντι-Mia40 (1-1000), αντι-Ern1 (1-2000) και αντι-cytc (1-10000) σε 1% γάλα διαλυμένου σε 1xTBST. Για την μέτρηση των εντάσεων των ζωνών χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Image Quant 5.2, όπου γνωρίζοντας την ποσότητα της πρωτεΐνης στην οποία αντιστοιχεί μια συγκεκριμένη τιμή έντασης ζώνης, δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη διαφορετική για κάθε περίπτωση πρωτεΐνης. Μέσω αυτής και γνωρίζοντας τις υπολογισμένες με τον ίδιο τρόπο τιμές των εντάσεων των ζωνών των μιτοχονδρίων αγρίου τύπου, υπολογίζεται η σχετική ποσότητα της εκάστοτε πρωτεΐνης ανά mg καθαρών μιτοχονδρίων. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιείται σε 20V σταθερά για 25 λεπτά και το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του εκάστοτε πρώτου αντισώματος γίνεται με 5% γάλα σε 1x TBST και 1 ώρα ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Η αρχική συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση τους στα 280nm με τη χρήση του προγράμματος NanoDrop και σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους από το πρόγραμμα ProtParam, όπου για την εκάστοτε μέτρηση χρησιμοποιείται: το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και η θεωρητική σταθερά απόσβεσης (ϵ ή extinction coefficient) που υπολογίζεται από την εξίσωση: $\epsilon(280\text{nm}) = 5500 (\#W) + 1490 (\#Y) + 125 (\#C)$, όπου $\#W$ = η περιεκτικότητα σε τρυπτοφάνες, $\#Y$ = η περιεκτικότητα σε τυροσίνες και $\#C$ = ο αριθμός των οξειδωμένων κυστεϊνών. Για την μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm συγκεκριμένα η πρωτεΐνη Erv1 αποδιατάχθηκε αρχικά με τελική συγκέντρωση ουρίας 6M. Ακόμα, τα μιτοχόνδρια που χρησιμοποιούνται είναι μόλις ξεπαγωμένα από τους -80°C ή από τους -20°C όντας αρχικά διαλυτοποιημένα σε 2x SDS SB με 5 λεπτά βράσιμο σε θερμοκρασία 95°C . Σε κάθε περίπτωση αρχικά τα μιτοχόνδρια ξεπλένονται από τη BSA που περιέχει το διάλυμα στο οποίο διατηρούνται τα μιτοχόνδρια, με ισοτονικό διάλυμα (BB) και επακόλουθη φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C .

3.12 Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης (Coupled Transcription / Translation, T_{NT})

Η ραδιοσήμανση του εκάστοτε πρόδρομου μορίου που πρόκειται να εισαχθεί σε μιτοχόνδρια, πραγματοποιείται από το συγκεκριμένο πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό μόριο. Η σήμανση του πρόδρομου μορίου, γίνεται με ραδιενεργή ^{35}S μεθειονίνη με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης σε κυτταρικό εκχύλισμα πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων κουνελιού (rabbit reticulocyte lysate) χρησιμοποιώντας την SP6 πολυμεράση και με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Promega T_{NT}). Για την επιτυχή ραδιοσήμανση πρωτεΐνης χρειάζεται πλασμίδιο υψηλής καθαρότητας απομονωμένο με κολώνα Qiagen. Η διαδικασία παραγωγής του ραδιενεργού πρωτεϊνικού μορίου λαμβάνει χώρα για 90 λεπτά στους 30°C όπου στη συνέχεια η ραδιενεργή πρωτεΐνη απομακρύνεται από τα ριβοσώματα με φυγοκέντρηση στις 25000 g για 30 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C .

4. Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη σακχαρομύκητα

Τα στελέχη *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είναι το στέλεχος FT5 (Tzamarias and Struhl, 1994) για την παραγωγή *Ern1His* μιτοχονδρίων και το στέλεχος D273-10B (MAT α) για την παραγωγή μιτοχονδρίων αγρίου τύπου. Τα κύτταρα μεγάλωσαν είτε σε πλούσιο θρεπτικό μέσο είτε σε φτωχό ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Και τα δύο στελέχη αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 30°C στα παρακάτω θρεπτικά ανάπτυξης: για την παραγωγή μιτοχονδρίων GalErn1 στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του στελέχους SL προστίθεται και 0.2% γλυκόζη για την διατήρηση της καταστολής του ενδογενούς γονιδίου *Ern1*.

YPD/YPL/YPGal (πλούσια θρεπτικά)

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

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

2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη για SC, γαλακτικό οξύ για SL, και γαλακτόζη για SG), 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% (w/v) (NH₄)₂SO₄ και 0.6% (w/v) cazamino amino acids.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗΝ ΣΟΥΛΦΥΔΡΙΛΟΞΕΙΔΑΣΗ Ern1 ΣΕ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

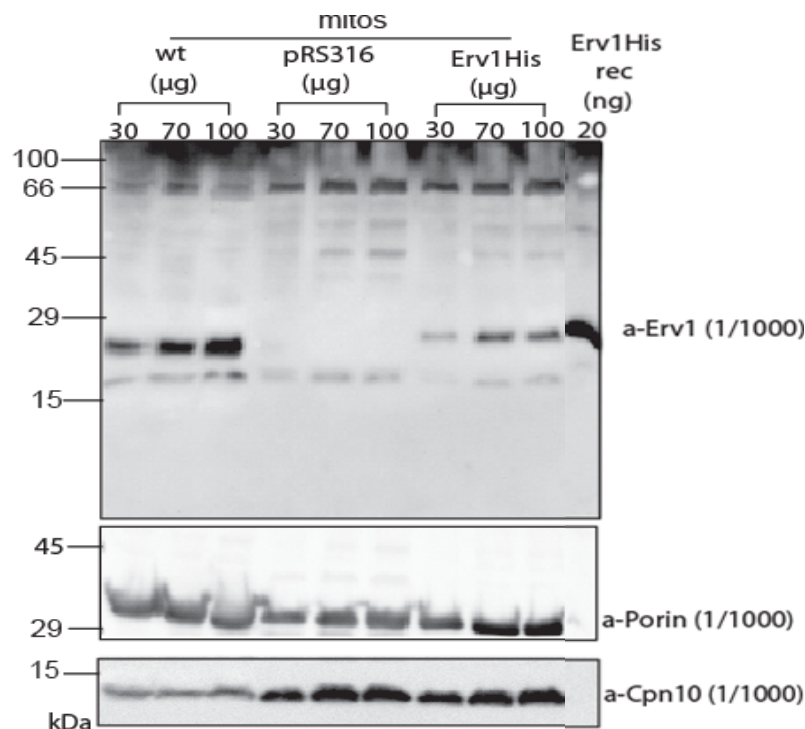
1.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες που μέχρι τώρα είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με την μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Ern1 είναι η οξειδοαναγωγή Mia40 και το κυτόχρωμα c της αναπνευστικής αλυσίδας. Η Mia40, εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα να είναι αγκυροβολημένη μέσω του αμινοτελικού της άκρου στην εσωτερική μεμβράνη του (Terziyska *et al.*, 2005) σε αντίθεση με το ορθόλογό της, MIA40, που στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια βρίσκεται να λειτουργεί μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο, χωρίς να είναι αγκυροβολημένο σε κάποια μεμβράνη. Το κυτόχρωμα c, που έχει βρεθεί ότι οξειδώνει ξανά την ανηγμένη πρωτεΐνη Ern1 για να μπορεί στη συνέχεια αυτή με τη σειρά της να οξειδώσει την πρωτεΐνη Mia40 και να την κάνει ξανά ενεργή, εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Επιπρόσθετα, και οι δύο πρωτεΐνες Ern1 και Mia40 έχειδειχθεί, για πρώτη φορά το 2008, ότι σχηματίζουν μαζί με το πρωτεϊνικό υπόστρωμα ένα κοινό σύμπλοκο και αλληλεπιδρούν με φυσικό τρόπο μεταξύ τους (Stojanovski *et al.*, 2008). Ο στόχος, επομένως, αυτού του μέρους εργασίας ήταν να βρεθούν πιθανές νέες πρωτεΐνες-υποστρώματα οι οποίες θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με φυσικό τρόπο με την πρωτεΐνη Ern1 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στο μιτοχόνδριο σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με αυτήν.

1.2 Παραγωγή καθαρών Ern1His μιτοχονδρίων και έλεγχος της έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης

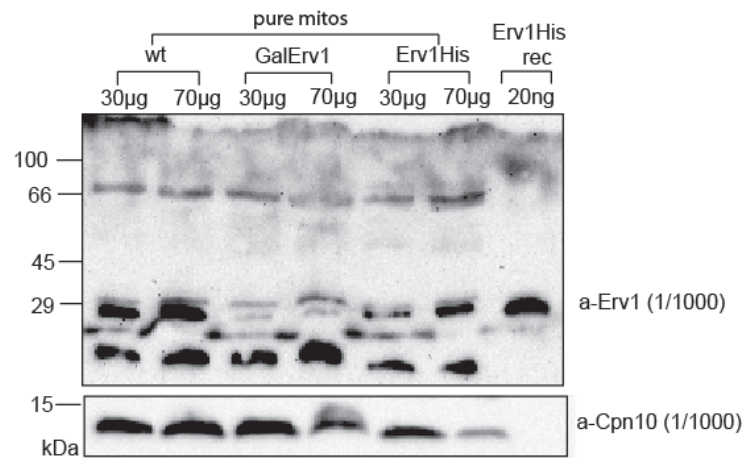
Για την εύρεση νέων πρωτεϊνών-παραγόντων που μπορεί να αλληλεπιδρούν σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Ern1, χρειάστηκε αρχικά η παραγωγή καθαρών μιτοχονδρίων, από το Ern1His στέλεχος του σακχαρομύκητα καθώς και ο έλεγχος της έκφρασης της Ern1His πρωτεΐνης σε αυτά, με την προοπτική να απομονωθεί στη συνέχεια το σύμπλοκο της Ern1His και των πρωτεϊνών με τις οποίες αυτό σχηματίζεται, μετά από πρόσδεσή του σε σφαιρίδια νικελίου.

Το Erv1His στέλεχος σακχαρομύκητα είχε προκύψει με μετασηματισμό του GalErv1 στελέχους χρησιμοποιώντας την κατασκευή pRS316-Erv1His, όπου ο συγκεκριμένος φορέας προσδίδει αυξοτροφία στην ουρακίλη. Η παραγωγή αρχικά μη καθαρών (crude) μιτοχονδρίων Erv1His (Εικόνα 4) έδειξε ότι εκφράζεται η πρωτεΐνη Erv1His, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια που εκφράζουν την Erv1 πρωτεΐνη και σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια που είχαν μετασηματιστεί με σκέτο φορέα pRS316 και που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό πείραμα ελέγχου. Επομένως, από την Εικόνα 4 παρατηρούμε ότι η Erv1His πρωτεΐνη φαίνεται να εκφράζεται σε σχετικά φυσιολογικά επίπεδα, αφού εντοπίζεται με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντι-Erv1 αντίσωμα, και να τρέχει στο ίδιο ύψος με αυτό της ανασυνδυασμένης και καθαρισμένης Erv1His πρωτεΐνης. Η Erv1His πρωτεΐνη τρέχει πιο ψηλά κατά την ηλεκτροφόρηση επειδή ακριβώς περιέχει και 6 ιστιδίνες (His) στο καρβοξυτελικό της άκρο. Αυτή η ουρά ιστιδινών στην πρωτεΐνη αυξάνει το μοριακό της βάρος κατά 2-3kDa.



Εικόνα 4: Έλεγχος έκφρασης της Erv1His πρωτεΐνης στα Erv1His μιτοχόνδρια. Ανοσοαποτύπωση με αντι-Erv1 (1/1000) μετά από ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης των διαφόρων ποσοτήτων μη καθαρών (crude) μιτοχονδρίων που δείχνει ότι η Erv1His εκφράζεται κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα. Ανοσοαποτύπωση με αντι-Porin, έναντι της διαμεμβρανικής πορίνης στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, και αντι-Cpn10, έναντι της πρωτεΐνης της μήτρας των μιτοχονδρίων Cpn10, πραγματοποιήθηκε για τον ποιοτικό έλεγχο των μιτοχονδρίων.

Αφού ελέγχθηκε η έκφραση της Erv1His πρωτεΐνης σε μικρή κλίμακα παραγωγής μιτοχονδρίων, ακολούθησε η παραγωγή και απομόνωση καθαρών μιτοχονδρίων, με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση Nycodenz (Υλικά και Μέθοδοι), από 30 λίτρα καλλιέργειας σακχαρομύκητα στελέχους Erv1His. Στη συνέχεια, ακολούθησε ξανά έλεγχος της έκφρασης της Erv1His πρωτεΐνης για να εξακριβωθεί αν απομονώθηκαν λειτουργικά, σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου, μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, η πρωτεΐνη Erv1His εκφράζεται και στα καθαρά Erv1His μιτοχόνδρια και σε συγκρίσιμα επίπεδα με το επίπεδο έκφρασης της αγρίου τύπου Erv1.



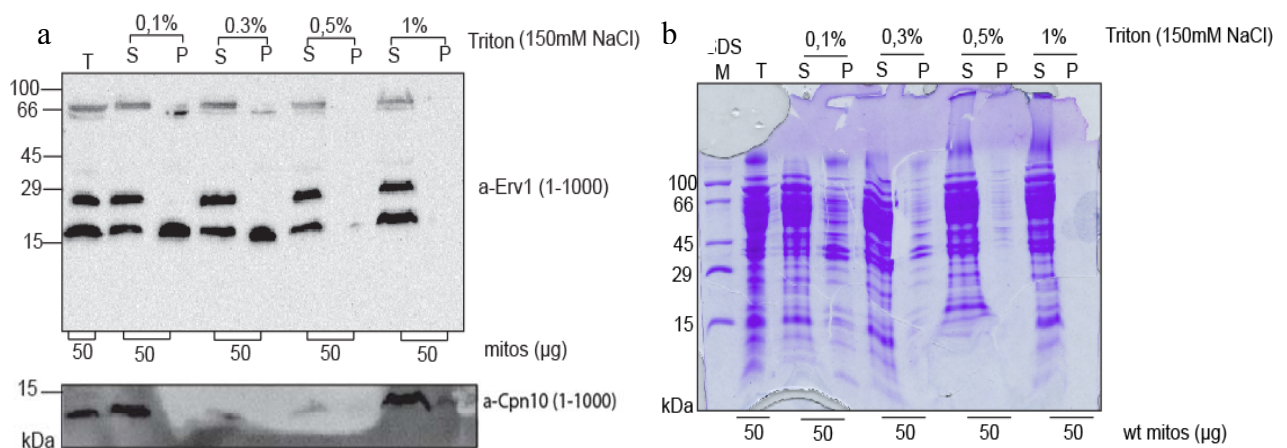
Εικόνα 5: Έλεγχος έκφρασης Erv1His πρωτεΐνης στα καθαρά Erv1His μιτοχόνδρια. Ανοσοαποτύπωση με αντι-Erv1 (1/1000) μετά από ηλεκτροφόρηση διαφορετικών ποσοτήτων μιτοχονδρίων αγρίου τύπου, GalErv1 και Erv1His σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Η πρωτεΐνη Erv1His εκφράζεται στα καθαρά Erv1His μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα. Για τον έλεγχο δομικά φυσιολογικών μιτοχονδρίων, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση με αντι-Cpn10 έναντι της Cpn10 πρωτεΐνης.

