

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

# Μελέτη των μηχανισμών εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια

Διδακτορική διατριβή : Ειρήνη Λιονάκη

Μέλη τριμελούς επιτροπής :

Κ. Τοκατλίδης (Επιβλέπων ερευνητής)  
Α. Οικονόμου (Υπεύθυνος καθηγητής)  
Δ. Καρδάσης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ  
ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2010

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 Το μιτοχόνδριο .....	10
1.2 Στόχευση πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια .....	12
1.2.1 Στόχευση στη εξωτερική μεμβράνη .....	12
1.2.2 Στόχευση στη μήτρα .....	13
1.2.3 Στόχευση στην εσωτερική μεμβράνη.....	16
1.2.4 Στόχευση στο διαμεμβρανικό χώρο.....	19
1.3 Μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης.....	20
1.3.1 Mia40, η οξειδάση / υποδοχέας των νεοεισερχόμενων ανηγμένων υποστρωμάτων .....	22
1.3.2 Ern1, μια συντηρημένη σουλφυδρυλοξειδάση στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.....	26
1.3.3 Το μονοπάτι ανταλλαγής δισουλφιδικών δεσμών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.....	30
1.4 Στόχευση βακτηριακών παραγόντων παθογονικότητας στα μιτοχόνδρια του ξενιστή	32
1.4.1 Enteropathogenic Escherichia coli .....	32
1.4.2 Ο γενετικός τύπος παθογονικότητας LEE.....	32
1.4.3 Αναδιοργάνωση της ακτίνης και σχηματισμός του «βάρθου».....	33
1.4.4 Παθογόνοι παράγοντες που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια .....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	35
2.1 Μέθοδοι μοριακής βιολογίας .....	36
2.2 Μέθοδοι <i>in organello</i> .....	36
2.2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από κύτταρα σακχαρομύκητα.....	36
2.2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων ή μη υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια.....	36
2.2.3 Παγίδευση μικτών δισουλφιδικών ενδιαμέσων μετά από είσοδο ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια .....	37
2.2.4 Κατακρήμιση πρόδρομου μορίου που φέρει τον επίτοπο έξι ιστιδινών (His tag) υπό αποδιατακτικές ή μη συνθήκες μετά την είσοδό του σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.....	37
2.2.5 Ανάλυση σχηματισμού συμπλόκων μετά από είσοδο υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	38
2.2.6 Δημιουργία μιτοπλαστών.....	38
2.2.7 Διαλύματα .....	39

2.3 Βιοχημικές Μέθοδοι.....	39
2.3.1 Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια .....	39
2.3.2 Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών <i>in vitro</i> με σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης .....	41
2.3.3 Ανασύσταση <i>in vitro</i> της ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης της Mia40ΔN290 με Ern1His αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένη .....	41
2.3.4 Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry –ITC) .....	42
2.3.5 Χημική πρόσδεση της ΔN72Ern1 μέσω γλουταραλδεϋδης .....	42
2.3.6 Παγίδευση ελεύθερων θειολικών ομάδων στο πεπτίδιο N72Ern1 <i>in vitro</i> .....	42
2.3.7 Μέθοδος πρόσδεσης σε συστοιχίας ακινητοποιημένων πεπτιδίων .....	42
2.3.8 Παρασκευή λιποσωμάτων .....	43
2.3.9 Επίπλευση λιποσωμάτων σε διάλυμα βαθμίδωσης σουκρόζης .....	43
2.3.10 Επίπλευση μιτοπλαστών σε διάλυμα βαθμίδωσης σουκρόζης.....	43
2.3.11 Προετοιμασία δειγμάτων για πρωτεομική ανάλυση.....	44
2.4 <i>In vivo</i> μέθοδοι .....	45
2.4.1 Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη .....	45
2.4.2 Κατασκευή του στελέχους GalErn1 .....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	46
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΟΠΑΣΗΣ TIM12 ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ .....	47
3.1.1 Εισαγωγή/ Σκοπός.....	47
3.1.2 Η Tim12 αλληλεπιδρά με τα λιπίδια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.....	48
3.1.3 Λειτουργική χαρτογράφηση των τμημάτων της πρωτεΐνης Tim12 .....	52
3.1.4 Το αμινοτελικό τμήμα της Tim12 συμμετέχει στη στόχευση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια .....	54
3.1.5 Το καρβοξυτελικό άκρο συμμετέχει στο σχηματισμό των συμπλόκων στα οποία συμμετέχει η Tim12 .....	56
3.1.6 Το καρβοξυτελικό άκρο έχει διπλό ρόλο μεσολαβώντας για τις αλληλεπιδράσεις της Tim12 τόσο με άλλες πρωτεΐνες όσο και με λιπίδια. ....	58
3.1.7 Η πρωτεΐνη Tim12 προσδένεται στα διαμεμβρανικά τμήματα του υποστρώματος AAC, μέσω του αμινοτελικού τμήματός της .....	62
3.1.8 Συζήτηση.....	64
3.2 Μελέτη της σουλφυδρυλοξειδάσης Ern1 του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου .....	68
3.2.1 Εισαγωγή - Σκοπός .....	68
3.2.2 Μέτρηση της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης μεταξύ Ern1 και Mia40 .....	70

3.2.3 Ανάλυση του σχηματισμού μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ των Mia40 και Ern1.....	72
3.2.4 Η οξείδωση της Mia40 από την Ern1 μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαμοριακής επικοινωνίας μεταξύ δύο μορίων Ern1 .....	81
3.2.5 Μελέτη του ρόλου των δύο τμημάτων της Ern1 (αμινοτελικό πεπτίδιο και καρβοξυτελικό τμήμα) κατά την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα Mia40.....	85
3.2.6 Συζήτηση .....	88
3.3 Μελέτη της στόχευσης και του μοριακού μηχανισμού δράσης της τοξίνης του <i>Enteropathogenic E. Coli</i> , EspF, στο μιτοχόνδριο του ξενιστή .....	92
3.3.1 Εισαγωγή – Σκοπός.....	92
3.3.2 Η EspF εισέρχεται ειδικά σε απομονωμένα yeast μιτοχόνδρια .....	94
3.3.3 Η είσοδος της EspF στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα προκαλεί απελευθέρωση κυτοχρώματος c. ....	95
3.3.4 Η EspF εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μήτρα, όπου αλληλεπιδρά περιφερικά με την εσωτερική μεμβράνη. ....	98
3.3.5 Ανίχνευση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τοξίνη Espf μετά τη στόχευσή της στη μιτοχονδριακή μήτρα .....	103
3.3.6 Συζήτηση .....	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 . ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ .....	112
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	118
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	128
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	129
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	132
ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ .....	133

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ / ABSTRACT**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Mia40 και Ern1 αποτελούν δύο βασικά συστατικά του μηχανισμού οξειδωτικής αναδίπλωσης στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, για υποστρώματα πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνες όπως αυτές της οικογένειας των μικρών Tim. Οι μικρές πρωτεΐνες Tim, δρουν ως σαπερόνες συνοδεύοντας υδρόφοβα υποστρώματα που στοχεύουν την εσωτερική μεμβράνη, διαμέσου του υδατικού διαμεμβρανικού χώρου (μονοπάτι TIM22). Η Tim12 είναι η μόνη πρωτεΐνη της οικογένειας που βρίσκεται περιφερειακά προσδεμένη με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Σκοπός του πρώτου μέρους αυτής της μελέτης ήταν να αποδειχθεί η λειτουργία που καθιστά την Tim12 απαραίτητη για τη επιβίωση του κυττάρου. Αρχικά, δείχνεται, ότι η Tim12 έχει εγγενή συνάφεια για τα λιπίδια της εσωτερικής μεμβράνης. Το καρβοξυτελικό τμήμα της Tim12 είναι απαραίτητο για την επιβίωση του σακχαρομύκητα και καθορίζει τόσο την αλληλεπίδραση με την μεμβράνη, όσο και την ενσωμάτωση της Tim12 στα σύμπλοκα με τις άλλες πρωτεΐνες Tim. Το αμινοτελικό άκρο, δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση. Βρέθηκε να περιλαμβάνει πληροφορία για τη στόχευση της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο, καθώς επίσης και να αλληλεπιδρά με τις διαμεμβρανικές περιοχές του υποστρώματος ScAAC. Τα παραπάνω αποτελέσματα, συνάδουν στο συμπέρασμα ότι ο σημαντικός ρόλος της Tim12 επαφύεται στην ιδιότητά της να δρα ως γέφυρα μεταξύ των διαλυτών και των μεμβρανοσύνδετων μετατοπασών, στο μονοπάτι εισόδου στην εσωτερική μεμβράνη, TIM22.

Η Mia40 είναι η οξειδάση / υποδοχέας που αναγνωρίζει τα υποστρώματα που στοχεύουν το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, προωθώντας την οξειδωτική αναδίπλωσή τους. Ένας βασικός ρόλος της Ern1 είναι να ανακυκλώνει την Mia40 στην ενεργή, οξειδωμένη μορφή της. Σκοπός του δεύτερου μέρους της διατριβής ήταν να μελετηθεί ο μοριακός μηχανισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνικών παραγόντων καθώς και η μελέτη της ενδομοριακής επικοινωνίας μεταξύ των δύο τμημάτων της Ern1. Παρατηρήθηκε ότι το αμινοτελικό άκρο της Ern1 είναι αναγκαίο και ικανό τόσο για την ομοιοπολική όσο και για την μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με τη Mia40. Επιπλέον, παρέχονται δεδομένα που υποδεικνύουν την ενδομοριακή ροή ηλεκτρονίων από το αμινοτελικό ευέλικτο άκρο της Ern1 προς τον καταλυτικό πυρήνα της πρωτεΐνης.

Το τρίτο και τελευταίο μέρος αυτής της μελέτης εστιάζει στην μιτοχονδριακή στόχευση της βακτηριακής τοξίνης EspF. Η EspF ενέεται από το εκκριτικό σύστημα τύπου III του *Enteropathogenic E. Coli* (EPEC), μέσα στο κυτταρόπλασμα του επιθηλικού κυττάρου του εντέρου (ξενιστής), όπου προκαλεί μεταξύ άλλων, διακοπή του δυναμικού της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος c. Στην παρούσα διατριβή δείχνεται ότι η EspF στοχεύεται ειδικά στη μιτοχονδριακή μήτρα του σακχαρομύκητα και

προκαλεί περιορισμένη απελευθέρωση κυτοχρώματος c, σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Στη μήτρα η EspF αλληλεπιδρά περιφερειακά με την εσωτερική μεμβράνη. Σε πείραμα συγκατακρήμνισης με στόχο την απομόνωση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τοξίνη, φάνηκε ότι η EspF προσδέεται σε τρεις πρωτεΐνες του μονοπατιού εισόδου στη μήτρα, TIM23. Η πιο άφθονη από αυτές είναι η σαπερόνη της μιτοχονδριακής μήτρας, mtHsp70. Το μοντέλο που προτείνεται για τον μοριακό μηχανισμό δράσης της τοξίνης EspF στο μιτοχόνδριο είναι ότι κατά τη διάρκεια της εισόδου της στο μιτοχόνδριο, συσσωρεύεται πάνω στη σαπερόνη mtHsp70 και παγιδεύει το κανάλι TIM23 στην 'ανοικτή' διαμόρφωση, γεγονός που οδηγεί στην εκπόλωση της μεμβράνης και την επακόλουθη απελευθέρωση κυτοχρώματος c.

## ABSTRACT

Erv1 and Mia40 constitute the two important components of the disulfide relay system that mediates oxidative protein folding of the small Tim proteins and other cysteine rich substrates in the mitochondrial intermembrane space. The small Tims chaperone hydrophobic precursors across the mitochondrial intermembrane space. Tim9 and Tim10 form the soluble TIM10 complex that binds precursors exiting from the outer membrane. Tim12 functions downstream, as the only small Tim peripherally attached on the inner membrane. The aim of the first part of this study was to investigate the function that renders Tim12 essential for the cell, and the domain via which it is mediated. It is shown that Tim12 has an intrinsic affinity for the lipids of the inner mitochondrial membrane. The C-terminal end of Tim12 is essential *in vivo* and it determines the interaction with the membrane and the assembly of the protein in complexes with the other Tims. The N-terminal end, is dispensable and it both contains targeting information and mediates direct binding of Tim12 to the substrates. These results provide a molecular basis for the concept that the essential role of Tim12 relies on its unique properties that allow it to act as a bridge for the soluble and membrane-embedded translocases in the carrier import pathway.

Mia40 is the import receptor that recognizes the substrates that target the intermembrane space of mitochondria introducing disulfide bonds to promote their folding. A key function of Erv1 is to recycle Mia40 to its active oxidative state. The aims in the second part of this study, were to dissect the domain of Erv1 that mediates the interaction with Mia40 and to investigate the intramolecular communication of the two Erv1 domains. It is established that the N' terminal flexible domain of Erv1 is necessary and sufficient for both the covalent and the non-covalent interaction with Mia40 to occur. Furthermore, we provide evidence for the intramolecular electron transfer from the shuttle cysteine pair of Erv1 to the catalytic core of the protein.

The final part of this study focuses on the mitochondrial targeting of the bacterial toxin, EspF. EspF is injected from the type II secretion system of *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) directly into the gut epithelial cell cytoplasm where it exerts its pathogenic role, which includes mitochondrial membrane potential disruption and cytochrome c release. It is shown that EspF is targeted specifically to yeast mitochondrial matrix and causes limited cytochrome c release, very early on. In the

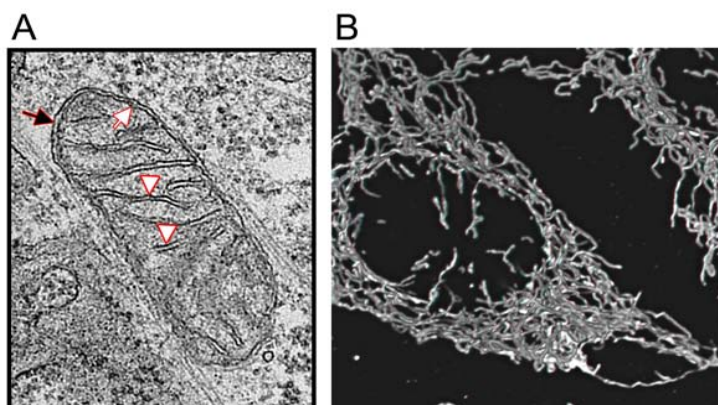


mitochondrial matrix EspF interacts with the inner membrane. Co-purification studies showed that EspF interacts with 3 proteins of the matrix targeted import pathway. The most abundant protein partner identified is the mtHsp70. The model that is proposed for the pathogenic function of EspF, is that by blocking TIM23 import pathway during its import into the mitochondrial matrix, it causes depolarization of the inner membrane, and cytochrome c release.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Το μιτοχόνδριο

Το ευκαρυωτικό κύτταρο περιβάλλεται και περιλαμβάνει ένα εκτεταμένο δίκτυο βιολογικών μεμβρανών που το χωρίζουν σε σχηματισμούς που ονομάζονται οργανίδια. Οι βιολογικές μεμβράνες εκτός από τη διαμερισματοποίηση του εσωτερικού του κυττάρου αποτελούν υπόστρωμα για μια πληθώρα βιοχημικών αντιδράσεων οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για την επιβίωσή του. Τέτοιες είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση (μιτοχόνδριο), η φωτοσύνθεση (χλωροπλάστης), η βιοσύνθεση λιπιδίων (ενδοπλασματικό δίκτυο) και άλλες. Το μιτοχόνδριο είναι ένα σημαντικό οργανίδιο που εμφανίζεται στην πλειονότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το σχήμα των μιτοχονδρίων μέσα σε ένα κύτταρο ποικίλει ανάλογα με τον οργανισμό, τον ιστό προέλευσης και τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου. Έτσι από τη μία πλευρά υπάρχει η κλασική εικόνα του μιτοχονδρίου από ηλεκτρονικό



Εικόνα 1 Εικόνες μιτοχονδρίων. Α. Κλασική εικόνα μιτοχονδρίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα βέλη δείχνουν την εξωτερική (μαύρο) και εσωτερική (άσπρο) μιτοχονδριακή μεμβράνη με τις χαρακτηριστικές πτυχώσεις της. Β. Χρώση της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης κυτόχρωμα c σε κύτταρα HeLa και εμφάνιση με μικροσκοπία φθορισμού. (Από *Dr Mariusz Karbowski*)

εικόνα ενός εκτεταμένου δικτύου νηματοειδών μιτοχονδριακών μεμβρανών που καταλαμβάνουν σημαντικό όγκο του κυττάρου. Το δίκτυο αυτό συνεχώς μεταβάλλεται, με συνεχείς συντήξεις και διαιρέσεις ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου (εικόνα 1B). Η δυναμική ισορροπία ανάμεσα σε εαυτές τις διεργασίες

είναι αυτή που καθορίζει το βαθμό συνοχής αλλά και την έκταση που καταλαμβάνει το δίκτυο μέσα στο κύτταρο.

Τα μιτοχόνδρια είναι γνωστά και ως τα «εργοστάσια» παραγωγής ενέργειας για τα κύτταρα, καθώς προμηθεύουν το κύτταρο ενέργεια με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Το μεγαλύτερο μέρος του ATP που χρησιμοποιείται από το κύτταρο παράγεται μέσα στα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια καταβολισμού οργανικών ενώσεων μέσω του κύκλου του Krebs και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Εκτός όμως από την μετατροπή της χημικής ενέργειας, διαδικασία γνωστή ως αναπνοή, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται και σε μία σειρά άλλων διεργασιών εξίσου σημαντικών για την επιβίωση και την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου. Τέτοιες είναι βιοσύνθεση

της αίμης, η βιοσύνθεση και απόδοση στο κυτταρόπλασμα των συμπλόκων σιδήρου-θείου, η β-οξειδωση των λιπιδίων, η αποθήκευση και απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου, και η μεταγωγή σημάτων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου, του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού (McBride, Neuspiel et al. 2006).

Δεδομένης της κεντρικής θέσης που κατέχουν τα μιτοχόνδρια στη φυσιολογία του κυττάρου, μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες είναι υπεύθυνες για μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, διάφορες μυοπάθειες μεταξύ των οποίων και καρδιοπάθειες, ενδοκρινολογικές ασθένειες, διαβήτη, ενώ όλο και περισσότερες ενδείξεις εμπλέκουν μιτοχονδριακές διαταραχές με τη γήρανση του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού. Οι μιτοχονδριακές διαταραχές μπορεί να οφείλονται είτε σε μεταλλαγές του μιτοχονδριακού DNA, επομένως κληρονομούνται μέσω του ωαρίου της μητέρας στο παιδί, είτε σε μεταλλαγές πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες.

Πρόσφατες πρωτεομικές μελέτες έδειξαν ότι τα μιτοχόνδρια του *Saccharomyces cerevisiae* περιλαμβάνουν περίπου 950 διαφορετικές πρωτεΐνες. Στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια ο αριθμός αυτός φτάνει τα 1500. Από αυτές μόλις 8 στο σακχαρομύκητα και 13 στον άνθρωπο, κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια και συντίθενται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος. Η εισαγωγή των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στην κατάλληλη θέση τους μέσα στο μιτοχόνδριο, είναι μία πολύπλοκη και αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, την οποία έχουν αναλάβει πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα (μετατοπάσες). Το μιτοχόνδριο χωρίζεται σε τέσσερα υπο-μιτοχονδριακά διαμερίσματα, δύο μεμβρανικά (εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη) και δύο υδατικά (διαμεμβρανικός χώρος, στρώμα ή μήτρα). Κάθε διαμέρισμα του μιτοχονδρίου επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες και αποτελείται από ένα ξεχωριστή ομάδα πρωτεϊνών. Η εσωτερική μεμβράνη χωρίζει την μήτρα από τον διαμεμβρανικό χώρο. Είναι μία πολλαπλώς αναδιπλωμένη μεμβράνη και σχηματίζει ένα μεγάλο αριθμό εγκοιλώσεων που ονομάζονται πτυχές (cristae) και εξυπηρετούν στην αύξηση της συνολικής μεμβρανικής επιφάνειας. Η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP, μέσω του κύκλου του Krebs και την αναπνευστικής αλυσίδας πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη και την μήτρα. Στη μήτρα λαμβάνει χώρα και η βιοσύνθεση των συμπλόκων σιδήρου-θείου, μία διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού. Η εξωτερική μεμβράνη ρυθμίζει την επικοινωνία με το κυτταρόπλασμα

και συμμετέχει σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. μαζί με την εσωτερική μεμβράνη συμμετέχει σε διαδικασίες σύντηξης (fusion), διαίρεσης (fission) και απόπτωσης.

Για κάθε ένα από αυτά τα υπομιτοχονδριακά διαμερίσματα έχει εξελιχθεί τουλάχιστον ένας μηχανισμός στόχευσης, που περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές υπομονάδες, οι οποίες συνεργάζονται μεταξύ τους, προκειμένου να μεταφέρουν το πρόδρομο μόριο στον προορισμό του ώστε να πάρει την τελική και λειτουργική δομή του. Αυτοί οι μηχανισμοί στόχευσης περιγράφονται περιληπτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

## **1.2 Στόχευση πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια**

Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι ημιπερατή, δηλαδή επιτρέπει την μη ειδική διάχυση μορίων με μοριακό βάρος μέχρι 5kDa, μέσω των καναλιών που σχηματίζονται από την πιο άφθονη πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης την πορίνη. Οι πρόδρομες μορφές των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που προορίζονται για στόχευση είναι στη συντριπτική πλειοψηφία τους μεγαλύτερες από 5kDa και απαιτούν εξειδικευμένη μονοπάτι εισόδου. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες συνήθως μεταφέρονται και αποδίδονται στο μιτοχόνδριο με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών σαπερονών, μετά την σύνθεση τους στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος (Komiya, Rospert et al. 1997). Σε άλλες περιπτώσεις έχει αναφερθεί η είσοδος των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων ταυτόχρονα με την σύνθεσή τους (co-translationally) από ριβοσώματα που βρίσκονται σε αλληλεπίδραση με τα την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Verner 1993). Η διέλευση αυτών των μορίων διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης επιτυγχάνεται μέσω του συμπλόκου μετατοπάσης TOM (translocase of the outer membrane). Το σύμπλοκο αυτό σχηματίζει τον γενικό πόρο εισόδου (General Import Pore, GIP) και περιλαμβάνει τους υποδοχείς Tom5, Tom6, Tom7 καθώς και την πρωτεΐνη Tom40, η οποία σχηματίζει το κανάλι. Τα πρόδρομα μόρια μετά την μεταφορά τους διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης από το κανάλι TOM, ακολουθούν το δικό τους μονοπάτι στόχευσης ανάλογα με το μιτοχονδριακό διαμέρισμα στο οποίο προορίζονται.

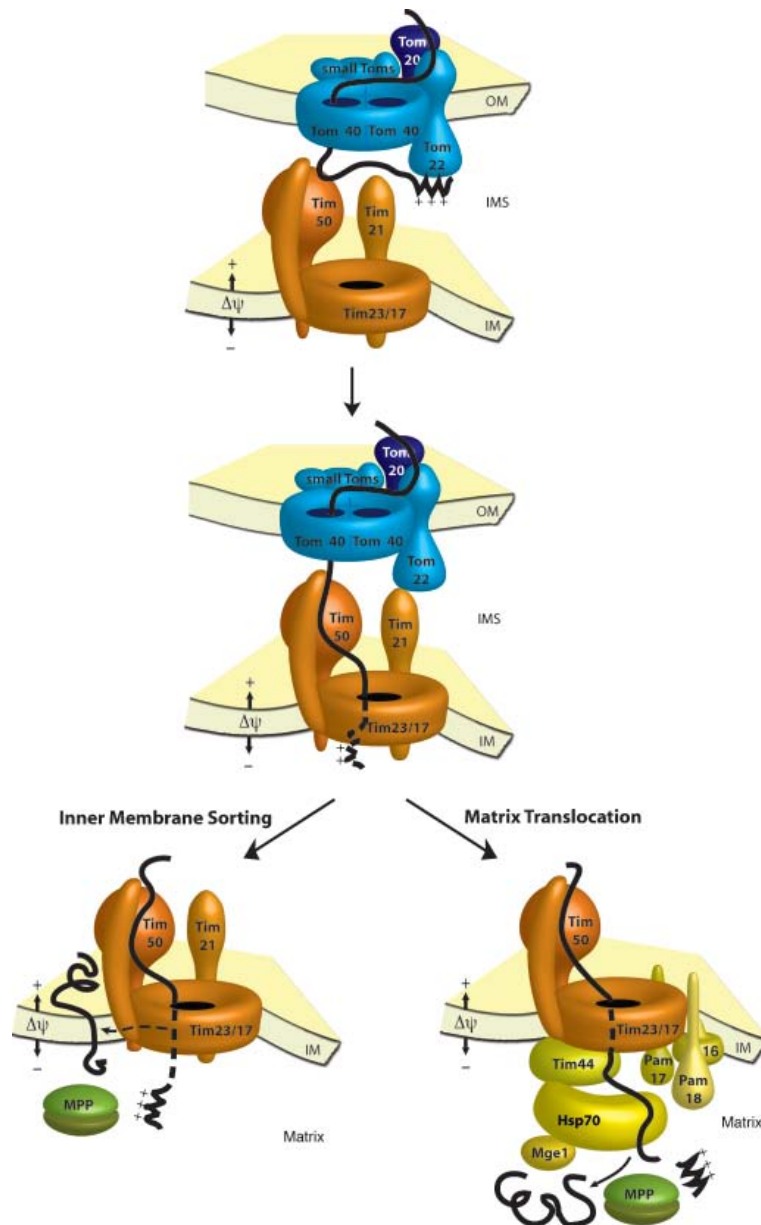
### **1.2.1 Στόχευση στη εξωτερική μεμβράνη**

Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για την εξωτερική μεμβράνη έχουν συνήθως δομή β-

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

### 1.2.2 Στόχευση στη μήτρα

Οι πρωτεΐνες που στοχεύονται στην μιτοχονδριακή μήτρα συνήθως φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο την θετικά φορτισμένη σηματοδοτική αλληλουχία στόχευσης (presequence). Το μονοπάτι αυτό προϋποθέτει την συνεργασία του συμπλόκου μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης TIM23 (Translocase of the Inner Membrane 23), με το σύμπλοκο TOM στην εξωτερική μεμβράνη, την αναπνευστική αλυσίδα, και τον κινητήρα PAM του συστήματος στη μήτρα, ενώ παράλληλα, χρησιμοποιεί δύο πηγές ενέργειας, το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης ( $\Delta\psi$ ) και την υδρόλυση ATP στη μήτρα (εικόνα 2). Τα πρόδρομα μόρια αρχικά δεσμεύονται στους υποδοχείς του συμπλόκου TOM. Μόλις η αλληλουχία στόχευσης της πρωτεΐνης αφήσει το κανάλι Tom40 το υπόστρωμα παραδίδεται στο σύμπλοκο TIM23 (Chacinska, Koehler et al. 2009). Ο πυρήνας του συμπλόκου TIM23 αποτελείται από την πρωτεΐνη Tim23, που σχηματίζει το κανάλι στην εσωτερική μεμβράνη (Truscott, Kovermann et al. 2001), αλλά παίζει ρόλο και στην αναγνώριση του υποστρώματος, και την Tim50, η οποία δρα ως υποδοχέας για τα υποστρώματα (Mokranjac, Sichting et al. 2009), ενώ παράλληλα εξασφαλίζει τη «στεγανότητα» του καναλιού και επομένως της εσωτερικής μεμβράνης σε κατιόντα. Η Tim23 μπορεί να βρίσκεται σε δύο διαμορφώσεις, την ανοικτή, όταν το διαπερνούν κατιόντα, και την



Εικόνα 2 Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συμπλόκου της μετατοπάσης TIM23. Το πρόδρομο μόριο (φαίνεται με μαύρο) αλληλεπιδρά με τα υδατοδιαλυτά τμήματα των υπομονάδων Tim50 και Tim23. Από εκεί και με τη βοήθεια της διαφοράς δυναμικού στην εσωτερική μεμβράνη, η φορτισμένη σηματοδοτική αλληλουχία του πρόδρομου μορίου έλκεται διαμέσου του καναλιού Tim23. Μόλις η σηματοδοτική αλληλουχία προβάλλει προς την μήτρα, προσδένεται από τη σαπερόνη mtHsp70, κεντρική υπομονάδα του κινητήρα PAM. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει την πρόσδεση των υπομονάδων Pam16, Pam18, ούτως ώστε να ενεργοποιηθεί η δράση σαπερόνης της mtHsp70 και να «τραβήξει» το προς μεταφορά μόριο στη μήτρα. Στην περίπτωση που το μόριο στοχεύει στην εσωτερική μεμβράνη, με πλευρική ενσωμάτωση μέσω του συμπλόκου TIM23, τότε οι υπομονάδες του PAM συνήθως δεν είναι απαραίτητες (εικόνα από (van der Laan, Rissler et al. 2006).

κλειστή (Meinecke, Wagner et al. 2006). Η ανοικτή διαμόρφωση επιτυγχάνεται μόνο παρουσία μεμβρανικού δυναμικού και πρόδρομου μορίου (Truscott, Kovermann et al. 2001). Τα πρόδρομα μόρια αλληλεπιδρούν αρχικά με την Tim50 και μετά οδηγούνται στην Tim23. Η καρβοξυτελική περιοχή της Tim50 προεξέχει στο IMS και είναι αυτή που αλληλεπιδρά με τις εισερχόμενες πρωτεΐνες (Geissler, Chacinska et al. 2002; Yamamoto, Esaki et al. 2002). Εκτός από τις Tim23 και Tim50, το σύμπλοκο

μετατοπάσης TIM23 αποτελείται ακόμη από τις Tim21 και Tim17. Ο ακριβής ρόλος τους δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, εντούτοις πιστεύεται ότι η Tim21

συμμετέχει στο σύμπλοκο όταν αυτό αναλαμβάνει την ενσωμάτωση πρωτεϊνών με ένα διαμεμβρανικό τμήμα στην εσωτερική μεμβράνη. Αντίστοιχα, η Tim17 λειτουργεί ως διακόπτης βοηθώντας το σύμπλοκο να αλλάξει μεταξύ των δύο

διαφορετικών μορφών του : αυτής που οδηγεί στην μήτρα και αυτής που οδηγεί στην εσωτερική μεμβράνη (Chacinska, Lind et al. 2005).