1.3 Δοκιμασία διαφόρων συνθηκών διαλυτοποίησης των μιτοχονδρίων

Για την απομόνωση του θεωρούμενου συμπλόκου της Erv1 με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μαζί της, μελετήθηκε αρχικά κάτω από ποιες συνθήκες η Erv1 πρωτεΐνη εντοπίζεται και παραλαμβάνεται στο υπερκείμενο-κλάσμα που προκύπτει μετά από τη διαλυτοποίηση και φυγοκέντρηση των μιτοχονδρίων. Για τον σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν διαφορετικά ποσοστά μη-ιοντικού απορρυπαντικού Triton όπως: 0.1%, 0.3%, 0.5% και 1%, κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση του αλατιού NaCl στα 150mM. Στην Εικόνα 6a, φαίνεται μετά από ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πως η πρωτεΐνη Erv1 εντοπίζεται ήδη από την διαλυτοποίηση των αγρίου τύπου μιτοχονδρίων με 0.1% Triton στο υπερκείμενο, ενώ δεν υπάρχει καθόλου Erv1 πρωτεΐνη στην πελέτα των μιτοχονδρίων. Σημειώνεται εδώ ότι με

ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντι-Erv1, εμφανίζεται και μία δεύτερη ζώνη στην μεμβράνη κάτω από την ζώνη της πρωτεΐνης Erv1 που τρέχει κάτω από τη ζώνη του πρωτεϊνικού μάρτυρα των 29kDa και η οποία ίσως δεν οφείλεται σε διαφορετική οξειδωτική κατάσταση της πρωτεΐνης Erv1 (Mesecke *et al.*, 2005). Σε αντίθεση με τη δημοσίευση των Mesecke *et al* του 2005 όπου και οι δύο ζώνες της Erv1 εξαφανίζονται σε GalErv1 μιτοχόνδρια στη δική μας περίπτωση φαίνεται να εμφανίζεται η δεύτερη μόνο ζώνη στα GalErv1 μιτοχόνδρια που χρησιμοποιήσαμε (Εικόνα 5) για αυτό και θεωρήσαμε ότι δεν είναι ειδική για την πρωτεΐνη Erv1.

Επίσης, στην Εικόνα 6b, με χρώση κυανού του Coomassie σε αποδιατακτικό πήκτωμα που έχουν φορτωθεί τα ίδια δείγματα φαίνεται ότι κατά την διαλυτοποίηση των μιτοχονδρίων με 0,1% Triton, το υπερκείμενο στο οποίο σύμφωνα με την ανοσοαποτύπωση παραλαμβάνεται και όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης Erv1, είναι και το πιο καθαρό από μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αφού αρκετές παραμένουν στο μέρος της πελέτας. Αντίθετα, με απορρυπαντικό 1% Triton τελικά παραλαμβάνονται και αυτές μαζί με την Erv1 στο μέρος του υπερκειμένου μετά την διαδικασία της διαλυτοποίησης των μιτοχονδρίων. Σημειώνεται ότι με το ίδιο ποσοστό Triton η δεύτερη μπάντα των περίπου 15kDa που σημειώθηκε πριν εντοπίζεται πια στο υπερκείμενο (Εικόνα 6a).

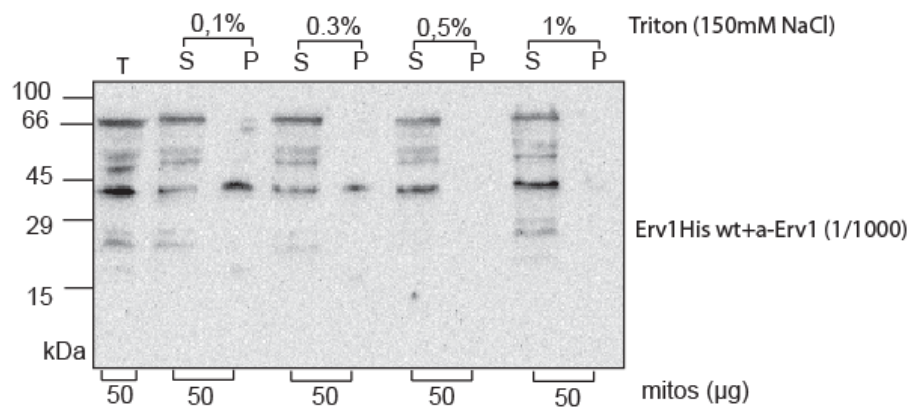


Εικόνα 6: Απομόνωση σχετικά καθαρής Erv1 πρωτεΐνης με 0,1% Triton. a. Ανοσοαποτύπωση και b. χρώση με κυανούν του Coomassie των ίδιων δειγμάτων που δείχνει ότι η Erv1 παραλαμβάνεται στο υπερκείμενο ήδη με 0.1% Triton με τις περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες να παραμένουν στην πελέτα όντας με αυτόν τον τρόπο πιο καθαρή. Ανοσοαποτύπωση με αντι-Cpn10 ως μάρτυρας φορτώματος των δειγμάτων.

Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι το συγκεκριμένο χαμηλό ποσοστό Triton (0,1%) είναι αρκετό για να απομονωθεί όλη η πρωτεΐνη Erv1His στη συνέχεια, από τον διαμεμβρανικό χώρο των Erv1His μιτοχονδρίων που εντοπίζεται, κάτω από

φυσιολογικές συνθήκες, και να ληφθεί στο υπερκείμενο όσο το δυνατόν πιο καθαρή από άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μετά τον διαχωρισμό υπερκείμενου-πελέτας.

Για περαιτέρω έλεγχο του αν η δεύτερη ζώνη που δίνει η ανοσοαποτύπωση με αντι-Erv1 αντίσωμα είναι ειδική για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με ένα διάλυμα όγκου 10ml που περιείχε αντίσωμα αντι-Erv1 (1/1000) και πρωτεΐνη Erv1His συνολικής ποσότητας 3.7mg. Μετά την επώαση της μεμβράνης της Εικόνας 6 με το παραπάνω διάλυμα θα περιμέναμε ό,τι ποσότητα πρωτεΐνης Erv1 υπάρχει σε αυτή την ζώνη να μην φαίνεται πλέον μετά από ανοσοαποτύπωση με αντι-Erv1 και άρα η ζώνη να εξαφανίζεται (Εικόνα 7). Η ποσότητα του αντισώματος αντι-Erv1 που υπάρχει στο διάλυμα δεσμεύεται από την ποσότητα της πρωτεΐνης Erv1His του διαλύματος και άρα δεν υπάρχει αρκετή ποσότητα αντισώματος ελεύθερη για να προσδεθεί όπου υπάρχει η Erv1 πρωτεΐνη πάνω στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.



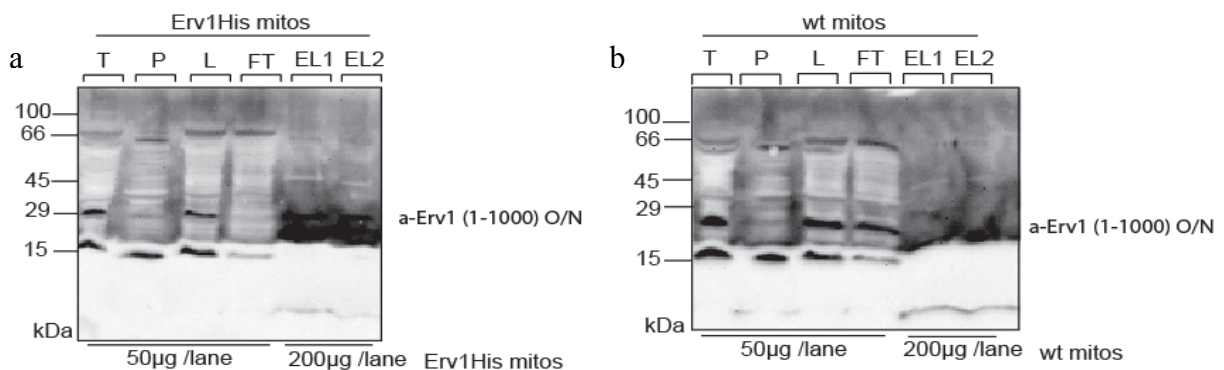
Εικόνα 7: Έκδυση της μεμβράνης της Εικόνας 6 και επώασή της με το διάλυμα που περιείχε: αντι-Erv1 και Erv1 πρωτεΐνη. Η δεύτερη ζώνη των περίπου 15kDa φαίνεται να εξαφανίζεται και να είναι ειδική για την πρωτεΐνη Erv1 όπως συμβαίνει με την ζώνη της Erv1 περίπου στα 22kDa.

Από την Εικόνα 7 φαίνεται η ζώνη των περίπου 15kDa να περιλαμβάνει τουλάχιστον μία πρωτεΐνη που αναγνωρίζεται από το αντι-Erv1 αντίσωμα λόγω του ότι φέρει παρόμοιους αντιγονικούς επιτόπους με αυτούς της Erv1. Επειδή όμως η δεύτερη αυτή ζώνη εμφανίζεται στα GalErv1 μιτοχόνδρια (Εικόνα 5), θεωρούμε ότι η ζώνη αυτή είναι μη ειδική για την πρωτεΐνη Erv1 και ότι με 0,1% Triton απελευθερώνεται όλη η ποσότητα Erv1 στο υπερκείμενο.

1.4 Η πρωτεΐνη Erv1His προσδένεται σε σφαιρίδια νικελίου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες

Για να ελεγχθεί η πρόσδεση της πρωτεΐνης Erv1His σε σφαιρίδια αγαρόζης Ni-NTA (Υλικά και Μέθοδοι) και συνεπώς αν τελικά είναι πιθανό να μπορεί να απομονωθεί από τα μιτοχόνδρια σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες μπορεί να αλληλεπιδρά, χρησιμοποιήθηκαν καθαρά μιτοχόνδρια Erv1His και μιτοχόνδρια αγρίου τύπου ως αρνητικό πείραμα ελέγχου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 250μg από το κάθε στέλεχος μιτοχονδρίων όπου η έκλυση της Erv1His έγινε με 300mM ιμιδαζόλιο (EL1) και τέλος, στα σφαιρίδια προστέθηκε 1x SB με β-merc όπου φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο κρατήθηκε ως υλικό έκλυσης 2 (EL2) (Υλικά και Μέθοδοι).

Με την παραπάνω διαδικασία, για τα μιτοχόνδρια Erv1His, η Erv1His εντοπίστηκε στο υπερκείμενο (L) όπου στη συνέχεια φαίνεται να μη χάνεται ποσότητά της στο κλάσμα FT (flow through) ενώ παραλαμβάνεται όλη στα κλάσματα έκλυσης EL1 και EL2 (Εικόνα 8a). Όσον αφορά τα μιτοχόνδρια αγρίου τύπου φαίνεται να παραλαμβάνεται η πρωτεΐνη Erv1 εξίσου στο L και όχι στο κλάσμα της πελέτας (P), όπως συνέβη και με την Erv1His, αλλά όλη η πρωτεΐνη στη συνέχεια φεύγει στο FT (Εικόνα 8b). Επομένως, τα δύο στάδια της έκλυσης της πρωτεΐνης Erv1 (EL1 και EL2), όπως ήταν αναμενόμενο δεν περιείχαν καθόλου πρωτεΐνη Erv1 όπου να μπορεί στη συνέχεια να εντοπιστεί με αντίσωμα αντι-Erv1. Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 8, όπου είναι εμφανές πως η πρωτεΐνη Erv1His είναι ικανή περιέχοντας μόνο 6 ιστιδίνες στο καρβοξυτελικό της άκρο να προσδένεται στα σφαιρίδια νικελίου και να εκλύεται με 300mM ιμιδαζόλιο.



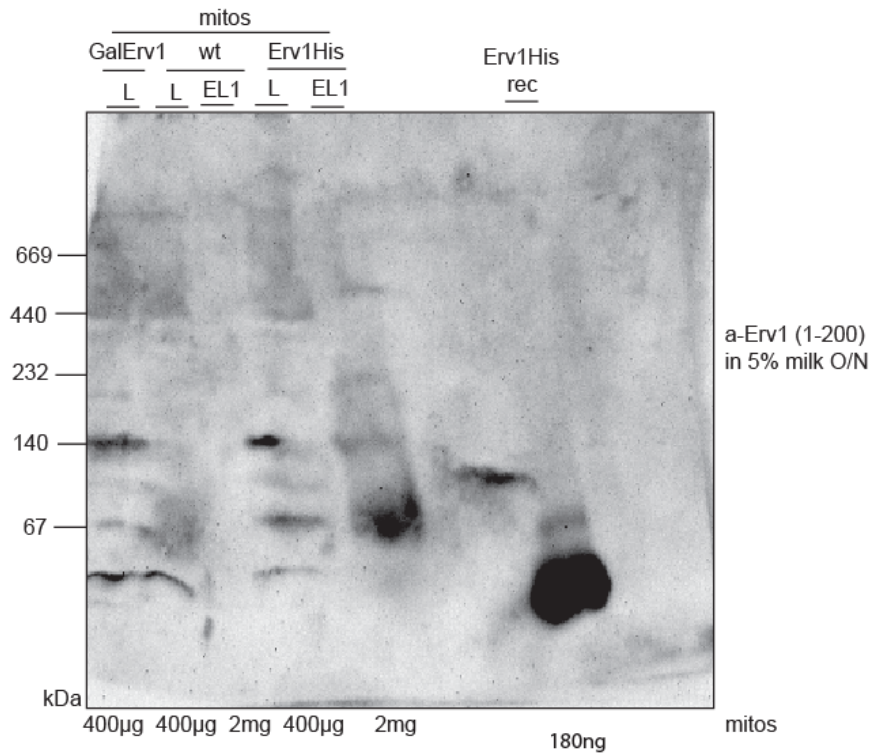
Εικόνα 8: Η Erv1His πρωτεΐνη προσδένεται σε σφαιρίδια νικελίου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Ανοσοαποτύπωση μετά από SDS-PAGE των κλασμάτων που προέκυψαν μετά τη διαδικασία πρόσδεσης της Erv1His (a) σε σφαιρίδια νικελίου και της Erv1 (b) ως αρνητικό πείραμα ελέγχου, όπου: T, το ολικό υλικό για 50μg μιτοχονδρίων, P η πελέτα που προέκυψε μετά την διαλυτοποίηση και

φυγοκέντρηση των μιτοχονδρίων, L, το υλικό που φορτώθηκε στα σφαιρίδια, EL1, το υλικό της έκλουσης από τα σφαιρίδια με 300mM ιμιδαζόλιο από 200μg μιτοχονδρίων και EL2, το υλικό έκλουσης-υπερκείμενο μετά από βράσιμο των σφαιριδίων σε 1xSB με β-merc για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 95°C και φυγοκέντρησή τους.

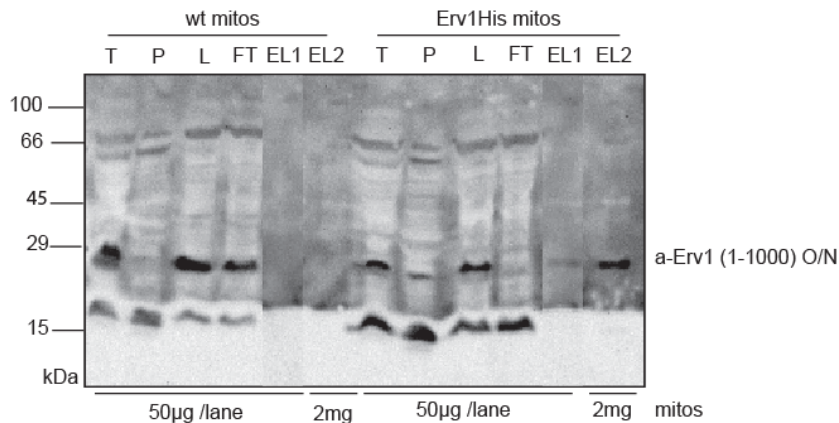
1.5 Εύρεση συμπλόκου της *Erv1His* πρωτεΐνης *in organello* και απομόνωσή του

Για τον εντοπισμό αρχικά και την απομόνωση αργότερα του συμπλόκου *Erv1His* από τα αντίστοιχου στελέχους μιτοχόνδρια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και η μέθοδος της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.

Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη *Erv1His* παραλαμβάνεται στο υπερκείμενο με τη χρήση μικρού ποσοστού απορρυπαντικού Triton 0.1% (Εικόνα 6) και ότι κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες διαλυτοποίησης η *Erv1His* πρωτεΐνη προσδένεται σε σφαιρίδια νικελίου και άρα μπορεί να απομονωθεί, έγιναν προσπάθειες να φανεί αρχικά αν υπάρχει κάποιο σύμπλοκο που να περιλαμβάνει την πρωτεΐνη *Erv1* και άλλους παράγοντες, στα *Erv1His* μιτοχόνδρια, και στη συνέχεια να απομονωθεί. Για αυτό το σκοπό έγινε ηλεκτροφόρηση σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE). Οι ομοιοπολικοί δεσμοί αλλά και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών διατηρούνται με αυτήν την τεχνική. Εκτός από τα *Erv1His* μιτοχόνδρια χρησιμοποιήθηκαν και αγρίου τύπου μιτοχόνδρια, ενώ ως αρνητικό πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν μιτοχόνδρια στελέχους *GalErv1* του σακχαρομύκητα, όπου το γονίδιο *Erv1* έχει κατασταλεί όντας κλωνοποιημένο καθοδικά του υποκινητή γαλακτόζης (*Gal1-10*). Μετά από την διαλυτοποίηση των παραπάνω τριών τύπων μιτοχονδρίων και τον διαχωρισμό με φυγοκέντρηση του υπερκείμενου από την πελέτα αυτών, φαίνεται να υπάρχει ένα σύμπλοκο το οποίο τρέχει περίπου στα 70kDa ακόμα και στα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια (L), όπως φαίνεται στην Εικόνα 9. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης *Erv1* έγινε με O/N επώαση της PVDF μεμβράνης χρησιμοποιώντας αντι-*Erv1* (1/200) αντίσωμα σε 5% γάλα με ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C.



Εικόνα 9: Το Erv1His σύμπλοκο φαίνεται να έχει μοριακό βάρος 70kDa. Ανοσοαποτύπωση μετά από ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BN-PAGE) μετά από διαλυτοποίηση με 0.1% Triton: GalErv1, wt και Erv1His μιτοχονδρίων συνολικής ποσότητας 400µg (T) για κάθε στέλεχος και του πρώτου κλάσματος έκλουσης (EL1), για τα αγρίου τύπου και Erv1His μιτοχονδρίων, από συνολική ποσότητα 2mg μιτοχονδρίων για κάθε περίπτωση. Η Erv1His ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη τρέχει διαλυμένη σε SDS sample buffer.



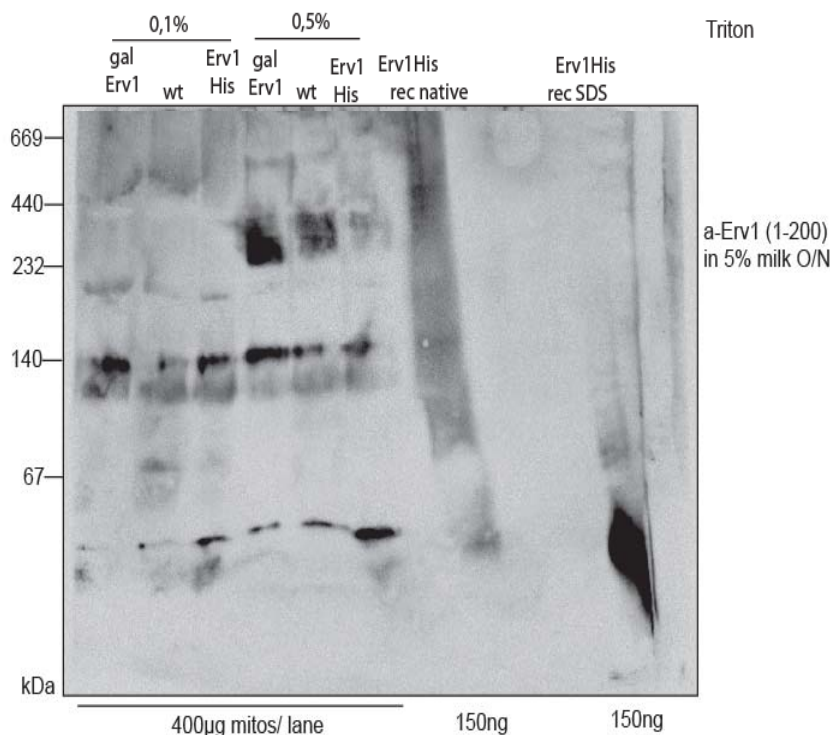
Εικόνα 10: Έλεγχος της πρόσδεσης του Erv1His συμπλόκου. Ανοσοαποτύπωση μετά από SDS-PAGE των δειγμάτων που έχουν προκύψει από την διαδικασία διαλυτοποίησης των μιτοχονδρίων αγρίου τύπου και Erv1His. Η Erv1 πρωτεΐνη φεύγει όλη στο FL που προέκυψε μετά από αρχική διαλυτοποίηση 50µg μιτοχονδρίων, ενώ η Erv1His πρωτεΐνη απομονώνεται με μικρό ποσοστό παρουσίας της στο EL1 της ίδιας ποσότητας μιτοχονδρίων.

Στην Εικόνα 10, παρουσιάζεται το πόσο αποτελεσματική ήταν η διαδικασία της πρόσδεσης του Erv1His συμπλόκου, κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία, κάτω από

φυσιολογικές συνθήκες. Τελικά, φαίνεται ότι η δοκιμασία πρόσδεσης της Erv1 στην συγκεκριμένη περίπτωση πέτυχε.

1.6 Δοκιμασία διαφόρων ποσοτήτων απορρυπαντικού Triton για την καλύτερη παρατήρηση και απομόνωση του Erv1His συμπλόκου

Για την καλύτερη δυνατή παρατήρηση και απομόνωση του συμπλόκου της Erv1His πρωτεΐνης σε κανονικές συνθήκες, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες απορρυπαντικού Triton, συγκεκριμένα 0.1% και 0.5%, για ηλεκτροφόρηση κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες των κλασμάτων έκλουσης μετά τη διαλυτοποίηση των μιτοχονδρίων και την πρόσδεση του συμπλόκου σε σφαιρίδια νικελίου. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι μετά από διαλυτοποίηση των μιτοχονδρίων με 0.1% Triton στα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια υπάρχει μία ζώνη που εντοπίζεται με αντι-Erv1 αντίσωμα περίπου στα 67kDa που φαίνεται λιγότερο αλλά υπάρχει και στα Erv1His μιτοχόνδρια., ενώ εξαφανίζεται και στους δύο αυτούς τύπους μιτοχονδρίων με 0.5% Triton.



Εικόνα 11: Εντοπισμός του Erv1His συμπλόκου στα μιτοχόνδρια με χρήση διαφορετικών ποσοτήτων Triton. Ανοσοαποτύπωση μετά από επώαση της PVDF μεμβράνης με το αντίσωμα αντι-Erv1 (1/200) σε 5% γάλα όπου φαίνεται το 0,5% Triton να επηρεάζει αρνητικά την παρουσία του συμπλόκου Erv1His.

Οπότε, εξαρχής το 0.1% Triton παρουσιάζεται το βέλτιστο για την απομόνωση του θεωρητικού αυτού συμπλόκου. Το αποτέλεσμα φαίνεται να είναι πιο αχνό αλλά συμφωνεί με αυτό της Εικόνας 9, ενώ με τη χρήση του 0.5% Triton το θεωρούμενο σύμπλοκο στα 67kDa χάνεται τελείως.

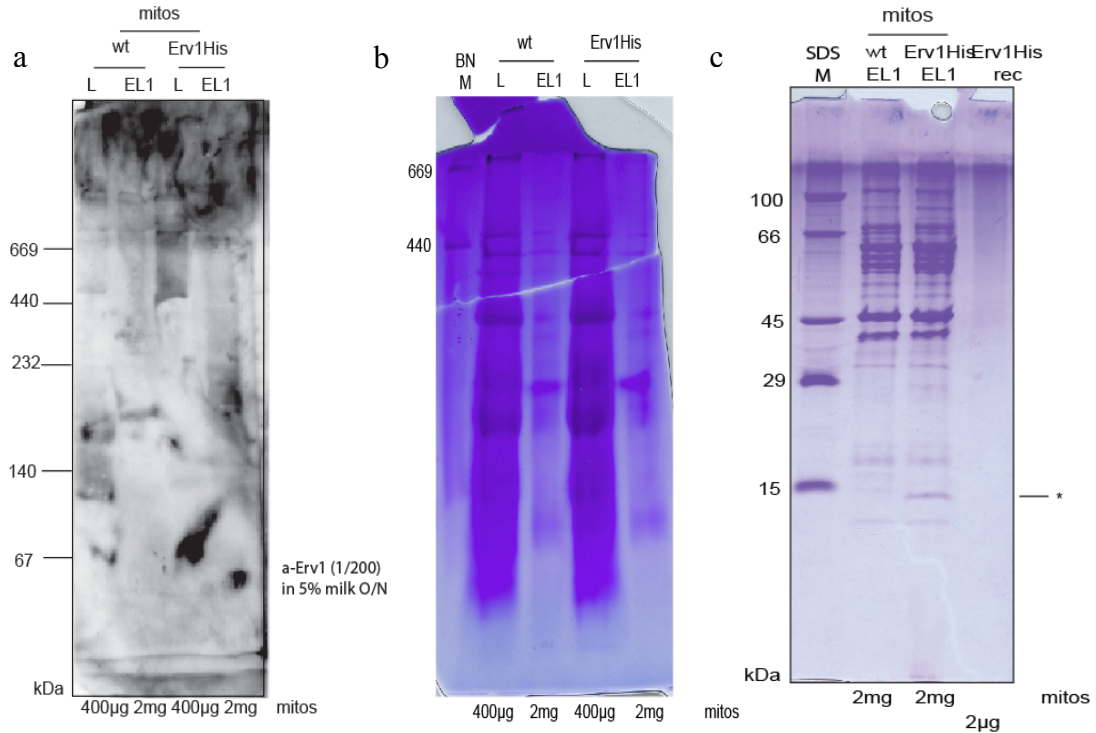
1.7 Κοπή ζωνών και ανάλυση αυτών με φασματοσκοπία μάζας

Αφού παρατηρήθηκε και επιλέχθηκε η ποσότητα του Triton 0.1% ως η βέλτιστη για την απομόνωση του συμπλόκου της πρωτεΐνης Ern1His, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες διαλυτοποίησης ποσότητας 2mg μιτοχονδρίων αγρίου τύπου και Ern1His, για να αναλυθούν τα κλάσματα έκλυσης που προέκυψαν μετά από την πρόσδεση των Ern1 συμπλόκων κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες σε σφαιρίδια νικελίου. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση (Εικόνα 12a) αλλά και χρώση με κυανούν του Coomassie (Εικόνα 12b). Επίσης ποσότητα κλασμάτων έκλυσης από ίδια ποσότητα των παραπάνω τύπων μιτοχονδρίων αναλύθηκαν με SDS-PAGE χρησιμοποιώντας 2μg ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης Ern1His για να δούμε αν υπάρχουν διαφορές στην ένταση των ζωνών που προκύπτουν σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια, οι οποίες μπορούν να αφορούν νέες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την Ern1. Το αποδιατακτικό πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση του εκλούμενου υλικού από τα σφαιρίδια χρωματίστηκε με κυανούν του Coomassie (Εικόνα 12c).

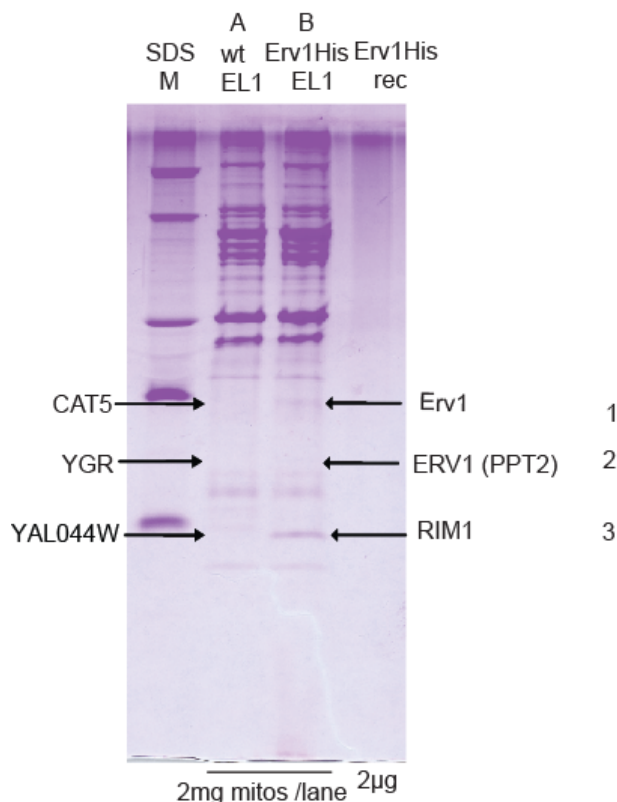
Ενώ τα αποτελέσματα των Εικόνων 12a και 12b δεν ήταν ικανοποιητικό, στην Εικόνα 12c μεταξύ της διαδρομής του αγρίου τύπου μιτοχονδρίων και των Ern1His μιτοχονδρίων υπάρχουν σε τρία διαφορετικά ύψη διαφορές στην ένταση των ζωνών (για παράδειγμα το ύψος στο οποίο σημειώνεται ο αστερίσκος). Συγκεκριμένα, προκύπτουν τρεις ζώνες στη διαδρομή που τρέχει το EL1 των 2mg Ern1His μιτοχονδρίων οι οποίες φαίνονται πιο έντονα σε αυτή τη διαδρομή συγκριτικά με τη διαδρομή των 2mg Ern1 μιτοχονδρίων όπου αυτές οι ζώνες δεν φαίνονται να υπάρχουν. Οι επιπλέον πρωτεΐνες που φαίνονται να εντοπίζονται στα Ern1His και όχι στα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια μπορεί να είναι εν δυνάμει πρωτεΐνες οι οποίες είτε αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Ern1 είτε κρατούνται στο ίδιο σύμπλοκο με αυτή μέσω άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η Ern1.

Για την ταυτοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των ζωνών, ακολούθησε κοπή του συγκεκριμένου πηκτώματος στα έξι συνολικά σημεία και τρυψινόλυση των

κομματιών του πηκτώματος που φαίνονται στην Εικόνα 13 με βέλος. Οι ζώνες στάλθηκαν για ανάλυση των πρωτεϊνών που περιείχαν, με φασματοσκοπία μάζας (nLC-ESI-MS-MS/MS) στο τμήμα Πρωτεϊνοματικής του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας.



Εικόνα 12: α. Ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-Erv1 σε συγκέντρωση 1/200 σε 5% γάλα, μετά από πρόσδεση σε σφαιρίδια νικελίου πρωτεΐνης προερχόμενης από 2mg μιτοχονδρίων Erv1His και αγρίου τύπου ως αρνητικό control. β. BN-PAGE και χρώση με κυανού του Coomassie γ. Διαφορές έντασης ζωνών μεταξύ των EL1 των αγρίου τύπου και Erv1His μιτοχονδρίων. Χρώση με κυανού της Coomassie των κλασμάτων έκλυσης μετά από SDS-PAGE αυτών.



Εικόνα 13: Ταυτοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των ζωνών που προέκυψαν μετά από SDS-PAGE και χρώση με κυανού του Coomassie του υλικού έκλυσης των αγρίου τύπου και Erv1His (EL1 και EL2) μιτοχονδρίων με nLC-ESI-MS/MS.

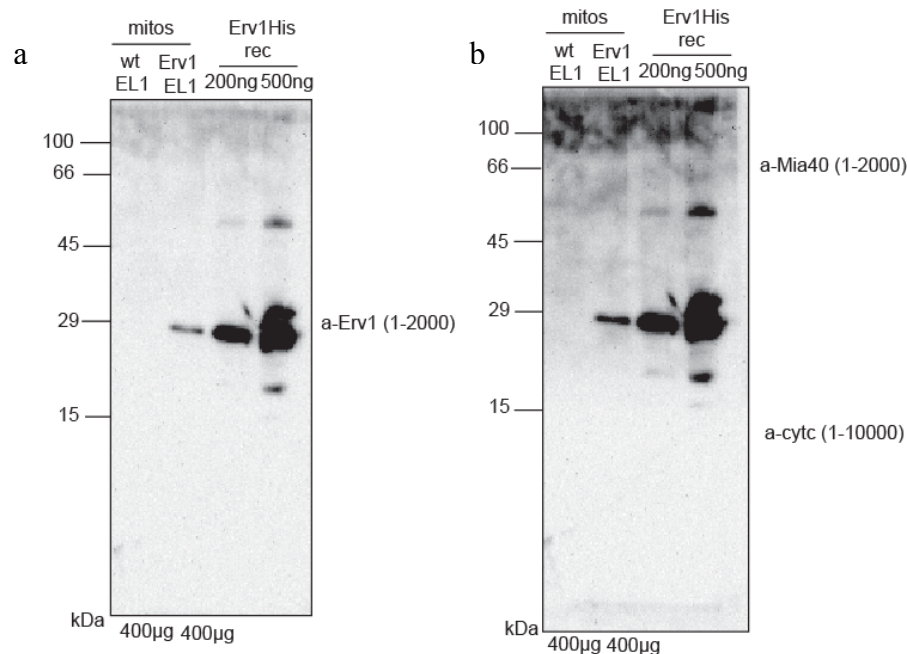
Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στις συγκεκριμένες ζώνες έγινε με τη χρήση του προγράμματος αντιστοίχισής τους σε πρωτεϊνική βάση δεδομένων: Mascot. Πιο αναλυτικά, οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αντιστοιχούν στις συγκεκριμένες ζώνες δόθηκαν σε μια λίστα από τις οποίες επιλέχθηκαν αυτές οι οποίες είναι πιο πιθανό να είναι και οι αντιπροσωπευτικές της κάθε ζώνης. Η επιλογή αυτή έγινε για κάθε περίπτωση με βάση της σημαντικότητας της στοίχισής τους με τις πρωτεΐνες που βρίσκει το πρόγραμμα Mascot η οποία καθορίζεται από μια τιμή (threshold) Οι πρωτεΐνες που παρουσιάζονται παρακάτω επιλέχθηκαν να έχουν κατώτατο όριο την τιμή 30 (threshold).

Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στις συγκεκριμένες ζώνες φαίνονται στην Εικόνα 13. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Ern1 ταυτοποιείται στο ύψος που αναμένεται να τρέχει σύμφωνα με το μοριακό της βάρος (διαδρομή 2, σειρά 1), ενώ φαίνεται να εντοπίζεται και στο ύψος 2 της διαδρομής B με δεύτερη αμέσως σε σημαντικότητα να ταυτοποιείται η PPT2 πρωτεΐνη. Η PPT2, η οποία περιέχει 6 κυστεΐνες, μεταφέρει την ομάδα PPT από το συνένζυμο A (CoA) στο υδροξύλιο OH της σερίνης της πρωτεΐνης ACP για να μετατρέψει από αποένζυμο σε ολοένζυμο. Στο ίδιο ύψος αλλά στην διαδρομή A η YGR είναι μια πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας όπως και η πρωτεΐνη της διαδρομής A στο ύψος 3, YAL044W-A, ενώ RIM1 που δεν έχει κυστεΐνικά κατάλοιπα στην αλληλουχία της είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε έναν από τους δύο κλώνους του DNA, σημαντική για την διατήρηση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Τέλος, η πρωτεΐνη που ανήκει στη ζώνη που εμφανίζεται στο ύψος με αριθμό 1 και διαδρομή A βρέθηκε ότι είναι η CAT5 (YOR125C). Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στη πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης που έρχεται σε επαφή με τη μήτρα των μιτοχονδρίων σε ένα μεγάλο σύμπλοκο με ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της ουβικινόνης καθώς και η ίδια είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση του συνενζύμου Q (Stuible *et al.*, 1998).

Από το παραπάνω πρώτο αποτέλεσμα ανάλυσης συμπεραίνουμε ότι η διαφορά στις δύο ζώνες του εκάστοτε ύψους δε μας δίνει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα, αφού στη διαδρομή B φαίνεται να υπάρχει η Ern1 πρωτεΐνη όπως είναι αναμενόμενο αφού απομονώνεται ως σημασμένη με κυστεΐνες και η RIM1 που προσδένεται στο DNA.

1.8 Η *Mia40* και το κυτόχρωμα *c* δεν εκλύονται από τα σφαιρίδια νικελίου μαζί με την πρωτεΐνη *Erv1His*

Δεδομένων των παραπάνω, προχωρήσαμε σε ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας τα αντισώματα αντι-*Erv1*, αντι-*Mia40* και α -*cytc*, για να δούμε αν ανιχνεύονται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες στο κλάσμα της έκλυσης του πρωτεϊνικού υλικού που προκύπτει μετά από διαλυτοποίηση 4mg αγρίου τύπου και *Erv1His* μιτοχονδρίων. Από την παρακάτω Εικόνα 14 φαίνεται να εντοπίζεται η *Erv1* στο υλικό έκλυσης μετά από SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση ενώ δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο για τις πρωτεΐνες *Mia40* και κυτόχρωμα *c*.



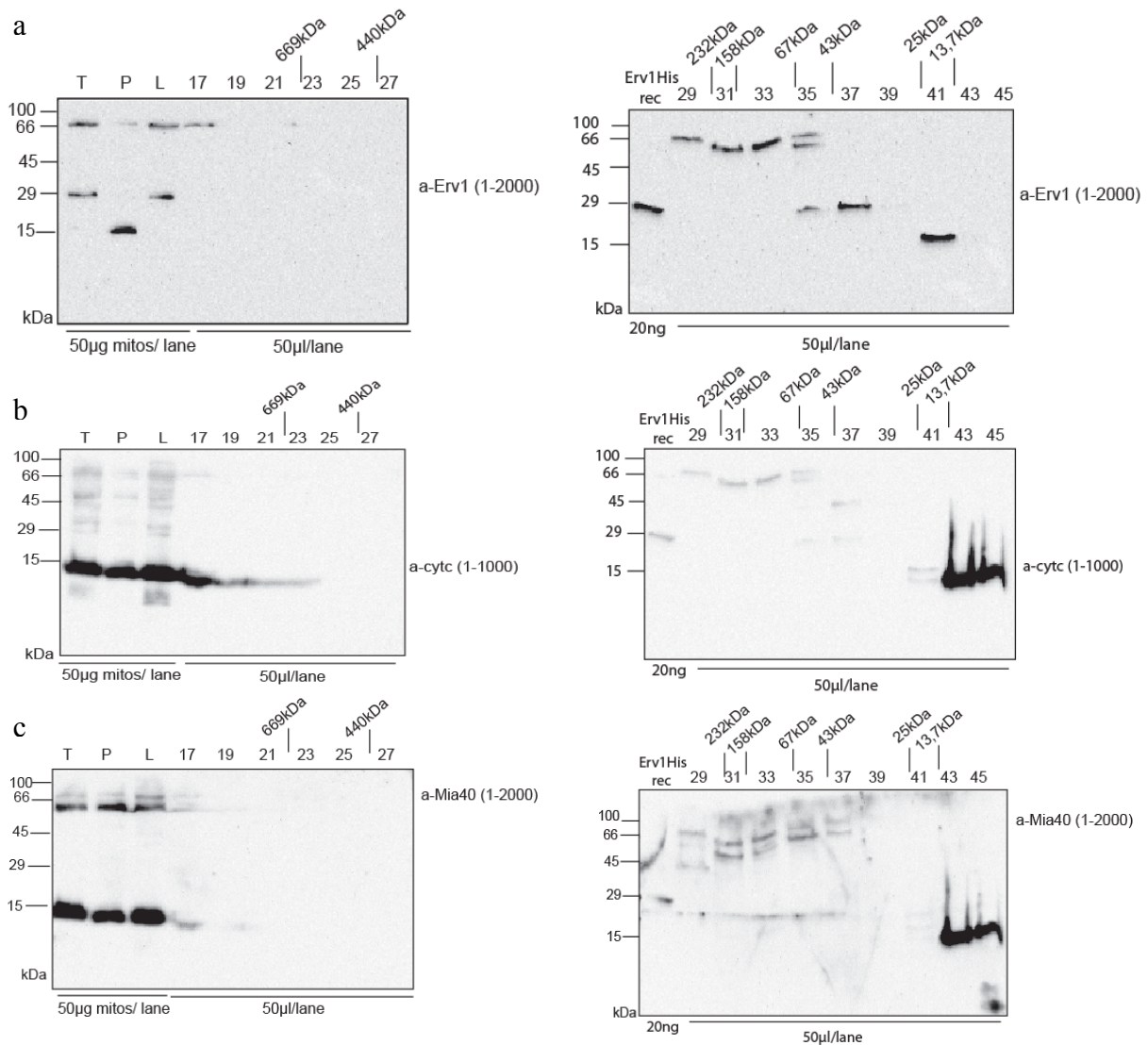
Εικόνα 14: Ανοσοαποτύπωση με αντι-*Erv1* (1/2000), αντι-*Mia40* (1-2000) και αντι-*cytc* (1-10000) της ίδιας μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (a) μετά από απομάκρυνση του αντισώματος με το οποίο εμφανίστηκε αρχικά (αντι-*Erv1*).

Οπότε, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14b, οι πρωτεΐνες *Mia40* και κυτόχρωμα *c* δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη *Erv1* κάτω από τις δεδομένες συνθήκες αφού δεν παραλαμβάνονται στο υλικό έκλυσης.

1.9 Απομόνωση του *Erv1His* συμπλόκου με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και πρόσδεσή του σε σφαιρίδια νικελίου

Για την ενίσχυση των ζωνών που φαίνονται να διαφέρουν σε ένταση μεταξύ των μιτοχονδρίων αγρίου τύπου και *Erv1His* (Εικόνα 12c) προχωρήσαμε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού έτσι ώστε στα συγκεκριμένα κλάσματα όπου θα εντοπιζόνταν με ανοσοαποτύπωση η πρωτεΐνη *Erv1* θα προχωρούσαμε σε πρόσδεση του υλικού τους σε σφαιρίδια νικελίου για απομόνωσή του συμπλόκου ως πιο καθαρού από άλλες πρωτεΐνες που προσδέονται μη ειδικά στα σφαιρίδια κατά την διαδικασία.

Το *Erv1His* σύμπλοκο φαίνεται, χρησιμοποιώντας υλικό από 2mg *Erv1His* μιτοχονδρίων, να παραλαμβάνεται στα κλάσματα με αριθμό “35” έως “37” (Εικόνα 15), που αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος συμπλόκων των 67kDa περίπου. Με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας και αντι-*Mia40* αντίσωμα δεν φάνηκε να εντοπίζεται στα ίδια κλάσματα με αυτά της *Erv1* αλλά σε κλάσματα πρωτεϊνικών συμπλόκων με μοριακό βάρος 158kDa, όπου είναι γνωστό ότι το *Mia40* σύμπλοκο τρέχει στα 140kDa (Εικόνα 15) (Chacinska *et al.*, 2004). Ομοίως, για το κυτόχρωμα c φαίνεται ότι τρέχει σε μοριακό βάρος 43kDa με 45kDa με αποτέλεσμα να ισχυροποιείται ακόμα πιο πολύ η προηγούμενη παρατήρηση ότι το σύμπλοκο της *Erv1His* κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στο μιτοχόνδριο δεν περιλαμβάνει τις δύο πρωτεΐνες *Mia40* και κυτόχρωμα c (Εικόνα 14). Για τον έλεγχο της διαδικασίας της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού έγινε ανοσοαποτύπωση με αντι-*Tim10* το οποίο είναι γνωστό ότι σχηματίζει 70kDa σύμπλοκο (Koehler *et al.*, 1998) (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 15: Το 67kDa Erv1His σύμπλοκο δεν περιλαμβάνει τις Mia40 και cytc πρωτεΐνες. Ανοσοαποτύπωση με αντι-Erv1 (1-2000), αντι-Mia40 (1-2000) και αντι-cytc (1-1000) μετά από χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους του Erv1His συμπλόκου από Erv1His μιτοχόνδρια κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Τα κλάσματα “35” έως “37”, στη συνέχεια επώαστηκαν με σφαιρίδια νικελίου για απομόνωση της Erv1His πρωτεΐνης ως σύμπλοκο με άλλους παράγοντες. Τα δείγματα-κλάσματα της διαδικασίας πρόσδεσης ελέγχθηκαν μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε αποδιατακτικό 12% Tricine BigSwiss πήκτωμα ακρυλαμίδης και η χρώση έγινε με άργυρο. Όμως, το αποτέλεσμα της πρόσδεσης δεν ήταν ικανοποιητικό καθώς η Erv1His δεν φαίνονταν στο κλάσμα της διαδοχικής αυτή τη φορά έκλουσης με 100, 200 και 300mM μιδαζόλιο, ενώ η χρώση των 200ng της αντίστοιχης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ήταν φανερή (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Επειδή οι συνθήκες πρόσδεσης του συμπλόκου της Erv1His σε σφαιρίδια νικελίου για την απομόνωση του δεν βοήθησαν στο να απομονώσουμε το σύμπλοκο

αυτό κατά την έκλυση, σε δεύτερη φάση πραγματοποιήσαμε αλλαγή του υλικού (διαπίδυση) στο οποίο παραλαμβάνονται τα κλάσματα που περιέχουν την Ern1 (35-37) με διάλυμα που περιείχε 50mM NaCl, 50mM Tris pH 7 και 5% γλυκερόλη. Πραγματοποιήθηκε ξανά χρώση με άργυρο των κλασμάτων που προκύπτουν από την διαδικασία μετά την πρόσδεση των δειγμάτων 35-37 σε σφαιρίδια νικελίου. Το αποτέλεσμα έδειξε με ανοσοαποτύπωση να απομονώνεται και να εκλύεται, το Ern1His σύμπλοκο αλλά δεν φάνηκε να παραλαμβάνεται μετά την έκλυση, με 100mM και 300mM ιμιδαζόλιο, αυτή τη φορά, υλικό ErnHis παρά το γεγονός ότι η όλη διαδικασία της πρόσδεσης ξεκίνησε με μεγαλύτερη ποσότητα υλικού που περιείχε και είχε ελεγχθεί από την αρχή ότι περιλαμβάνει την Ern1His πρωτεΐνη.