Οι σηματοδοτικές αλληλουχίες των πρόδρομων μορίων αφού περάσουν το κανάλι Tim23 προσδένονται από τον κινητήρα PAM (Presequence translocase-Associated Motor). Η κεντρική υπομονάδα του κινητήρα PAM είναι η σαπερόνη mtHsp70 (mitochondrial Heat Shock Protein 70), η οποία προσδένεται στο πολυπεπτίδιο που μεταφέρεται (Yamano, Kuroyanagi-Hasegawa et al. 2008) και προωθεί την είσοδό του στη μήτρα σε μία αντίδραση που απαιτεί την υδρόλυση ATP. Ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου Mge1 (Mitochondrial GrpE 1), ομόλογος της βακτηριακής GrpE, καταλύει την απελευθέρωση του ADP από την mtHsp70 και διεγείρει την πρόσδεση νέου μορίου ATP και την έναρξη ενός νέου κύκλου μετατόπισης του πρόδρομου μορίου προς τη μήτρα. Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του συμπλόκου PAM είναι η ύπαρξη τεσσάρων μεμβρανοσύνδετων συν-σαπερονών οι οποίες ρυθμίζουν και κατευθύνουν την δράση της mtHsp70 στην έξοδο του καναλιού TIM23. Αυτές είναι οι Tim44, Pam 16, Pam18 και Pam17. Η Tim44 είναι περιφερικά προσδεμένη με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και παρέχει ένα δυναμικό σημείο πρόσδεσης για την mtHsp70 (ευαίσθητο στην παρουσία ATP ή/και πρόδρομης πρωτεΐνης), φέρνοντάς την, έτσι, κοντά στο κανάλι και στις αναδύμενες πρωτεΐνες (Slutsky-Leiderman, Marom et al. 2007). Η Pam18 περιλαμβάνει ένα διαμεμβρανικό τμήμα το οποίο αλληλεπιδρά με την Tim17 (D'Silva, Schilke et al. 2008) καθώς και ένα J domain με τη βοήθεια του οποίου διεγείρει την δράση ATPάσης της mtHsp70. Η Pam16 αλληλεπιδρά με το κανάλι Tim23, ενώ παράλληλα σχηματίζει σύμπλοκο με την Pam18 και ρυθμίζει την δράση της (Kozany, Mokranjac et al. 2004; Li, Dudek et al. 2004; Mokranjac, Bourenkov et al. 2006). Η πρόσδεση των πρωτεϊνών Pam18/16 με την mtHsp70 συμβαίνει μόνο όταν αυτή δεν είναι σε αλληλεπίδραση με την Tim44 (Slutsky-Leiderman, Marom et al. 2007). Έτσι, το μοντέλο που επικρατεί είναι το εξής: η mtHsp70 βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με την Tim44 για να συγκρατείται στη θέση που πρέπει κοντά στην έξοδο του καναλιού. Μόλις μία εισερχόμενη πρωτεΐνη προβάλλει από το TIM23, η αλληλεπίδρασή της με την σαπερόνη διαταράσσει την πρόσδεσή της στην Tim44, και τότε η mtHsp70 προσδένεται στο σύμπλοκο Pam18/16 το οποίο διεγείρει τη δράση ATPάσης και προωθεί την μετατόπιση του πρόδρομου μορίου. Η Pam17 έχει προταθεί ότι προσδένεται στην Tim23 ανταγωνιστικά με την Tim21, συμμετέχοντας στην δομική αλλαγή που υπόκειται το σύμπλοκο ανάλογα με τον προορισμό της πρόδρομης

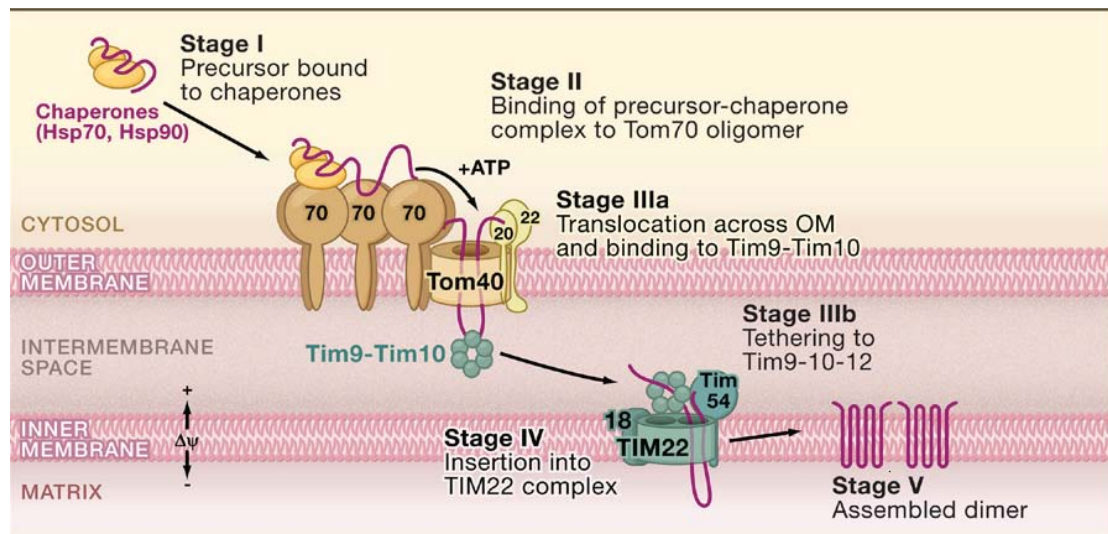


πρωτεΐνης στη μήτρα ή στην εσωτερική μεμβράνη (Popov-Celeketic, Mapa et al. 2008).

### 1.2.3 Στόχευση στην εσωτερική μεμβράνη

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το σύμπλοκο μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης Tim23 μπορεί να συμμετέχει και στην ενσωμάτωση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη. Πρόκειται συνήθως για πρωτεΐνες που έχουν ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα ενώ παράλληλα φέρουν και αμινοτελική σηματοδοτική αλληλουχία. Οι πρωτεΐνες αυτές εισέρχονται στη μήτρα μέσω του TIM23 μέχρις ότου το υδρόφοβο τμήμα τους φτάσει στο κανάλι. Από κει και πέρα, και με τη βοήθεια της υπομονάδας Tim21, η πρωτεΐνη σταματά να αντλείται προς τη μήτρα και χωρίς τη βοήθεια του κινητήρα PAM ενσωματώνεται πλευρικά στην εσωτερική μεμβράνη (Chacinska, Lind et al. 2005; van der Laan, Meinecke et al. 2007). Παράλληλα, έχειδειχθεί ότι το σύμπλοκο TIM23, μέσω της υπομονάδας Tim21, αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας, προωθώντας την ενσωμάτωση στην εσωτερική μεμβράνη (van der Laan, Wiedemann et al. 2006). Για αυτήν την ενσωμάτωση στην εσωτερική μεμβράνη τα ελάχιστα συστατικά που απαιτούνται είναι η μετατοπάση TIM23, μία λιπιδική μεμβράνη πλούσια στο φωσφολιπίδιο καρδιολιπίνη και η ύπαρξη διαφοράς δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης (van der Laan, Meinecke et al. 2007).

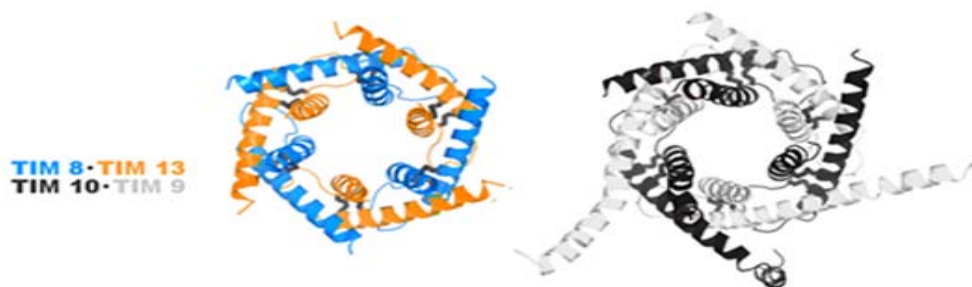
Εκτός από τις πρωτεΐνες που περιέχουν ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ενσωματώνονται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του TIM23, υπάρχουν και οι πολυτοπικές μεμβρανικές πρωτεΐνες όπως αυτές που ανήκουν στην οικογένεια των μεταφορέων, και είναι αρκετά άφθονες στην εσωτερική μεμβράνη. Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι και ο μεταφορέας ATP/ADP (ATP/ADP Carrier – AAC). Ο ρόλος αυτής της πρωτεΐνης στην εσωτερική μεμβράνη είναι να μεταφέρει ένα μόριο ATP από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο με ταυτόχρονη μεταφορά ενός μορίου ADP στην αντίθετη κατεύθυνση, από το διαμεμβρανικό χώρο στη μήτρα. Η πρωτεΐνη AAC περιλαμβάνει 6 διαμεμβρανικές περιοχές (TM1 – 6) οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με λούπες που προβάλλουν στη μήτρα και τον διαμεμβρανικό χώρο εναλλάξ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μεταφορέων είναι τυπικά παραδείγματα πρόδρομων μορίων που απαιτούν τη δράση κυτταροπλασματικών σαπερονών προκειμένου να στοχευθούν στα μιτοχόνδρια. Έτσι, σαπερόνες των οικογενειών Hsp70 και Hsp90, προσδένονται στα πρόδρομα αυτά μόρια προκειμένου να αναστείλουν τη



Εικόνα 3 Μονοπάτι εισόδου TIM22. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού εισόδου της πολυτοπικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, AAC, μέσω του συμπλόκου μετατοπάσης TIM22. Το μονοπάτι για λόγους απλοποίησης χωρίζεται σε 5 στάδια (Stages). Στο πρώτο στάδιο (Stage I) οι πρόδρομες πρωτεΐνες προσδένονται στις σαπερόνες του κυτταροπλάσματος. Στο δεύτερο στάδιο (Stage II) οι σαπερόνες «φορτωμένες» με το υπόστρωμα αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα Tom70 διεγείροντας τον ολιγομερισμό του. Με τη βοήθεια υδρόλυσης ATP οι σαπερόνες απελευθερώνουν το υπόστρωμα πάνω στον υποδοχέα. Στην αρχή του τρίτου σταδίου (Stage IIIa) πραγματοποιείται η μεταφορά του υποστρώματος διαμέσου του συμπλόκου TOM και η πρόσδεσή του στις σαπερόνες του διαμεμβρανικού χώρου, Tim9-Tim10. Στο τέλος του τρίτου σταδίου (Stage IIIb) το σύμπλοκο Tim9-Tim10 «φορτωμένο» ενσωματώνει και την μεμβρανοσύνδετη υπομονάδα Tim12 του συμπλόκου TIM22. Στο τέταρτο στάδιο (stage IV) το υπόστρωμα ενσωματώνεται πλευρικά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ στο πέμπτο και τελευταίο στάδιο (stage V), το AAC διμερίζεται μέσα στην μεμβράνη, αποκτώντας την τελική λειτουργική του δομή (Εικόνα από (Chacinska, Koehler et al. 2009)

μεταφορά τους διαμέσου του υδρόφιλου κυτταροπλάσματος. Μόλις φτάσουν κοντά στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου, οι σαπερόνες αποδίδουν το φορτίο τους, με παράλληλη υδρόλυση ATP, στον ειδικό υποδοχέα Tom70. Ο υποδοχέας Tom70 περιλαμβάνει θέσεις πρόσδεσης τόσο για τα πρόδρομα μόρια όσο και για τις σαπερόνες που τα μεταφέρουν (Wiedemann, Pfanner et al. 2001; Young, Hoogenraad et al. 2003; Wu and Sha 2006; Chacinska, Koehler et al. 2009; Zara, Ferramosca et al. 2009). Τα πρόδρομα μόρια αυτής της κατηγορίας δεν φέρουν αμινοτελική σηματοδοτική αλληλουχία αλλά αντιθέτως περιλαμβάνουν εσωτερικά σινιάλα στόχευσης, τα οποία αναγνωρίζονται από τον Tom70 και προωθούν τον ολιγομερισμό του. Κατά την υδρόλυση του ATP, οι σαπερόνες απελευθερώνονται από τον υποδοχέα και το φορτίο τους αρχίζει την είσοδό του στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου TOM, υπό τη μορφή τριών μοτίβων λούπας (stage IIIa, (Wiedemann, Pfanner et al. 2001). Προκειμένου να ολοκληρωθεί η είσοδος των πρόδρομων μορίων στο διαμεμβρανικό χώρο, πρέπει αυτά να προσδεθούν από μία άλλη κατηγορία σαπερονών, που βρίσκονται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και είναι

ανεξάρτητες από την υδρόλυση ATP. Οι σαπερόνες αυτές είναι εξαμερή σύμπλοκα που αποτελούνται από τρία μόρια Tim9 και τρία μόρια Tim10 (σύμπλοκο Tim9/10), ή από τρία μόρια Tim8 και τρία μόρια Tim13 (σύμπλοκο Tim8/13) (Curran, Leuenberger et al. 2002; Curran, Leuenberger et al. 2002; Lu, Allen et al. 2004; Lu, Golovanov et al. 2004; Vasiljev, Ahting et al. 2004; Webb, Gorman et al. 2006; Beverly, Sawaya et al. 2008). Τα σύμπλοκα αυτά δεν δρουν μόνο κατά τη μεταφορά πρωτεϊνών της οικογένειας των μεταφορέων αλλά και άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης (Hoppins and Nargang 2004; Wiedemann, Truscott et al. 2004; Davis, Alder et al. 2007). Στο σύμπλοκο Tim9/10, έχειδειχθεί ότι η Tim9 παίζει δομικό ρόλο, βοηθώντας στη σταθερότητα του συμπλόκου, ενώ το Tim10 αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα, μέσω του αμινοτελικού του άκρου (Vergnolle, Baud et al. 2005).



Εικόνα 4 Σύγκριση της κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων Tim8/13 και Tim9/10. Τα σύμπλοκα αυτά έχουν σχήμα προπέλας, στην οποία τα μονομερή των δύο υπομονάδων εναλλάσσονται αφήνοντας ένα κενό στο κέντρο της προπέλας, ενώ οι α-έλικες των μονομερών είναι προσανατολισμένες όλες προς την ίδια πλευρά (στην εικόνα προεκτείνονται προς τον θεατή). Το υπόστρωμα προσδέεται πάνω σε αυτές τις α-έλικες (πλοκάμια) και μεταφέρεται σε επόμενα σύμπλοκα μετατοπισμών (εικόνα από (Beverly, Sawaya et al. 2008).

Το αποδιαταγμένο υπόστρωμα, προσδεμένο πάνω στη σαπερόνη, διασχίζει τον υδατοδιαλυτό διαμεμβρανικό χώρο και φτάνει στην εσωτερική μεμβράνη. Εκεί βρίσκεται το σύμπλοκο TIM22 το οποίο αναλαμβάνει την ενσωμάτωση του υποστρώματος στην εσωτερική μεμβράνη. Το σύμπλοκο TIM22 (300kDa) αποτελείται από μεμβρανικές πρωτεΐνες τις Tim22, Tim18, Tim54 και τη περιφερικά προσδεμένη μικρή πρωτεΐνη Tim12. Έχειδειχθεί ότι η Tim12 συμμετέχει και σε ένα μικρότερο σύμπλοκο των 70kDa, το οποίο βρίσκεται εν δυνάμει μέσα στο μεγαλύτερο σύμπλοκο TIM22 των 300kDa, μαζί με τις άλλες δύο μικρές Tim πρωτεΐνες (Tim9 και Tim10) (Adam, Endres et al. 1999; Endres, Neupert et al. 1999). Η Tim12 έχει αναφερθεί ότι δρα μετά το Tim10 στο μονοπάτι αυτό και μπορεί να προσδέει επίσης το προς μεταφορά υπόστρωμα (Sirrenberg, Endres et al. 1998). Εντούτοις, ο ακριβής ρόλος της στο μονοπάτι εισόδου των μεταφορέων της οικογένειας του AAC, μέσω TIM22 παραμένει ασαφής.

Τέλος, στην στόχευση στην εσωτερική μεμβράνη συμβάλει και ένα άλλο σύμπλοκο που βρίσκεται ενσωματωμένο σε αυτήν, το OXA1. Μέσω του OXA1 ενσωματώνονται τα πρόδρομα μόρια τα οποία πρωτογενώς εισέρχονται στην μιτοχονδριακή μήτρα μέσω του TIM23, και δευτερογενώς και από την πλευρά της μήτρας πλέον, ενσωματώνονται στην εσωτερική μεμβράνη. Αυτό το σύμπλοκο συμμετέχει και στην στόχευση των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA και εκφράζονται στα ριβοσώματα της μήτρας.

#### 1.2.4 Στόχευση στο διαμεμβρανικό χώρο

Η είσοδος στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων δεν γίνεται μέσω ενός μόνο μοναπατιού αλλά μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος. Υπάρχουν πρωτεΐνες που περιέχουν μια διμερή αλληλουχία στόχευσης (bipartite presequence) και εισάγονται μέσω του καναλιού TIM23 με το μονοπάτι διακοπής μεταφοράς (stop-transfer) (Hartl, Ostermann et al. 1987; van Loon and Schatz 1987). Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιούν το μονοπάτι TIM23 και μετά υφίστανται δύο διαδοχικά πρωτεολυτικά στάδια ωρίμανσης. Ένα στην πλευρά της μήτρας, όπου απομακρύνεται η θετικά φορτισμένη σηματοδοτική αλληλουχία (presequence) μέσω της πεπτιδάσης της μήτρας MPP, και ένα στην πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου, απ' όπου απελευθερώνεται η ώριμη μορφή, διαλυτή μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο. Παραδείγματα πρωτεϊνών που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία αποτελούν οι πρωτεΐνες cytochrome b2 και c2 (Glick, Brandt et al. 1992), cytochrome c peroxidase (Esser, Tursun et al. 2002), και Mgm1 (Herlan, Vogel et al. 2003). Η μετατόπιση αυτών των υποστρωμάτων απαιτεί την ύπαρξη διαφοράς δυναμικού στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

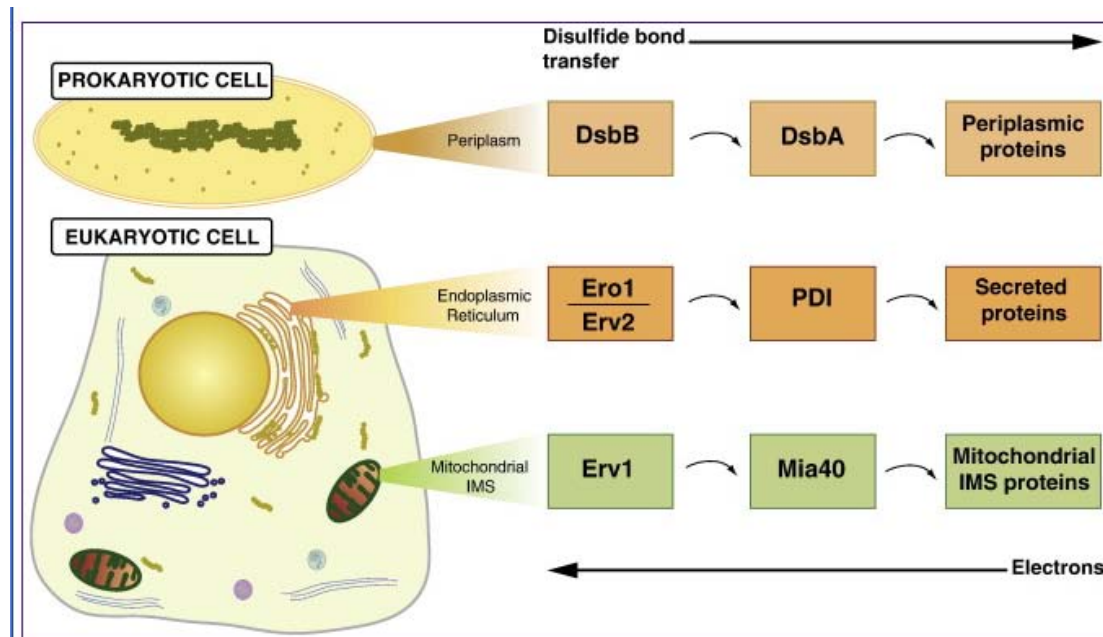
Μια άλλη κατηγορία υποστρωμάτων που στοχεύουν το διαμεμβρανικό χώρο είναι τα μόρια που περιλαμβάνουν συντηρημένα μοτίβα κυστεϊνών και η ωρίμανση και αναδίπλωσή τους εξαρτάται από το σχηματισμό ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών. Αυτή η διαδικασία αναδίπλωσης που περιλαμβάνει σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών ονομάζεται «οξειδωτική αναδίπλωση» και δεν απαιτεί την ύπαρξη διαφοράς δυναμικού, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης δεν χρησιμοποιούνται. Οι πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν δισουλφιδικούς δεσμούς είναι στην πλειοψηφία τους μικρού μοριακού βάρους (μέχρι 22kDa) και εμπίπτουν κυρίως σε δύο κατηγορίες. Αυτές που περιλαμβάνουν μοτίβα

CX<sub>3</sub>C και αυτές που περιλαμβάνουν μοτίβα CX<sub>9</sub>C. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μικρές πρωτεΐνες Tim που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες παραγράφους, ενώ στη δεύτερη ανήκουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό του συμπλόκου της κυτοχρωμικής οξειδάσης π.χ. Cox11, Cox12, Cox17, Cox19, Cox23 και άλλες (Koehler and Tienson 2009). Ο μηχανισμός οξείδωσης και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτόν περιγράφονται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

### 1.3 Μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τα μιτοχόνδρια υπέστησαν σημαντικές αλλαγές προκειμένου να προσαρμοστούν στις ανάγκες ενός ενδοκυτταρικού οργανιδίου. Εντούτοις, οι βασικές λειτουργίες όπως η μετατροπή της ενέργειας, η διαίωσιση και η έκφραση της γενετικής πληροφορίας, καθώς και η σύνθεση και αναδίπλωση των πρωτεϊνών, παραμένουν αρκετά όμοιες με τις αντίστοιχες των βακτηρίων. Στα βακτήρια οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες αποκτούν την τελική διαμόρφωσή τους με τη βοήθεια σαπερονών. Στο κυτταρόπλασμα, οι σαπερόνες χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση ATP προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με τα αποδιαταγμένα (πλήρως ή μερικώς) υποστρώματά τους. Δύο συστήματα σαπερονών παίζουν βασικό ρόλο κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης με ταυτόχρονη κατανάλωση ATP : το σύστημα DnaK / Hsp70 και το σύστημα GroEL / Hsp90 (Hartl and Hayer-Hartl 2002; Young, Agashe et al. 2004). Και τα δύο αυτά συστήματα έχουν ορθόλογα μόρια στη μιτοχονδριακή μήτρα ενώ το περιβάλλον της μιτοχονδριακής μήτρας αλλά και οι αρχές της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης εκεί ταιριάζουν με τα αντίστοιχα του βακτηριακού περιπλάσματος. Εντούτοις, το περίπλασμα των βακτηρίων δεν έχει ATP, και η πρωτεϊνική αναδίπλωση εκεί καθοδηγείται από την οξείδωση καταλοίπων κυστεΐνης. Το σύστημα πρωτεϊνών που έχει αναλάβει την εισαγωγή δισουλφιδικών δεσμών σε πρωτεΐνες του βακτηριακού περιπλάσματος είναι το DsbA-DsbB, ενώ η ανακατανομή / ισομερίωση των δεσμών αυτών πραγματοποιείται από το ζεύγος πρωτεϊνών DsbC-DsbD (Inaba 2009). Οι παραπάνω σουλφυδρυλοξειδάσες δέχονται τα ηλεκτρόνια από τα υποστρώματα και τα μεταφέρουν στην αναπνευστική αλυσίδα της εσωτερικής μεμβράνης. Αντίστοιχο μονοπάτι εισαγωγής δισουλφιδικών δεσμών υπάρχει στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Εκεί το ένζυμο που καταλύει την οξείδωση του υποστρώματος είναι η PDI, ενώ η επανοξείδωση της PDI πραγματοποιείται κυρίως από την Ero1p και δευτερευόντως από την Ero2

(περιληπτικά τα συστήματα οξείδωσης στα τρία διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα φαίνονται στην εικόνα 5).



Εικόνα 5 Τα μονοπάτια οξειδωτικής αναδίπλωσης σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα

Μέχρι πολύ πρόσφατα δεν ήταν τίποτα γνωστό για το μηχανισμό με τον οποίον αναδιπλώνονται οι πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων. Εντούτοις, δομικές και βιοχημικές μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Το γεγονός αυτό προκάλεσε έκπληξη καθώς, μέχρι τότε, το περιβάλλον του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων θεωρούνταν αναγωγικό, όπως του κυτταροπλάσματος, και δισουλφιδικοί δεσμοί πιστεύονταν ότι σχηματίζονται μόνο στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων (Sevier and Kaiser 2006). Εντούτοις, τελευταία έχει δειχθεί ότι δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζονται και στο αναγωγικό κυτταρόπλασμα, όπως δείχνει το παράδειγμα των ιών ροx, που διαθέτουν ένα ολόκληρο μηχανισμό από σουλφυδρυλοξειδάσες για την οξείδωση πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται στο καψίδιό τους, μέσα στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Senkevich, White et al. 2000). Επομένως, ο διαμεμβραβικός χώρος του μιτοχονδρίου θα μπορούσε να διαθέτει, όπως το βακτηριακό περίπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο του ευκαρυωτικού κυττάρου (Kadokura, Katzen et al. 2003; Sevier and Kaiser 2006), έναν μηχανισμό σουλφυδρυλοξειδάσων που θα καταφέρνουν να εισάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς στα υποστρώματα βοηθώντας στην απόκτηση της

λειτουργικής τους δομής. Τα βασικά συστατικά αυτού του μονοπατιού τα οποία είναι υπεύθυνα πιθανώς για όλους τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου έχουν ανακαλυφθεί πρόσφατα και είναι οι σουλφυδρυλοξειδάσες Mia40 (Mitochondrial Intermembrane Space Assembly 40) και Erv1 (Essential for Respiration and Vegetative growth (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004; Naoe, Ohwa et al. 2004; Mesecke, Terziyska et al. 2005).

### **1.3.1 Mia40, η οξειδάση / υποδοχέας των νεοεισερχόμενων ανηγμένων υποστρωμάτων**

Η πρωτεΐνη Mia40 του σακχαρομύκητα (ScMia40) ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε ως οξειδάση του διαμεμβρανικού χώρου για πρώτη φορά το 2004 από τους (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 44 kDa, που διαθέτει έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης και πολλά αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα, γεγονός που την κάνει να μετατοπίζεται ως πρωτεΐνη μοριακού βάρους 64 kDa σε SDS ηλεκτροφόρηση. Ομόλογες της Mia40 του σακχαρομύκητα εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια άλλων μυκήτων, φυτών και ζώων. Απουσία της Mia40 σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα επηρεάζει δραματικά τα επίπεδα των μικρών πρωτεϊνών Tim καθώς και άλλων πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου πλούσιων σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Παράλληλα, πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες σχηματίζουν παροδικά ομοιοπολικά σύμπλοκα με τη Mia40, σε πρώιμα στάδια κατά την είσοδό τους στο μιτοχόνδριο, γεγονός που οδήγησε στον χαρακτηρισμό της ως υποδοχέα των πρωτεϊνών αυτών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, η Mia40 αλληλεπιδρά με τα υποστρώματα που φέρουν συντηρημένα μοτίβα κυστεϊνών μόλις αυτά εισέλθουν στο διαμεμβρανικό χώρο, επάγει την αναδίπλωσή τους μέσω της εισαγωγής δισουλφιδικών δεσμών (οξειδωτική αναδίπλωση) και οδηγεί στην παγίδευσή τους στο συγκεκριμένο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα. Οι πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου που φέρουν κυστεϊνικά μοτίβα συνοψίζονται στον πίνακα 1.

<b>Redox Proteins</b>	<b>Function</b>	<b>Motif</b>
Rieske FeS Protein	Cytochrome bc1 function	other
Qcr6	Cytochrome bc1 function	other
Sod1	Superoxide Dismutase	other
Ccs1	Sod1p Assembly	other
Sco1	Cytochr. Oxidase assembly	other
Sco2	Cytochr. Oxidase assembly	other
Cox11a	Cytochr. Oxidase assembly	other
Cox12a	Cytochr. Oxidase assembly	other
Cox17	Cytochr. Oxidase assembly	Twin CX9C
Cox19	Cytochr. Oxidase assembly	Twin CX9C
Cox23a	Cytochr. Oxidase assembly	Twin CX9C
Pet191a	Cytochr. Oxidase assembly	Twin CX9C
Cmc1a	Cytochr. Oxidase assembly	Twin CX9C
Som1a	Inner membrane peptidase subunit	Twin CX9C
Tim8	Protein Import	Twin CX3C
Tim9	Protein Import	Twin CX3C
Tim10	Protein Import	Twin CX3C
Tim12	Protein Import	Twin CX3C
Tim13	Protein Import	Twin CX3C
Mic14	Unknown Function	Twin CX9C
Mic17	Unknown Function	Twin CX9C
Mdm35	Mito. Morphology	Twin CX9C
Mia40	Protein Import	Twin CX9C
Erv1	Sulfhydryl Oxidase / FeS cluster export	other

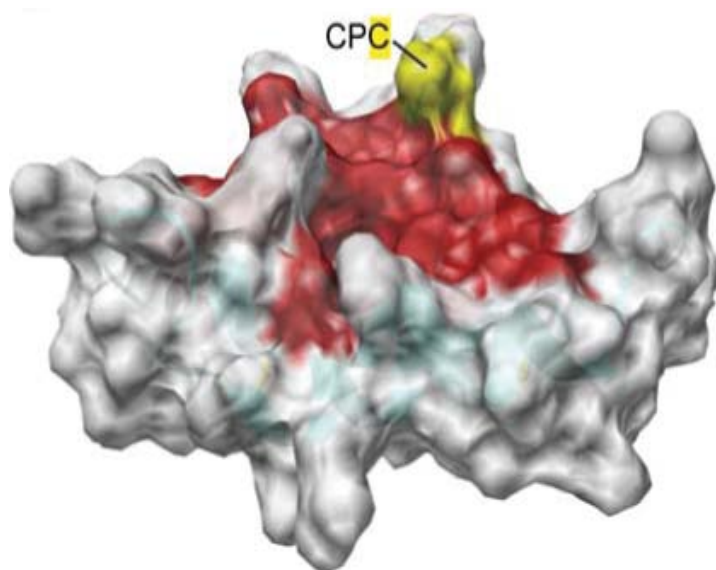
Πίνακας 1. Πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων που περιέχουν κυστεΐνες.



Η πρωτεΐνη βρίσκεται είτε διαλυτή στον διαμεμβρανικό χώρο είτε αγκυροβολημένη στην εσωτερική μεμβράνη (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004; Naoe, Ohwa et al. 2004; Hofmann, Rothbauer et al. 2005; Terziyska, Lutz et al. 2005). Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο μορφών Mia40 εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο. Στο αμινοτελικό άκρο της Mia40 του σακχαρομύκητα υπάρχει σηματοδοτική αλληλουχία στόχευσης που κατευθύνει την πρωτεΐνη στο σύμπλοκο μετατοπάσης TIM23, απ' όπου ενσωματώνεται πλευρικά στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του μηχανισμού διακοπής μεταφοράς (stop-transfer). Σε μιτοχόνδρια από ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η αμινοτελική σηματοδοτική αλληλουχία της ScMia40 απουσιάζει και η πρωτεΐνη είναι διαλυτή στον διαμεμβρανικό χώρο. Εντούτοις, όλες οι ομόλογες πρωτεΐνες Mia40 περιλαμβάνουν ένα πολύ συντηρημένο τμήμα περίπου 60 καταλοίπων στο καρβοξυτελικό άκρο τους το οποίο περιλαμβάνει και τα έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης.

Όλα τα μόρια Mia40 περιλαμβάνουν ένα συντηρημένο διπλό μοτίβο CX<sub>9</sub>C. Οι κυστεΐνες του μοτίβου αυτού υπό φυσιολογικές συνθήκες οξειδώνονται σχηματίζοντας μεταξύ τους δύο ενδομοριακούς δεσμούς (Mesecke, Terziyska et al. 2005). Συγκεκριμένα, πειράματα περιορισμένης τρυψινόλυσης και φασματομετρίας μάζας έδειξαν ότι οι κυστεΐνες του διπλού αυτού μοτίβου οργανώνονται αντιπαράλληλα, δηλαδή η πρώτη κυστεΐνη σχηματίζει εσωτερική δισουλφιδική γέφυρα με την τέταρτη και οι δύο εσωτερικές, η δεύτερη και η τρίτη, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Grumbt JBC 2007). Οι δεσμοί του διπλού μοτίβου CX<sub>9</sub>C είναι αρκετά σταθεροί, ανάγονται μόνο κάτω από πολύ ισχυρές αναγωγικές συνθήκες, και θεωρείται ότι έχουν μόνο δομικό ρόλο, χωρίς να συμμετέχουν στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Αντίθετα το μοτίβο CPC, που προηγείται ελάχιστα στην πρωτοταγή δομή από το διπλό μοτίβο, σχηματίζει ένα δισουλφιδικό δεσμό, ο οποίος είναι πολύ ευαίσθητος σε αλλαγές στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον, και αποτελεί το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (Banci, Bertini et al. 2009; Terziyska, Grumbt et al. 2009).

Βιοχημικές και δομικές μελέτες αποκάλυψαν ότι το ενεργό κέντρο της Mia40



Εικόνα 6 Χωροπληρωτικό μοντέλο του καταλυτικού πυρήνα της ανθρώπινης Mia40. Με κόκκινο εμφανίζεται η περιοχή της υδρόφοβης αύλακας που υποδέχεται την σηματοδοτική περιοχή των υποστρωμάτων, και με κίτρινο η ενεργή κυστεΐνη του μοτίβου CPC, που δεσπάζει στην κορυφή της αύλακας (Banci, Bertini et al. 2009).

αποτελείται από μία υδρόφοβη αύλακα (Banci, Bertini et al. 2009) πάνω στην οποία αλληλεπιδρούν οι σηματοδοτικές αλληλουχίες των υποστρωμάτων (MISS / ITS) (Milenkovic, Ramming et al. 2009; Sideris, Petrakis et al.

2009). Στην κορυφή της αύλακας αυτής προβάλλει η ενεργή κυστεΐνη της Mia40, δηλαδή αυτή που πρώτη

πραγματοποιεί την πυρηνόφιλη προσβολή στην ανηγμένη κυστεΐνη του υποστρώματος, η οποία είναι η δεύτερη του μοτίβου CPC (εικόνα 6) (Banci, Bertini et al. 2009). Μέσω αυτής της αντίδρασης, ένα ζεύγος ηλεκτρονίων περνά από το ανηγμένο νεοεισερχόμενο υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου Mia40, ενώ ταυτόχρονα ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταφέρεται από το ένζυμο στο υπόστρωμα. Τα υποστρώματα της Mia40 συνήθως χρειάζονται δύο δισουλφιδικούς δεσμούς προκειμένου να αποκτήσουν την τελική λειτουργική τους δομή. Ο σχηματισμός του δεύτερου δισουλφιδικού δεσμού αποτελεί μέχρι σήμερα αντικείμενο έρευνας. Έχει προταθεί ότι σχηματίζεται είτε με τη βοήθεια του μοριακού οξυγόνου (Banci 2009), εφόσον μετά τον σχηματισμό του πρώτου δεσμού οι δύο άλλες κυστεΐνες έρχονται πολύ κοντά μεταξύ τους, με τη βοήθεια μετάλλων που μπορούν να λειτουργήσουν ως δέκτες ηλεκτρονίων, είτε με τη βοήθεια κάποιας άλλης οξειδάσης. Συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι αυτή η άλλη οξειδάση μπορεί να είναι η Ern1, η οποία έχει βρεθεί σε ταυτόχρονη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με τη Mia40 όσο και με το υπόστρωμα (Stojanovski, Milenkovic et al. 2008).

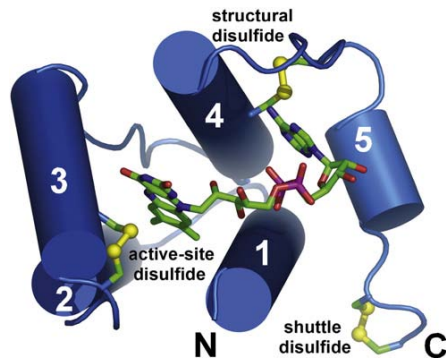
Η οξείδωση του υποστρώματος αφήνει το ενεργό κέντρο της Mia40 ανηγμένο. Προκειμένου να οξειδωθεί το ενεργό κέντρο της Mia40 και να καταστεί ξανά ενεργό για να οξειδώσει ένα νέο μόριο ανηγμένου υποστρώματος, αναλαμβάνει δράση μία

άλλη συντηρημένη σουλφυδρυλοξειδάση του διαμεμβρανικού χώρου, η Erv1 (Mesecke, Cell 2005).

### 1.3.2 Erv1, μια συντηρημένη σουλφυδρυλοξειδάση στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

Η Erv1 είναι η μόνη γνωστή FAD-εξαρτώμενη σουλφυδρυλοξειδάση του μιτοχονδρίου. Το κοινό χαρακτηριστικό των σουλφυδρυλοξειδάσεων είναι ότι χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων, μέσω του προσδεμένου συμπαραγόντα FAD, για την οξείδωση υποστρωμάτων με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου ( $H_2O_2$ ) κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Coppock and Thorpe 2006; Thorpe and Coppock 2007). Σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής η Erv1 δεν παρουσιάζει κάποια ομολογία με τις αντίστοιχες οξειδάσες DsbB και Ero1p του βακτηριακού περιπλάσματος και του ενδοπλασματικού δικτύου αντίστοιχα. Εντούτοις, σουλφυδρυλοξειδάσες που προσδέουν FAD και μοιράζονται κοινή δομή υπάρχουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια μυκήτων, φυτών και ζώων, ενώ μπορεί να εκκρίνονται και εξωκυτταρικά. Στους ανώτερους ευκαρυώτες συχνά αναφέρεται και ως ALR (Augmenter of Liver Regeneration) / GFER (Growth Factor, augmenter of liver regeneration Erv1 homolog / HPO (Hepatopoietin). Παράλληλα, ορισμένοι ιοί περιλαμβάνουν σουλφυδρυλοξειδάσες που μοιάζουν με την Erv1 (E10R), και καταλύουν την οξείδωση πρωτεϊνών του ιικού καψιδίου στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Senkevich, White et al. 2000). Γενικά θεωρείται ότι έχουν δράση σουλφυδρυλοξειδάσης αλλά σε πολλές περιπτώσεις τα υποστρώματά τους δεν έχουν ακόμη βρεθεί. Συνήθως πρόκειται για πρωτεΐνες με ένα τυπικά αναδιπλωμένο πυρήνα που προσδέει το μόριο FAD, και επιπλέον ευέλικτα τμήματα, ανιμοτελικά ή καρβοξυτελικά αυτής της περιοχής. Ο πυρήνας με τη χαρακτηριστική δομή της Erv1, εντοπίζεται ακόμη και σε μεγαλύτερες πρωτεΐνες με πολλαπλά τμήματα (multidomain proteins), τις QSOX (Heckler, Rancy et al. 2008).

Το ομόλογο του σακχαρομύκητα ανακαλύφθηκε το 1992, και χαρακτηρίστηκε ως υπεύθυνο για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων, τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Lisowsky 1992). Το γονίδιο της ERV1 είναι απαραίτητο για την επιβίωση του σακχαρομύκητα, καθώς πειράματα με θερμοευαίσθητο στέλεχος Erv1<sup>ts</sup> στην μη επιτρεπτή θερμοκρασία έδειξαν ότι απουσία της Erv1 από το κύτταρο του σακχαρομύκητα, προκαλεί σχεδόν απώλεια των μιτοχονδριακών δομών και μη αντιστρεπτή βλάβη στα κύτταρα ακόμη όταν αυτά



Εικόνα 7 Σχηματικό διάγραμμα ενός μορίου Erv2, όπου οι έλικες αναπαριστώνται ως κύλινδροι και οι δισουλφιδικοί δεσμοί με κίτρινο χρώμα. ανάμεσα στις έλικες φιλοξενείται ένα μόριο FAD. Όπως φαίνεται απέναντι από το δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης του FAD βρίσκεται το ζευγάρι του ενεργού κέντρου (active site disulfide), στο κινητό καρβοξυτελικό άκρο το ακραίο ζευγάρι κυστεϊνών (shuttle disulfide), και τέλος, το ζευγάρι CX<sub>16</sub>C (structural disulfide) φέρει κοντά την έλικα 4 με την λούπα που ενώνει την έλικα 4 με την έλικα 5, σταθεροποιώντας το μόριο FAD στον πυρήνα της πρωτεΐνης. (Fass 2008)

ενζυμικό μονοπάτι, ενώ οι πρωτεΐνες Fe/S που εδράζονται εκεί ωριμάζουν κανονικά. Έχει προταθεί ότι η Erv1 αναλαμβάνει δράση κατά την έξοδο των συμπλόκων από την μήτρα, μέσω της πρωτεΐνης της εσωτερικής μεμβράνης Atm1 (Kispal, Csere et al. 1999). Τέλος, η ALR των θηλαστικών, και μάλιστα η εξωκυτταρική ισομορφή της, έχει συσχετιστεί με την αναγέννηση συκωτιού, με άγνωστο μηχανισμό (Giorda, Hagiya et al. 1996).

Η δομή που χαρακτηρίζει την οικογένεια Erv/ALR είναι συντηρημένη και έχει καθοριστεί με κρυσταλλογραφική ανάλυση διαφόρων μελών της, όπως: η Erv2 του *Saccharomyces cerevisiae* (εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο) (Sevier, Cuzzo et al. 2001), η ALR (Augmenter of Liver Regeneration) του *Rattus norvegicus* (εντοπίζεται σε κυτταρόπλασμα, πυρήνα, μιτοχόνδρια και εξωκυτταρικά) (Gandhi, Kuddus et al. 1999; Lange, Lisowsky et al. 2001; Li, Wei et al. 2002; Wu, Dailey et al. 2003; Tury, Mairet-Coello et al. 2005), η Erv1 του *Arabidopsis Thaliana* (AtErv1-εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια) (Levitan, Danon et al. 2004; Vitu, Bentzur et al. 2006). Πολύ πρόσφατα, έγινε κρυσταλλογραφική ανάλυση και της ανθρώπινης ALR από τους (Daithankar, Schaefer et al.). Όλα τα παραπάνω μόρια μοιράζονται μία δομή που αποτελείται από 5 α-έλικες. Οι 4 από αυτές σχηματίζουν μία δέσμη, που στο ένα άκρο της ανοίγει σαν χωνί για να φιλοξενήσει το δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης του

μεγαλώνουν παρουσία ζυμώσιμης πηγής άνθρακα (Becher, Kricke et al. 1999). Παράλληλα, η Erv1 έχει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων που φέρουν δισουλφιδικούς δεσμούς (Allen, Lu et al. 2003; Mesecke, Terziyska et al. 2005; Rissler, Wiedemann et al. 2005). Ένας ακόμα σημαντικός ρόλος της Erv1 εντοπίζεται στην ωρίμανση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που φέρουν σύμπλοκα σιδήρου-θείου (Lange, Lisowsky et al. 2001). Συγκεκριμένα, απουσία της Erv1, οι πρωτεΐνες αυτές δεν μπορούν να ενσωματώσουν τα σύμπλοκα Fe/S και να ωριμάσουν. Στην περίπτωση αυτή τα σύμπλοκα Fe/S συσσωρεύονται μέσα στην μήτρα, όπου και συντίθενται από εξειδικευμένο

μορίου FAD, ενώ η κοντή πέμπτη έλικα εντοπίζεται κάθετα προς τις άλλες (εικόνα 7). Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαμόρφωση του μορίου FAD στα μέλη της οικογένειας Ern είναι μοναδική και δεν συναντιέται σε κανένα άλλο φλαβοένζυμο. Η παραπάνω δομή σχηματίζεται από περίπου 100 κατάλοιπα σε κάθε ομόλογο μόριο Ern, στα πλαίσια των οποίων συναντάται το χαρακτηριστικό μοτίβο της οικογένειας: G-X<sub>3</sub>-W-X<sub>3</sub>-H-X<sub>5</sub>-F/Y-X<sub>23</sub>-P-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>N</sub>-H-N-X<sub>2</sub>-N (όπου X : μεταβλητό αμινοξύ και όπου X<sub>N</sub> : μεταβλητός αριθμός μεταβλητών αμινοξέων). Τα περισσότερα από τα συντηρημένα κατάλοιπα που παραπάνω μοτίβου, επικοινωνούν με τον συμπαράγοντα FAD και μέσω αυτού πιθανώς βοηθούν στη σταθερότητα της δομής του πυρήνα της πρωτεΐνης.

Εκτός από τα κατάλοιπα του παραπάνω μοτίβου, τα μέλη της οικογένειας Ern/ALR περιλαμβάνουν συντηρημένα μοτίβα κυστεϊνών, ορισμένα από τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενζυματική λειτουργία της πρωτεΐνης. Στον πυρήνα της πρωτεΐνης και πολύ κοντά στο δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης του μορίου FAD βρίσκεται ένα συντηρημένο μοτίβο CxxC. Οι κυστεΐνες του μοτίβου αυτού είναι ενωμένες μεταξύ τους με δισουλφιδική γέφυρα και αποτελούν το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (Lee, Hofhaus et al. 2000). Τα ευέλικτα άκρα των πρωτεϊνών αυτών, που μπορεί να βρίσκονται είτε αμινοτελικά είτε καρβοξυτελικά από τον καταλυτικό πυρήνα, περιλαμβάνουν άλλο ένα ζευγάρι κυστεϊνών που επίσης σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό. Η απόσταση του ζευγαριού αυτού (ακραίο) από το καταλυτικό κέντρο αλλά και το μοτίβο στο οποίο είναι οργανωμένο το ακραίο ζευγάρι, διαφοροποιείται στα μέλη της οικογένειας Ern. Έτσι, στον σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* και τον άνθρωπο το ακραίο ζεύγος κυστεϊνών βρίσκεται σε CX<sub>2</sub>C μοτίβο στο αμινοτελικό άκρο, στο φυτό *Arabidopsis thaliana* το ίδιο ζεύγος είναι σε μοτίβο CX<sub>4</sub>C στο καρβοξυτελικό άκρο (Levitan, Danon et al. 2004), ενώ στην Ern2 του *S.cerevisiae*, το ζεύγος σχηματίζει το μοτίβο CGC στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Gross, Sevier et al. 2002). Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση αλλά και η λύση της δομής της Ern2 υποδεικνύουν ότι το ζεύγος πάνω στο ευέλικτο άκρο, πιθανώς είναι αυτό που παραλαμβάνει πρώτο το ζεύγος ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα και το μεταφέρει στο ζευγάρι κυστεϊνών του ενεργού κέντρου, απ' όπου περνούν στο FAD και από κει σε επόμενους αποδέκτες. Κι αυτό γιατί στον κρύσταλλο της Ern2 το καρβοξυτελικό τμήμα βρίσκεται σε δύο καταστάσεις : Στη μία το CGC μοτίβο είναι τοποθετημένο πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο κυστεϊνών και στην άλλη ήταν τοποθετημένο περίπου 10 Å μακριά από αυτό (Gross, Sevier et al. 2002).

Εκτός από τα δύο αυτά ζευγάρια που θεωρείται ότι συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (Dabir et al., 2007), τα μέλη της οικογένειας Ern/ALR έχουν ακόμη ένα ζευγάρι κυστεϊνών που απέχουν μεταξύ τους 16 αμινοξέα, παρόλαυτά βρίσκονται ενωμένες με δισουλφιδικό δεσμό ο οποίος συμβάλει στη σταθερότητα του πυρήνα της δομής (Ang and Lu 2009) (εικόνα 7). Τέλος, δύο ακόμη κυστεΐνες είναι συντηρημένες μεταξύ των ανώτερων ευκαρυωτών (δεν υπάρχουν στις πρωτεΐνες της οικογένειας Ern/ALR στους μύκητες) και συμμετέχουν στο σχηματισμό διμερών με αντιπαράλληλη διαμόρφωση, όπως φάνηκε στη δομή της ανθρώπινης ALR που δημοσιεύτηκε πρόσφατα (Daithankar, Schaefer et al.).

Η πρωτεΐνη Ern1 του σακχαρομύκητα αποτελείται από 189 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο λειτουργικά τμήματα (εικόνα 8). Αμινοτελικά περιλαμβάνει ένα τμήμα 72 αμινοξέων, που προβλέπεται να είναι ευέλικτο χωρίς κάποια αυστηρή διαμόρφωση. Στα πλαίσια αυτού βρίσκονται και οι κυστεΐνες C30-C33 οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιβίωση του οργανισμού και έχουν δείξει να συμμετέχουν *in vitro* στο διμερισμό της πρωτεΐνης μέσω δισουλφιδικών δεσμών (Hofhaus, Lee et al.



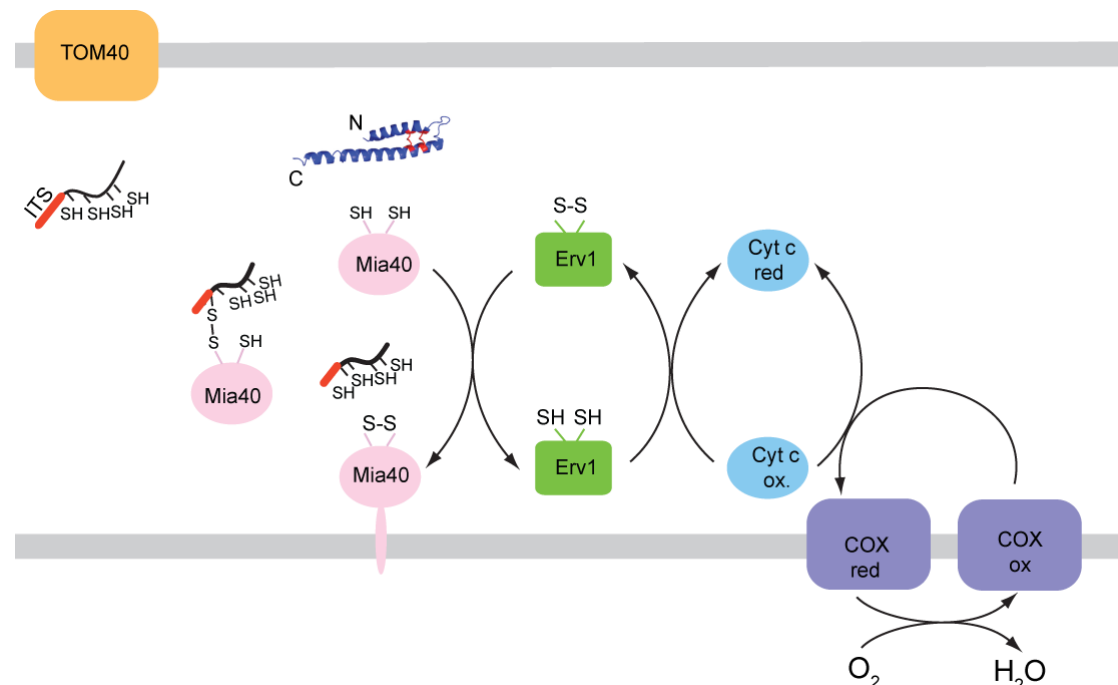
Εικόνα 8 Σχηματικό διάγραμμα της Ern1 από το *Saccharomyces cerevisiae* που συνοψίζει τα ζεύγη κυστεϊνών της. Οι κυστεΐνες συμβολίζονται με κάθετες γραμμές. Ο καταλυτικός πυρήνας της πρωτεΐνης φαίνεται με γκρι, ενώ το ευέλικτο N' άκρο δεν είναι χρωματισμένο.

2003). Ο καρβοξυτελικός πυρήνας περιλαμβάνει το ζευγάρι του ενεργού κέντρου C130-C133 και διατηρεί την ικανότητα να οξειδώνει μικρά τεχνητά υποστρώματα *in vitro* όπως η διθειοθρεϊτόλη (DTT) (Lee,

Hofhaus et al. 2000). Εντούτοις, μεγαλύτερα τεχνητά υποστρώματα, όπως το TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), δεν μπορούν να οξειδωθούν από τον καταλυτικό πυρήνα (Ang and Lu, JBC, 2009) *in vitro*. Παράλληλα, *in vitro* μελέτες στο ανθρώπινο ομόλογο μόριο ALR, μαζί με το φυσιολογικό υπόστρωμά του, την ανθρώπινη Mia40 (hMia40), έδειξαν ότι για την οξείδωση της hMia40 *in vitro* δεν αρκεί ο καταλυτικός πυρήνας της ALR, αλλά αντίθετα χρειάζεται ολόκληρο το μόριο (Daithankar, Farrell et al. 2009). Τέλος, η Ern1 του σακχαρομύκητα περιλαμβάνει το ζευγάρι κυστεϊνών C159-C176, που έχουν κυρίως δομικό ρόλο, συμβάλλοντας στη σταθερότητα του μορίου (Ang and Lu 2009).

### 1.3.3 Το μονοπάτι ανταλλαγής δισουλφιδικών δεσμών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων

Όπως αναφέρθηκε, τα ένζυμα που περιγράφηκαν παραπάνω συμμετέχουν στη βιογένεση μικρών πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου που περιλαμβάνουν κυστεϊνικά μοτίβα. Αφού περάσουν την εξωτερική μεμβράνη μέσω του συμπλόκου TOM, και προκειμένου να παραμείνουν στον διαμεμβρανικό χώρο και να μην γλιστρήσουν ξανά έξω από το μιτοχόνδριο, οι πρωτεΐνες αυτές πρέπει να αναδιπλωθούν. Το ένζυμο που καταλύει την οξείδωση και άρα την αναδίπλωση των υποστρωμάτων είναι η Mia40 (Chacinska, Pfannschmidt et al. 2004). Η τελευταία, για να είναι καταλυτικά ενεργή, πρέπει να είναι σε οξειδωμένη κατάσταση. Σε φυσιολογικές συνθήκες η Mia40 είναι οξειδωμένη μέσα στο μιτοχόνδριο. Απουσία της Erv1, η οξειδωτική κατάσταση της Mia40 επηρεάζεται (Mesecke, Terziyska et al. 2005). Παράλληλα, *in vitro* πειράματα ανασυγκρότησης της αλληλεπίδρασης έχουν δείξει ότι η Erv1 μπορεί να οξειδώσει το CPC μοτίβο της Mia40 (Terziyska, Grumbt et al. 2009). Αντίθετα η οξείδωση ενός υποστρώματος *in vitro* από την Erv1 δεν έχει ποτέ δειχθεί. Το μοντέλο που επικρατεί για την λειτουργία του μονοπατιού οξειδωτικής αναδίπλωσης στο μιτοχόνδριο περιγράφεται περιληπτικά στην εικόνα 9.



Εικόνα 9 Μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης στο μιτοχόνδριο. Σχηματικό μοντέλο που αναπαριστά το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Για λεπτομέρειες βλπ στο κείμενο.

Τα υποστρώματα εισάγονται μέσω της εξωτερικής μεμβράνης στα μιτοχόνδρια σε αποδιαταγμένη και ανηγμένη κατάσταση όπου αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα Mia40. Στην συνέχεια, σχηματίζεται μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ του υποστρώματος και της Mia40 μέσω του οποίου μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα στη Mia40 ενώ ο δισουλφιδικός δεσμός που αρχικά υπήρχε στο ενεργό κέντρο (CPC) της Mia40, τώρα μεταφέρεται στο υπόστρωμα. Το υπόστρωμα οξειδωμένο και αναδιπλωμένο πλέον παγιδευεται στον διαμεμβρανικό χώρο αποκτώντας την φυσιολογική δομή και λειτουργία του.

Μετά την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα η Mia40 παραμένει ανηγμένη στο καταλυτικό κέντρο της και ανίκανη να δράσει ως οξειδάση. Προκειμένου να οξειδωθεί ξανά, η Mia40, αλληλεπιδρά με την Ern1 και καθίσταται έτσι, ικανή για έναν νέο κύκλο οξείδωσης μέσω ανταλλαγής δισουλφιδικών δεσμών. Σε πειράματα ανασύστασης του μονοπατιού σε αερόβιες συνθήκες *in vitro*, έχει παρατηρηθεί ότι επώαση ανηγμένου υποστρώματος με καταλυτικές ποσότητες οξειδωμένης Mia40 και Ern1 οδηγεί στην πλήρη οξείδωση του υποστρώματος και της Mia40 (Grumbt, Stroobant et al. 2007; Terziyska, Grumbt et al. 2009; Tienson, Dabir et al. 2009). Φαίνεται λοιπόν ότι μόνο αυτά τα τρία στοιχεία παρουσία οξυγόνου, είναι αρκετά για την ανασυγκρότηση του οξειδοαναγωγικού μονοπατιού στα μιτοχόνδρια.

Αποδέκτης των ηλεκτρονίων του υποστρώματος, μέσω του FAD της Ern1, μπορεί να είναι το μοριακό οξυγόνο, με ταυτόχρονη παρασκευή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Lee, Hofhaus et al. 2000; Bihlmaier, Mesecke et al. 2007; Dabir, Leverich et al. 2007). Εντούτοις, το κυτόχρωμα c έχει δειχθεί να είναι *in vitro* 100 φορές καλύτερος αποδέκτης από το μοριακό οξυγόνο (Farrell and Thorpe 2005). Η αλληλεπίδραση της Ern1 με το κυτόχρωμα c έχει δειχθεί και *in organello* μέσω πειράματος συγκατακρήμνισης (Dabir, Leverich et al. 2007). Φαίνεται λοιπόν πως το κυτόχρωμα c και η αναπνευστική αλυσίδα αποτελούν τον τελευταίο κρίκο στο μονοπάτι οξείδωσης στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων ο οποίος συνδέει το μονοπάτι βιογένεσης με την αναπνευστική αλυσίδα (Allen, Balabanidou et al. 2005; Bihlmaier, Mesecke et al. 2007).



## 1.4 Στόχευση βακτηριακών παραγόντων παθογονικότητας στα μιτοχόνδρια του ξενιστή

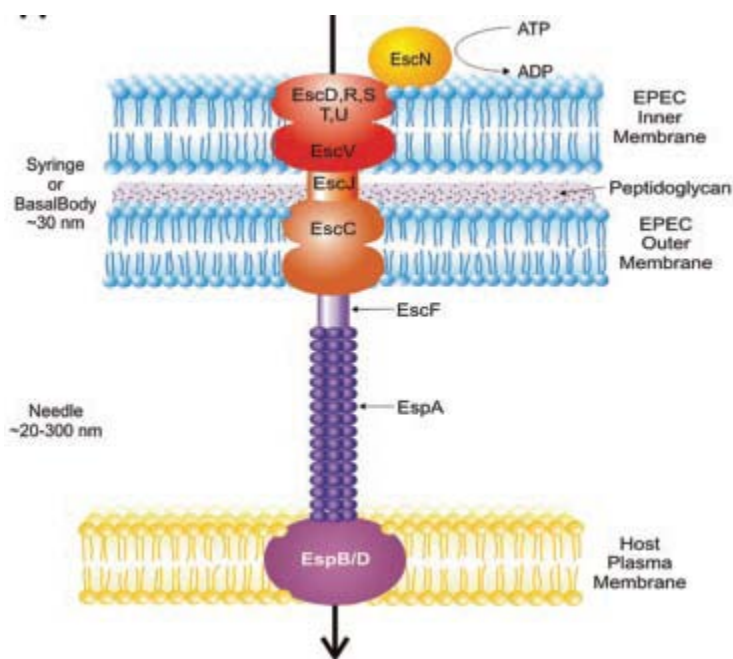
### 1.4.1 Enteropathogenic *Escherichia coli*

Το 1945, οι Bray και Beaven πρότειναν την εμπλοκή ενός στελέχους *E.coli*, του *Enteropathogenic E. coli*, σε μία επιδημία βρεφικής διάρροιας στο Middlesex, του Ηνωμένου Βασιλείου. Εντούτοις, η ανακάλυψη του στελέχους της *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), το οποίο μπορούσε να προκαλέσει έκκριση σε βρόχους του λεπτού εντέρου κουνελιού, έθεσε σε αμφισβήτηση την παθογονικότητα του EPEC. Η αβεβαιότητα λύθηκε το 1978, όταν οι Levine et al.,(Levine, Bergquist et al. 1978), μπόρεσαν να επάγουν διάρροια σε εθελοντές, με επιμόλυνση από το στέλεχος E2348/69 του EPEC. Έκτοτε, το στέλεχος E2348/69 θεωρείται το πρότυπο στέλεχος EPEC και χρησιμοποιείται στην μικροβιολογική έρευνα. Πρόσφατα οι ερευνητές συμφώνησαν σε έναν ορισμό για το EPEC που συνοψίζεται στο: διαρροιογόνο *E. coli* που προκαλεί χαρακτηριστική ιστοπαθολογία γνωστή ως βλάβες προσκόλλησης και απαλοιφής (Attaching and Effacing Lesions – A/E), στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Οι βλάβες A/E χαρακτηρίζονται από απώλεια των μικρολαχνών του εντερικού επιθηλίου και ισχυρή προσκόλληση των βακτηρίων πάνω στη κυτταροπλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (Chen and Frankel 2005). Σήμερα γνωρίζουμε ότι πρόκειται για Gram<sup>-</sup> εξωκυτταρικά βακτήρια, τα οποία αποτελούν τη βασική αιτία βρεφικών θανάτων από διάρροια στις αναπτυσσόμενες χώρες (Garmendia, Frankel et al. 2005).

### 1.4.2 Ο γενετικός τύπος παθογονικότητας LEE

Η ικανότητα πρόκλησης των βλαβών A/E οφείλεται κυρίως σε μία σειρά γονιδίων που εντοπίζονται στο χρωμοσωμικό τόπο LEE (Locus of Enterocyte Effacement) μεγέθους 35 κιλοβάσεων, ο οποίος είναι ενσωματωμένος στο χρωμόσωμα των βακτηρίων EPEC (McDaniel, Jarvis et al. 1995). Ο χρωμοσωμικός τύπος LEE περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συνθέτουν το βακτηριακό σύστημα έκκρισης τύπου 3 (Type 3 secretion system – T3SS), πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την έκκριση, σαπερόνες που συνοδεύουν τα προς μεταφορά μόρια και τους ίδιους τους παράγοντες παθογονικότητας (effectors). Το σύστημα έκκρισης τύπου 3 των βακτηρίων EPEC, θυμίζει «μοριακή σύριγγα» που ενύει τους παράγοντες παθογονικότητας που εκκρίνει κατευθείαν μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-

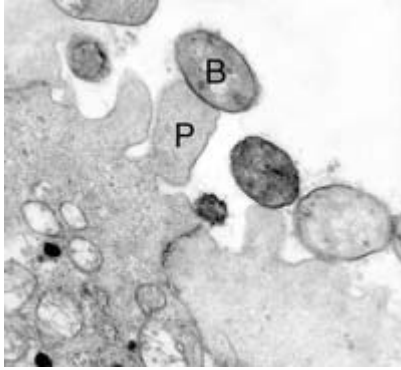
ξενιστή. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνουν ότι αυτές οι μοριακές μηχανές αποτελούνται από μία βάση (ή σύριγγα), που διαπερνάει τις δύο βακτηριακές μεμβράνες και το στρώμα πεπτιδογλυκάνης, και αποτελείται από δύο δακτυλίους και ένα κεντρικό αγωγό που τους ενώνει, και από ένα εξωτερικό σχηματισμό, κούφιο, που προεκτείνεται έξω από το βακτηριακό κύτταρο και συχνά έχει βρεθεί να ενώνεται με την μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή (βελόνα) (εικόνα 10). Αυτού του τύπου το εκκριτικό σύστημα, αποτελεί πολύ αποτελεσματικό «εργαλείο» και γι' αυτό συναντάται εκτός από το *E. coli* και σε πολλά άλλα Gram- παθογόνα βακτήρια που προσβάλλουν ζώα αλλά και φυτά (μεταξύ άλλων, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* κ.α.). Από τους παράγοντες παθογονικότητας που εκκρίνονται μέσω του T3SS, 7 κωδικοποιούνται από τον γενετικό τόπο LEE, και είναι οι : Tir, Map, EspB, EspF, EspH, EspZ, και EspG.