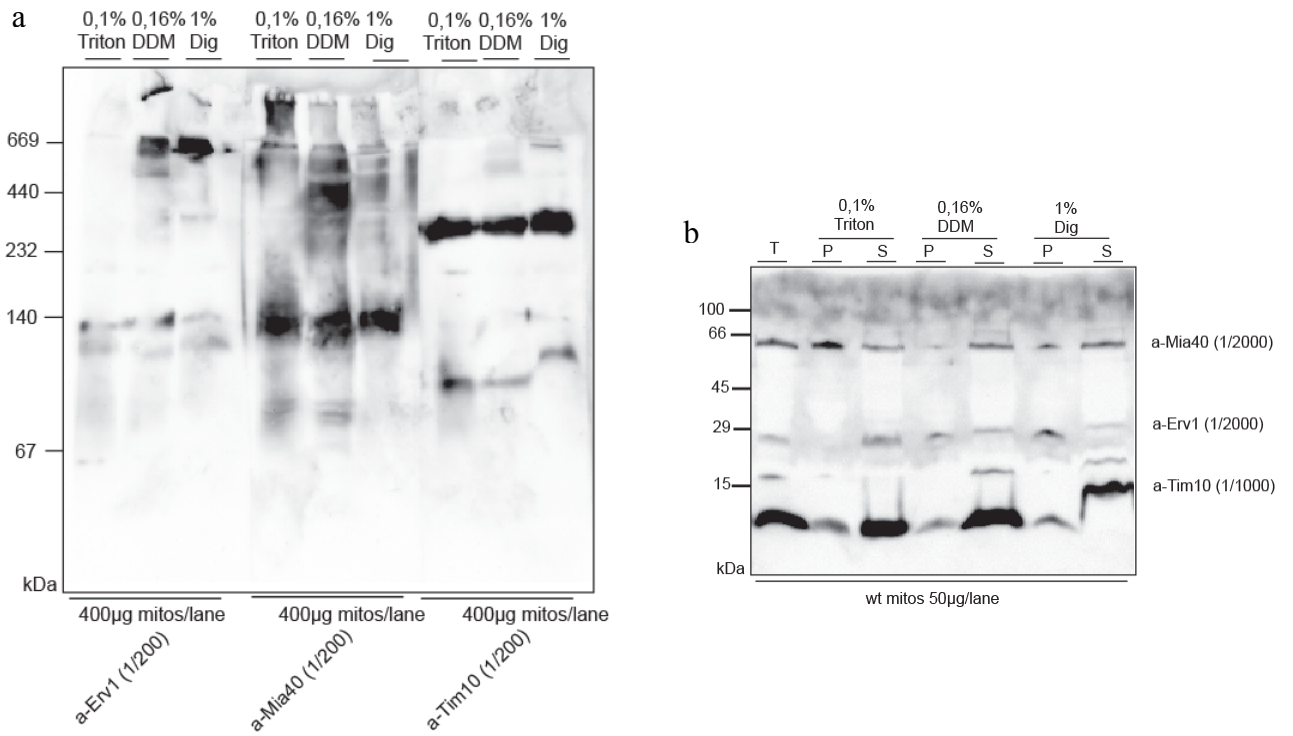
1.10 Η απομόνωση του συμπλόκου της πρωτεΐνης Ern1 φαίνεται να εξαρτάται από τον τύπο του απορρυπαντικού κατά την διαλυτοποίηση των Ern1His μιτοχονδρίων

Για να ελεγχθεί κατά πόσον η απομόνωση του συμπλόκου τελικά είναι ανεξάρτητη από τον τύπο του απορρυπαντικού που χρησιμοποιείται για την διαλυτοποίηση των μιτοχονδρίων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των υπερκειμένων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε αν το σύμπλοκο αρχικά σχηματίζεται, και κάτω από ποιες συνθήκες διαλυτοποίηση μιτοχονδρίων αγρίου τύπου εντοπίζονται στο υπερκείμενο καθεμιά από τις πρωτεΐνες Mia40, Ern1 και κυτόχρωμα c.

Το αποτέλεσμα της Εικόνας 16 δείχνει αρχικά για την Ern1 ότι απομονώνεται και με τα τρία απορρυπαντικά που χρησιμοποιήθηκαν: 0.1% Triton, 0.16% DDM και 1% Digitonin στο υπερκείμενο μετά από την φυγοκέντρηση των διαλυτοποιημένων αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σε TLA-100 55000 στροφές για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε μεγαλύτερο ποσοστό χρησιμοποιώντας 0.1% Triton, σε λιγότερο χρησιμοποιώντας 0.16% DDM και σε ακόμα λιγότερο με 1% Digitonin (Εικόνα 16b).

Η πρωτεΐνη Mia40, φαίνεται να συμπεριφέρεται διαφορετικά από την πρωτεΐνη Ern1 και να υπάρχει η μεγαλύτερη ποσότητά της στην πελέτα με 1% Digitonin, λιγότερη με 0.16% DDM και ακόμα λιγότερη με 0.1% Triton. Τέλος, για την πρωτεΐνη Tim10 παρατηρείται ότι δεν επηρεάζεται σημαντικά ο εντοπισμός της στην πελέτα μετά την διαλυτοποίηση με οποιοδήποτε από τα τρία απορρυπαντικά.

Οπότε φαίνεται το απορρυπαντικό ανάλογα με τον τύπο του να επηρεάζει την απομόνωση του συμπλόκου Ern1His.



Εικόνα 16: Ανοσοαποτύπωση της μεμβράνης PVDF για τον εντοπισμό του συμπλόκου Ern1 στο υπερκείμενο (a) και μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για να εντοπιστεί η ποσότητα Ern1, Mia40 και cyst στην πελέτα (b) αγρίου τύπου μιτοχονδρίων, ανάλογα τον τύπο του απορρυπαντικού.

2. ΣΧΕΤΙΚΗ ΣΤΟΙΧΕΙΟΜΕΤΡΙΑ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ *Erv1*, *Mia40* ΚΑΙ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ C ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

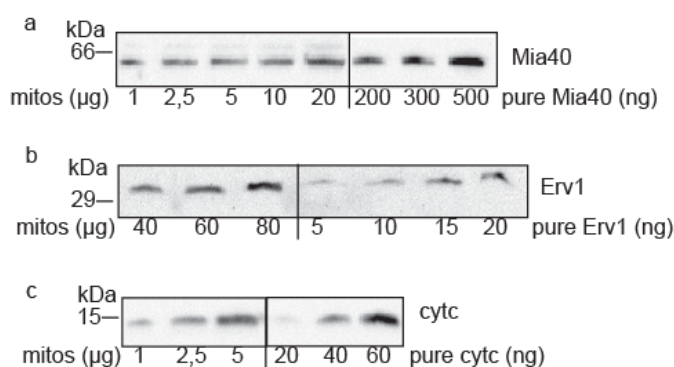
2. 1 Εισαγωγή

Ένα πολύ σημαντικό θέμα κατά την μελέτη της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών είναι αυτό που αφορά τις σχετικές ποσότητες στις οποίες αυτές ανιχνεύονται στο κυτταρικό διαμέρισμα που εντοπίζονται και λειτουργούν. Είναι πολύ σημαντικό, επομένως, στο μιτοχόνδριο να γνωρίζουμε τη σχετική ποσότητα στην οποία εντοπίζεται η *Erv1* σε σύγκριση με την ποσότητα των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτήν, *Mia40* και κυτόχρωμα c, καθώς αυτή η πληροφορία μπορεί να βοηθήσει στην απάντηση πολλών άλλων ερωτημάτων που αφορούν την περαιτέρω ερμηνεία της λειτουργίας της όπως για παράδειγμα τη συχνότητα με την οποία η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες-υποστρώματά της και άρα την πιθανότητα να σχηματίζει μαζί τους σταθερά ή παροδικά σύμπλοκα.

Προς αυτήν την κατεύθυνση, η εύρεση της στοιχειομετρίας των πρωτεϊνών *Erv1*/ALR και *Mia40* *in vivo* είναι πολύ σημαντική. Μια υπόθεση είναι ότι, επειδή η πρωτεΐνη *Erv1*/ALR οξειδώνει την ανηγμένη μορφή της *Mia40* για να την κάνει πάλι λειτουργική και ενεργή έτσι ώστε να μπορεί να οξειδώσει τα υποστρώματά της (Mesecke *et al.*, 2005), αυτό θα εξηγούνταν λογικά από την παρουσία της ALR/*Erv1* σε υποστοιχειομετρικά επίπεδα συγκριτικά με την πρωτεΐνη *Mia40*. Από την άλλη πλευρά, έχει προταθεί μια εναλλακτική υπόθεση δια της οποίας η *Erv1*/ALR και η *Mia40* λειτουργούν σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο για την οξείδωση πρωτεϊνών-υποστρωμάτων (Stojanovski *et al.*, 2008), πράγμα το οποίο θα ήταν δύσκολο να ισχύει αν οι δύο αυτές πρωτεΐνες δεν είναι σε ίση στοιχειομετρία μεταξύ τους *in vivo*. Τέλος, αληθεύει το γεγονός ότι σε έναν αριθμό πειραμάτων, *in vitro* ανασύστασης του συστήματος οξείδωσης που εμπλέκει τις δύο πρωτεΐνες *Erv1* και *Mia40*, έχει χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία διαφορετικών στοιχειομετρικών αναλογιών αυτών των πρωτεϊνών (Tienson *et al.*, 2009).

2.2 Η οξειδάση σουλφυδριλίων *Erv1* εντοπίζεται σε υποστοιχειομετρική ποσότητα συγκριτικά με την οξειδοοδουκτάση *Mia40*, *in vivo*

Για την ποσοτικοποίηση κάθε μιας από τις πρωτεΐνες *Erv1*, *Mia40* και κυτόχρωμα c (*cytc*) φορτώθηκαν διαφορετικές ποσότητες καθαρών αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης, καθώς και διαφορετικές κάθε φορά ποσότητες καθαρών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *Erv1* και *Mia40*, και της πρωτεΐνης: κυτόχρωμα c. Οι πρωτεΐνες του εκάστοτε πήκτωματος μεταφέρθηκαν με ηλεκτροαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με ειδικά αντισώματα που τις αναγνωρίζουν για μία ώρα με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα, το αντίσωμα αντι-Porin που αναγνωρίζει την πορίνη, η οποία είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ακεραιότητας της εξωτερικής τους μεμβράνης αλλά και ως πρωτεΐνη-μάρτυρας της διακύμανσης της έντασης των ζωνών της εκάστοτε πρωτεΐνης των μιτοχονδριακών δειγμάτων.



Εικόνα 17: Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών *Mia40*, *Erv1* και κυτοχρώματος c *in vivo*. Διαφορετικά ποσά καθαρών αγρίου τύπου μιτοχονδρίων και πρωτεϊνών αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με χρήση των ειδικών για τις πρωτεΐνες αυτές αντισωμάτων (a) *Mia40*, (b) *Erv1* και (c) κυτόχρωμα c.

Όσον αφορά τα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών *Erv1* και *Mia40* *in vivo*, βρέθηκε με ημιποσοτική ανάλυση, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageQuant 5.2 και την πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από τις τιμές της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνών και των σχετικών τους ποσοτήτων, ότι η *Mia40* βρίσκεται σε ποσότητα 10μg ανά mg καθαρών μιτοχονδρίων (ή περίπου 220pmoles ανά mg μιτοχονδρίων) (Εικόνα 17, Σχήμα 2 και Πίνακες 4 και 5) και η *Erv1* σε ποσότητα 0.4μg (ή περίπου 18pmoles ανά mg μιτοχονδρίων) (Εικόνα 17, Σχήμα 1 και Πίνακες 2 και 3). Τέλος, με την ίδια ανάλυση βρέθηκε για το κυτόχρωμα c, που αλληλεπιδρά με την *Erv1* να εμφανίζεται σε ποσότητα 15μg ανά mg (ή περίπου 1250pmoles ανά mg

μιτοχονδρίων) (Εικόνα 17, Σχήμα 1 και Πίνακες 6 και 7). Από τα παραπάνω αποτελέσματα-τιμές, προτείνεται ότι η Egn1 εντοπίζεται σε μικρότερη ποσότητα στοιχειομετρικά συγκριτικά με την ποσότητα της Mia40 *in vivo*, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την ενζυμική φύση και δράση της πρωτεΐνης αυτής.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ern1 ΚΑΙ Mia40 ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Ern1 και Mia40, πρέπει κανείς να γνωρίζει ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά στάδια κατά τα οποία αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν. Κατά το πρώτο, η πρωτεΐνη Ern1 αποτελεί ένα υπόστρωμα του οξειδωτικού μονοπατιού αναδίπλωσης των πρωτεϊνών Ern1-Mia40, όπου αναγνωρίζεται από τη Mia40 και εισάγεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, όπου εκεί οξειδώνεται και παίρνει τη σωστή ενεργή δομή της (Terziyska *et al.*, 2007). Κατά το δεύτερο, η Ern1 όντας ένα λειτουργικό ένζυμο μετά την είσοδό της στο διαμεμβρανικό χώρο δρα πάνω στην Mia40 οξειδώνοντας την ανηγμένη δομή της Mia40, έτσι ώστε αυτή με τη σειρά της να μπορεί στη συνέχεια να οξειδώνει τα υποστρώματά της (Gabriel *et al.*, 2007).

Πρόσφατα προτάθηκε, από συνεργάτες μας ερευνητές στην Ιταλία, ότι η ανθρώπινη ALR (hALR), ομόλογη της Ern1, πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την MIA40 μέσω αμινοξέων καθοδικά του δευτέρου κυστεϊνικού της μοτίβου (CRAC) (Banci *et al.*, submitted) *in vitro* στο δεύτερο στάδιο αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών από τα δύο που αναφέρθηκαν παραπάνω, όπου η hALR αναγνωρίζει και δρα πάνω στην MIA40. Θα ήταν λοιπόν εύλογο να υποθέσει κανείς ότι το ίδιο θα μπορούσε να συμβαίνει και για τις πρωτεΐνες Ern1-Mia40 σε ένα ομόλογο σύστημα όπως είναι αυτό του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα. Επομένως, ερευνήσαμε αν υπάρχουν αντίστοιχα σημαντικά αμινοξέα καθοδικά του αντίστοιχου για το CRAC μοτίβο που περιέχει το κυστεϊνικό “ζεύγος κίνησης”, CRSC μοτίβο της Ern1 πρωτεΐνης για αυτήν την αλληλεπίδραση *in vivo*.

Για να μελετηθεί η παραπάνω αλληλεπίδραση μεταξύ των Ern1 και Mia40, έγινε αρχικά η στοίχιση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών ALR-If και Ern1, για να βρεθεί το αντίστοιχο κομμάτι καθοδικά του CRSC μοτίβου (αντίστοιχο του CRAC) στο οποίο υπάρχουν πιθανά σημαντικά αμινοξέα για την αλληλεπίδραση και των πρωτεϊνών γ Ern1 με γ Mia40 (Εικόνα 18). Συγκεκριμένα, η περιοχή στην οποία εστίασαμε για το CRAC μοτίβο μαζί με αυτό και καθοδικά αυτού είναι το κομμάτι CRACVDFKTWM ενώ το αντίστοιχο για την πρωτεΐνη Ern1 είναι το