Εικόνα 10 Σχηματικό μοντέλο του εκκριτικού συστήματος τύπου 3, όπου συνοψίζονται τα βασικά δομικά συστατικά του (Gauthier, Thomas et al. 2003)

### 1.4.3 Αναδιοργάνωση της ακτίνης και σχηματισμός του «βάρθου»

Στο πρώτο στάδιο της μόλυνσης, η βακτηριακή πρωτεΐνη Tir ενύεται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και στη συνέχεια ενσωματώνεται στην πλασματική μεμβράνη του ευκαρυώτη με μορφή φουρκέτας : το N και C άκρο της πρωτεΐνης προβάλλει στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή ενώ το κεντρικό τμήμα της προβάλλει στον



Εικόνα 11 Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επιθηλιακών κυττάρων επιμολυσμένων με EPEC. Ο σχηματισμός βάρους απεικονίζεται με P (Pedestal) ενώ τα βακτήρια απεικονίζονται με B (Vallance and Finlay 2000)

εξωκυττάριο χώρο. το κεντρικό τμήμα της Tir αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη intimin που βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων πάνω στη μεμβράνη του επιθηλιακού κυττάρου και το

σχηματισμό μικροαποικιών (Kenny, DeVinney et al. 1997). Τόσο τα άκρα της tir που βρίσκονται μέσα στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή όσο και άλλοι παθογόνοι παράγοντες που ενύονται, χρησιμοποιούν

μονοπάτια μεταγωγής σήματος προκειμένου να επάγουν πολυμερισμό της ακτίνης. Αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μιας προεκβολής της επιφάνειας του ευκαρυώτη (βάθρο – pedestal) πάνω στην οποία βρίσκεται εντοπίζεται το βακτηριακό κύτταρο (εικόνα 11).

#### 1.4.4 Παθογόνοι παράγοντες που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια

Δύο από παθογόνοι παράγοντες που εκκρίνονται από τον EPEC, έχειδειχθεί ότι στοχεύουν τα μιτοχόνδρια του κυττάρου-ξενιστή, όπου πραγματοποιούν, τουλάχιστον εν μέρει, την παθογονική τους δράση. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι πρωτεΐνη Map (Mitochondrial Associated Protein), και η πρωτεΐνη EspF (EPEC Secreted Protein F). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο σηματοδοτική αλληλουχία που είναι υπεύθυνη για τη στόχευσή τους στα μιτοχόνδρια του ξενιστή (Nagai, Abe et al. 2005; Papatheodorou, Domanska et al. 2006) ενώ έχουν εμπλακεί στην υπονόμηση πολλών διαφορετικών κυτταρικών λειτουργιών όπως η διατήρηση των στενοσυνδέσμων, και ο κυτταρικός θάνατος. Στη συγκεκριμένη μελέτη το ενδιαφέρον εστιάζεται στην EspF, η δράση της οποίας περιγράφεται αναλυτικότερα στο αντίστοιχο κεφάλαιο (παράγραφος 3.3.1).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Μέθοδοι μοριακής βιολογίας

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

## 2.2 Μέθοδοι *in organello*

### 2.2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από κύτταρα σακχαρομύκητα

Για τα πειράματα εισόδου πρόδρομης πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια από το αγρίου τύπου στέλεχος του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, D273-10B (MATα), το οποίο αναπτύχθηκε στους 30°C σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γαλακτικό οξύ (YPL). Η πηγή άνθρακα που περιέχει αυτό το μέσο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας στο κυτταρόπλασμα (μέσω γλυκόλυσης), κι έτσι αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα που διαθέτουν λειτουργικά μιτοχόνδρια, ενώ ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε αυτά είναι μεγάλος, αυξάνοντας την ποσότητα μιτοχονδρίων που θα απομονωθεί. Η διαδικασία απομόνωσης των μιτοχονδρίων γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των (Daum, Gasser et al. 1982) και αποθηκεύονται στους -80°C. Το πρωτόκολλο κάνει χρήση του πολυσακχαρίτη Nycodenz το οποίο ξεχωρίζει τα μιτοχόνδρια από άλλα μεμβρανώδη οργανίδια (Glick 1991; Glick and Pon 1995). Στην περίπτωση απομόνωσης μιτοχονδρίων από Το στέλεχος GalErν1 στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε επιπλέον 0.2% (κ.ο) γλυκόζη, (για 24 ώρες), έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης καταστολή του ενδογενούς γονιδίου.

### 2.2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων ή μη υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύονται σε import buffer σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml και εξισορροπούνται στους 30°C. Στην συνέχεια προστίθεται το πρόδρομο υπόστρωμα (ραδιενεργό ή απομονωμένο από βακτήρια και αποδιατυμένο με επώαση σε 8M ουρία) και συνεχίζεται η επώαση στους 30°C. Ο χρόνος επώασης των

μιτοχονδρίων με το υπόστρωμα διαφοροποιείται ανάλογα με το πείραμα. Μετά την αντίδραση εισαγωγής τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 14000 στροφές στους 4oC. Το μη εισαγμένο πρόδρομο μόριο απομακρύνεται με επαναδιάλυση του ιζήματος σε ισοτονικό διάλυμα παρουσία πρωτεΐνης K (0.1 mg / ml) στους 4oC για 20 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη PMSF (4 mM), για 10 λεπτά στους 4oC. Τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 15 μl 2x Laemmli sample buffer με β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα δείγματα βράζονται σε θερμοκρασία 95oC για 5 λεπτά και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε 12% Tris-Tricine SDS-PAGE. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 30 λεπτά στα 20 V με το σύστημα semi-dry transfer. Οι μεμβράνες στην συνέχεια αναλύονται είτε με αυτοραδιογραφία είτε με ανοσοπαούτωση.

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

Στην περίπτωση που πραγματοποιείται πείραμα εισόδου ραδιενεργού υποστρώματος με σκοπό την παγίδευση μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου στην διάρκεια οξειδωσης του υποστρώματος το πείραμα πραγματοποιείται κανονικά (2.2.2) με την διαφορά ότι σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη 20 mM NEM για 5 λεπτά στον πάγο. Επιπλέον τα δείγματα αναλύονται απουσία αναγωγικού μέσου σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

### **2.2.4 Κατακρήμνιση πρόδρομου μορίου που φέρει τον επίτοπο έξι ιστιδινών (His tag) υπό αποδιατακτικές ή μη συνθήκες μετά την είσοδό του σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα**

Η παρούσα διαδικασία ακολουθεί την αντίδραση εισόδου της αποδιαταγμένης πρόδρομης πρωτεΐνης (ErnlHis ή HisEspF) σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια αφού ολοκληρωθεί το πείραμα εισόδου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2 απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση και επαναδιαλύονται σε αποδιατακτικό μη αναγωγικό διάλυμα (1% Triton, 8M ουρία, 150μM NaCl, 50mM Tris pH8.0, 2mM PMSF, 10mM ιμιδαζόλιο). Η συγκέντρωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κατά την

διαλυτοποίηση είναι 2.5mg/ml. Η διαλυτοποίηση προχωράει για 30min σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20min σε 16000g (20°C). Το υπερκείμενο επωάζεται με σφαιρίδια νικελίου για 1 ώρα σε RT με ήπια ανάδευση. Ακολούθως τα σφαιρίδια ξεπλένονται τρεις φορές με διάλυμα διαλυτοποίησης όπου η συγκέντρωση του Triton είναι πλέον 0.1% και του ιμιδαζολίου 20mM. Τέλος, το προσδεμένο υλικό εκλύεται με επαναδιάλυση των σφαιριδίων σε Laemmli sample buffer. Στην περίπτωση που η συγκατακρήμνιση γίνεται υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, η διαλυτοποίηση των μιτοχονδρίων (και όλη η επακόλουθη διαδικασία) γίνεται στους 4°C, ενώ η σύνθεση του διαλύματος διαλυτοποίησης είναι: 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 20mM Hepes pH7,4, 0.6M sorbitol, 20mM ιμιδαζόλιο. Το κατακρημνισμένο υλικό διαχωρίζεται με SDS-PAGE και αναλύεται κάθε φορά ανάλογα με τις ανάγκες των δειγμάτων.

#### **2.2.5 Ανάλυση σχηματισμού συμπλόκων μετά από είσοδο υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης**

Η εγγενής ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενδιάμεσων πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζονται κατά την διάρκεια εισόδου πρόδρομων μορίων σε μιτοχόνδρια. Η παρούσα διαδικασία ακολουθεί την αντίδραση εισόδου ραδιενεργού πρωτεϊνικού υποστρώματος στα μιτοχόνδρια (2.2.2). Έτσι, τα μιτοχόνδρια, μετά την είσοδο της ραδιενεργής προ-πρωτεΐνης, φυγοκεντρώνται (14000rpm, 5min, 4°C) και επαναδιαλύονται στο ήπιο μη-ιοντικό απορρυπαντικό διάλυμα DDM για 30 λεπτά στον πάγο, έτσι ώστε να διατηρηθούν ανέπαφα τα ενδογενή πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στη συνέχεια το διαλυτό μέρος απομακρύνεται από τα μη διαλυτοποιημένα μιτοχόνδρια με φυγοκέντρηση στα 100.000g για 20 λεπτά και στο οποίο προστίθεται 10x BN sample buffer. Τα δείγματα μετατοπίζονται σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα με βαθμίδωση 6-16% πολυακρυλαμίδης και αναλύονται με αυτοραδιογραφία.

#### **2.2.6 Δημιουργία μιτοπλαστών**

Για την δημιουργία μιτοχονδρίων απαλλαγμένα από την εξωτερική τους μεμβράνη (μιτοπλάστες) τα μιτοχόνδρια επώαστηκαν με υποτονικό διάλυμα. Συγκεκριμένα τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε συγκέντρωση 5 mg/ml με 1x import buffer και αμέσως μετά αραιώθηκαν σε 9 όγκους mitoplast buffer, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση μιτοχονδρίων να είναι 0.5mg/ml, παρουσία ή απουσία 0,1 mg/ml πρωτεΐνάσης K για 30' στον πάγο. Στην περίπτωση προσθήκης πρωτεΐνάσης K απενεργοποιήθηκε με 4 mM PMSF για 10' στον πάγο. Το υπερκείμενο

(διαμεμβρανικός χώρος) διαχωρίζεται από την πελέτα (μιτοπλάστες και τμήματα της εξωτερικής μεμβράνης) με φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές στους 4°C για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή γίνεται είτε πριν είτε μετά την εισαγωγή της πρόδρομης πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο ανάλογα με το τι εξετάζουμε.

### 2.2.7 Διαλύματα

#### *Import buffer*

100 mM Hepes, pH 7.1, 1.2 M sorbitol, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>,

5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM L-Methionine, 2 mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), 2 mM ATP, 2.5 mM NADH.

#### *Ισοτονικό διάλυμα επαναδιάλυσης μιτοχονδρίων*

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

#### *Υποτονικό διάλυμα δημιουργίας μιτοπλαστών*

20 mM Hepes-KOH pH 7.4,

#### *10 x Laemmli sample buffer*

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

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

50 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM Hepes/KOH pH 7.4, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF

## 2.3 Βιοχημικές Μέθοδοι

### 2.3.1 Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών από βακτήρια

Οι HisTim12, EspFHis, εκφράστηκαν στο στέλεχος του *E. coli* BL21 (DE3) από τους πλασμιδιακούς φορείς pET28 και pET22 αντίστοιχα. Τα μεταλλάγματα της Tim12 ΔN17 και ΔC18 εκφράστηκαν από τον pET28 όπως η αγρίου τύπου πρωτεΐνη, ενώ τα ΔN28 και ΔC39 εκφράστηκαν από το πλασμιδιακό φορέα pRSETa. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.4) και έπειτα έσπασαν με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα και απομονώθηκαν από το αδιάλυτο κλάσμα (πελέτα) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Οι πελέτες διαλυτοποιήθηκαν σε 8M



ουρία και αφέθηκαν 2 ώρες σε RT προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση. Κατόπιν αραιώθηκαν με διάλυμα A σε 6M ουρία και προσδέθηκαν σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads, Qiagen) παρουσία 5mM ιμιδαζολίου. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα 6M ουρίας και μέχρι 20mM ιμιδαζόλιο και το προσδεμένο υλικό εκλούσθηκε με 300mM ιμιδαζολίου. Η Ern1 εκφράστηκε στο στέλεχος *E. coli* BL21 (DE3) (rare codon) παρουσία 10μM FAD. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.4) + 10μM FAD και έπειτα έσπασαν με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Η Ern1 (και τα μεταλλάγματά της) εντοπίστηκαν στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο προσδέθηκε σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης παρουσία 10mM ιμιδαζολίου και έπειτα τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A στο οποίο προστέθηκαν 30 mM ιμιδαζόλιο. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια με διάλυμα A + 300 mM ιμιδαζόλιο. Οι εκλουσμένες πρωτεΐνες καθαρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία ανιόνανταλλαγής (anion exchange chromatography) με τη χρήση στήλης MonoQ HR 5/5 (Pharmacia Biotech). Οι Mia40ΔN290 και Mia40ΔN290 SPS εκφράστηκαν στο στέλεχος του *E. coli* BL21 (DE3) από τον pET22. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.4) και έπειτα έσπασαν με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο προσδέθηκε σε σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads, Qiagen) και έπειτα τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A στο οποίο προστέθηκαν 50 mM ιμιδαζόλιο. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια με διάλυμα A + 300mM ιμιδαζόλιο. Οι εκλουσμένες πρωτεΐνες καθαρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία ανιόνανταλλαγής (anion exchange chromatography) με τη χρήση στήλης MonoQ HR 5/5 (Pharmacia Biotech). Το πεπτίδιο N72Ern1 εκφράστηκε ενωμένο με GST (Glutathion- S-Transferase) από τον πλασμιακό φορέα pGEX4T-1. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,4) και έπειτα έσπασαν με τη χρήση υπερήχων. Τα σπασμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο επώαστηκε με σφαιρίδια γλουταθιόνης (GST-agarose beads, Sigma) για 6 ώρες ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη. Κατόπιν, τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A και η προσδεμένη πρωτεΐνη εκλούσθηκε με διάλυμα A όπου προστέθηκαν 5 U/ml σφαιριδίων. Η θρομβίνη παρέμεινε για να αποκόψει τον επίτοπο της GST από

τη πρωτεΐνη για 6 ώρες. Μετά την αποκοπή, η πρωτεΐνη εκλούσθηκε από τα σφαιρίδια και απομονώθηκε από το μίγμα με χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιώντας στήλη S75superdex (GE Healthcare).

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

Η ραδιοσήμανση πρωτεϊνών πραγματοποιείται από πλασμίδιο που φέρει το επιθυμητό κάθε φορά γονίδιο ανάλογα με το υπόστρωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είτε σε πειράματα εισόδου σε μιτοχόνδρια. Η σήμανση γίνεται με <sup>35</sup>S μεθειονίνη με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης σε κυτταρικό εκχύλισμα πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων από κουνέλι (rabbit reticulocyte lysate) χρησιμοποιώντας πολυμεράση SP6 ή T7 (ανάλογα με τον φορέα) και με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Promega TNT). Για την επιτυχή ραδιοσήμανση πρωτεΐνης χρειάζεται πλασμίδιο υψηλής καθαρότητας απομονωμένο με κολώνα Qiagen. Η αντίδραση γίνεται για 90 λεπτά στους 30°C και η πρωτεΐνη απομακρύνεται από ριβοσώματα με φυγοκέντρηση στα 55000 g, για 15 λεπτά, στους 4°C.

### **2.3.3 Ανασύσταση *in vitro* της ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης της Mia40ΔN290 με Ern1His αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένη**

Η Mia40ΔN290 επωάζεται για 15min στον πάγο με 2mM DTT (ή 1mM TCEP) προκειμένου ανηχθεί μόνο η δεσμός του ενεργού κέντρου CPC. Κατόπιν, αραιώνεται 10 φορές σε διάλυμα, 50mM NaCl, 50mM Tris pH7.4. Ακολούθως, επωάζεται με ισομοριακή ποσότητα Ern1His ή μεταλλαγμάτων αυτής, ενώ η τελική συγκέντρωση DTT στην αντίδραση είναι <0.01mM. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 20μM NEM ενώ τα δείγματα επαναδιαλύονται σε Laemmli sample buffer και αναλύονται σε αναγωγικό ή μη πήκτωμα ακρυλαμίδης με ηλεκτροφόρηση SDS. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ των δύο αντιδρώντων εντοπίζεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα για την Mia40. Για τον υπολογισμό της ποσότητας της Ern1 που απαιτείται, λογαριάστηκε μόνο η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που φέρει FAD.

#### **2.3.4 Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry - ITC)**

Για την θερμοδυναμική ανάλυση της αλληλεπίδραση μεταξύ των ΔN290Mia40 SPS και Ern1His, ΔN72Ern1His ή N72Ern1, χρησιμοποιήθηκε θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης. Τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25oC. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση μικροθερμιδόμετρου VP-ITC (Microcal). Τα πρωτεϊνικά δείγματα υπέστησαν εκτεταμένη διαπίδυση διαμέσω μεμβράνης (dialysis) σε διάλυμα 50 mM KPi pH 7,4 για 24 ώρες στους 4 oC. Η Ern1 και τα μεταλλάγματά της χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0,1 mM, ενώ η ΔN290Mia40 SPS προστέθηκε με έγχυση σε συγκέντρωση 0,5 mM σε μεσοδιαστήματα των 15 δευτερολέπτων.

#### **2.3.5 Χημική πρόσδεση της ΔN72Ern1 μέσω γλουταραλδεΐδης**

Η πρωτεΐνη NΔ72Ern1 μεταφέρεται με διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης σε διάλυμα 50mM Hepes pH7,4, 50mM NaCl. Στο διάλυμα προστίθεται γλουταραλδεΐδη (GA) σε τελική συγκέντρωση 0.1% και η αντίδραση χημικής πρόσδεσης αφήνεται για 5 min στον πάγο. Ακολούθως, η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 100mM Tris pH8.0 (τελική συγκέντρωση). Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE υπό αναγωγικές συνθήκες.

#### **2.3.6 Παγίδευση ελεύθερων θειολικών ομάδων στο πεπτίδιο N72Ern1 in vitro**

Το πεπτίδιο επωάζεται με 15mM AMS παρουσία 1%SDS, 100mM Tris pH 8.0 και 1mM EDTA για μία ώρα σε RT, σε σκοτεινό μέρος. Ακολούθως τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE (πήκτωμα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 16% ) και το πεπτίδιο ακολουθείται με ανοσοπαστύρωση.

#### **2.3.7 Μέθοδος πρόσδεσης σε συστοιχίας ακινητοποιημένων πεπτιδίων**

Χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες με ακινητοποιημένα πεπτίδια της ScAAC (103 πεπτίδια των 13 καταλοίπων που αλληλεπικαλύπτονται κατά 10 κατάλοιπα) και της ScTim9 (38 πεπτίδια των 13 καταλοίπων που αλληλεπικαλύπτονται κατά 11 κατάλοιπα) (JPT Technologies). Η καθαρισμένη πρωτεΐνη (200ng) επώαστηκε με τη μεμβράνη σε διάλυμα 100mM KCl, 30mM Tris pH8.0, 5% sucrose, 0.1% Tween-20, 0.5%BSA, για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από ξεπλύματα, η

προσδεμένη στη μεμβράνη πρωτεΐνη μεταφέρθηκε σε μεμβράνη PVDF και ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση.

### 2.3.8 Παρασκευή λιποσωμάτων

12 mg φωσφατιδυλοχολίνης (PC) η 10mg PC και 2mg καρδιολιπίνης (CL) (Avanti Polar Lipids) σε χλωροφόρμιο, τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη. Το χλωροφόρμιο απομακρύνθηκε με εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου για 30 λεπτά. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με διάλυμα που περιείχε 150mM NaCl, 50mM Tris pH7.4, και επώαστηκε σε RT για 1 ώρα ώστε σχηματιστούν κυστίδια πολλαπλών στοιβάδων. Ακολούθως, αλληπαλλήλοι κύκλοι, παγώματος/ξεπαγώματος στους 50°C δημιουργούν τα λιποσώματα (κυστίδια με απλή στοιβάδα). Τέλος τα λιποσώματα ομογενοποιήθηκαν σε μέγεθος περνώντας 20 φορές από φίλτρο αποκλεισμού (extruder) με πόρους 100nm. Η συγκέντρωση των λιποσωμάτων μετρήθηκε σύμφωνα με τον (Bartlett 1959).

### 2.3.9 Επίπλευση λιποσωμάτων σε διάλυμα βαθμίδωσης σουκρόζης

100μg / αντίδραση αραιώνονται σε διάλυμα 100mM NaCl, 20mM Hepes pH 7.4 και φυγοκεντρώνται για 1 ώρα στα 100000g (22°C). Η πελέτα των λιποσωμάτων επαναδιαλύεται σε 50μl διαλύματος 100mM NaCl, 20mM Hepes pH7.4. Εκεί προστίθενται 0.5μg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Tim12 ή των μεταλλαγμάτων της. Οι πρωτεΐνες βρίσκονταν αρχικά σε διάλυμα ουρίας 6M και στη συνέχεια αραιώνονται στο μη αποδιατακτικό διάλυμα που περιέχει τα λιποσώματα. Οι αντιδράσεις αφήνονται για 30min σε υδατόλουτρο στους 22°C. Στη συνέχεια, αναμιγνύονται με διάλυμα σουκρόζης 2.4M, 100mM NaCl, 20mM Hepes pH7.4 (έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της σουκρόζης να είναι 1.2 M ) και τοποθετούνται στον πυθμένα ενός σωλήνα φυγοκέντρωσης. Εκεί επικαλύπτονται από διάλυμα σουκρόζης 0.25M, 100mM NaCl, 20mM Hepes pH7.4 και φυγοκεντρώνται (100000g, 3 ώρες, 22°C). Κλάσματα των 50μl λαμβάνονται από την κορυφή και αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση.

### 2.3.10 Επίπλευση μιτοπλαστών σε διάλυμα βαθμίδωσης σουκρόζης

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν μιτοπλάστες που προέρχονται από 50μg μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα αγρίου τύπου. Οι μιτοπλάστες είτε επώαστηκαν με διάλυμα πρωτεΐνάσης K, η οποία στη συνέχεια ανεστάλη με προσθήκη PMSF, είτε

έμειναν ως είχαν. Ακολούθως και τα δύο είδη μιτοπλαστών επωάστηκαν με 0.5μg πρωτεΐνης Tim12 και μεταλλαγμάτων αυτής, για 30min, στους 22°C, μέσα σε 50μl διαλύματος σουκρόζης 0.25M, 1mM EDTA, 10mM MOPS, pH7.4. ακολούθως, οι αντιδράσεις αναμιγνύονται με 130μl διαλύματος σουκρόζης 2.4M, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση σουκρόζης να είναι 1.8M. Τα 180μl αντίδρασης τοποθετούνται στον πυθμένα ενός σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης και επικαλύπτονται με άλλα 320μl διαλύματος 1.8M, 1000μl διαλύματος 1.6M και 500μl διαλύματος 0.25M (συνολικά 2ml μέσα στο σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης). Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στις 100000g, για 4 ώρες στους 4°C. κλάσματα των 250μl λαμβάνονται από την κορυφή (το πρώτο-κορυφαίο απορρίπτεται), κατακτημνίζονται με διάλυμα TCA 10% και αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση.

### **2.3.11 Προετοιμασία δειγμάτων για πρωτεομική ανάλυση**

Το πεπτίδιο N72 Ern1 επωάστηκε για 30min στους 30°C, παρουσία ή απουσία DTT (5mM). Στη συνέχεια αφέθηκε σε RT για 45min παρουσία 20mM NEM. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE και το πεπτίδιο εμφανίστηκε στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με διάλυμα «Blue Silver» (0.12% Coomassie G-250, 10% θειικό αμμώνιο, 10% φωσφορικό οξύ και 20% μεθανόλη). Οι ζώνες που αντιστοιχούν στο πεπτίδιο αποκόπτονται από το πήκτωμα και υπόκεινται σε αποχρωματισμό (destaining), με διαδοχικές επώσεις είτε σε 50% ακετονιτρίλιο είτε σε 50mM άλατος διττανθρακικού αμμωνίου. Κατόπιν, τα τμήματα του πηκτώματος επωάζονται για 45min με διάλυμα ιωδοακεταμιδίου συγκέντρωσης 55mM (RT), και τέλος με το διάλυμα της τρυψίνης (4μg/ml σε 50mM άλατος διττανθρακικού αμμωνίου) (~16 ώρες στους 37°C). Μετά την τρυψινόλυση, ακολουθεί έκλυση των πεπτιδίων πουέχουν προκύψει από το πήκτωμα με διαδοχικές επώσεις σε 1. νερό, 2. 50% ακετονιτρίλιο σε νερό και 3. 0.1% τριφλωροοξικό οξύ σε 50% ακετονιτρίλιο. Το κλάσμα έκλυσης εξατμίζεται με φυγοκέντρωση υπό κενό, και τα λυοφιλοποιημένα πεπτίδια φυλάσσονται στους -20°C, μέχρι να αναλυθούν.

## 2.4 *In vivo* μέθοδοι

### 2.4.1 Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη

Τα στελέχη *S.cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα : FT5 (Tzamarias and Struhl 1994), για την κατασκευή του στελέχους GalErv1, D273-10B (MAT $\alpha$ ), για απομόνωση μιτοχονδρίων αγρίου τύπου

Τα κύτταρα μεγάλωσαν είτε σε πλούσιο θρεπτικό μέσο είτε σε φτωχό ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω. Όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν στους 30°C.

*YPD/YPL/YPGal* (πλούσια θρεπτικά)

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

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

2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη για SC, γαλακτικό οξύ για SL, και γαλακτόζη για SG), 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% (w/v) (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ , 0.6% (w/v) casamino amino acids. Στην περίπτωση των *Gal* στελεχών στο θρεπτικό διάλυμα SL προστίθεται και 0.2% γλυκόζη για διατήρηση καταστολής του ενδογενούς γονιδίου.

### 2.4.2 Κατασκευή του στελέχους GalErv1

Το στέλεχος κατασκευάστηκε με πολλαπλασιασμό της κασέτας *kanMX4/Gal1-10* που περιέχει τον υποκινητή της γαλακτόζης από το πλασμιαδικό φορέα M4801 (δώρο από Αντώνη Μακρή - MAIX) με τους κάτωθι εκκινητές: (forward)

5'-GGATGCTACAAGTACGTTGTCATCTCAACCTCTTGATTAAGGGAGCT  
CGTTTTTCGACACTGG-3' και 5'CTTGTGGTGGATTATCCGTCATTTTA

TCTATTGCTTTCATGGATCCGTTTTTCTCCTTGAC3' (reverse). Το προϊόν περιείχε άκρα του γονιδίου της ScErv1 και χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους σακχαρομύκητα FT5 (Tzamarias and Struhl, 1994). Οι αποικίες επιλέχθηκαν σε θρεπτικό YPGal με 0.2mg/ml geneticin. Η ένθεση του Gal υποκινητή μπροστά από το γονίδιο της Erv1 επαληθεύτηκε με PCR σε απομονωμένο DNA του σακχαρομύκητα. Η μείωση της πρωτεϊνικής ποσότητας της Erv1 επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση σε κύτταρα που είχαν μεγαλώσει σε γλυκόζη για 12, 24 και 36 ώρες.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΟΠΑΣΗΣ TIM12 ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

### 3.1.1 Εισαγωγή/ Σκοπός

Το μιτοχόνδριο έχει αναπτύξει εξειδικευμένα σύμπλοκα μετατοπασών τόσο στην εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη όσο και στο διαμεμβρανικό χώρο. Τα σύμπλοκα αυτά χρησιμοποιούνται από τις πρόδρομες πρωτεΐνες που εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα προκειμένου να στοχευθούν στο κατάλληλο υπο-μιτοχονδριακό διαμέρισμα. Η οικογένεια των μικρών πρωτεϊνών Tim που βρίσκονται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου στο σακχαρομύκητα, αποτελείται από πέντε μέλη, τις Tim9, Tim10, Tim8, Tim13 και Tim12. Πρόκειται για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (περίπου 10kDa), κάθε μια από τις οποίες περιλαμβάνει δύο συντηρημένα διπλά κυστεϊνικά μοτίβα CX3C, που σχηματίζουν δύο ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς απαραίτητους για την τελική αναδίπλωση της πρωτεΐνης, την στόχευση και την σωστή λειτουργία της (Allen, Lu et al. 2003; Mesecke, Terziyska et al. 2005; Webb, Gorman et al. 2006; Sideris and Tokatlidis 2007). Ομόλογα αυτών των πρωτεϊνών συναντώνται σε σχεδόν όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μέχρι και τον άνθρωπο (Gentle, Perry et al. 2007). Οι Tim9, 10 και 12 είναι απαραίτητες για την επιβίωση του σακχαρομύκητα, ενώ σε μεταλλαγή της τέταρτης κυστεϊνης της ανθρώπινης Tim8 (DDP1/TIMM8) αποδίδεται το σύνδρομο Morh-Tranebjaerg (ή Deafness Dystonia Syndrome) (Hofmann, Rothbauer et al. 2002).

Ο πιο καλά μελετημένος ρόλος των μικρών πρωτεϊνών Tim είναι αυτός της σαπερόνης του διαμεμβρανικού χώρου για υδρόφοβα πρόδρομα μόρια που στοχεύονται κυρίως στην εσωτερική αλλά και στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Chacinska, van der Laan et al. 2010; Endo, Yamano et al. 2010). Κατά τη στόχευση ενός πρόδρομου μορίου, π.χ. AAC, στην εσωτερική μεμβράνη, οι πρωτεΐνες Tim9 και 10, (και οι Tim8 και 13 αντίστοιχα) σχηματίζουν ένα υδατοδιαλυτό εξαμερές σύμπλοκο, το Tim9/10, που προσδένεται στα νεοεισαχθέντα πρόδρομα μόρια μόλις αυτά περάσουν την μετατοπάση της εξωτερικής μεμβράνης (TOM). Στη συνέχεια, το υπόστρωμα, από το σύμπλοκο Tim9/10 μεταφέρεται σε ένα σύμπλοκο Tim9/10/12 ίσου μοριακού βάρους, προκειμένου τελικά να αποδοθεί στο μεμβρανικό σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης TIM22.



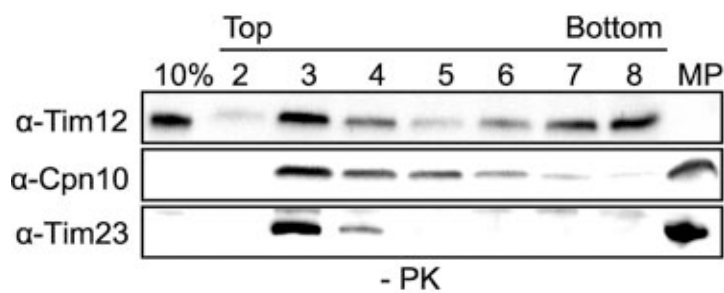
Η πρωτεΐνη Tim12 είναι απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού, ενώ λειτουργικά ομόλογα αυτής υπάρχουν σε πολλούς ανώτερους ευκαρυώτες, μέχρι και στον άνθρωπο (Muhlenbein, Hofmann et al. 2004). Το χαρακτηριστικό που την ξεχωρίζει από τις άλλες μικρές Tim πρωτεΐνες είναι ότι βρίσκεται περιφεριακά προσδεσμένη με την εσωτερική μεμβράνη, ενώ έχει αναφερθεί να συμμετέχει σε δύο σύμπλοκα. Συγκεκριμένα, η Tim12 αποτελεί μία από τις περιφεριακές υπομονάδες του συμπλόκου TIM22 (300kDa), ενώ παράλληλα συμμετέχει και σε ένα σύμπλοκο 70kDa μαζί με τις Tim9 και Tim10 (Endres, Neupert et al. 1999). Όσον αφορά στο μοριακό μηχανισμό δράσης της Tim12, όταν ξεκίνησε αυτή η μελέτη ήταν γνωστό ότι δρά μετά την πρόσδεση του υποστρώματος στο σύμπλοκο Tim9/10 (Sirrenberg, Endres et al. 1998; Endres, Neupert et al. 1999). Εντούτοις, ο ακριβής ρόλος της καθώς και ο μηχανισμός δράσης της στο μονοπάτι εισόδου πρωτεϊνών στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη παρέμενε άγνωστος.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση αυτού του μοριακού μηχανισμού στόχευσης και δράσης της Tim12, καθώς και ο προσδιορισμός της ιδιότητας εκείνης που κάνει την πρωτεΐνη απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού.

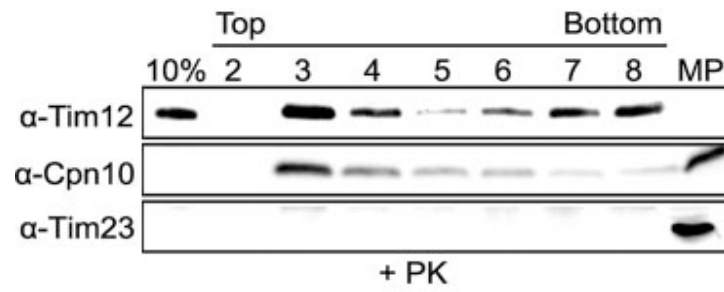
### **3.1.2 Η Tim12 αλληλεπιδρά με τα λιπίδια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης**

Όπως έχει αναφερθεί στο παρελθόν η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Tim12 εκφρασμένη και απομονωμένη από βακτήρια είναι λιγότερη διαλυτή *in vitro*, από τα άλλα μέλη της οικογένειας, Tim9 και Tim10 (Baud, de Marcos-Lousa et al. 2007). Για το λόγο αυτό, καθώς και εξαιτίας της μοναδικής ιδιότητάς της ως περιφερικά προσδεμένης στην μεμβράνη, θελήσαμε να εξετάσουμε την συνάφεια που έχει η Tim12 για τα λιπίδια, και συγκεκριμένα αυτά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα επίπλευσης μιτοπλαστών αλλά και συνθετικών λιποσωμάτων σε διάλυμα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης. Συγκεκριμένα, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Tim12 εκφράστηκε σε βακτήρια *E. Coli* (BL21, DE3) φέροντας τον επίτοπο έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας, πάνω σε στήλη από σφαιρίδια αγαρόζης Ni-NTA. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη επωάστηκε με αγρίου τύπου μιτοπλάστες από σακχαρομύκητα, για μισή ώρα στους 22°C. Μιτοπλάστες ονομάζονται τα μιτοχόνδρια που έχουν υποστεί ωσμωτικό σοκ ώστε να

διαρραγεί η εξωτερική μεμβράνη τους και να απελευθερωθεί το διαλυτό τμήμα του διαμεμβρανικού χώρου στο υπερκείμενο διάλυμα. Στους μιτοπλάστες, που βρίσκονται στο ίζημα μετά από φυγοκέντρηση υπο-ωσμωτικού διαλύματος μιτοχονδρίων, υπάρχουν τμήματα της εξωτερικής μεμβράνης που συνδέονται μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με την εσωτερική, ενώ η εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι πλέον προσβάσιμη. Το διάλυμα των μιτοπλαστών αναμίχθηκε με διάλυμα σουκρόζης ώστε η τελική συγκέντρωση σουκρόζης να είναι 1.8M και τοποθετήθηκε στον πυθμένα ενός ειδικού σωλήνα υπερφυγοκέντρησης. Πάνω από το διάλυμα προστέθηκαν διαλύματος σουκρόζης



Εικόνα 12 Πείραμα επίπλευσης μιτοπλαστών. Επίπλευση μιτοπλαστών σε διάλυμα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης. Τα κλάσματα του διαλύματος μετά την υπερφυγοκέντρηση είναι αριθμημένα από την κορυφή (Top) έως τον πυθμένα(Bottom).



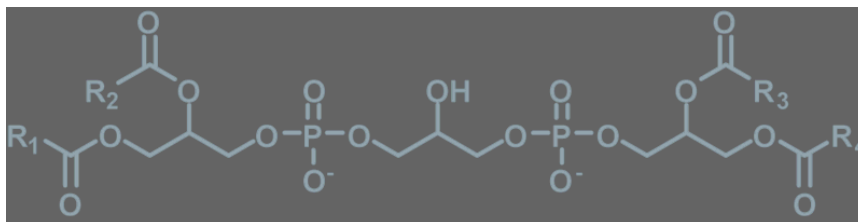
Εικόνα 13 Πείραμα επίπλευσης μιτοπλαστών. Επίπλευση μιτοπλαστών που έχουν πρωτεολυθεί εξωτερικά με πρωτεϊνάση K (PK), και στη συνέχεια έχουν επωαστεί με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Tim12, σε διάλυμα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης.

ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση με αντισώματα για τις πρωτεΐνες που φαίνονται στην εικόνα 12. Τα κλάσματα του διαλύματος είναι αριθμημένα από την κορυφή (Top) έως τον πυθμένα (Bottom). Στη πρώτη θέση έχει φορτωθεί το 10% της συνολικής ποσότητας Tim12 (0.5μg) που χρησιμοποιήθηκε σε ένα πείραμα, ενώ στην τελευταία φορτώθηκε ποσότητα μιτοπλαστών ίση με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε σε ένα πείραμα (50μg). Όπως φαίνεται στην εικόνα 12 η

χαμηλότερης συγκέντρωσης έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα διάλυμα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης. Μετά από 4 ώρες υπερφυγοκέντρησης στα 100000g, το υλικό χωρίστηκε σε κλάσματα των 250μl από την κορυφή προς τον πυθμένα. Το πρωτεϊνικό υλικό σε κάθε κλάσμα κατακρημνίστηκε σε διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος 10%, και φορτώθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για να χωριστεί με

μεμβρανική πρωτεΐνη Tim23 της εσωτερικής μιτοχονδριακής, η οποία χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για την επίπλευση των μιτοπλαστών, βρίσκεται μετά την υπερφυγοκέντρωση στο τρίτο κλάσμα του διαλύματος. Αντίστοιχα, η διαλυτή πρωτεΐνη της μήτρας crn10 βρίσκεται επίσης στο τρίτο κλάσμα, υποδεικνύοντας ότι οι μιτοπλάστες είναι ακέραιοι. Όπως φαίνεται ένα ποσοστό την ανασυνδυασμένης Tim12 που επώαστηκε με τους μιτοπλάστες προσδέθηκε σε αυτούς και επέπλευσε μαζί τους στο τρίτο κλάσμα του διαλύματος. Αυτή η πρόσδεση θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Tim12 με κάποιες πρωτεΐνες των μιτοπλαστών που προεκβάλλουν προς το διαμεμβρανικό χώρο, είτε σε αλληλεπιδράσεις με τα λιπίδια των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Προκειμένου να εξακριβώσουμε τη φύση αυτών των αλληλεπιδράσεων επαναλάβουμε το παραπάνω πείραμα μόνο που αυτή τη φορά οι μιτοπλάστες είχαν επωαστεί προηγουμένως με πρωτεΐνωση K, ώστε να πρωτεολυθούν όλα τα πρωτεϊνικά τμήματα που προεκβάλλουν από την μεμβράνη και είναι εκτεθειμένα στην πρωτεάση. Η αποτελεσματικότητα της πρωτεόλυσης ελέγχθηκε στην εικόνα 13 όπου η πρωτεΐνη μάρτυρας Tim23, η οποία είναι διαμεμβρανική με το μεγαλύτερο τμήμα της να προεκβάλλει στον διαμεμβρανικό χώρο δε ανιχνεύεται πλέον κατά την ανοσοαποτύπωση. Πριν την προσθήκη της διαλυτής Tim12, η δράση της πρωτεάσης ανεστάλη με προσθήκη PMSF. Σκοπός είναι να ελεγχθεί εάν επηρεάζεται η αλληλεπίδραση της Tim12 με τους μιτοπλάστες όταν λείπουν αυτά τα διαλυτά μεμβρανικά τμήματα. Στην εικόνα 13 φαίνεται ότι η Tim12 επιπλέει εξίσου με τους μιτοπλάστες που έχουν επωαστεί με πρωτεάση, επομένως η δέσμευσή της με αυτούς δεν περιορίζεται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Τέλος, προκειμένου να ελεγχθεί η συνάφεια που μπορεί να έχει η Tim12 με τα λιπίδια, μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή της με δύο ειδών συνθετικά λιποσώματα.

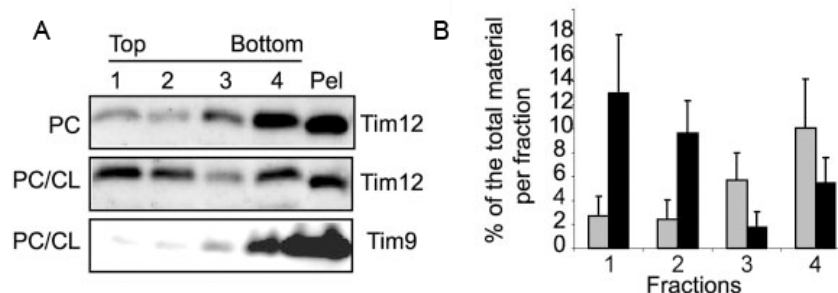


Εικόνα 14 Συντακτικός τύπος μορίου καρδιολιπίνης. Οι αλυσίδες ανθράκων (R1-4) μπορούν να ποικίλουν σε μήκος ανάλογα τον οργανισμό και τον ιστό.

Πρώτον με λιποσώματα που αποτελούνται μόνο από φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και δεύτερον με λιποσώματα που αποτελούνται από φωσφατιδυλοχολίνη και

καρδιολιπίνη σε αναλογία 5/1. Η καρδιολιπίνη είναι ένα διφωσφατιδυλογλυκερίδιο (εικόνα 14) που φέρει 4 αλυσίδες ανθράκων και δυνητικά 2 αρνητικά φορτία.

Συναντάται σχεδόν αποκλειστικά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σε ποσοστό 20% του συνολικού ποσού λιπιδίων. Η πρωτεΐνη Tim12 (ή η Tim9 αντίστοιχα) επώαστηκε με λιποσώματα για 30min στους 22°C, και το διάλυμα που προέκυψε ανακατεύθηκε με διάλυμα σουκρόζης ώστε να προκύψει συγκέντρωση σουκρόζης 1.2M. Το μίγμα αυτό τοποθετήθηκε στον πυθμένα ενός σωλήνα και από πάνω εναποτέθηκαν 100μl από διάλυμα σουκρόζης συγκέντρωσης 0,25M. Ακολούθησε τρίωρη υπερφυγοκέντρωση στα 100000g, και το υλικό χωρίστηκε σε κλάσματα των 50μl από την κορυφή προς τον πυθμένα, με αριθμούς 1 έως 4 αντίστοιχα. Το πρωτεϊνικό υλικό σε κάθε κλάσμα κατακρημνίστηκε σε διάλυμα τριγλωροοξικού οξέος 10%, και φορτώθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για να χωριστεί με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση με αντισώματα για τις πρωτεΐνες που φαίνονται στην εικόνα 15A. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση οδήγησε στην κατασκευή του διαγράμματος 15B. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την χρήση των αποτελεσμάτων τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 15 Πείραμα επίπλευσης λιποσωμάτων. Επίπλευση λιποσωμάτων φωσφατιδυλοχολίνης (PC) ή φωσφατιδυλοχολίνης/καρδιολιπίνης (PC/CL) που έχουν προηγουμένως επωαστεί είτε με Tim12 είτε με Tim9. Α. SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση για τις Tim12 και Tim9 αντίστοιχα. Β. Διάγραμμα στηλών που προέκυψε μετά από ποσοτικοποίηση των ζωνών που εμφανίζονται κατά την ανοσοαποτύπωση. Υποδεικνύει το % ποσοστό της Tim12 που βρίσκεται σε κάθε κλάσμα του διαλύματος σουκρόζης μετά την φυγοκέντρωση. Οι μαύρες στήλες αντιστοιχούν σε πειράματα με λιποσώματα PC/CL, ενώ οι γκρι στήλες σε πειράματα με λιποσώματα PC. Το διάγραμμα προέκυψε από την στατιστική επεξεργασία τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 15, όταν χρησιμοποιούνται λιποσώματα PC, ένα πολύ μικρό ποσοστό της Tim12 επιπλέει με αυτά στα κορυφαία κλάσματα του διαλύματος. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιούνται λιποσώματα PC/CL, το ποσοστό αυτό σχεδόν τετραπλασιάζεται. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η Tim12 έχει εγγενή συνάφεια για τα

λιπίδια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, πράγμα που δεν ισχύει για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των μικρών Tim.

### 3.1.3 Λειτουργική χαρτογράφηση των τμημάτων της πρωτεΐνης Tim12

Τα μέλη της οικογένειας των μικρών Tim δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους μεγάλη ομολογία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, όπως φαίνεται και στην σύγκριση των αλληλουχιών των Tim12, Tim9 και Tim10 στην εικόνα 17. Συγκεκριμένα, το Tim12 έχει 36% ομολογία με την Tim10 (αλγόριθμος : NCBI/BLAST/blastp) και ακόμη

χαμηλότερη με την Tim9. Στην εικόνα 16 φαίνεται ακόμη ότι η Tim12 έχει ένα μακρύτερο καρβοξυτελικό

```

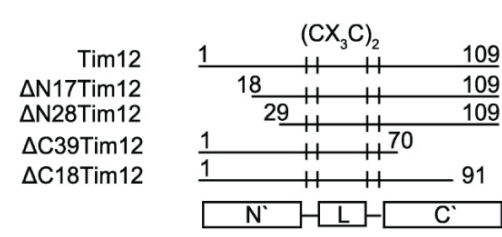
yTim9 (1)  -MDALNSKEQCEF---QK-VVEQKQMKDFMRLYSNLVERCFETDGV--NDF
yTim10 (1) MSFLGFGGGQPQLSSQOKIQAAEAELDLVTDMFNKLVNNCYKKEI-NTSY
yTim12 (1) MSFFLNSLRGNQEVSQEKLDVAGVQFDAMCSTFNNILSTCLEKQIPHEGF

yTim9 (44) TTSKLTINKEQTCTIMKQSEKFLKHSERVEQRFQEQNAALGQGLGR-----
yTim10 (50) SEGELNKNESSCLDRGVAKYFETNVQVGENMOKMGQSFNAAGKF-----
yTim12 (51) GEPDLTKGEQCCIDRQVAKMHYSNRLIGGFVQTRGFGPENQLRHYSRFVA

yTim9 (88) -----
yTim10 (94) -----
yTim12 (101) KEIADDSKK
    
```

Εικόνα 17 Ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών Tim12, 10 και 9. Με ανοιχτό γκρι απεικονίζονται τα συντηρημένα κατάλοιπα και με σκούρο γκρι οι κυστεΐνες

να αποτελεί τη βάση για τη μοναδική ιδιότητα της Tim12 όσον αφορά την συνάφεια με την μεμβράνη; Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση κατασκευάστηκαν μεταλλάγματα απαλοιφής, τόσο από το αμινοτελικό όσο και από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Τα μεταλλάγματα αυτά παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα

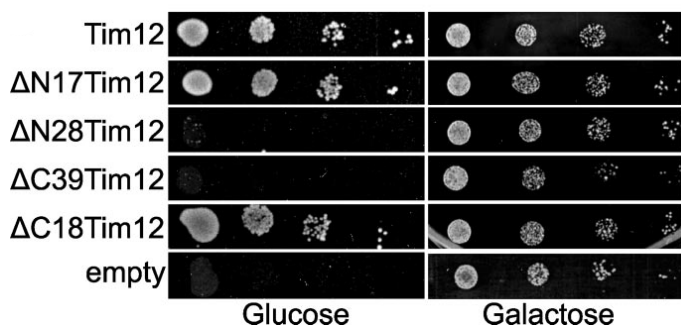


Εικόνα 16 Σχεδιάγραμμα των μεταλλαγμάτων απαλοιφής της Tim12. N' : αμινοτελικό τμήμα πριν την πρώτη κυστεΐνη C' : καρβοξυτελικό άκρο μετά την τελευταία κυστεΐνη L : ενδιάμεση περιοχή (Loop) ανάμεσα στις ενωμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς κυστεΐνες

16 και στο εξής θα ονομάζονται ΔN17, ΔN28 (στα οποία λείπουν 17 και 28 αμινοξέα αντίστοιχα από το αμινοτελικό άκρο), ΔC18 και ΔC39 (στα οποία λείπουν 18 και 39 αμινοξέα αντίστοιχα από το καρβοξυτελικό άκρο). Τα μεταλλάγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να αποκαλυφθεί ο ρόλος της Tim12 στο σχηματισμό των γνωστών συμπλόκων στα οποία συμμετέχει καθώς επίσης και στην

πρόσδεση του υποστρώματος. Σε πρώτη φάση ελέγχθηκε η ικανότητα των μεταλλαγμάτων αυτών να συμπληρώνουν τον φαινότυπο σε ένα στέλεχος

σακχαρομύκητα στο οποίο το ενδογενές γονίδιο *TIM12* βρίσκεται υπό την ρύθμιση ενός υποκινητή, επαγόμενου από γαλακτόζη. Κατά την κατασκευή του στελέχους αυτού (στο εξής θα ονομάζεται Gal1-10*TIM12*), ο ενδογενής υποκινητής του γονιδίου *TIM12* (συγκεκριμένα 300 βάσεις ανοδικά του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου), αντικαταστάθηκε από τον υποκινητή GAL1-10. Όταν αυτό το στέλεχος μεγαλώνει παρουσία γαλακτόζης το *TIM12* εκφράζεται συστατικά. Αντίθετα, παρουσία γλυκόζης, το *TIM12* καταστέλλεται. Μετά από 48 ώρες στη γλυκόζη, τα κύτταρα του στελέχους αυτού σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Μετασηματίστηκαν κύτταρα του στελέχους αυτού με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα μεταλλαγμένα γονίδια υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή (300 βάσεις ανοδικά από την έναρξη του γονιδίου- endogenous promoter, καθώς και 300 βάσεις καθοδικά του γονιδίου- endogenous terminator). Τα μετασηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν παρουσία γλυκόζης ή γαλακτόζης για 36 ώρες και στη συνέχεια, 5μl από διαδοχικές αραιώσεις



Εικόνα 18 Test συμπληρωματικότητας in vivo του φαινοτύπου αγρίου τύπου από τα τέσσερα μεταλλάγματα και την αγρίου τύπου Tim12, στο στέλεχος Gal1-10*TIM12*

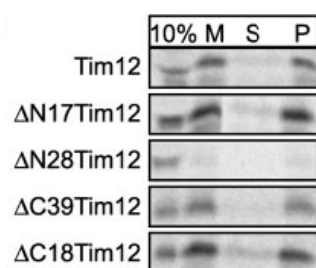
αυτών των καλλιεργειών, εναποτέθηκαν πάνω σε πιάτα petri με στερεό θρεπτικό που περιέχει γλυκόζη ή γαλακτόζη αντίστοιχα, και αφέθηκαν στους 30°C για να αναπτυχθούν το αποτέλεσμα φαίνεται στην εικόνα 18. Τα κύτταρα που μετασηματίστηκαν με τον

πλασμιδιακό φορέα χωρίς το γονίδιο (empty), όπως αναμένεται δεν μεγαλώνουν παρουσία γλυκόζης. Τα μεταλλαγμένα γονίδια με τις δύο μεγαλύτερες ελλείψεις από το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο (ΔN28 και ΔC39) δεν μπορούν αναπτυχθούν μετά από 2 μέρες στη γλυκόζη, όπως μπορεί η αγρίου τύπου πρωτεΐνη αλλά και οι δύο μικρότερες ελλείψεις (ΔN17 και ΔC18). Εντούτοις, όταν το μεταλλάγμα ΔN28 αφέθηκε να αναπτυχθεί περισσότερες μέρες, τότε κάποιες αποικίες φάνηκε να επιβιώνουν. Αντίθετα η μεταλλαγή ΔC39 είναι θανατηφόρα. Όλα τα στελέχη αναπτύσσονται κανονικά παρουσία γαλακτόζης, αφού υπό αυτές τις συνθήκες εκφράζεται το ενδογενές γονίδιο. Από αυτό το πείραμα φαίνεται ότι το καρβοξυτελικό τμήμα της Tim12 είναι απολύτως απαραίτητο για τη λειτουργία της και επομένως την επιβίωση του οργανισμού. Ποιες είναι όμως αυτές οι λειτουργίες

της Tim12 που πραγματοποιούνται από το εν λόγω τμήμα και καθιστά την πρωτεΐνη απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού;

### 3.1.4 Το αμινοτελικό τμήμα της Tim12 συμμετέχει στη στόχευση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια

Προκειμένου να βρεθεί η μοριακή εξήγηση των *in vivo* φαινοτύπων, ελέγχθηκε εάν τα μεταλλάγματα έλλειψης που κατασκευάστηκαν μπορούσαν να στοχευθούν στα μιτοχόνδρια. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από σακχαρομύκητα αγρίου τύπου. Ειδικότερα, η Tim12p καθώς και τα μεταλλάγματά της εκφράστηκαν ως ραδιενεργά υποστρώματα σε *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης (βλπ Κεφάλαιο 2/Υλικά και Μέθοδοι) και επώαστηκαν με απομονωμένα μιτοχόνδρια παρουσία ATP και NADH, στους 30°C (εικόνα 19). Μετά την φυγοκέντρηση που ακολούθησε, το ίζημα των μιτοχονδρίων επαναδιαλύθηκε σε ισοοσμωτικό διάλυμα που περιείχε 0,1mg/ml πρωτεΐνάσης K (PK). Η πρωτεάση αυτή πέπτει όλο το υλικό που δεν έχει περάσει την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

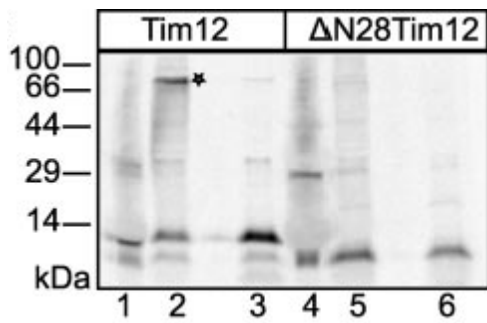


Εικόνα 19 Πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια ραδιενεργών μορίων σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε αυτοραδιογραφία

Μετά την απενεργοποίηση της πρωτεάσης με την προσθήκη PMSF, κάθε δείγμα χωρίστηκε στη μέση και τα δύο τμήματα φυγοκεντρήθηκαν. Το ίζημα των μιτοχονδρίων επαναδιαλύθηκε είτε μέσα σε διάλυμα SDS ώστε να είναι έτοιμο για SDS-PAGE (εικόνα 19 – M)

είτε σε υπο-οσμωτικό ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Hepes. Τα δείγματα που διαλύονται σε υποοσμωτικό διάλυμα υπόκεινται ωσμωτικό shock, και μετά την φυγοκέντρηση χωρίζονται σε μιτοπλάστες (P) και διαλυτό διαμεμβρανικό χώρο (S). Τα πρωτεϊνικά δείγματα χωρίζονται με

ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Οι ραδιενεργά σημασμένες πρωτεΐνες φαίνονται με αυτοραδιογραφία. Στην εικόνα 19, στην πρώτη θέση κάθε πλαισίου, έχει φορτωθεί το 10% του συνολικού ραδιενεργού υλικού που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση εισόδου. Τόσο η αγρίου τύπου Tim12, όσο και όλα τα μεταλλάγματα, εκτός του ΔN28Tim12, καταφέρνουν να περάσουν σε ποσοστό περίπου 10-20% την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, και εντοπίζονται σε αλληλεπίδραση με τους μιτοπλάστες. Αντίθετα, το μετάλλαγμα ΔN28Tim12, δεν καταφέρνει να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια. Γνωρίζοντας το ρόλο που παίζει η οξειδάση Mia40 στην είσοδο όλων των μικρών Tim, ελέγξαμε την ικανότητα αυτού του μεταλλάγματος να αλληλεπιδρά και να

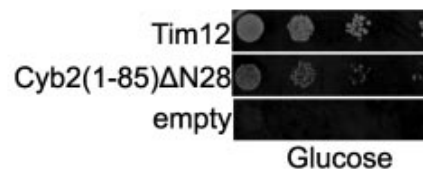


Εικόνα 20 Πείραμα εισόδου σε μιτοπλάστες. Επώαση ραδιενεργής Tim12 και ΔN28Tim12 με μιτοπλάστες, και ανάλυση με μη αναγωγική SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με την Mia40 κατά την διάρκεια της στόχευσής του. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, το ραδιενεργό πρόδρομο μόριο επώαστηκε με μιτοπλάστες

αντί άθικτα μιτοχόνδρια. Στους μιτοπλάστες η Mia40 είναι ενσωματωμένη την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, προεξέχοντας

προς το διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι είναι εύκολα προσβάσιμη από το ραδιενεργό υπόστρωμα. Στην αντίδραση ελέγχου του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20 (θέση 2), η αγρίου τύπου Tim12 αλληλεπιδρά με τη Mia40 σχηματίζοντας έναν ενδιάμεσο που σε SDS-PAGE μεταναστεύει στα 80kDa περίπου, και υποδεικνύεται από έναν αστερίσκο. Το μόριο αποτελεί μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο καθώς είναι ευαίσθητο σε DTT, όπως αναμένεται και φαίνεται στη θέση 3 της εικόνας 20. Αντιθέτως, το μετάλλαγμα ΔN28Tim12 δεν καταφέρνει να σχηματίσει τέτοιο μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο (θέση 5). Στις θέσεις 1 και 4 έχει φορτωθεί το 10% του συνολικού ραδιενεργού υλικού για πού χρησιμοποιήθηκε από κάθε πρόδρομο μόριο (αγρίου τύπου και ΔN28Tim12 αντίστοιχα). Επομένως συμπεραίνεται ότι το μετάλλαγμα ΔN28Tim12 δεν καταφέρνει να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια γιατί δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την οξειδάση του συστήματος Mia40. Άρα, σε αυτήν την αλληλεπίδραση το αμινοτελικό άκρο της Tim12 είναι απαραίτητο. Εκτός όμως από τη διαδικασία στόχευσης, το αμινοτελικό άκρο είναι σημαντικό για τη λειτουργία της πρωτεΐνης; Προκειμένου να ελεγχθεί αυτό, παράχθηκε μία υβριδική πρωτεΐνη στην οποία τα 28 πρώτα αμινοξέα της Tim12 αντικαταστάθηκαν από τα 85 πρώτα αμινοξέα μίας άλλης πρωτεΐνης του διαμεμβρανικού χώρου, του κυτοχρώματος β2, στα οποία εμπεριέχεται η σηματοδοτική αλληλουχία στόχευσης του κυτοχρώματος β2



Εικόνα 21 Test συμπληρωματικότητας in vivo της αγρίου τύπου ανάπτυξης από το μετάλλαγμα Cyb2(1-85)ΔN28TIM12, σε κύτταρα του στελέχους Gal1-1071TIM12

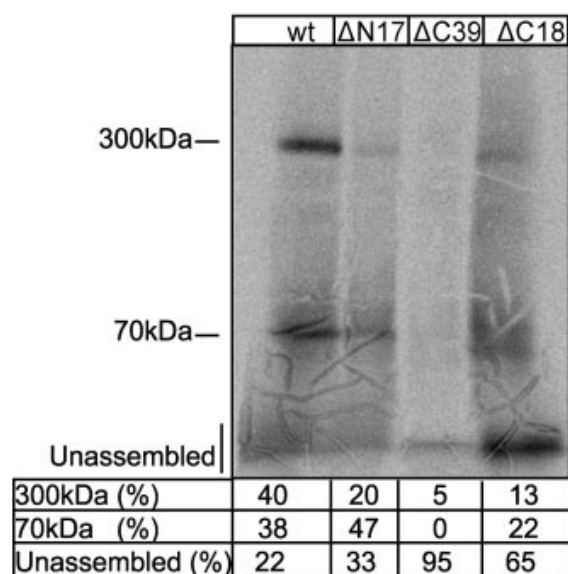
(Guiard 1985). Η κατασκευή αυτή κλωνοποιήθηκε μέσα στον φορέα που φέρει τα ενδογενή ρυθμιστικά στοιχεία του TIM12, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει κύτταρα σακχαρομύκητα του γενετικά τροποποιημένου στελέχους



Gal1-10TIM12. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην εικόνα 21. Τα κύτταρα που εκφράζουν το μετάλλαγμα Cyb2 (1-85) $\Delta$ N28Tim12 φαίνεται τώρα να μεγαλώνουν καλύτερα από ότι αυτά που εκφράζουν το  $\Delta$ N28TIM12 και φαίνονται στην εικόνα 18. Η ανάπτυξη των κυττάρων που εκφράζουν την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (Tim12) όπως και αυτών που δεν εκφράζουν καθόλου Tim12 (empty), επίσης φαίνονται στην εικόνα 21. Συμπερασματικά, το αμινοτελικό άκρο της Tim12 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη στόχευση της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην αλληλεπίδρασή της με την οξειδάση Mia40. Εντούτοις, αυτό το κομμάτι της πρωτεΐνης δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό και απαραίτητο ρόλο στη μετέπειτα λειτουργία της Tim12, καθώς όταν το μετάλλαγμα που δεν φέρει το αμινοτελικό άκρο, καταφέρνει να μπει στα μιτοχόνδρια, έστω μέσω ενός άλλου μονοπατιού στόχευσης στο διαμεμβρανικό χώρο, τα κύτταρα πλέον επιβιώνουν.