CRSCNTLLDFQ (Εικόνα 18), οπότε και μεταλλάξαμε στην Erv1 τα υδρόφοβα αμινοξέα: πρώτη και δεύτερη λευκίνη (L), την πρώτη φαινυλανανίνη (F) και την πρώτη γλουταμίνη (Q) καθοδικά αυτού του μοτίβου σε αλανίνη (LLFQ/A), σε δεύτερη φάση όλα αυτά τα αμινοξέα εκτός της φαινυλαλανίνης πάλι σε αλανίνη (LLQ/A) και σε τρίτη φάση των δύο λευκινών και φαινυλαλανίνης σε γλουταμικό οξύ (E). Παράλληλα, έγινε η μετάλλαξη των αμινοξέων καθοδικά του αντίστοιχου CRAC της hALR-If φαινυλαλανίνη (F), τρυπτοφάνη (W) και μεθειονίνη (M) σε αλανίνη (A) για να μελετηθεί με την ίδια προσέγγιση και η περίπτωση αλληλεπίδρασης της hALR-If με τη γMia40 σε ένα ετερόολογο σύστημα, όπως είναι τα μιτοχόνδρια αγρίου τύπου του σακχαρομύκητα.

```

Erv1 MKAIDKMTDNPPQEGLSGRKIIYDEDGKPCRSCNTLLDFQYVTGKISNGLKNLSSNGKLA 60
ALR -----MAAPGERGRFHHGGNLFPLPGGARSEMMDLATDARGRGAGRRDAAASASTPAQA 54
      * : : * : : : . * . . : * * . . : * . *

Erv1 GTG--ALTGEASELMPG-----SRTYRKVDPPDVEQLGRSSWTLLHSVA 102
ALR PTSDSPVAEDASRRRPCRACVDFKTFWMRTQQKRDTKFREDCPDREELGRHSWAVLHTLA 114
      * . . : : * . * . . : : * * * * * * * * * * * * * * * * *

Erv1 ASYPAQPTDQQKGEMKQFLNIFSHIYPCNWC AKDFEKYIRE NAPQVESREELGRWMCEAH 162
ALR AYYPDLPTRPEQQQDMAQFIHLFSKFPCEECAEDLRKRLCRNHDPDRTRACFTQWLCHLH 174
      * * * * * : : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : : * * *

Erv1 NKVNKCLRKPKFDCNFWEKRWKDGWDE---- 189
ALR NEVNRKLGKPDFDCSKVDERWRD GWKDGSCD 205
      * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

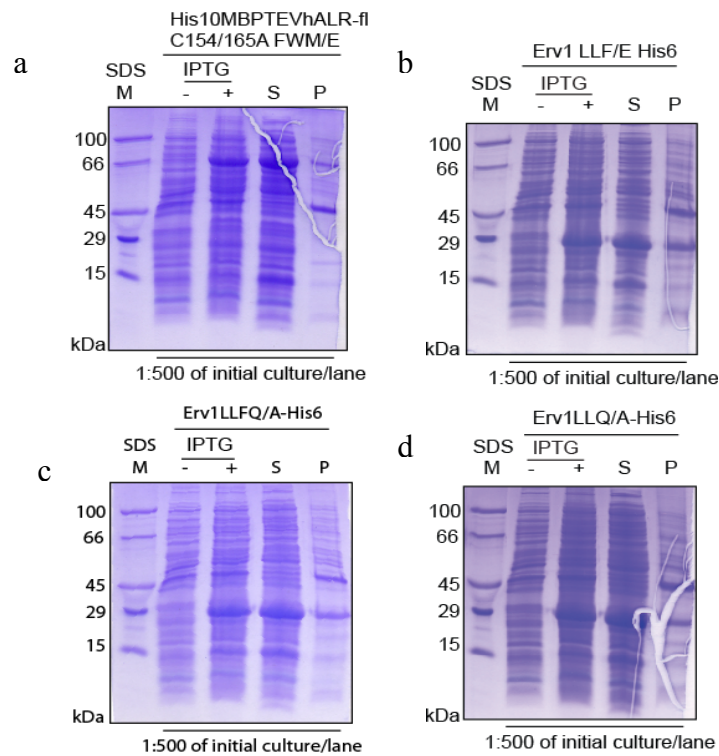
```

Εικόνα 18: Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών Erv1 και hALR-If χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalW2.

3.2 Παραγωγή, υπερέκφραση και καθαρισμός των Erv1 και hALR-If C154/165A μεταλλαγμάτων

Για την πραγματοποίηση του παραπάνω στόχου χρειάστηκε η δημιουργία, η παραγωγή και ο καθαρισμός των Erv1 LLQ/A, LLFQ/A και LLF/E μεταλλαγμάτων (Υλικά και Μέθοδοι). Το ίδιο έγινε και για την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη hALR-If C154/165A FWM/E. Στην Εικόνα 19, φαίνεται με χρώση με κυανού του Coomassie, ότι και οι τέσσερις πρωτεΐνες υπερεκφράζονται και ότι, μετά τη λύση των κυττάρων με τη βοήθεια υπερήχων και την επακόλουθη φυγοκέντρωση, όλες εντοπίζονται στο διαλυτό υπερκείμενο. Οπότε, ακολούθησε στη συνέχεια έκφραση και απομόνωσή τους σε μεγάλη κλίμακα από 4 λίτρα καλλιέργειας στις ίδιες συνθήκες έκφρασης για κάθε περίπτωση όπου πάλι επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι όλες υπερεκφράζονται

(χρήση 10 μ M FAD επιπλέον για κάθε περίπτωση) (Εικόνα 19). Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα που ακολούθησαν.



Εικόνα 19: Έλεγχος της έκφρασης των μεταλλαγμάτων της hALR-If C154/165A FWM/E (a) και των Erv1 LLF/E (b), LLFQ/A (c) και LLQ/A (d). Όλες οι πρωτεΐνες παραλαμβάνονται στο υπερκείμενο μετά το σπάσιμο των κυττάρων.

Στην συνέχεια, οι παραπάνω ανασυνδυασμένες και καθαρές πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν για το *in organello* πείραμα που ακολούθησε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Erv1 και Mia40 του σακχαρομύκητα.

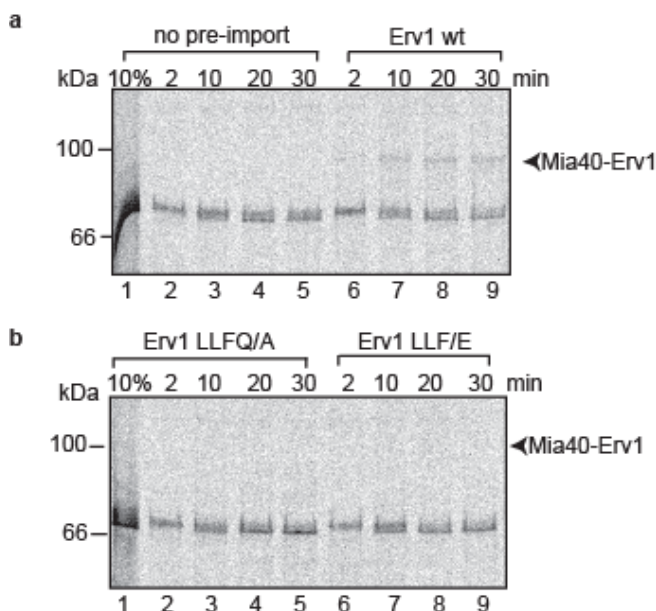
3.3 Η αλληλεπίδραση των Erv1 και Mia40 επηρεάζεται *in organello* μετά από μεταλλαγή συγκεκριμένων αμινοξέων καθοδικά του CRSC μοτίβου της Erv1

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των Erv1 και Mia40 του σακχαρομύκητα μετά την είσοδο της πρώτης στα μιτοχόνδρια, αρχικά έγινε είσοδος ή όχι της αγρίου τύπου Erv1 πρωτεΐνης ή των μεταλλαγμάτων αυτής σε GalErv1 μιτοχόνδρια (Lionaki *et al.*, 2010) για 30 λεπτά (Υλικά και Μέθοδοι) και στη συνέχεια είσοδος της ραδιενεργής Mia40SPC μετά την απομόνωση των μιτοχονδρίων. Σημειώνεται ότι χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη μεταλλαγμένη στο CPC μοτίβο της, πρωτεΐνη Mia40, επειδή το δισουλφιδικό ενδιάμεσο με αυτόν τον τρόπο μπλοκάρεται αφού η πρώτη κυστεΐνη έχει μεταλλαχθεί σε σερίνη μη μπορώντας να προσβάλλει το δισουλφιδικό δεσμό και

να αφήσει να ολοκληρωθεί η απομάκρυνση του οξειδωμένου πια υποστρώματος Erv1 από τη Mia40.

Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν ότι χωρίς αρχικά την εισαγωγή Erv1 πρωτεΐνης στα GalErv1 μιτοχόνδρια, η Mia40 εισήχθη από την ενδογενής Mia40 των μιτοχονδρίων αυτών, τα οποία δεν περιλαμβάνουν Erv1 αλλά περιλαμβάνουν τη Mia40 και μάλιστα σε οξειδωμένη και επομένως λειτουργική μορφή. Το σύμπλοκο που προκύπτει στη συγκεκριμένη περίπτωση τρέχει περίπου στα 100kDa (σειρά 2-5, Εικόνα 20). Όμως, μετά την εισαγωγή της Mia40, αυτή δε σχημάτισε μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο Erv1-Mia40 αφού δεν υπάρχει η Erv1 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων αυτών.

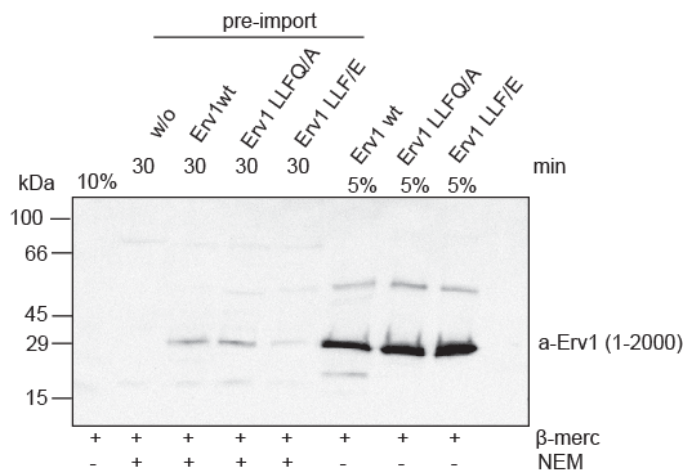
Μετά την είσοδο της αγρίου τύπου Erv1 στα GalErv1 μιτοχόνδρια, σχηματίζεται ένα πολύ ευδιάκριτο σύμπλοκο μεταξύ της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και της ραδιενεργής Mia40 (ως “Mia40-Erv1” σειρές 6-9, Εικόνα 20). Στη συνέχεια, εισαγάγαμε αρχικά είτε το Erv1 LLQ/A είτε το LLFQ/A και τέλος το μετάλλαγμα Erv1 LLF/E χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης με αυτήν που χρησιμοποιήσαμε για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Erv1 (Εικόνα 21) όπου τα επίπεδα όλων των μορφών της Erv1 που εισήχθησαν είναι σχετικά συγκρίσιμα μετά από έλεγχο τους με ανοσοαποτύπωση. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 20 με την είσοδο



Εικόνα 20: Είσοδος σε δύο στάδια ραδιενεργού υποστρώματος σε GalErv1 μιτοχόνδρια. Η είσοδος του ραδιενεργού πρόδρομου μορίου Mia40 αναλύθηκε μετά από είσοδο διαφορετικών μορφών της Erv1 που χρησιμοποιήθηκε ως καθαρή και ανασυνδυασμένη. Πριν από την είσοδο της ραδιενεργής Mia40 εισήχθησαν πρώτα (a) αγρίου τύπου Erv1wt και στη συνέχεια (b) τα μετάλλαγμα της Erv1 LLFQ/A και LLF/E.

αρχικά είτε της Ern1 LLFQ/A ή της LLF/E, πριν από την εισαγωγή της Mia40SPC πρωτεΐνης (σειρά 1-5 και 6-9, αντίστοιχα), η είσοδος της Mia40 δεν επηρεάστηκε, αλλά το “Mia40-Ern1” σύμπλοκο καταργήθηκε τελείως.

Από τα παραπάνω, εύκολα συμπεραίνουμε ότι τα υδρόφοβα αμινοξέα της περιοχής καθοδικά του μοτίβου CRSC που μεταλλάξαμε, και ίσως και του CRAC ομόλογου μοτίβου για την περίπτωση της hALR-If σε ένα ανάλογο πείραμα ελέγχου, είναι τελικά πολύ σημαντικά για την αλληλεπίδραση της εισαγμένης και αναδιπλωμένης Ern1 με το CPC ενεργό μοτίβο της Mia40.

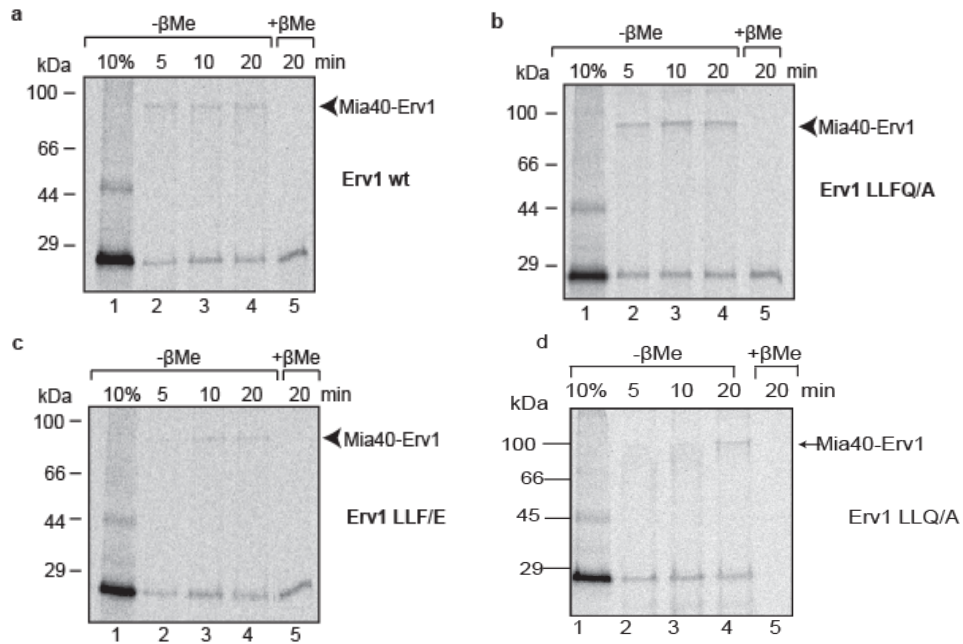


Εικόνα 21: Ανοσοαποτύπωση για τον έλεγχο της ποσότητας αγρίου τύπου Ern1 μεταλλαγμάτων. Η ποσότητα της αρχικά εισαγμένης πρωτεΐνης Ern1 αγρίου τύπου ή μεταλλαγμάτων LLFQ/A και LLF/E στα GalErn1 μιτοχόνδρια πριν την είσοδο της ραδιενεργής πρωτεΐνης Mia40SPC, φαίνεται να είναι περίπου η ίδια.

3.4 Η είσοδος της πρωτεΐνης Ern1 δεν επηρεάζεται *in organello* μετά από μεταλλαγή συγκεκριμένων αμινοξέων καθοδικά του CRSC μοτίβου της Ern1

Για να διαπιστώσουμε αν τα ίδια αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν καθοδικά του CRSC μοτίβου της Ern1 παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο και κατά το πρώτο στάδιο της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Mia40 και Ern1, όπου η Ern1 αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα από την πρωτεΐνη Mia40, τα μεταλλάγματα της Ern1 αλλά και η αγρίου τύπου Ern1 εκφράστηκαν ως ραδιενεργές προ-πρωτεΐνες (Υλικά και Μέθοδοι) για την είσοδό τους σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα. Παρατηρήσαμε για την είσοδο των αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων της Ern1 πρωτεΐνης, το σχηματισμό μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου “Mia40-Ern1” σε όλες τις περιπτώσεις (Εικόνα 22) ενώ για την περίπτωση της εισόδου ραδιενεργής hALR-If C154/165A FWM/E πρωτεΐνης σε μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα δεν μπορέσαμε να δούμε το παραπάνω αποτέλεσμα επειδή η είσοδος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αλλά και της

αγρίου τύπου πρωτεΐνης, όσες φορές δοκιμάστηκε και κάτω από διάφορες συνθήκες, δεν ήταν εφικτή.