### 3.1.5 Το καρβοξυτελικό άκρο συμμετέχει στο σχηματισμό των συμπλόκων στα οποία συμμετέχει η Tim12

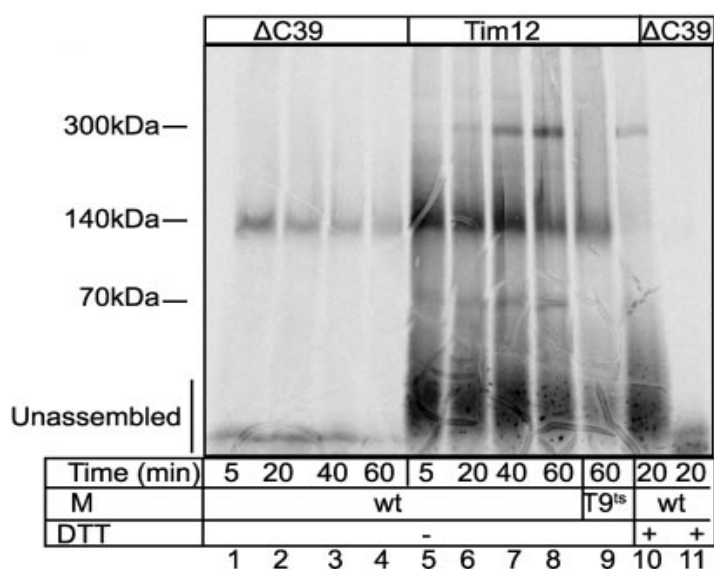
Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα των μεταλλαγμάτων που εισέρχονται κανονικά στο μιτοχόνδριο να σχηματίζουν τα σύμπλοκα στα οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχει η Tim12, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, BN-PAGE. Συγκεκριμένα, οι πρόδρομες πρωτεΐνες παράχθηκαν στο *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης και επώαστηκαν με μιτοχόνδρια όπως έχει ήδη περιγραφεί. Στο τέλος, του πειράματος εισόδου στα μιτοχόνδρια όμως, τα δείγματα αντί να επαναδιαλυθούν σε διάλυμα με SDS για ανάλυση με SDS-PAGE,



επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 1M αμινοεξανοϊκού οξέος και αναλύθηκαν υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. Υλικά και μέθοδοι). Οι ραδιενεργές ζώνες, οι οποίες περιείχαν Tim12 αποκαλύφθηκαν με αυτοραδιογραφία.

Εικόνα 22. Ανάλυση ραδιενεργών συμπλόκων σε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση BN-PAGE. Μετά από αντίδραση εισόδου της ραδιενεργής πρωτεΐνης Tim12, και των μεταλλαγμάτων που διατηρούν ικανότητα εισόδου, σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια, τα μιτοχόνδρια επώαστηκαν με τα πρόδρομα μόρια για 1 ώρα, ενώ μετά ακολούθησε επώαση με πρωτεάση K. Τα δείγματα αναλύθηκαν απουσία αναγωγικού παράγοντα σε BN-PAGE και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

Είναι γνωστό ότι η αγρίου τύπου Tim12 συμμετέχει σε δύο σύμπλοκα μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, ένα 70kDa και ένα 300kDa, μαζί με τις Tim9/10 και το σύμπλοκο Tim22, αντίστοιχα (εικόνα 22) (Koehler, Jarosch et al. 1998). Το ΔN28Tim12 δεν μπορεί να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια και γι'αυτό δεν αναλύεται σε αυτό το πείραμα. Τα δύο μεταλλάγματα με τις μικρότερες ελλείψεις από το N και το C άκρο μπορούν να σχηματίσουν τα δύο σύμπλοκα στα οποία βρίσκεται και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Αντίθετα, το ΔC39Tim12, το οποίο όπως περιγράφηκε παραπάνω δεν μπορεί να συμπληρώσει το φαινότυπο απουσία της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, παρότι μπορεί να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια δεν καταφέρνει να σχηματίσει κανένα από τα δύο εν λόγω σύμπλοκα μετά από 1 ώρα επώασης. Στη συνέχεια, εξετάστηκε κινητικά η ικανότητα της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και αυτού του



Εικόνα 23. Ανάλυση ραδιενεργών συμπλόκων σε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση BN-PAGE. Κινητική αντίδρασης εισόδου ραδιενεργής πρωτεΐνης Tim12 αγρίου τύπου ή ΔC39Tim12 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Ο χρόνος επώασης, το στέλεχος προέλευσης των μιτοχονδρίων καθώς και η παρουσία αναγωγικού παράγοντα DTT, φαίνονται στο κάτω μέρος της εικόνας. Η ανάλυση έγινε με BN-PAGE ενώ ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

εξαιρετικά ευαίσθητη στην πρωτεόλυση. Τα δείγματα και πάλι αναλύονται υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε BN-PAGE που ακολουθείται από αυτοραδιογραφία (εικόνα 23). Όπως φαίνεται, η αγρίου τύπου Tim12 βρίσκεται σε τρία διαφορετικά σύμπλοκα: 1) ήδη στα 5 πρώτα λεπτά φαίνεται να είναι ενσωματωμένη σε ένα σύμπλοκο 140kDa, το οποίο είναι ευαίσθητο στον αναγωγικό παράγοντα DTT (βλέπε συγκριτικά θέσεις 6 και 10). Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει το μικτό δισουλφιδικό

μεταλλάγματος να σχηματίζουν τα γνωστά σύμπλοκα, αλλά και να αλληλεπιδρούν με την οξειδάση του μονοπατιού οξειδωτικής αναδίπλωσης, την Mia40. Προκειμένου να παρακολουθήσουμε το σχηματισμό του συμπλόκου με τη Mia40, θα πρέπει το πείραμα να

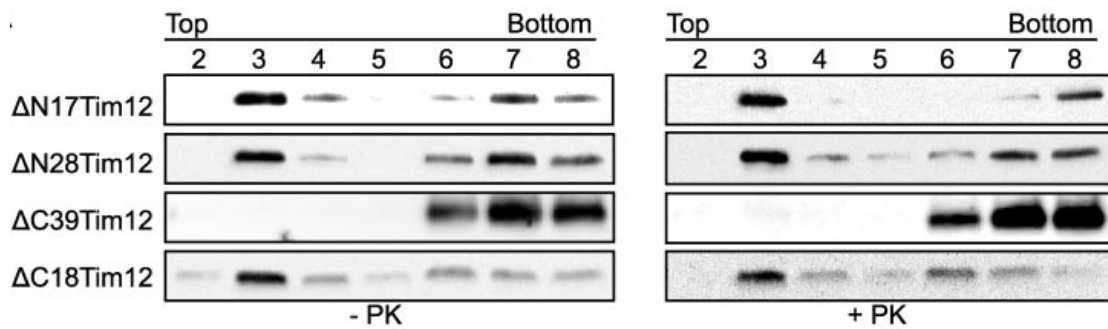
πραγματοποιηθεί χωρίς την τελική επώαση με την πρωτεΐνάση K, καθώς η Mia40 ακόμη και μέσα στο μιτοχόνδριο είναι

ενδιάμεσο με τη Mia40, και φαίνεται να επιμένει μέχρι και μετά από 60 λεπτά επώασης, αν και η έντασή του μειώνεται προοδευτικά με το χρόνο (θέσεις 5-8). 2) Σχεδόν ταυτόχρονα με το σύμπλοκο 140kDa εμφανίζεται το σύμπλοκο 70kDa. Αυτό όπως είναι γνωστό περιλαμβάνει το Tim9-10 σύμπλοκο – σαπερόνης του διαμεμβρανικού χώρου. Γι'αυτό και όταν η Tim12 επωάζεται με μιτοχόνδρια από το θερμοευαίσθητο στέλεχος Tim9<sup>ts</sup> στα οποία δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα της Tim9, το σύμπλοκο των 70kDa εξαφανίζεται (θέση 9). 3) Τέλος, τελευταίο κινητικά εμφανίζεται το σύμπλοκο των 300kDa στο οποίο είναι γνωστό ότι ενυπάρχουν τόσο το Tim9-10 όσο και ολόκληρο το TIM22 σύμπλοκο μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης. Στην περίπτωση που το Tim9 απουσιάζει (θέση 9) το σύμπλοκο των 300kDa δεν είναι δυνατόν να σχηματιστεί. Από την άλλη μεριά, το μετάλλαγμα του καρβοξυτελικού άκρου αν και μπορεί να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια και να αλληλεπιδράσει με την Mia40, δεν μπορεί να ενσωματωθεί σε κανένα από τα άλλα δύο σύμπλοκα. Η παραπάνω ανάλυση υποδεικνύει το εξής μοντέλο για την είσοδο και ενσωμάτωση της Tim12 στα απαραίτητα σύμπλοκα μέσω των οποίων δρα. Αρχικά, η Tim12 αλληλεπιδρά με την Mia40 από την οποία και οξειδώνεται προκειμένου να πάρει την τελική ενεργή της διαμόρφωση και να είναι ικανή να ενσωματωθεί στα μετέπειτα σύμπλοκα. Στη συνέχεια, η Tim12, αλληλεπιδρώντας πιθανότατα με την Tim9 (Baud, de Marcos-Lousa et al. 2007) ενσωματώνεται αρχικά σε ένα σύμπλοκο 70kDa και στη συνέχεια στο σύμπλοκο TIM22 της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το τμήμα της Tim12 που μεσολαβεί και κατευθύνει το σχηματισμό αυτών των συμπλόκων φαίνεται να είναι το καρβοξυτελικό τμήμα της και μάλιστα μεταξύ των καταλοίπων 18 και 39 από το τέλος της πρωτεΐνης.

### **3.1.6 Το καρβοξυτελικό άκρο έχει διπλό ρόλο μεσολαβώντας για τις αλληλεπιδράσεις της Tim12 τόσο με άλλες πρωτεΐνες όσο και με λιπίδια.**

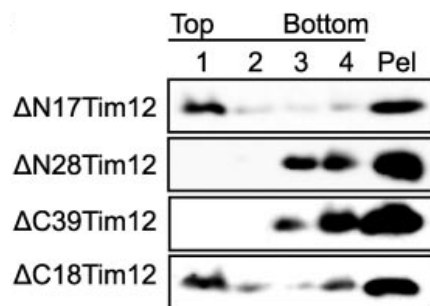
Όπως φάνηκε παραπάνω το καρβοξυτελικό άκρο της Tim12 είναι κρίσιμο για την ενσωμάτωση της πρωτεΐνης στα γνωστά σύμπλοκα. Το ερώτημα που προκύπτει είναι σε ποιες μοριακές αλληλεπιδράσεις συμμετέχει αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης και είναι σημαντικές για τον σχηματισμό των συμπλόκων αυτών; Καθώς είναι γνωστό ότι η Tim12 αλληλεπιδρά με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (εικόνα 12) αλλά και με την πρωτεΐνη Tim9, ελέγχθηκε εάν επηρεάζονται αυτές από την έλλειψη κάποιου τμήματος της Tim12. Στην εικόνα 24 φαίνεται το πείραμα επίπλευσης

μιτοπλαστών που πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση με κάθε ένα από



Εικόνα 24 Πειράμα επίπλευσης μιτοπλαστών που έχουν επωαστεί με τα μεταλλάγματα έλλειψης της Tim12 σε διάλυμα με βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης. Τα δείγματα έχουν αναλυθεί με SDS-PAGE και το εκάστοτε μετάλλαγμα Tim12 παρακολουθείται με ανοσοαποτύπωση.

τα μεταλλάγματα έλλειψης ξεχωριστά. Κάθε μετάλλαγμα, επίπλευσε τόσο με αγρίου τύπου μιτοπλάστες (-PK) όσο και με μιτοπλάστες των οποίων η επιφάνεια έχει υποστεί πρωτεόλυση από PK (+PK). Όπως φαίνεται, όλα τα μεταλλάγματα εκτός του

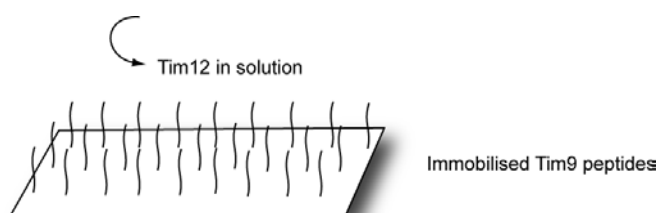


Εικόνα 25 Επίπλευση λιποσωμάτων μετά από επώαση με τα μεταλλάγματα της Tim12 σε διάλυμα με βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης. Ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση.

ΔC39Tim12 διατηρούν την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Επομένως, το καρβοξυτελικό άκρο της Tim12 πιθανώς να παίζει το ρόλο της άγκυρας με την οποία η πρωτεΐνη προσδένεται περιφερικά με τη μεμβράνη. Τι ποσοστό αυτής της αλληλεπίδρασης οφείλεται στα λιπίδια της εσωτερικής μεμβράνης; Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επίπλευσης λιποσωμάτων σύνθεσης παρόμοιας

με αυτήν της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (PC/CL = 5/1), σε διάλυμα βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης. Τα λιποσώματα πριν τοποθετηθούν στο διάλυμα σουκρόζης προκειμένου να φυγοκεντρηθούν, επωάζονται με τα μεταλλάγματα έλλειψης της tim12. Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προκειμένου να παρατηρηθεί εάν οι πρωτεΐνες επιπλέουν μαζί με τα λιποσώματα στο κορυφαίο κλάσμα του διαλύματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, οι μικρές ελλείψεις από τα άκρα της Tim12, εξακολουθούν να αλληλεπιδρούν με τα λιπίδια. Αντίθετα, τα μεταλλάγματα στα οποία λείπουν μεγάλα τμήματα από το N ή το C άκρο, χάνουν την ικανότητά τους να προσδένονται στα λιπίδια. Επομένως, φαίνεται και τα δύο άκρα της Tim12 να είναι σημαντικά για την εγγενή συνάφεια που

παρουσιάζει για τα λιπίδια. Εντούτοις, στα πλαίσια του φυσιολογικού μεμβρανικού υποστρώματος για την Tim12 που είναι η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη του αμινοτελικό άκρο δεν είναι απαραίτητο. Πώς εξηγείται ότι το ΔN28Tim12 εξακολουθεί να αλληλεπιδρά με τους μιτοπλάστες αλλά δεν μπορεί να προσδεθεί με τα λιπίδια; Η πιο προφανής εξήγηση είναι ότι το C άκρο δεν προσδένεται μόνο με τα λιπίδια αλλά και σε κάποιο πρωτεϊνικό παράγοντα που υπάρχει στους μιτοπλάστες και πιθανώς είναι εμπεδωμένος στα λιπίδια γι' αυτό και είναι ανθεκτικός στην πρωτεόλυση από την PK. Και γιατί δεν είναι αρκετή η αλληλεπίδραση του N άκρου με τα λιπίδια για να επιπλεύσει το ΔC39Tim12 με τα λιποσώματα; Πιθανώς αυτό συμβαίνει γιατί η απουσία του N άκρου επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο το

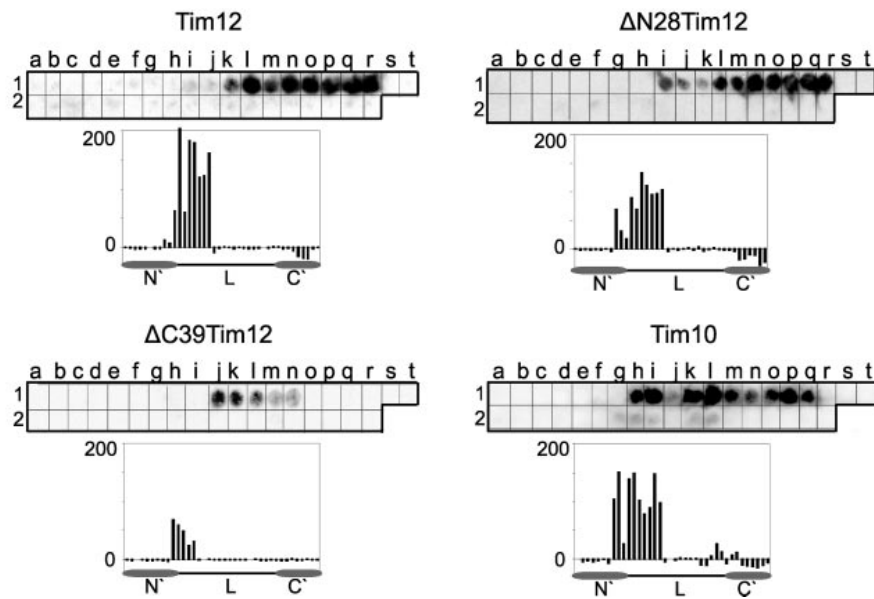


Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης των ακινητοποιημένων πεπτιδίων.

μετάλλαγμα τοποθετείται απέναντι στα μεμβράνη και ίσως τότε το C άκρο δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει εξίσου αποτελεσματικά με αυτή. Επομένως, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι πιθανώς και

τα δύο άκρα να παίζουν κάποιο ρόλο με την αλληλεπίδραση με τα λιπίδια αλλά, σίγουρα η αλληλεπίδραση με πρωτεϊνικό παράγοντα που πραγματοποιείται από το C άκρο είναι καθοριστικής σημασίας για την πρόσδεση της Tim12 περιφερικά με τη μεμβράνη.

Στο παρελθόν έχει δημοσιευτεί ότι η Tim12 αλληλεπιδρά με την Tim9 *in vitro* (Baud, de Marcos-Lousa et al. 2007). Αυτή η αλληλεπίδραση πιθανώς είναι σημαντική για την ενσωμάτωσή της στα σύμπλοκα Tim9/10 και TIM22. Επομένως, προκειμένου να μελετηθεί η συμμετοχή των διαφορετικών τμημάτων της Tim12 αλλά και των αντίστοιχων καταλοίπων της Tim9 σε αυτήν την αλληλεπίδραση, ελέγχθηκε η ικανότητα των μεταλλαγμάτων της Tim12 να αλληλεπιδρούν με ακινητοποιημένα διαδοχικά πεπτίδια της πρωτεΐνης Tim9 (εικόνα 26). Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα, είχε ακινητοποιημένα 38 διαδοχικά πεπτίδια της Tim9, κάθε ένα από τα οποία περιείχε 13 αμινοξέα και η αλληλουχία τους αλληλεπικαλύπτεται με αυτήν του προηγούμενου πεπτιδίου κατά 11 κατάλοιπα. Δηλαδή κάθε πεπτίδιο περιλαμβάνει 11 ίδια κατάλοιπα με το προηγούμενο συν δύο καινούργια. Η μεμβράνη αυτή επωάζεται με διάλυμα που περιλαμβάνει την εκάστοτε



Εικόνα 27 Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με ακινητοποιημένα πεπτίδια της πρωτεΐνης Tim9. Κάτω από κάθε εικόνα ανοσοαποτύπωσης παρατίθεται το ιστόγραμμα που προκύπτει από μέτρηση της έντασης κάθε σημείου - πεπτιδίου.

ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε συγκέντρωση 200μΜ. Η διαλυτή πρωτεΐνη Tim12 προσδένεται πάνω στα κατάλοιπα της Tim9 με τα οποία αλληλεπιδρά

. Στη συνέχεια, η μεμβράνη αυτή τοποθετείται σε συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF που προορίζεται για ανοσοαποτύπωση. Η πρωτεΐνη Tim12 που είναι προσδεμένη σε ορισμένα κατάλοιπα, μεταφέρεται πάνω στην PVDF, σε αντίθεση με τα ακινητοποιημένα πεπτίδια της Tim9. Ακολουθεί ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την Tim12, για να αποκαλυφθούν οι θέσεις στις οποίες έχει γίνει πρόσδεση. Κάτω από κάθε εικόνα ανοσοαποτύπωσης παρατίθεται ένα ιστόγραμμα. Στο ιστόγραμμα αυτό κάθε στήλη αντιστοιχεί σε ένα σημείο στην ανοσοαποτύπωση (άρα και ένα πεπτίδιο της Tim9) και είναι ανάλογο της έντασης που έχει το σημείο αυτό (και άρα της τάσης που έχει η Tim12 να αλληλεπιδρά με αυτό το πεπτίδιο). Κάτω από το ιστόγραμμα υπάρχει μία σχηματική απεικόνιση της αλληλουχίας αμινοξέων της Tim9, στην οποία κάθε σημείο αντιστοιχεί στα πεπτίδια των οποίων η ένταση έχει ποσοτικοποιηθεί από πάνω. Στην απεικόνιση αυτή, με L ονομάζεται η περιοχή ανάμεσα στα κατάλοιπα κυστεΐνης (ή Loop), με N' και C' τα αμινο- και καρβοξυτελικά άκρα αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 27, η Tim12 αλληλεπιδρά με κατάλοιπα της Tim9 που βρίσκονται στη λούπα μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης που σχηματίζουν τους ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Σε αυτά τα πεπτίδια υπάρχουν τα συντηρημένα κατάλοιπα που είναι σημαντικά για το σχηματισμό ιοντικών δεσμών που σταθεροποιούν το σύμπλοκο Tim9-10 (Vergnolle, Alcock et al. 2007; Baker, Webb et al. 2009). Πράγματι, εάν δούμε τα πεπτίδια της Tim9 που προσδένει ο κύριος πρωτεϊνικός της εταίρος, η πρωτεΐνη Tim10, θα παρατηρήσουμε

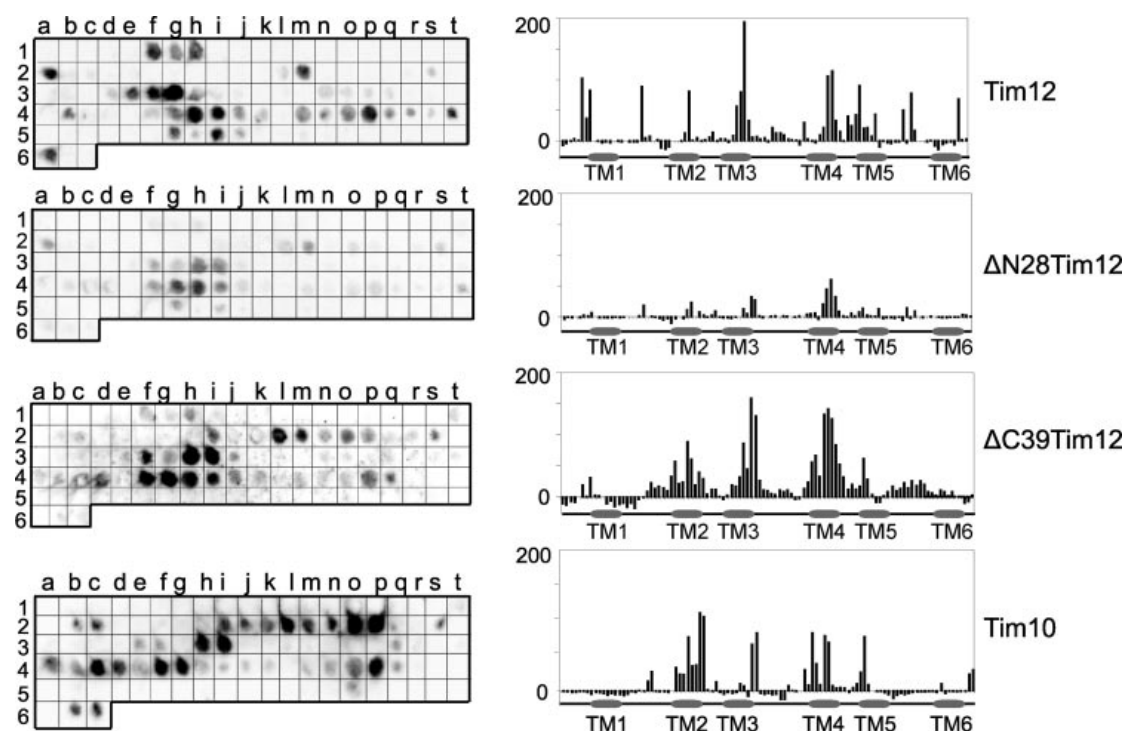
ότι πρόκειται για σχεδόν τα ίδια κατάλοιπα. Στην ίδια πειραματική διαδικασία, ελέγχθηκαν τα μεταλλάγματα της Tim12 με τις μεγαλύτερες ελλείψεις είτε από το N' είτε από το C' άκρο (ΔN28 και ΔC39 αντίστοιχα). Είναι φανερό ότι η απουσία του αμινοτελικού άκρου της Tim12 δεν επηρεάζει την πρόσδεση στην Tim9. Αντίθετα, η έλλειψη του καρβοξυτελικού άκρου, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την πρόσδεση. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το καρβοξυτελικό άκρο της Tim12 είναι σημαντικό και για την αλληλεπίδραση με την Tim9, και συγκεκριμένα με την περιοχή της Tim9 ανάμεσα στα κατάλοιπα κυστεΐνης.

Συμπερασματικά, προκύπτει ότι, το καρβοξυτελικό άκρο της Tim12 έχει διπλό ρόλο μεσολαβώντας τόσο στην αλληλεπίδραση με την Tim9 όσο και σε αυτήν με την εσωτερική μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο παίζει σημαντικό ρόλο στην ενσωμάτωση της πρωτεΐνης Tim12 στα γνωστά σύμπλοκα στα οποία συμμετέχει.

### **3.1.7 Η πρωτεΐνη Tim12 προσδένεται στα διαμεμβρανικά τμήματα του υποστρώματος AAC, μέσω του αμινοτελικού τμήματός της**

Η πρωτεΐνη Tim12 φυσιολογικά δρα στα πλαίσια του μονοπατιού εισόδου στην εσωτερική μεμβράνη μέσω της μετατοπάσης TIM22. Αυτό το μονοπάτι εισόδου χρησιμοποιείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως οι φορείς (carriers) της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι οποίες είναι υδρόφοβες και έχουν πολλά διαμεμβρανικά τμήματα. Μία τέτοια πρωτεΐνη – υπόστρωμα του μονοπατιού TIM22 είναι η πρωτεΐνη που μεταφέρει ATP από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, με ταυτόχρονη αντίστροφη μεταφορά ενός μορίου ADP (ATP/ADP Carrier ή AAC). Η Tim12 έχει δειχθεί ότι συμμετέχει σε αυτό το μονοπάτι, και ότι δρα μετά την πρόσδεση του υποστρώματος με την Tim10, ενώ έχει πραγματοποιηθεί χημική πρόσδεση (cross-linking) της Tim12 με το υπόστρωμα AAC κατά τη διάρκεια της εισόδου του στο μιτοχόνδριο (Sirrenberg, Endres et al. 1998). Το ερώτημα που τέθηκε λοιπόν είναι εάν το Tim12 προσδένει άμεσα το υπόστρωμα, δρώντας μετά την πρόσδεση του από το Tim10, ή αποτελεί ένα δομικό στοιχείο που σταθεροποιεί το σύμπλοκο που φέρει το υπόστρωμα (Tim9/10) πάνω στη μεμβράνη; Για να δοθεί απάντηση σε αυτό το ερώτημα πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα πρόσδεσης της Tim12, εκφρασμένης και απομονωμένης από βακτήρια, πάνω σε ακινητοποιημένα διαδοχικά πεπτίδια του υποστρώματος AAC (εικόνα 28). Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την διαδικασία περιέχει ακινητοποιημένα

διαδοχικά πεπτίδια μήκους 13 αμινοξέων, ενώ κάθε πεπτίδιο διαφέρει από το επόμενο του κατά 3 κατάλοιπα. Το αποτέλεσμα αυτού του πειράματος δείχνει ότι η αγρίου τύπου πρωτεΐνη προσδένεται απ'ευθείας στο υπόστρωμα AAC, δείχνοντας προτίμηση στις διαμεμβρανικές περιοχές 3, 4 και 5 (βλπ ιστόγραμμα και σχηματική απεικόνιση του μορίου της AAC δίπλα από την εικόνα της ανοσοαποτύπωσης, TM3, TM4 και TM5), με έμφαση στην TM3.



Εικόνα 28 Ανάλυση της αλληλεπίδρασης με ακινητοποιημένα πεπτίδια του υποστρώματος AAC. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη συστοιχία πεπτιδίων φαίνονται στα δεξιά κάθε ιστογράμματος. Το ιστόγραμμα που παρατίθεται δίπλα από κάθε εικόνα ανοσοαποτύπωσης προκύπτει από την ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε σημείου-πεπτιδίου στην ανοσοαποτύπωση.

Η πρωτεΐνη Tim10, προσδένεται στα διαμεμβρανικά τμήματα της AAC 2, 4 και 5 αλλά με έμφαση στο TM2. Το μετάλλαγμα ΔC39Tim12 εξακολουθεί να προσδένεται στο υπόστρωμα διατηρώντας την αλληλεπίδραση με τα TM3, 4 και 5, ενώ παράλληλα φαίνεται να προσδένει καλύτερα από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη την περιοχή TM2. Με αυτό τον τρόπο, το μετάλλαγμα αυτό μιμείται τη δράση του Tim10 πάνω στο υπόστρωμα. Από την άλλη πλευρά, το ΔN28Tim12, παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη πρόσδεση με το υπόστρωμα σε σχέση με τις άλλες πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν σε αυτήν την πειραματική διαδικασία. Συμπερασματικά, γίνεται σαφές ότι η Tim12 μπορεί να αλληλεπιδράσει απευθείας με το υπόστρωμα, και μάλιστα με τις διαμεμβρανικές περιοχές TM3, TM4 και TM5, δηλαδή σε θέσεις που

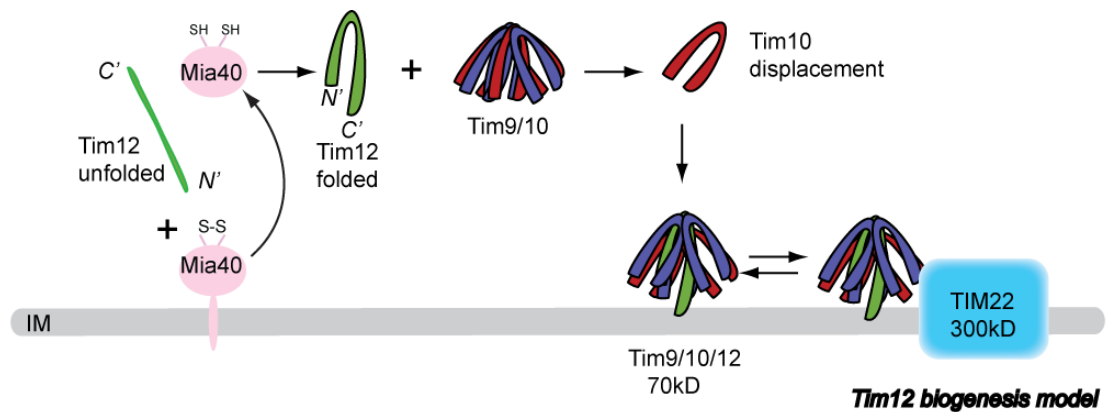


αναγνωρίζονται, έστω μερικώς, και από το Tim10. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι αυτή η αλληλεπίδραση μεσολαβείται από το αμινοτελικό άκρο της Tim12.