Εικόνα 22: Είσοδος και αλληλεπίδραση με την ενδογενής Mia40 των ραδιενεργών μορφών της Erv1. Αυτοραδιογραφία που δείχνει το αποτέλεσμα εισόδου σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια των: (a) αγρίου τύπου Erv1, (b) Erv1 LLF/E μεταλλάγματος, (c) Erv1 LLQ/A μεταλλάγματος και (d) Erv1 LLFQ/A μεταλλάγματος. Η είσοδος του εκάστοτε ραδιενεργού πρόδρομου μορίου πραγματοποιήθηκε για 5, 10 και 20 λεπτά παρουσία NEM, για να μετρηθεί το ενδιάμεσο μεταξύ του πρόδρομου μορίου Erv1 που εισέρχεται ως υπόστρωμα και της ενδογενούς Mia40 ('Mia40-Erv1'), με ακόλουθες διαδικασίες τις SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ hALR-If C154/176A ΚΑΙ hALR-sf C154/165A ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

4.1 Εισαγωγή

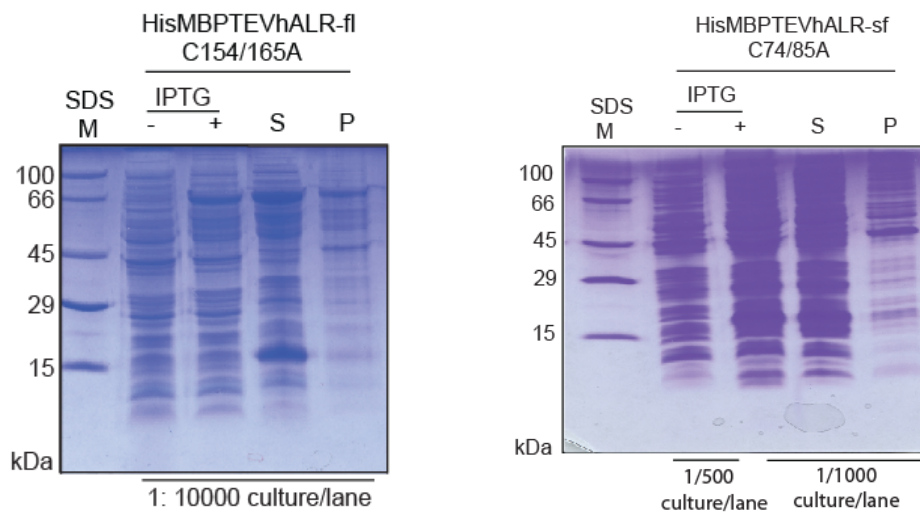
Παράλληλα με το παραπάνω πείραμα έγιναν προσπάθειες να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση της hALR-If σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα με την ενδογενή πρωτεΐνη Mia40, μελετώντας ότι και στην προηγούμενη ενότητα αλλά σε ένα ετερόλογο σύστημα. Προς αυτήν την κατεύθυνση και για την απομόνωση της πρωτεΐνης hALR-If επειδή η ίδια σχηματίζει διμερή κατά την απομόνωσή της από τα βακτήρια, όπως και η hALR-sf, τα οποία κατά τη διάρκεια μιας μέρας σχηματίζουν ευαίσθητα σε DTT ολιγομερή (Dainthakar *et al.*, 2010), μεταλλάξαμε τις μη σημαντικές για το διμερισμό κυστεΐνες της εκάστοτε πρωτεΐνης C154 και C156 σε αλανίνη για τη hALR-If καθώς και τις C74 και C85 σε αλανίνη για την πρωτεΐνη hALR-sf (Υλικά και Μέθοδοι).

Σκοπός, ήταν η εισαγωγή ραδιενεργούς hALR-If σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για να δούμε αρχικά πού εντοπίζεται μέσα στο μιτοχόνδριο και στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί εισαγωγή αυτής σε μιτοχόνδρια ή μιτοπλάστες GalErv1 με ακόλουθη εισαγωγή της ραδιενεργούς Mia40SPC για να δούμε πως αλληλεπιδρούν μεταξύ τους οι δύο πρωτεΐνες hALR-If και γMia40. Παράλληλα θα παρατηρούσαμε αν αυτή η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τα υδρόφοβα αμινοξέα καθοδικά του N-τελικού “ζεύγους κίνησης” κυστεϊνών της hALR-If (CRAC): φαινυλαλανίνη (F), τρυπτοφάνη (W), και μεθειονίνη (M), χρησιμοποιώντας το μετάλλαγμα hALR-If C154/165A FWM/E.

4.2 Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hALR-If C154/165A και της hALR-sf C74/85A πρωτεΐνης

Τα μεταλλάγματα hALR-If C154/165A και hALR-sf C74/85A αυτά που προέκυψαν μετά από μεταλλαξογένεση των γονιδίων τους στον φορέα pET24a(+) όντας κλωνοποιημένα ανοδικά ενός επιτόπου 6 ιστιδινών (His tag), εκφράστηκαν και απομονώθηκαν στη συνέχεια μετά από σπάσιμο των BL21 (DE3 rare) κυττάρων που μετασχηματίστηκαν με τις συγκεκριμένες γονιδιακές κατασκευές (Υλικά και Μέθοδοι). Μετά τη λύση των κυττάρων με τη βοήθεια υπερήχων και την επακόλουθη

φυγοκέντρησή τους, και οι δύο αυτές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, αλλά και η αγρίου τύπου, εντοπίστηκαν κυρίως στο διαλυτό υπερκείμενο και όχι στο ίζημα των κυττάρων μετά την επαγωγή της έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών οι συνθήκες της οποίας αναφέρονται επίσης στα “Υλικά και Μέθοδοι” (Εικόνα 23). Επομένως, φάνηκε ότι οι μεταλλαγές σημείων που φέρουν τα μεταλλάγματα δεν επηρεάζει την διαλυτότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες hALR-If C154/165A και hALR-sf C74/85A, εκφράστηκαν τελικά σε μεγάλη κλίμακα από καλλιέργειες 6 και 2 λίτρων, αντίστοιχα.



Εικόνα 23: Έκφραση και εντοπισμός των πρωτεϊνών hALR-If C154/165A και hALR-sf C74/85A. Η έκφραση και των δύο δίνει την εκάστοτε πρωτεΐνη στο υπερκείμενο μετά την απομόνωσή της από τα κύτταρα καλλιέργεια 6 λίτρων και 50ml, αντίστοιχα.

ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, αρχικά έγινε μια προσπάθεια εύρεσης νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Erv1 ως σύμπλοκο με αυτήν σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Με την κατασκευή του Erv1His στελέχους προσπαθήσαμε να απομονώσουμε, από το υπερκείμενο μετά την διαλυτοποίηση και φυγοκέντρηση των μιτοχονδρίων για πρόσδεσή του σε σφαιρίδια νικελίου, το συγκεκριμένο σύμπλοκο. Αυτό που τελικά βρήκαμε μετά από ηλεκτροφόρηση υλικού έκλυσης κάτω από αποδιατακτικές ή μη συνθήκες, ήταν ένα σύμπλοκο μοριακού βάρους περίπου 70kDa. Το σύμπλοκο αυτό δεν φαίνεται να περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Mia40 και κυτόχρωμα c. Ίσως, επομένως, το σύμπλοκο αυτό να μην αφορά το σύμπλοκο που αναφέρεται στη δημοσίευση των Stojanovski *et al.*, όπου σημειώνεται περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Erv1, Mia40 και το προς οξείδωση υπόστρωμα.

Επειδή η ποσότητα του υλικού έκλυσης στα συγκεκριμένα πειράματα δεν ήταν αρκετή για την πραγματοποίηση ανάλυσης πρωτεϊνικών δειγμάτων με φασματοσκοπία μάζας, κρίνεται αναγκαία η επανάληψη των πειραμάτων, από υλικό διαλυτοποίησης μεγαλύτερης ποσότητας μιτοχονδρίων, και η βελτίωση όσον αφορά το θόρυβο από άλλες πρωτεΐνες οι οποίες στην πραγματικότητα δεν φαίνεται να εντοπίζονται μαζί με την Erv1His πρωτεΐνη σε σύμπλοκο αλλά απομονώνονται μαζί της στο διάλυμα. Εναλλακτικά θα μπορούσε να γίνει πρώτα η πρόσδεση του υλικού διαλυτοποίησης των μιτοχονδρίων σε σφαιρίδια νικελίου και στη συνέχεια η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού προς την ίδια παραπάνω κατεύθυνση βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον θόρυβο ή να γίνει η χρήση χημικών συνδετών (crosslinking) για να επιτευχθεί η απομόνωση τυχόν παροδικού συμπλόκου μεταξύ Erv1 και άλλων πρωτεϊνών.

Σε ένα δεύτερο στάδιο, έγινε μια προσπάθεια ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα: Mia40, Erv1 και κυτόχρωμα c οι οποίες συμμετέχουν σε ένα κοινό σύστημα οξείδωσης πρωτεϊνών-υποστρωμάτων στο μιτοχόνδριο, το λεγόμενο Erv1-Mia40 μονοπάτι (Mesecke *et al.*, 2005). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ημιποσοτική ανάλυση με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες των παραπάνω πρωτεϊνών όπως και αγρίου τύπου μιτοχονδρίων. Οι ποσότητες στις οποίες αυτές βρέθηκαν να υπάρχουν *in vivo* ανά mg μιτοχονδρίων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ήταν: 10ng, 0,4ng και 15ng, αντίστοιχα. Από την βιβλιογραφία, τα μέχρι τώρα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την

ποσότητα των παραπάνω πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο, αφορούν την ποσοτικοποίηση των Mia40 και κυτοχρώματος c, ενώ δεν υπάρχει διαθέσιμο κάποιο δεδομένο σχετικά με την ποσοτικοποίηση της Ern1 στο μιτοχόνδριο. Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά, οι Ghaemmaghami *et al* το 2003 ποσοτικοποίησαν την πρωτεΐνη Mia40 ανά κύτταρο να εντοπίζεται σε αριθμό 5040 μορίων στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα ενώ η ισομορφή του κυτοχρώματος c (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CYCI*) να βρίσκεται σε 7330 μόρια επίσης ανά κύτταρο σακχαρομύκητα στο κυτταρόπλασμα αυτού και στον πυρήνα (Huh *et al.*, 2003). Η συγκεκριμένη έρευνα έγινε με την κατασκευή δύο συλλογών πρωτεϊνών στελεχών του σακχαρομύκητα, που και οι δύο στα περισσότερα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος του γονιδιώματός του, είχαν καρβοξυτελικές διασυνδέσεις με ένα TAP σήμα ή ένα GFP σήμα. (Howson *et al.*, 2005). Κατά την εξακρίβωση της έκφρασης των συνδεδεμένων με τα παραπάνω σήματα πρωτεϊνών σε αυτές τις συλλογές μπόρεσαν και πήραν σημαντική πληροφορία όσον αφορά την απόλυτη αφθονία των πρωτεϊνών (TAP συλλογή) και τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό (GFP συλλογή). Αυτές οι συλλογές αποτέλεσαν ένα σημαντικό μέρος του πρωτεώματος (75%) όπως έδειξαν αναλύοντας με ανοσοαποτύπωση για την TAP συλλογή ή με μικροσκοπική ανάλυση για την GFP συλλογή, όπου όλες οι διασυνδέσεις (fusions) ήταν κάτω από ενδογενής υποκινητές ελαχιστοποιώντας τα πιθανά λάθη (artifacts) εξαιτίας υπερέκφρασης.

Σημειώνεται, ότι οι παραπάνω τιμές των Ern1, Mia40 και κυτοχρώματος c που βρέθηκαν από τους Huh *et al.*, 2003, αναφέρονται στην γενωμική βάση δεδομένων του σακχαρομύκητα *S. Cerevisiae* (SGD) και ότι η ποσοτικοποίηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας GFP για τις πρωτεΐνες Mia40 και κυτόχρωμα c γενικά είναι σε συμφωνία όσον αφορά τη σχετική ποσότητα του κυτοχρώματος c συγκριτικά με τη πρωτεΐνη Mia40 όπως αναφέρεται στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι δεν υπάρχει ακόμα κάποιο δεδομένο διαθέσιμο σχετικά με την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης Ern1, κάνει την προσπάθεια ποσοτικοποίησής της σε αυτήν την εργασία ιδιαίτερα σημαντική για την περαιτέρω μελέτη της λειτουργίας της *in vivo*. Θα ήταν εξίσου χρήσιμο μελλοντικά να διερευνούσαμε πως οι ποσότητες των τριών αυτών πρωτεϊνών, δεδομένου των παραπάνω τιμών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλάζουν όταν το κύτταρο απαντά σε κάποιο ερέθισμα ή σε συγκεκριμένη περιβαλλοντική κατάσταση. Οι αλλαγή στις συγκεκριμένες τιμές των πρωτεϊνών και επομένως ο ρόλος τους, θα

μπορούσε να διερευνηθεί επιπλέον και κατά την διάρκεια ανάπτυξης του σακχαρομύκητα, οπότε αν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν κάποιο αναπτυξιακό ρόλο στο σακχαρομύκητα καθώς και τον ρόλο της διαφορετικής τους ποσοτικής αφθονίας στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες και στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους και υποκυτταρικό εντοπισμό τους.

Σε τρίτη φάση, δεδομένου των πρόσφατων αποτελεσμάτων των συνεργατών μας (Banci *et al.*, submitted) οι οποίοι προτείνουν ότι η πρωτεΐνη ALR, ομόλογη της Erv1, αλληλεπιδρά με την MIA40 μέσω αμινοξέων καθοδικά του δεύτερου κυστεϊνικού της μοτίβου (CRAC), υποθέσαμε ότι το παραπάνω ίσως να αφορά και την ομόλογή της, Erv1, στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα. Τα ομόλογα αυτά αμινοξέα της Erv1 ίσως να μην διαδραματίζουν κάποιο ρόλο όσον αφορά την είσοδο της Erv1 στο μιτοχόνδριο μετά την αναγνώρισή της από τη Mia40, αλλά να βοηθούν στην μετέπειτα αλληλεπίδραση των Erv1-Mia40 στο διαμεμβρανικό χώρο, όπου η Erv1 λειτουργεί για να οξειδώνει ξανά την Mia40.

Πάνω στο συγκεκριμένο θέμα, δείξαμε ότι η είσοδος των ραδιενεργών υποστρωμάτων Erv1 wt, LLFQ/A και LLF/E δεν επηρεάζεται. Το “Mia40-Erv1” μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο να σχηματίζεται, με αποτέλεσμα οι μεταλλαγές καθοδικά του CRSC μοτίβου (που περιλαμβάνει το “ζεύγος κίνησης”) να καταλήγουμε στο ότι δεν έχουν κάποιο ρόλο στην αλληλεπίδραση των Erv1 και Mia40 όταν η πρωτεΐνη Erv1 είναι υπόστρωμα της Mia40. Αντίθετα, φαίνεται ότι μετά την είσοδο των μεταλλαγμάτων της Erv1 και την αλληλεπίδρασή τους με την πρωτεΐνη Mia40 το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο “Erv1-Mia40” δεν σχηματίζεται πια και η αλληλεπίδραση μεταξύ του ραδιενεργού υποστρώματος γ Mia40 και των προεισαχθέντων Erv1 μεταλλαγμένων πρωτεϊνών επηρεάζεται. Η Erv1 όντας αναδιπλωμένη και ενζυμικά λειτουργική, δεν μπορεί να οξειδώσει την Mia40 με αλληλεπίδρασή της μέσω των συγκεκριμένων αμινοξέων που μεταλλάξαμε και έτσι η ίδια δεν μπορεί να γίνει λειτουργική και να οξειδώσει τη Mia40-υπόστρωμα. Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι υπάρχουν αμινοξέα καθοδικά του μοτίβου CRSC της Erv1 (συγκεκριμένα τα αμινοξέα λευκίνη (L), φαινυλαλανίνη (F) και γλουταμίνη (Q)) που όταν μεταλλαχθούν σε συνδυασμούς μεταξύ τους σε αλανίνη (A) ή γλουταμικό οξύ (E) είναι σημαντικά για την επανοξείδωση της Mia40 και την παραπέρα λειτουργία της.

Η αλληλεπίδραση της hALR, ομόλογή της Ern1 πρωτεΐνης, με την Mia40 θα μπορούσε να μελετηθεί εύκολα σε ένα ετερόλογο σύστημα χρησιμοποιώντας μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα. Για τον συγκεκριμένο σκοπό, η hALR-lf C154/165A έχει μεταλλαχθεί καθοδικά του CRAC μοτίβου της, αντίστοιχο του CRSC μοτίβου της Ern1, στα αμινοξέα φαινυλαλανίνη (F), τρυπτοφάνη (W) και μεθειονίνη (M) σε γλουταμικό οξύ (E) και το γονίδιο, που κωδικοποιεί την συγκεκριμένη πρωτεΐνη, έχει κλωνοποιηθεί και σε φορέα pSP64 για πειράματα εισόδου της πρωτεΐνης αυτής ως ραδιενεργής σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια όπως και της αγρίου τύπου αλλά και σε φορέα pET24a(+) για την έκφραση αυτής και της αγρίου τύπου όπως και έγινε. Η πρωταρχική δυσκολία σε αυτό το σύστημα είναι η είσοδος της πρωτεΐνης, αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένης, ως ραδιενεργή στα μιτοχόνδρια όπου έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές διαφορετικές συνθήκες προετοιμασίας του εισαγόμενου πρόδρομου μορίου χωρίς καμία όμως να δώσει κάποιο αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν καθαρισμένες οι αγρίου τύπου hALR-lf C154/165A και η μεταλλαγμένη hALR-lf C154/165A FWM/E για το πείραμα της Εικόνας 23.

Τέλος, σχετικά με την αλληλεπίδραση των Ern1/ALR και μεταλλαγμάτων αυτών με την πρωτεΐνη Mia40, θα μπορούσε αυτή να εξεταστεί *in vitro*, στο επίπεδο των μη ομοιοπολικών δεσμών με τη χρήση της τεχνικής θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Σε αυτή τη διαδικασία η μεταλλαγμένη Mia40SPS ενδείκνυται να χρησιμοποιείται για το γεγονός ότι δεν επιτρέπει τη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών με το εκάστοτε υπόστρωμα όπου δεν θα άφηναν να γίνουν εμφανείς οι μη ομοιοπολικοί που μας ενδιαφέρει να μετρήσουμε.

Οπότε, συνολικά από αυτή την μελέτη προκύπτει ότι η Ern1 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα εντοπίζεται σε ένα σύμπλοκο των ~70kDa, το οποίο δεν περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Mia40 και κυτόχρωμα c, η πρωτεΐνη Ern1 αλληλεπιδρά με την Mia40 αφού εισέλθει και αναδιπλωθεί στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω συγκεκριμένων αμινοξέων καθοδικά του CSRC κυστεϊνικού μοτίβου της και τέλος ότι η Ern1 εντοπίζεται σε υποστοιχειομετρική ποσότητα σε σύγκριση με τη Mia40, ενώ το κυτόχρωμα c εντοπίζεται σε αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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: 937-944.
- Bardwell JC, McGovern K, Beckwith J. 1991. Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* 67: 581-589.
- 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: 1171-1181.
- Becker T, Vogtle FN, Stojanovski D, Meisinger C. 2008. Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1777: 557-563.
- Bessette PH, Cotto JJ, Gilbert HF, Georgiou G. 1999. In vivo and in vitro function of the Escherichia coli periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem* 274: 7784-7792.
- Bihlmaier K, Mesecke N, Terziyska N, Bien M, Hell K, Herrmann JM. 2007. The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol* 179: 389-395.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. 2009. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644.
- Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuan Szklarz 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: 3735-3746.
- Collet JF, Bardwell JC. 2002. Oxidative protein folding in bacteria. *Mol Microbiol* 44: 1-8.
- Daithankar VN, Schaefer SA, Dong M, Bahnson BJ, Thorpe C. 2010. Structure of the human sulfhydryl oxidase augments liver regeneration and characterization of a human mutation causing an autosomal recessive myopathy. *Biochemistry* 49: 6737-6745.
- 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.
- Fass D. 2008. The Erv family of sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1783: 557-566.
- 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: 612-620.

- Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S. 2006. Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function. *World J Gastroenterol* 12: 4951-4958.
- Gerber J, Muhlenhoff U, Hofhaus G, Lill R, Lisowsky T. 2001. Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem* 276: 23486-23491.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-741.
- Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A. 1996. Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 271: 14504-14509.
- Gross E, Sevier CS, Vala A, Kaiser CA, Fass D. 2002. A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat Struct Biol* 9: 61-67.
- Hiniker A, Bardwell JC. 2004. In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* 279: 12967-12973.
- 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: 1528-1535.
- Hofmann S, Rothbauer U, Muhlenbein N, Baiker K, Hell K, Bauer MF. 2005. Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *J Mol Biol* 353: 517-528.
- Hogg PJ. 2003. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* 28: 210-214.
- Howson R, Huh WK, Ghaemmaghami S, Falvo JV, Bower K, Belle A, Dephoure N, Wykoff DD, Weissman JS, O'Shea EK. 2005. Construction, verification and experimental use of two epitope-tagged collections of budding yeast strains. *Comp Funct Genomics* 6: 2-16.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith J. 2003. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 72: 111-135.
- Koehler CM, Tienson HL. 2009. Redox regulation of protein folding in the mitochondrial intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* 1793: 139-145.
- Koehler CM, Merchant S, Schatz G. 1999. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* 24: 428-432.

Koehler CM, Merchant S, Oppliger W, Schmid K, Jarosch E, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Tokatlidis K. 1998. Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J* 17: 6477-6486.

Kutik S, *et al.* 2008. Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* 132: 1011-1024.

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: 715-720.

Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T. 2000. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett* 477: 62-66.

Levitan A, Danon A, Lisowsky T. 2004. Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *J Biol Chem* 279: 20002-20008.

Lionaki E, Aivaliotis M, Pozidis C, Tokatlidis K. 2010. The N-terminal Shuttle Domain of Erv1 Determines the Affinity for Mia40 and Mediates Electron Transfer to the Catalytic Erv1 Core in Yeast Mitochondria. *Antioxid Redox Signal*.

Lisowsky T. 1992. Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 232: 58-64.

Lisowsky T. 1994. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 26: 15-20.

Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A, Hofhaus G. 2001. Mammalian augments of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig Liver Dis* 33: 173-180.

Mamathambika BS, Bardwell JC. 2008. Disulfide-linked protein folding pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 211-235.

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: 1059-1069.

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: 47815-47821.

Neupert W, Herrmann JM. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 723-749.

Pawlowski R, Jura J. 2006. ALR and liver regeneration. *Mol Cell Biochem* 288: 159-169.

Rissler M, Wiedemann N, Pfannschmidt S, Gabriel K, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A. 2005. The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol* 353: 485-492.

Schmidt B, Ho L, Hogg PJ. 2006. Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry* 45: 7429-7433.

Senkevich TG, White CL, Koonin EV, Moss B. 2000. A viral member of the ERV1/ALR protein family participates in a cytoplasmic pathway of disulfide bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12068-12073.

Sevier CS, Kaiser CA. 2006. Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxid Redox Signal* 8: 797-811.

Sickmann A, *et al.* 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13207-13212.

Stojanovski D, Milenkovic D, Muller 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: 195-202.

Stuible HP, Meier S, Wagner C, Hannappel E, Schweizer E. 1998. A novel phosphopantetheine:protein transferase activating yeast mitochondrial acyl carrier protein. *J Biol Chem* 273: 22334-22339.

Terziyska N, Grumbt 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: 1098-1102.

Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Mokranjac 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: 179-184.

Thornton JM. 1981. Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol* 151: 261-287.

Tienison HL, Dabir DV, Neal SE, Loo R, Hasson SA, Boonthung 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: 3481-3490.

Tokatlidis K. 2005. A disulfide relay system in mitochondria. *Cell* 121: 965-967.

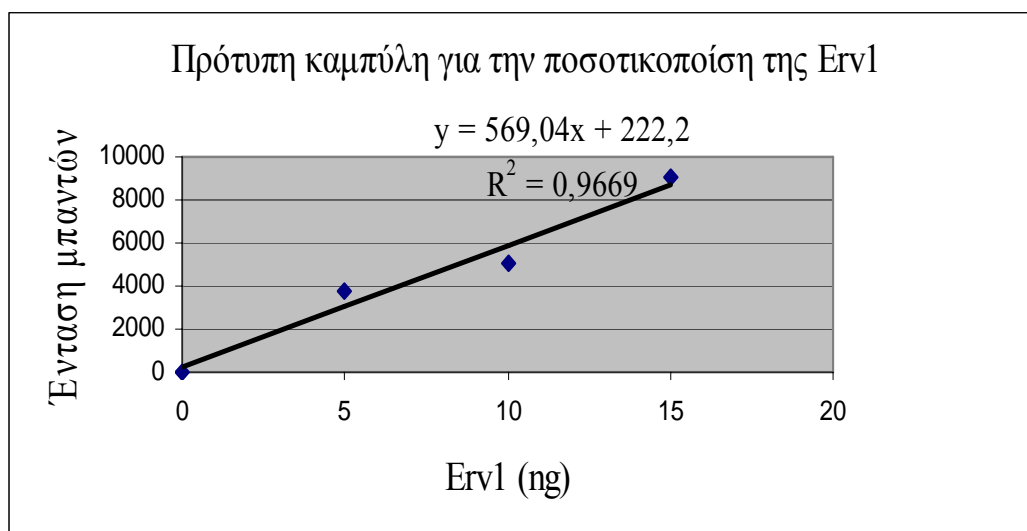
Walther DM, Papic D, Bos MP, Tommassen J, Rapaport D. 2009. Signals in bacterial beta-barrel proteins are functional in eukaryotic cells for targeting to and assembly in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2531-2536.

Διαδίκτυο

<http://www.tutorvista.com/biology/eukaryotic-cell-mitochondria>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1:



Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Ern1. Οι εντάσεις των ζωνών των διαφορετικών ποσοτήτων της Ern1 μετρήθηκαν με το πρόγραμμα ImageQuant 5.2 και φαίνονται στον Πίνακα 2.

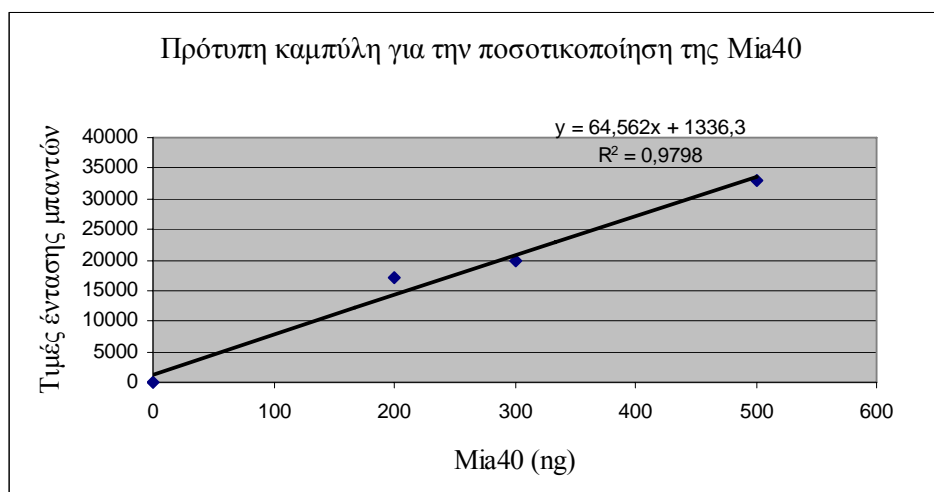
Ποσότητα πρωτεΐνης Ern1 (ng)	Τιμές έντασης ζωνών
0	0
5	3815
10	5084
15	9061

Πίνακας 2: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη Ern1. Στον πίνακα αυτόν φαίνονται οι τιμές ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Ern1 που φορτώθηκε και οι τιμές των εντάσεων των ζωνών αυτών μετρημένες με το πρόγραμμα Image Quant 5.2.

Ποσότητα αγρίου τύπου μιτοχονδρίων (μg)	Τιμές έντασης ζωνών	Ποσότητα Ern1 (ng)	Συγκέντρωση Ern1 στα μιτοχόνδρια (ng/μg)
0	0	0	0
40	9225	16	0,4
60	13844	24	0,4
80	18594	32	0,4
Μέσος όρος			0,4

Πίνακας 3: Ποσοτικοποίηση της Ern1 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Η Ern1 υπάρχει σε ποσότητα 0.4μg ανά mg αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα *in vivo*.

Παράρτημα 2:



Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Mia40. Οι εντάσεις των ζωνών των διαφορετικών ποσοτήτων της ΔN67SPCMia40 μετρήθηκαν με το πρόγραμμα ImageQuant 5.2 και φαίνονται στον Πίνακα 4.

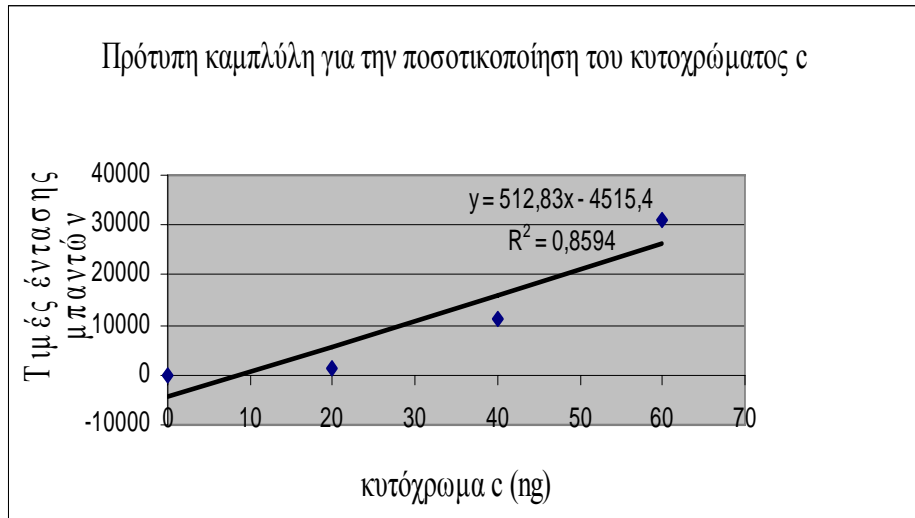
Ποσότητα πρωτεΐνης ΔN67SPCMia40 (ng)	Τιμές έντασης ζωνών
0	0
200	17105
300	19761
500	33041

Πίνακας 4: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη Mia40. Στον πίνακα αυτόν φαίνονται οι τιμές ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης ΔN67SPCMia40 που φορτώθηκε και οι τιμές των εντάσεων των ζωνών αυτών μετρημένες με το πρόγραμμα Image Quant 5.2.

Ποσότητα αγρίου τύπου μιτοχονδρίων (μg)	Τιμές έντασης ζωνών	Ποσότητα Mai40 (ng)	Συγκέντρωση Mia40 στα μιτοχόνδρια (ng/μg)
0	0	0	0
10	8.699	114	114
20	11.698	160	64
Μέσος όρος			10

Πίνακας 5: Ποσοτικοποίηση της Mia40 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Η Mia40 υπάρχει σε ποσότητα 10μg ανά mg αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα *in vivo*.

Παράρτημα 3:



Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης κυτόχρωμα c. Οι εντάσεις των ζωνών των διαφορετικών ποσοτήτων του κυτόχρωματος c μετρήθηκαν με το πρόγραμμα ImageQuant 5.2 και φαίνονται στον Πίνακα 6.

Ποσότητα πρωτεΐνης κυτόχρωματος c (ng)	Τιμές έντασης ζωνών
0	0
20	1457
40	11020
60	31001

Πίνακας 6: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη κυτόχρωμα c. Στον πίνακα αυτόν φαίνονται οι τιμές πρωτεΐνης κυτόχρωμα c (από το στέλεχος *S. cerevisiae*, Sigma) που φορτώθηκε και οι τιμές των εντάσεων των ζωνών αυτών μετρημένες με το πρόγραμμα Image Quant 5.2.

Ποσότητα αγρίου τύπου μιτοχονδρίων (μg)	Τιμές έντασης ζωνών	Ποσότητα κυτόχρωματος c (ng)	Συγκέντρωση κυτόχρωματος c στα μιτοχόνδρια (ng/μg)
0	0	0	0
1	4.793	18	18
2,5	12.885	33	13
5	28.644	64	12
Μέσος όρος			14,8

Πίνακας 7: Ποσοτικοποίηση του κυτόχρωματος c σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα c υπάρχει σε ποσότητα 15μg ανά mg αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα *in vivo*.