### 3.1.8 Συζήτηση

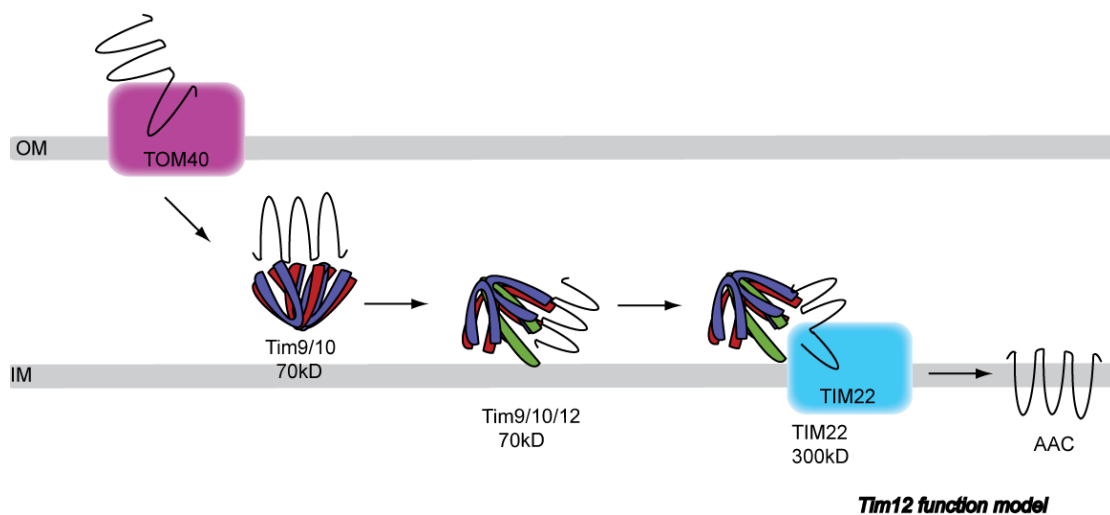
Το πρώτο σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης είναι η εγγενής συνάφεια που παρουσιάζει η Tim12 για τα λιπίδια. Η συνάφεια αυτή εξαρτάται από την παρουσία της καρδιολιπίνης πράγμα που εξειδικεύει την συνάφεια της Tim12 για την λιπίδια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, η οποία είναι εμπλουτισμένη σε καρδιολοπίνη. Η ιδιότητά της αυτή την ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των μικρών πρωτεϊνών Tim. Η περιφερική αλληλεπίδραση υπομονάδων των μετατοπασών με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη Tim44 η οποία αποτελεί υπομονάδα της μετατοπάσης TIM23, ειδικής για τη στόχευση πρόδρομων πρωτεϊνών στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Η μετατοπάση TIM23 δρα με τη βοήθεια του ATP-εξαρτώμενου κινητήρα, που αποτελείται από τη σαπερόνη του συστήματος mHsp70 (mitochondrial heat-shock protein 70kDa), το σύστημα συν-σαπερόνης (Pam18/pam16) και τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων mGrpE. Με τη βοήθεια του κινητήρα αυτού και την ενέργεια από την υδρόλυση ATP, τα πρόδρομα μόρια αποδιατάσσονται και περνούν την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προκειμένου να φτάσουν τη μήτρα (Chacinska, Koehler et al. 2009). Η Tim44, χωρίς να έχει διαμεμβρανικό τμήμα, βρίσκεται περιφερικά προσδεμένη με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη από την πλευρά της μήτρας και δρα σαν άγκυρα για τα πρωτεϊνικά συστατικά του κινητήρα. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο της Tim44, έχει σταθερή δομή και αλληλεπιδρά με μοντέλα λιπιδικών μεμβρανών που περιέχουν αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως η καρδιολιπίνη (Weiss, Orpliger et al. 1999; Marom, Safonov et al. 2009). Οι Tim12 και Tim44 είναι δομικά και λειτουργικά πολύ διαφορετικά μόρια. Εντούτοις, η κοινή τους ιδιότητα να προσδέονται περιφερικά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, υποδεικνύει μια κοινή στρατηγική για τη στρατολόγηση πρωτεϊνών στην σωστή τους θέση κοντά στην μεμβράνη όπου θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με άλλες υπομονάδες ή υποστρώματα των συμπλόκων-μετατοπασών. Η στρατηγική αυτή περιλαμβάνει αλληλεπίδραση με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια που εντοπίζονται μόνο σε αυτήν την μεμβράνη.

Η Tim12 είναι μία πρωτεΐνη απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού ενώ λειτουργικά ομόλογά της υπάρχουν και στους ανώτερους ευκαρυώτες, μέχρι τον άνθρωπο. Προκειμένου να είναι λειτουργική πρέπει να εισαχθεί στο μιτοχόνδριο, να πάρει τη σωστή διαμόρφωση, δηλαδή να αποκτήσει δύο ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και στη συνέχεια να ενσωματωθεί στα σύμπλοκα των 70kDa (Tim9/10) και των 300kDa (TIM22). Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι για την είσοδο της Tim12 στο μιτοχόνδριο, και για την οξειδωσή της προκειμένου να παγιδευτεί στο διαμεμβρανικό χώρο, σημαντικό ρόλο παίζουν τα κατάλοιπα 18-28 στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Όταν λείπουν αυτά τα κατάλοιπα η πρωτεΐνη δεν καταφέρνει να αλληλεπιδράσει με την οξειδάση Mia40 και έτσι δεν μπαίνει στο μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα τα κύτταρα που φέρουν αυτήν την μεταλλαγή να μην μπορούν να επιβιώσουν. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι τα κατάλοιπα 17-28 της Tim12 φέρουν πληροφορία για τη στόχευση της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο. Όταν τα κατάλοιπα αυτά αντικατασταθούν από τη σηματοδοτική αλληλουχία ενός άλλου μορίου που στοχεύεται επίσης στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, πλέον τα κύτταρα που φέρουν αυτήν την κατασκευή μπορούν να επιβιώσουν. Επομένως, τα κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο που φέρουν την σηματοδοτική πληροφορία δεν παίζουν κάποιον άλλο κρίσιμο ρόλο στην λειτουργία της πρωτεΐνης αφού και χωρίς αυτά η Tim12 εκπληρώνει το στόχο της. Από την άλλη, για την ενσωμάτωση της Tim12 στα υπόλοιπα σύμπλοκα, σημαντικό ρόλο παίζει το καρβοξυτελικό τμήμα της και συγκεκριμένα τα κατάλοιπα 18-39 από το τέλος του μορίου. Περαιτέρω ανάλυση των μοριακών αλληλεπιδράσεων που πιθανώς να οδηγούν την ενσωμάτωση της Tim12 στα εν λόγω σύμπλοκα έδειξε, ότι τόσο η πρόσδεση στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όσο και η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Tim9, καθοδηγούνται από το καρβοξυτελικό άκρο της. Όσον αφορά ειδικότερα την αλληλεπίδραση με την Tim9, παρατηρήθηκε ότι τα κατάλοιπα που φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την Tim12 είναι τα ίδια με αυτά προσδένονται από το Tim10. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το σύμπλοκο Tim9/10 φαίνεται να έχει το ίδιο μοριακό βάρος με το σύμπλοκο Tim9/10/12 συνηγορούν υπέρ του μοντέλου ότι ένα μόριο Tim12 ενσωματώνεται στο σύμπλοκο Tim9/10 με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου Tim10, κι έτσι προκύπτει το σύμπλοκο Tim9/10/12. Το μοντέλο που προτείνεται για τη βιογένεση της Tim12 περιγράφεται



Εικόνα 29 Μοντέλο για τη βιογένεση της πρωτεΐνης Tim12

Η ιδιότητα της Tim12 να αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με την μεμβράνη και με την πρωτεΐνη Tim9 της προσδίδει το ρόλο μιας «γέφυρας» η οποία φέρει τα διαλυτό σύμπλοκο Tim9/10 πάνω στην μεμβράνη. Η προσέγγιση του συμπλόκου Tim9/10 στη μεμβράνη είναι εξαιρετικής σημασίας όταν το σύμπλοκο αυτό είναι «φορτωμένο» με το προς μεταφορά υπόστρωμα. Το μοντέλο του μοριακού μηχανισμού δράσης της πρωτεΐνης Tim12 περιγράφεται στο σχήμα 30. Σύμφωνα με αυτό, το υπόστρωμα AAC εισέρχεται στο μιτοχόνδριο μέσω του γενικού πόρου εισόδου που σχηματίζεται από το TOM40 στην εξωτερική μεμβράνη (OM).



Εικόνα 30 Μοντέλο του μηχανισμού δράσης της Tim12 κατά τη διάρκεια εισόδου του υποστρώματος AAC.

Μόλις περάσει το γενικό πόρο εισόδου, το υπόστρωμα συλλαμβάνεται από το σύμπλοκο-σαπερόνη του διαμεμβρανικού χώρου προκειμένου να προστατευτούν τα υδρόφοβα τμήματα του από το υδατικό περιβάλλον. Ακολούθως, το AAC το υπόστρωμα μεταφέρεται στο μεμβρανοσύνδετο σύμπλοκο Tim9/10/12 και επομένως

κοντά στην μετατοπάση που θα το ενσωματώσει στην εσωτερική μεμβράνη (IM). Η αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το σύμπλοκο Tim9/10/12 μεσολαβείται από τόσο από το Tim10 (Vergnolle, Baud et al. 2005) όπως είναι ήδη γνωστό, αλλά και από το Tim12, όπως φάνηκε σε αυτήν την μελέτη. Το τμήμα της Tim12 που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα είναι το αμινοτελικό. Μάλιστα κάποιες από τις διαμεμβρανικές περιοχές του AAC, αναγνωρίζονται τόσο από την Tim10 όσο και από την Tim12. Το υπόστρωμα πρέπει να αποδοθεί στη μετατοπάση της εσωτερικής μεμβράνης TIM22 προκειμένου να ενσωματωθεί. Αυτό μπορεί να επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση ολόκληρου του Tim9/10/12, φορτωμένου με το υπόστρωμα, στο σύμπλοκο TIM22. Περαιτέρω πειράματα χρειάζονται για να προσδιοριστεί ακριβώς ποιος είναι ο ρόλος της Tim12, αλλά και των υπόλοιπων υπομονάδων του συμπλόκου των 70kDa, στην ενσωμάτωση αυτή με τη μετατοπάση TIM22, αλλά με ποιος είναι ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το υπόστρωμα μετατοπίζεται από το ένα σύμπλοκο στο άλλο.

Εν συντομία, παρατηρήθηκε ότι η υπομονάδα Tim12 αλληλεπιδρά τόσο με το υπόστρωμα, μέσω του αμινοτελικού άκρου της, όσο και με λιπίδια και πρωτεϊνικά συστατικά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της. Δεδομένου ότι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της και κατ' επέκταση την επιβίωση του οργανισμού, σε αντίθεση με το καρβοξυτελικό, προτείνεται ότι: Η ιδιότητα της Tim12 που την καθιστά απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού είναι η δράση της ως «γέφυρας» που φέρει το διαλυτό σύμπλοκο Tim9/10 κοντά στην μεμβράνη προκειμένου να περάσει το προς μεταφορά υπόστρωμα στην μεμβρανική μετατοπάση TIM22. Η πρόσδεση του υποστρώματος από την Tim12 δεν φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για το σύστημα, καθώς πιθανώς επικαλύπτεται από τη δράση της Tim10.

## 3.2 Μελέτη της σουλφυδρυλοξειδάσης Ern1 του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου

### 3.2.1 Εισαγωγή - Σκοπός

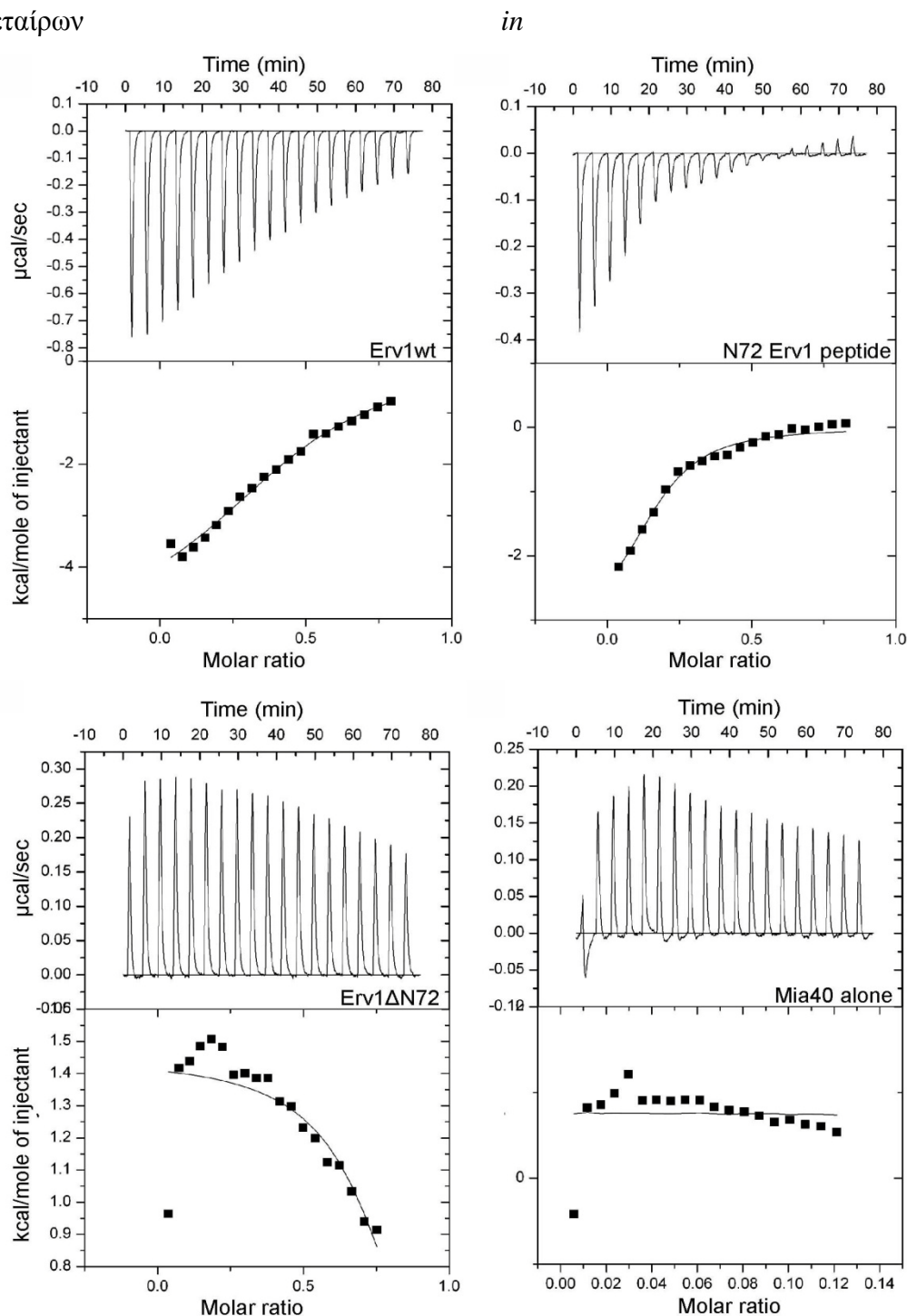
Το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία 6 χρόνια, αν και πολλά ερωτήματα μένουν ακόμη αναπάντητα. Τα βασικά συστατικά του μονοπατιού αυτού περιγράφονται αναλυτικά στην εισαγωγή της διατριβής. Συνοπτικά, γνωρίζουμε ότι η οξειδάση που είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του πρώτου δισουλφιδικού δεσμού στο ανηγμένο υπόστρωμα είναι η Mia40. Η μεταφορά ενός δισουλφιδικού δεσμού από το ενεργό κέντρο της Mia40 στο υπόστρωμα συνοδεύεται από ταυτόχρονη μεταφορά ενός ζεύγους ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα προς τη Mia40. Η αντίδραση αυτή αφήνει την οξειδάση του συστήματος σε ανηγμένη μορφή. Προκειμένου να ξαναγίνει ενεργή και ικανή να δράσει πάνω σε ένα νεοεισερχόμενο υπόστρωμα, πρέπει να ξαναοξειδωθεί. Την οξείδωση της Mia40 έχει αναλάβει ένα άλλο μόριο, η FAD-εξαρτώμενη σουλφυδρυλοξειδάση Ern1. Έτσι, το ζεύγος των ηλεκτρονίων από την ανηγμένη Mia40 περνάει στην Ern1. Τα ηλεκτρόνια από την Ern1 και συγκεκριμένα από το μόριο FAD μπορούν να μεταφερθούν είτε στο μοριακό οξυγόνο, με παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), είτε στο κυτόχρωμα c. Το κυτόχρωμα c είναι 100 φορές καλύτερος δέκτης ηλεκτρονίων από το μοριακό οξυγόνο (Farrell and Thorpe 2005). Μέσω του κυτοχρώματος c τα ηλεκτρόνια από τα υποστρώματα καταλήγουν στην αναπνευστική αλυσίδα, για να ενωθούν με τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων και πάλι το μοριακό οξυγόνο, αλλά με ταυτόχρονη παραγωγή νερού αυτή τη φορά.

Στο κομμάτι της διατριβής που ακολουθεί η μελέτη επικεντρώνεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο βασικών συστατικών του μονοπατιού οξειδωτικής αναδίπλωσης, τη Mia40 και την Ern1. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μεταφορά ενός δισουλφιδικού δεσμού από την Ern1 στην Mia40, περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ τους. Για την επίτευξη αυτού του δισουλφιδικού δεσμού, μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πρωτεϊνικών εταίρων θα πρέπει να συμβούν, ώστε τα σωστά κατάλοιπα κυστεΐνης να έρθουν σε κατάλληλη απόσταση ώστε να αλληλεπιδράσουν. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι:

1. Η ανάλυση των μοριακού μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ της Mia40 και της Ern1, σε μη ομοιοπολικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, θα εξεταστεί ποιο τμήμα της Ern1 είναι απαραίτητο για την επίτευξη αυτών των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη Mia40.
2. Η μελέτη των κυστεϊνών της Ern1 που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με τη Mia40.
3. Διερεύνηση του τρόπου ροής των ηλεκτρονίων μέσα στο μόριο της Ern1, από το ένα ζευγάρι κυστεϊνών στο άλλο, μέχρι να καταλήξουν στο μόριο FAD, και από εκεί εγκαταλείψουν την Ern1.

### 3.2.2 Μέτρηση της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης μεταξύ Erv1 και Mia40

Η πιο ακριβής μέθοδος για τη μέτρηση της συγγένειας μεταξύ δύο πρωτεϊνικών εταίρων



Εικόνα 31 Θερμοδυναμική ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Erv1 και Mia40

είναι θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry – ITC). Για τα πειράματα ITC χρησιμοποιήθηκαν: α) η αγρίου τύπου Erv1, β) το μετάλλαγμα έλλειψης ΔN72Erv1, που περιλαμβάνει μόνο τον καταλυτικό πυρήνα της

Ern1 με το ζευγάρι κυστεϊνών του ενεργού κέντρου (C130-C133), γ) πεπτίδιο N72Ern1, που περιλαμβάνει τα 72 πρώτα αμινοξέα της Ern1 μεταξύ των οποίων και το ζευγάρι «οδηγό» των κυστεϊνών (C30-C33), δ) το μετάλλαγμα ΔN290Mia40SPS, το οποίο περιλαμβάνει το συντηρημένο και καταλυτικά ενεργό κομμάτι της Mia40 στο οποίο όμως οι κυστεΐνες του ενεργού κέντρου (CPC : κυστεΐνη-προλίνη-κυστεΐνη) είναι μεταλλαγμένες σε σερίνες. Σκοπός αυτής της σειράς πειραμάτων είναι αρχικά να μετρηθεί η σταθερά διάστασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνικών εταίρων, και επομένως να προσδιοριστεί η συνάφεια της μίας για την άλλη, και στη συνέχεια να αποκαλυφθεί ποιο τμήμα της Ern1 είναι υπεύθυνο για αυτήν την συνάφεια για την Mia40. Χρησιμοποιείται το καταλυτικά ανενεργό μετάλλαγμα της Mia40, για να αποφευχθεί η δημιουργία ενός ομοιοπολικού δεσμού, η οποία θα προκαλούσε τόσο μεγάλη διαφορά στη θερμοκρασία που θα κάλυπτε τις μικρές αλλαγές που προκαλούνται από τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε βακτήρια και απομονώνονται όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. Η Mia40 τοποθετείται στη σύριγγα του θερμιδόμετρου, ενώ η Ern1 και τα μεταλλάγματά της τοποθετούνται στην κυψελίδα. Η Mia40 ενέεται μέσα στην κυψελίδα σε τακτικά χρονικά διαστήματα. Σε κάθε ένεση η θερμοκρασία του συστήματος μεταβάλλεται εξαιτίας της αντίδρασης που συμβαίνει μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Η ενέργεια που δαπανάται από το θερμιδόμετρο προκειμένου να επαναφέρει το σύστημα στην θερμοκρασία αναφοράς ανά λεπτό της αντίδρασης, καταγράφεται και αποδίδεται στην εικόνα 31. Σαν αντίδραση ελέγχου πραγματοποιείται ένεση της Mia40 μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ίδιο με αυτό στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες (50mM KpH 7.4). Στην αντίδραση αυτή μετριέται η θερμότητα που παράγεται κατά την αραίωση της Mia40 μέσα στο διάλυμα που βρίσκεται στην κυψελίδα. Το γράφημα που προκύπτει από την αντίδραση ελέγχου φαίνεται στο κάτω δεξιά πλαίσιο της εικόνας 31. Όταν στην κυψελίδα προστίθεται η αγρίου τύπου Ern1 παρατηρούμε ότι η αντίδραση προχωράει προς ισορροπία ενώ παράλληλα, η σταθερά διάστασης υπολογίζεται στα 25μM (εικόνα 31, πάνω αριστερά). Όταν χρησιμοποιείται το μετάλλαγμα έλλειψης ΔN72 Ern1 που περιλαμβάνει όλο τον καταλυτικό πυρήνα της πρωτεΐνης, ο οποίος εξακολουθεί να προσδένει FAD, η εικόνα που προκύπτει για την αντίδραση αυτή είναι ίδια με αυτήν της αντίδρασης ελέγχου (εικόνα 31 κάτω αριστερά). Δεν ανιχνεύεται παραγωγή ή κατανάλωση θερμότητας, επομένως, δεν ανιχνεύεται κάποια αντίδραση ανάμεσα σε αυτές τις δύο πρωτεΐνες. Συμπεραίνεται ότι το αμινοτελικό άκρο της Ern1 είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με τη



Mia40. Είναι και ικανό; Όταν χρησιμοποιείται το αμινοτελικό πεπτίδιο της Ern1 μόνο του, (το οποίο φέρει το ζευγάρι κυστεϊνών C30-C33), παρατηρείται ότι διατηρεί στο ακέραιο την ικανότητα να προσδένει το υπόστρωμα Mia40 (εικόνα 31, πάνω δεξιά). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η Ern1 αλληλεπιδρά με τη Mia40 και μη ομοιοπολικά, όπως αναμενόταν. Η σταθερά διάστασης της αντίδρασης είναι μετρήσιμη αλλά υψηλή αντίδραση γεγονός που υποδεικνύει ότι η αντίδραση είναι ειδική αλλά παροδική. Παράλληλα και αμινοτελικό τμήμα της Ern1 είναι αναγκαίο και ικανό για την αλληλεπίδραση με τη Mia40.

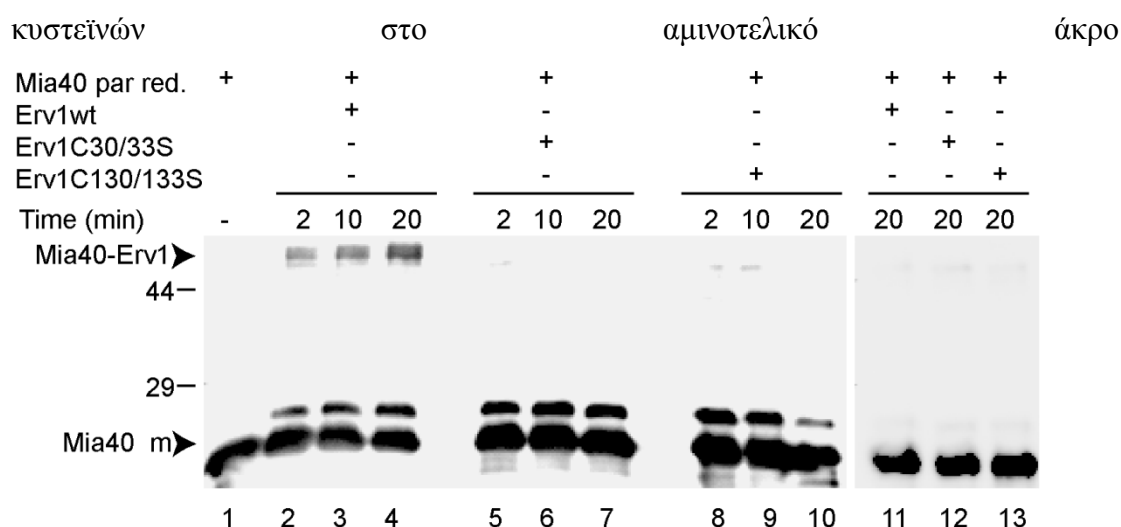
### 3.2.3 Ανάλυση του σχηματισμού μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ των Mia40 και Ern1

Η ανάλυση της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης μεταξύ Ern1 και Mia40 έδειξε ότι τα πρώτα 72 αμινοξέα της Ern1, στα οποία περιλαμβάνεται στο ζευγάρι κυστεϊνών C30-C33, είναι αναγκαία και ικανά για την πραγματοποίησή της. Το ερώτημα που προκύπτει είναι ποια κυστεϊνικά κατάλοιπα της Ern1 είναι απαραίτητα για το σχηματισμό του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ τους. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο *in vitro* όσο και *in organello*.

#### A. *In vitro*

Στα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα έλλειψης της ΔN290Mia40 που περιλαμβάνει όλο το καταλυτικό πυρήνα της πρωτεΐνης, με το ενεργό κέντρο αργίου τύπου (CPC). Το ενεργό κέντρο της Mia40 ανάγεται με επώαση με 2mM DTT για 15 λεπτά στους 30°C. Αντίθετα, η αναγωγή των δύο δομικών δισουλφιδικών δεσμών που υπάρχουν στη Mia40 απαιτεί πολύ ισχυρότερες αναγωγικές συνθήκες όπως 100mM DTT, και βράσιμο στους 95°C για 10 λεπτά (Grumbt, Stroobant et al. 2007). Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα της Ern1 και των μεταλλαγμάτων της να σχηματίζουν μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με το υπόστρωμα Mia40, επωάζεται το μερικώς ανηγμένο υπόστρωμα με ισομοριακές ποσότητες οξειδάσης για προοδευτικά αυξανόμενα χρονικά διαστήματα. Για να σταματήσει η αντίδραση μεταξύ οξειδάσης και υποστρώματος προστίθενται στην αντίδραση 20mM ενός αλκυλιωτικού παράγοντα, NEM, ο οποίος προσδένεται στις ελεύθερες κυστεΐνες των αντιδρώντων μορίων και με αυτόν τον τρόπο σταματάει η περαιτέρω αντίδραση μεταξύ τους. Μετά την προσθήκη του NEM οι αντιδράσεις αναλύονται με SDS-PAGE υπό αναγωγικές ή μη, συνθήκες. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη

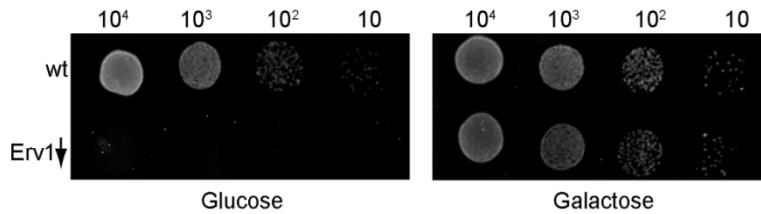
νιτροκυτταρίνης και η Mia40 παρακολουθείται με ανοσοαποτύπωση. Στην εικόνα 32 φαίνεται το αποτέλεσμα του πειράματος *in vitro*, μεταξύ της Mia40 και των Erv1 αγρίου τύπου αλλά και των μεταλλαγμάτων C30/33S (στο ζευγάρι κυστεϊνών του αμινοτελικού άκρου) και C130/133S (στο ζευγάρι κυστεϊνών του ενεργού κέντρου). Η Erv1 αγρίου τύπου δίνει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με τη Mia40 με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (εικόνα 32 θέσεις 2-4), που εμφανίζεται στα 50kDa περίπου (Mia40-Erv1). Αυτό το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο είναι ευαίσθητο σε αναγωγικό παράγοντα (β-μερκαπτοαιθανόλη) όπως φαίνεται στην εικόνα 32, θέση 11. Σε αντίθεση, το μετάλλαγμα C30/33S της Erv1 δεν είναι ικανό να σχηματίσει δισουλφιδικό δεσμό (εικόνα 32, θέσεις 5-7). Επομένως, φαίνεται το ζευγάρι κυστεϊνών



Εικόνα 32. Αλληλεπίδραση *in vitro* μεταξύ του ανηγμένου υποστρώματος Mia40, και της Erv1 αγρίου τύπου ή των μεταλλαγμάτων της

φαίνεται να είναι σημαντικό για την πρόσδεση με το υπόστρωμα. Από την άλλη, το μετάλλαγμα των κυστεϊνών του ενεργού κέντρου, Erv1 C130/133S, παρότι περιέχει τις κυστεΐνες του αμινοτελικού άκρου, δεν διατηρεί την ικανότητα να σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με τη Mia40, *in vitro*. Άρα και το ζευγάρι του ενεργού κέντρου είναι σημαντικό για το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με το υπόστρωμα *in vitro*. Στα ίδια ακριβώς αποτελέσματα καταλήξαμε όταν για την μερική αναγωγή του υποστρώματος Mia40, χρησιμοποιήσαμε 1mM από έναν άλλο αναγωγικό παράγοντα που δεν είναι ο ίδιος υπόστρωμα για την Erv1, το TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride).

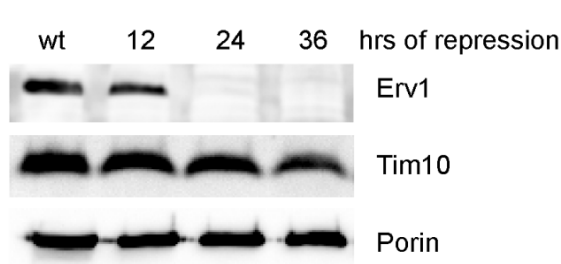
## B. In organello



Εικόνα 33 Έλεγχος της ανάπτυξης του στελέχους σακχαρομύκητα στο οποίο το ERV1 βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή Gal1-10. Ο αριθμός των κυττάρων που έχουν ακινητοποιηθεί πάνω στο στερεό θρεπτικό μέσο φαίνονται στο πάνω μέρος της εικόνας. Το στέλεχος αγρίου τύπου (wt) μεγαλώνει εξίσου καλά τόσο παρουσία γλυκόζης, όσο και παρουσία γαλακτόζης, σε αντίθεση με το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος (Erv1↓) το οποίο μεγαλώνει μόνο παρουσία γαλακτόζης.

Το πείραμα *in vitro* δείχνει ότι και τα δύο ζευγάρια κυστεϊνών της Erv1 είναι σημαντικά για την αντίδραση με τη Mia40, εντούτοις δεν βοήθησε να ξεκαθαριστεί ο ρόλος κάθε ζευγαριού σε αυτήν

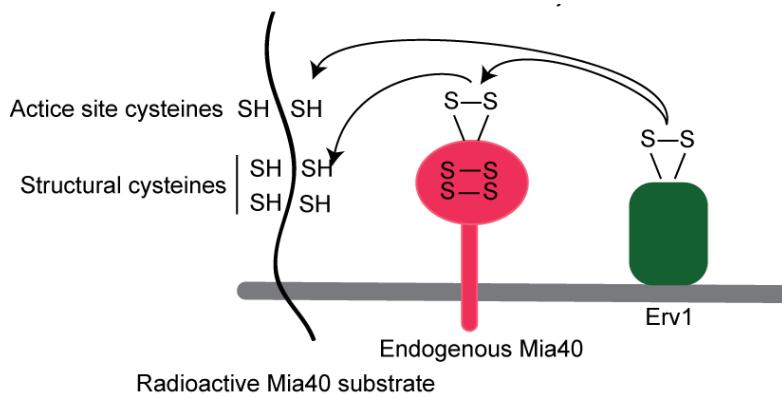
την αλληλεπίδραση. Προκειμένου να μελετηθεί η αντίδραση αυτή στο φυσιολογικό της περιβάλλον, το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, κατασκευάστη-κε ένα στέλεχος σακχαρομύκη-τα στο οποίο το γονίδιο *ERV1* βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός επαγόμενου υποκινητή, του Gal1-10. Το στέλεχος αυτό (στο εξής θα ονομάζεται GalErv1) μεγαλώνει φυσιολογικά παρουσία γαλακτόζης στο θρεπτικό μέσο, καθώς το *ERV1* εκφράζεται συστατικά. Εντούτοις, η γλυκόζη επάγει καταστολή του γονιδίου Erv1 ενώ, τα κύτταρα σταματούν να διπλασιάζονται μετά από 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη (εικόνα 33). Κύτταρα του GalErv1 στελέχους αφέθηκαν



Εικόνα 33 Έλεγχος της έκφρασης της Erv1 στο στέλεχος GalErv1. Απομονωμένα μιτοχόνδρια από κύτταρα σακχαρομύκητα αγρίου τύπου (wt) και GalErv1 μετά από 12, 24 και 36 ώρες καταστολή (hrs of repression) σε γλυκόζη αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοοτύπωση.

να μεγαλώσουν παρουσία γλυκόζης, ώστε να κατασταλεί το *ERV1*, για 12, 24 ή 36 ώρες. Στη συνέχεια, μιτοχόνδρια απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοοτύπωση προκειμένου να παρακολουθήσουμε την καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης Erv1 (εικόνα 34). Όπως φαίνεται ήδη από

τις 24 ώρες στη γλυκόζη, τα επίπεδα της Erv1 δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμα από το αντίσωμα. Επιπλέον φαίνεται ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Tim10, η οποία αποτελεί υπόστρωμα του μονοπατιού της Mia40, μειώνονται με την πάροδο του χρόνου. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει την οξειδωτική κατάσταση της οξειδάσης του συστήματος, Mia40, η οποία, απουσία της Erv1, δεν βρίσκεται σε καταλυτικά ενεργή



μορφή ώστε να «συλλάβει» αποτελεσματικά τα υποστρώματα. Αντίθετα, η πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, πορίνη

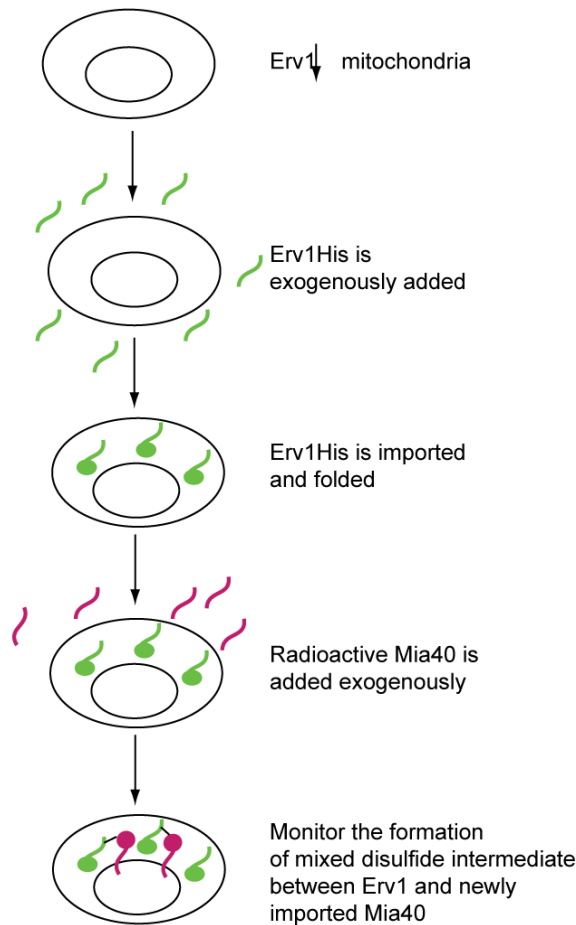
Εικόνα 34 Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της νεοεισερχόμενης Mia40, με την ενδογενή Mia40 και την Erv1

(porin), της οποίας η στόχευση δεν πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού

της Mia40, δεν επηρεάζεται από την καταστολή της Erv1. Επομένως, η αλλαγή στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης που παρατηρείται, αφορά ειδικά τα υποστρώματα του μονοπατιού οξειδωτικής αναδίπλωσης και παρατηρείται μόνο μετά από παρατεταμένη καταστολή του γονιδίου της Erv1, για χρονικά διαστήματα από 36 ώρες και πάνω.

Όπως προαναφέρθηκε, η Mia40 αποτελεί υπόστρωμα για το μονοπάτι της οξειδωτικής αναδίπλωσης, παρότι εισέρχεται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω της μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης TIM23. Συγκεκριμένα, κατά την είσοδο της Mia40 στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα, το πρόδρομο μόριο αρχικά εμπεδώνεται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω TIM23. Στην συνέχεια και προκειμένου να αναδιπλωθεί πρέπει να εισαχθούν δύο δισουλφιδικοί δεσμοί στις δομικές κυστεΐνες του μορίου που σχηματίζουν το διπλό μοτίβο CX9C (C307-C340 και C317-C330). Αυτή η οξείδωση πραγματοποιείται από την ενδογενή Mia40. Τέλος, και αφού το πρόδρομο μόριο έχει αναδιπλωθεί πρέπει να οξειδωθεί στο ενεργό κέντρο του, δηλαδή να εισαχθεί ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεϊνών του μοτίβου CPC (C296-C298) προκειμένου να καταστεί τα μόριο καταλυτικά ενεργό. Η σχέση μεταξύ του νεοεισαγμένου πρόδρομου μορίου Mia40, της ήδη υπάρχουσας μέσα στο μιτοχόνδριο ενδογενούς Mia40 και της Erv1, περιγράφεται στο σχήμα της εικόνας 35. Συνοπτικά βλέπουμε ότι η ενδογενής Mia40 εφόσον είναι οξειδωμένη και άρα καταλυτικά ενεργή, οξειδώνει τις δομικές κυστεΐνες του πρόδρομου μορίου Mia40, το οποίο έχει ήδη εισαχθεί στην εσωτερική μεμβράνη. Στη συνέχεια, και προκειμένου να επανέλθει στην καταλυτικά ενεργή μορφή, η ενδογενής Mia40 οξειδώνεται στο ενεργό κέντρο της από την Erv1. Παράλληλα, το νέο-εισαχθέν μόριο Mia40, επίσης οξειδώνεται στο ενεργό κέντρο του μέσω της οξειδάσης Erv1. Όλες οι

οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που περιγράφηκαν πραγματοποιούνται μέσω σχηματισμού μικτών δισουλφιδικών ενδιάμεσων μεταξύ των αντιδρώντων μορίων.

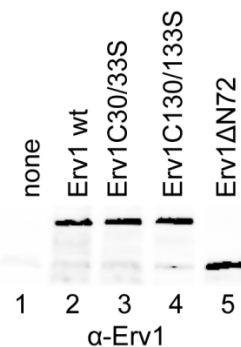


Εικόνα 35 Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας συμπλήρωσης των μιτοχονδρίων GalErv1 με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Erv1 αγρίου τύπου ή μεταλλαγμάτων, πριν την είσοδο του ραδιενεργού υποστρώματος Mia40SPC

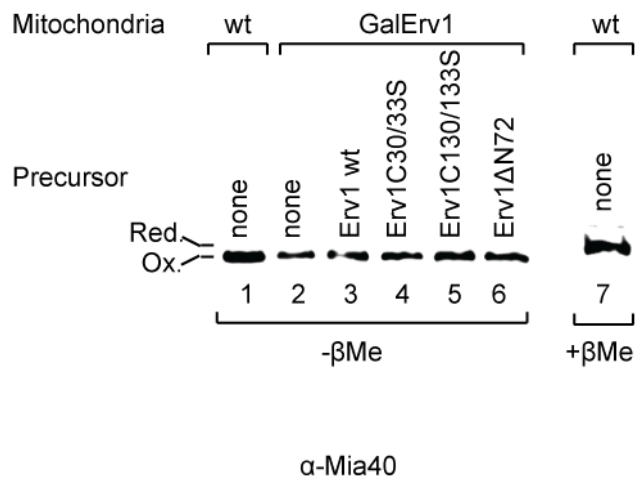
Η πειραματική διαδικασία που σχεδιάστηκε περιγράφεται περιληπτικά στο σχήμα της εικόνας 36.

Συνοπτικά, απομονωμένα μιτοχόνδρια χωρίς Erv1, επωάζονται με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Erv1His, εκφρασμένη και απομονωμένη από βακτήρια. Η αποδιαταγμένη πρωτεΐνη Erv1His εισέρχεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και αναδιπλώνεται. Κατόπιν, τα μιτοχόνδρια αυτά, «φορτωμένα» με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση, και επαναχρησιμοποιούνται σε πείραμα εισόδου ραδιενεργού υποστρώματος Mia40. Η

Προκειμένου να επιτευχθεί η ανασύσταση της αντίδρασης μεταξύ της Erv1 και του υποστρώματός της, Mia40, στο πιο φυσιολογικό περιβάλλον του διαμεμβρανικού χώρου των μιτοχονδρίων, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια από το στέλεχος GalErv1, μετά από 24 ώρες καταστολή σε γλυκόζη. Αυτά τα μιτοχόνδρια δεν περιείχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα πρωτεΐνης Erv1, εντούτοις, περιλαμβάνουν σχεδόν ανεπηρέαστα τα υπόλοιπα συστατικά του μονοπατιού. Έτσι, τα αποτελέσματα της ανάλυσης *in organello* οφείλονται αποκλειστικά στην έλλειψη της Erv1 κι όχι στην δευτερογενή έλλειψη κάποιου παράγοντα, η στόχευση του οποίου εξαρτάται από την Erv1.



Εικόνα 36 Πείραμα εισόδου απομονωμένης πρωτεΐνης Erv1His αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένης σε GalErv1 μιτοχόνδρια.



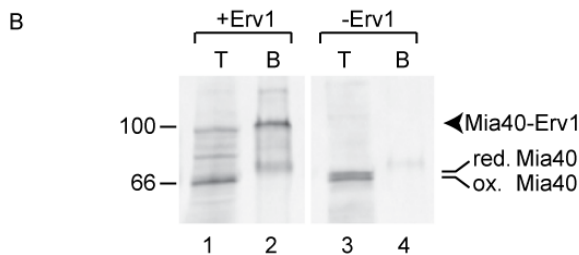
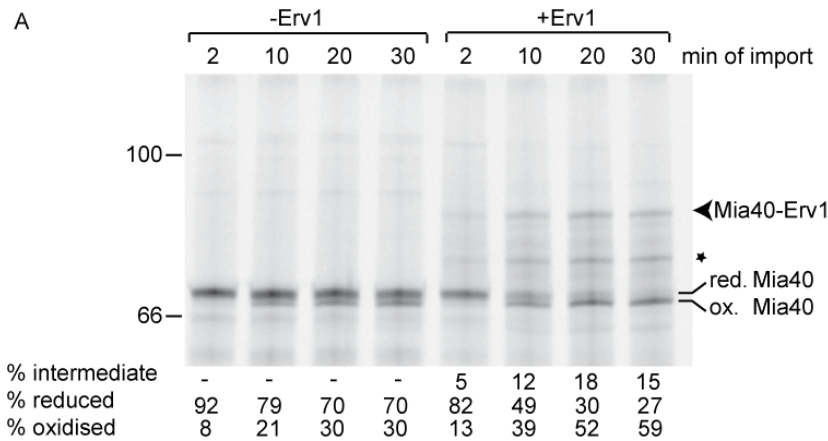
Εικόνα 37. Έλεγχος της οξειδωτικής κατάστασης της ενδογενούς Mia40. Ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με α-Mia40

ραδιενεργή Mia40 εισέρχεται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, μέσω της μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης TIM23, και εμποδώνεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Εκεί αλληλεπιδρά με την ήδη υπάρχουσα ενδογενή Mia40, και αναδιπλώνεται (οξειδώνεται). Τέλος, για να αποκτήσει την καταλυτικά ενεργή μορφή της,

αλληλεπιδρά με την Erv1 που έχει εισαχθεί προηγουμένως στα GalErv1 μιτοχόνδρια, μέσω σχηματισμού μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου. Αυτό το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο παρακολουθείται με ανάλυση σε SDS-PAGE υπό μη αναγωγικές συνθήκες και αυτοραδιογραφία.

Στα πλαίσια ελέγχου της πειραματικής διαδικασίας που σχεδιάστηκε πρέπει να ταυτοποιηθεί αφ' ενός εάν η ανασυνδυασμένη Erv1His και τα μεταλλάγματά της είναι ικανά να εισέρχονται στα Gal. Erv1 μιτοχόνδρια, και αφ' ετέρου, ποια είναι η οξειδωτική κατάσταση της ενδογενούς Mia40 στα GalErv1 μιτοχόνδρια, αφού στη δράση αυτής οφείλεται η εισαγωγή των δομικών δισουλφιδικών δεσμών στο ραδιενεργό υπόστρωμα. Έτσι, απομονωμένα μιτοχόνδρια GalErv1 επώαστηκαν με απομονωμένη πρωτεΐνη Erv1His αγρίου τύπου, ή τα μεταλλάγματά της C30/33S, C130/133S και ΔN72. Στη συνέχεια τα δείγματα χωρίστηκαν στη μέση και τα μισά αναλύθηκαν με SDS-PAGE υπό αναγωγικές συνθήκες, και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την Erv1 (εικόνα 37), ενώ τα άλλα μισά αναλύθηκαν σε SDS-PAGE υπό μη αναγωγικές συνθήκες και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την Mia40 (εικόνα 38). Όπως φαίνεται, δεν ανιχνεύεται καθόλου ενδογενής Erv1 στα GalErv1 μιτοχόνδρια (θέση 1), ενώ όλα τα μόρια της Erv1 που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να εισαχθούν εξίσου αποτελεσματικά στα GalErv1 μιτοχόνδρια (εικόνα 37 θέσεις 2-5). Στην εικόνα 38 στις θέσεις 1 και 7, έχουν αναλυθεί μιτοχόνδρια αγρίου τύπου (wt) απουσία ή παρουσία αναγωγικού παράγοντα (β-μερκαπτοαιθανόλης) αντίστοιχα στο ίδιο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, προκειμένου να υπάρχει σύγκριση για το που ακριβώς μεταναστεύει η ανηγμένη (red.) σε σχέση με την οξειδωμένη (ox.) ενδογενή

Mia40 (υπενθυμίζεται ότι η διαφορά στον τρόπο μετανάστευσης σε ανάλυση SDS-PAGE, προκαλείται από τους δισουλφιδικούς δεσμούς στο διπλό μοτίβο CX9C). Στις θέσεις 2 έως 6, έχουν φορτωθεί τα δείγματα της εικόνας 37, με GalErv1 μιτοχόνδρια στα οποία έχουν εισαχθεί ή όχι τα διάφορα Erv1 μόρια (precursor). Όπως φαίνεται, η ενδογενής Mia40 παραμένει οξειδωμένη στο διπλό μοτίβο CX9C, ακόμη και απουσία της Erv1 (θέση 2), ή παρουσία όλων των μορίων ανασυνδυασμένης Erv1. Αυτό



Εικόνα 38 Πειράματα εισόδου ραδιενεργής Mia40SPC σε GalErv1 μιτοχόνδρια τα οποία έχουν συμπληρωθεί με πρωτεΐνη Erv1His (+Erv1) ή όχι (-Erv1). A. Τα δείγματα μετά την αντίδραση εισόδου αναλύονται σε SDS-PAGE υπό μη αναγωγικές συνθήκες και αυτοραδιογραφία. Μετά από ποσοτικοποίηση των ζωνών που αντιπροσωπεύουν το ανηγμένο (reduced) ή οξειδωμένο (oxidized) μονομερές Mia40 και το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ Mia40-Erv1 (intermediate), υπολογίζεται το ποσοστό κάθε είδους σε σχέση με τη συνολική εισαγμένη πρωτεΐνη. Τα ποσοστά παρουσιάζονται κάτω από την εικόνα της αυτοραδιογραφίας. B. Μετά από πείραμα εισόδου, τα μιτοχόνδρια διαλυτοποιούνται υπό αποδιατακτικές, μη αναγωγικές συνθήκες και επωάζονται με σφαιρίδια νικελίου. Η πρωτεΐνη Erv1 λόγω του επιτόπου 6 ιστιδινών που φέρει, προσδένεται στα σφαιρίδια και μαζί με αυτή προσδένεται και κατακρημνίζεται όποια πρωτεΐνη είναι ομοιοπολικά προσδεμένη μαζί της. Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. Το υλικό που κατακρημνίστηκε (B:Bound) βρίσκεται στις θέσεις 2 και 4, ενώ στις θέσεις 1 και 3, βρίσκεται το 50% του συνολικού υλικού (T:Total) που χρησιμοποιήθηκε για την κατακρήμνιση.

μπορεί να φαίνεται σε αντίθεση με τα όσα δημοσιεύτηκαν από τους (Mesecke, Terziyska et al. 2005) όπου απουσία Erv1 η Mia40 βρισκόταν στο μεγαλύτερο ποσοστό ανηγμένη.

Στην πραγματικότητα, όμως, δεν είναι,

καθώς σε εκείνη την δημοσίευση τα κύτταρα παρέμειναν 48 ώρες χωρίς την παραγωγή Erv1 πριν την απομόνωση των μιτοχονδρίων, σε αντίθεση με τις 24 ώρες που έμειναν

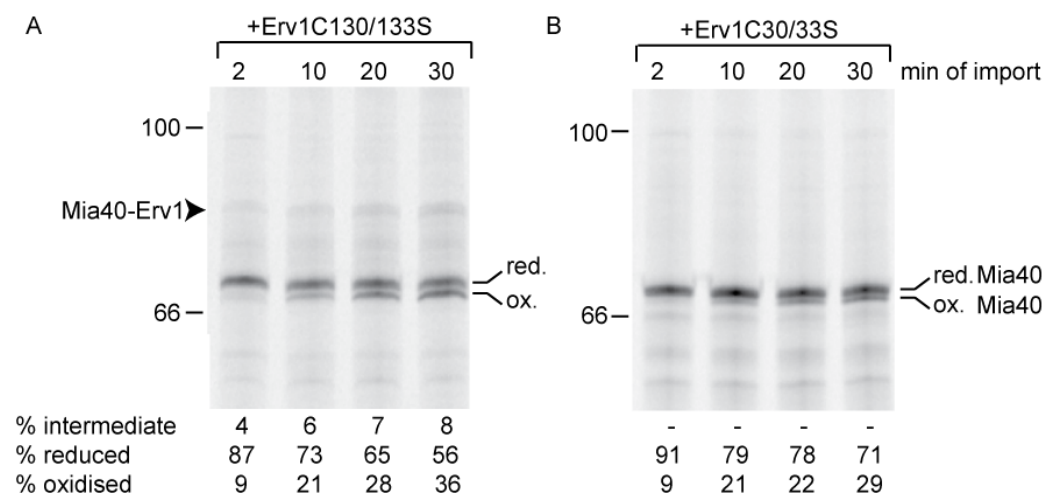
στη γλυκόζη στη δική μας περίπτωση. Επομένως, η απουσία της Erv1 δεν έχει επηρεάσει σε τόσο δραματικό βαθμό τα μιτοχόνδρια και τα υπόλοιπα συστατικά του μονοπατιού στο οποίο συμμετέχει.

Στα πειράματα *in organello* χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα Mia40 SPC. Το μετάλλαγμα αυτό διατηρεί την ενεργή δεύτερη κυστεΐνη του μοτίβου CPC, ενώ η μεταλλαγή της πρώτης βοηθάει στη σταθεροποίηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου, όπως έχει δημοσιευτεί (Banci, Bertini et al. 2009; Terziyska, Grumbt et al. 2009). Στο πείραμα που ακολουθεί η ραδιενεργή πρωτεΐνη Mia40SPC εισάγεται σε GalErv1 μιτοχόνδρια, τα οποία είτε έχουν επώαστεί με ανασυνδυασμένη Erv1His (+Erv1) είτε όχι (-Erv1) για προοδευτικά αυξανόμενα χρονικά διαστήματα (2, 10, 20 και 30 λεπτά). Η αντίδραση εισόδου σταματάει με την προσθήκη 20mM NEM. Ακολούθως, τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία, στην εικόνα 39. Το μονομερές της Mia40 μπορεί να βρίσκεται σε δύο μορφές, την ανηγμένη (red. Mia40) στην οποία οι δομικές κυστεΐνες δεν βρίσκονται σε δισουλφιδικούς δεσμούς, και την οξειδωμένη (ox. Mia40), στην οποία έχουν σχηματιστεί οι δομικοί ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί. Οι δύο αυτές οξειδωτικές καταστάσεις της Mia40 ξεχωρίζουν σε SDS-PAGE ανάλυση, καθώς η ανηγμένη μεταναστεύει λίγο πιο αργά στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης απ' ότι η οξειδωμένη. Το ραδιενεργό πρόδρομο μόριο Mia40, που παράγεται στο σύστημα *in vitro* μεταγραφής και μετάφρασης βρίσκεται ήδη σε ανηγμένη μορφή, προκειμένου να είναι ικανό να εισέλθει στο μιτοχόνδριο. Όπως φαίνεται, μετά από 2 λεπτά επώασής του με τα μιτοχόνδρια, σχεδόν όλη η ποσότητα που έχει μπει βρίσκεται ακόμη σε ανηγμένη ακόμη. Ήδη από τα δέκα λεπτά εισόδου, αρχίζει να εμφανίζεται η οξειδωμένη μορφή, σε ποσοστό περίπου 20%. Το ποσοστό της οξειδωμένης μορφής, ακόμη και μετά από 30 λεπτά δεν αυξάνεται πάνω από 30% της συνολικής εισαγμένης πρωτεΐνης. Αντίθετα, όταν η ραδιενεργή πρωτεΐνη εισάγεται σε μιτοχόνδρια τα οποία έχουν συμπληρωθεί με πρωτεΐνη Erv1His, παρατηρούνται τα εξής: A) Μετά από ήδη 2 λεπτά επώασης εμφανίζεται μία νέα ραδιενεργή ζώνη, που έχει μέγεθος περίπου 80kDa (εικόνα 39A). Η ζώνη αυτή αυξάνεται σε ένταση καθώς αυξάνεται ο χρόνος επώασης με τα μιτοχόνδρια και είναι ευαίσθητη σε επίδραση αναγωγικού παράγοντα. Αυτή η ραδιενεργή ζώνη μπορεί να κατακρημνιστεί πάνω σε σφαιρίδια νικελίου μαζί με την Erv1His, όπως φαίνεται στην εικόνα 39B (θέσεις 1 και 2), επομένως αντιπροσωπεύει το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ Erv1 και Mia40. B) Όσον αφορά το μονομερές της Mia40 φαίνεται ότι ήδη από τα 20 λεπτά η οξειδωμένη μορφή υπερτερεί, ενώ στα 30 λεπτά η οξειδωμένη μορφή είναι υπερδιπλάσια σε ποσότητα από την ανηγμένη. Συμπερασματικά, η πειραματική διαδικασία αυτή επιτρέπει α) την παρακολούθηση του σχηματισμού μικτού



δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ Erv1 και Mia40, και β) μελέτη της οξειδωτικής κατάστασης της νεοεισερχόμενης Mia40 και επομένως την ενεργότητα της ενδογενούς Mia40 πάνω στο νεοεισερχόμενο υπόστρωμα. Δεδομένου ότι η ενδογενής Mia40 είναι οξειδωμένη σε όλες τις περιπτώσεις, η διαφοροποίηση που παρατηρείται στην οξείδωση του ραδιενεργού υποστρώματος, αντικατοπτρίζει τις διαφορές στην οξειδωτική κατάσταση του ενεργού κέντρου της ενδογενούς Mia40, η οποία ρυθμίζεται από το εισαγμένο μόριο Erv1.

Τι γίνεται στην περίπτωση που τα GalErv1 μιτοχόνδρια έχουν «φορτωθεί» με μεταλλάγματα της Erv1 στις κυστεΐνες είτε του αμινοτελικού άκρου είτε του ενεργού κέντρου; Το πείραμα παρατίθεται στην εικόνα 40. Όπως φαίνεται, όταν οι κυστεΐνες του ενεργού κέντρου της Erv1 (Erv1C130/133S) είναι μεταλλαγμένες σε σερίνες (εικόνα 40A), το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με τη ραδιενεργή Mia40 SPC,



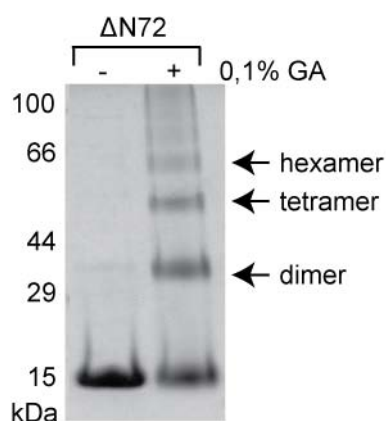
Εικόνα 40 Αλληλεπίδραση ραδιενεργού υποστρώματος Mia40SPC με προ-εισαγμένα μεταλλάγματα Erv1 σε GalErv1 μιτοχόνδρια. Πείραμα εισόδου ραδιενεργής Mia40SPC σε απομονωμένα GalErv1 μιτοχόνδρια στα οποία έχουν προεισαχθεί Α. το μετάλλαγμα του ενεργού κέντρου Erv1C130/133S ή Β) το μετάλλαγμα του αμινοτελικού άκρου Erv1C30/33S. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε SDS-PAGE υπό μη αναγωγικές συνθήκες και αυτοραδιογραφία

εξακολουθεί να σχηματίζεται, αν και η έντασή του αντιστοιχεί στο 50% του ενδιάμεσου μεταξύ της αγρίου τύπου Erv1 με το ραδιενεργό υπόστρωμα (εικόνα 39A). Από την άλλη, όταν τα μιτοχόνδρια έχουν συμπληρωθεί με το μετάλλαγμα του αμινοτελικού άκρου Erv1C30/33S, η ζώνη του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου δεν εμφανίζεται καθόλου (εικόνα 40B). Τέλος, κανένα από τα δύο μεταλλάγματα δεν μπορεί να προκαλέσει ανασύσταση της οξείδωσης της ραδιενεργής Mia40 SPC, όπως γίνεται από την αγρίου τύπου Erv1 (εικόνα 39A). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι το ζευγάρι κυστεϊνών στο αμινοτελικό άκρο της Erv1 είναι απολύτως απαραίτητο

για το σχηματισμό μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με τη Mia40. Παράλληλα, γίνεται σαφές ότι το ενεργό κέντρο της Erv1 είναι επίσης σημαντικό για την αλληλεπίδραση με το νεοεισαχθέν υπόστρωμα, καθώς μεταλλαγή του οδηγεί σε μείωση της ποσότητας του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου, και αδυναμία ολοκλήρωσης της αντίδρασης οξειδωσης του διπλού μοτίβου CX9C της Mia40 SPC.

### 3.2.4 Η οξείδωση της Mia40 από την Erv1 μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαμοριακής επικοινωνίας μεταξύ δύο μορίων Erv1

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση της Erv2 από τους Gross et al., το 2002, έδειξε ότι πιθανώς το ένζυμο αυτό να δρα ως διμερές. Το διμερές αυτό αποτελείται από δύο μονομερή σε αντιπαράλληλη διάταξη, έτσι ώστε το αμινοτελικό άκρο του ενός να βρίσκεται σε γειτνίαση με το ενεργό κέντρο του άλλου. Παράλληλα, από το 2000 το



Εικόνα 39 Χημική πρόσδεση μέσω GA της πρωτεΐνης ΔN72Erv1 *in vitro*. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε SDS-PAGE + β-μερκαπτοαιθανόλη και χρώση με Coomassie Brilliant Blue

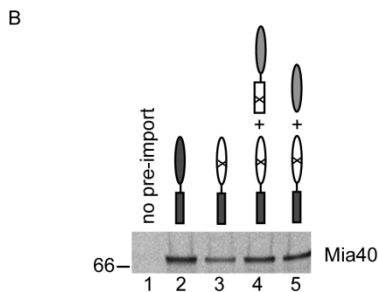
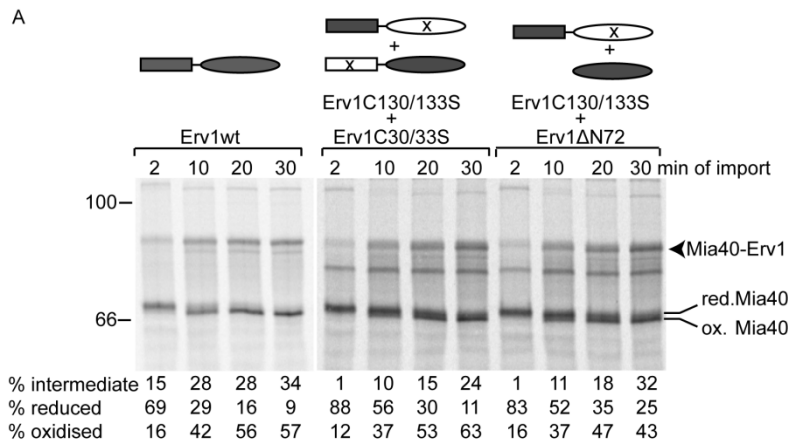
εργαστήριο του Thomas Lisowski, έδειξε ότι η Erv1 του *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να διμερίζεται *in vitro* μέσω της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών, για τους οποίους υπεύθυνο είναι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και επομένως οι κυστεΐνες C30 και C33 (Lee, Hofhaus et al. 2000; Hofhaus, Lee et al. 2003). Μέχρι στιγμής όμως δεν γνωρίζουμε την ολιγομερική κατάσταση της Erv1 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και απουσία των δισουλφιδικών δεσμών. Προκειμένου, να ελεγχθεί

αυτή η κατάσταση της πρωτεΐνης *in vitro*, πραγματοποιήθηκε πείραμα χημικής πρόσδεσης (crosslinking). Ο χημικός προσδέτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η γλουταραλδεΐδη (GA). Η

πρόσδεση μέσω GA δεν αντιστρέφεται από αναγωγικό παράγοντα. Για το *in vitro* πείραμα χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα ΔN72 Erv1 από το οποίο λείπει ολόκληρο το αμινοτελικό τμήμα και δεν έχει τη δυνατότητα διμερισμού μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Σκοπός είναι να μελετηθεί η ικανότητα της Erv1 να ολιγομερίζεται υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 41 το μετάλλαγμα ΔN72Erv1 σχηματίζει κυρίως διμερή αλλά και μεγαλύτερα ολιγομερικά σύμπλοκα (τετραμερή ή εξαμερή) σε μικρότερο βαθμό. Ο διμερισμός της Erv1 *in vitro* επομένως είναι γεγονός και οφείλεται στο καρβοξυτελικό καταλυτικό τμήμα της πρωτεΐνης. Εκτός από χημική

πρόσδεση, το διμερές ΔN72Erv1 έχει ταυτοποιηθεί και αναλυθεί και με φασματομετρία μάζας, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται η ανάλυση του αμινοτελικού πεπτιδίου της Erv1

(Aivaliotis et al., in preparation).



Εικόνα 40 Διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών μορίων Erv1 *in organello* συμπληρώνει το σχηματισμό μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου με το ραδιενεργό υπόστρωμα Mai40SPC, καθώς και την οξειδωσή του στο μοτίβο CX9C. Πιο αναλυτικά η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στο κείμενο.

οποίο διαθέτει το ζευγάρι κυστεϊνών του αμινοτελικού άκρου είναι ικανό να δώσει περίπου το 50% του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου που προκύπτει μεταξύ της Erv1 αγρίου τύπου και της Mia40. Παράλληλα, η αντίδραση οξειδωσης της νεοεισερχόμενης ραδιενεργής Mia40 στο μοτίβο CX9C, δεν φαίνεται να συμπληρώνεται από κανένα από τα δύο μεταλλάγματα. Τι θα γίνει όμως εάν συνδυαστούν τα δύο διαφορετικά μεταλλάγματα μέσα στα GalErv1 μιτοχόνδρια; Εάν η Erv1 δρα ως διμερές όπως η Erv2, θα περίμενε κανείς ότι ο συνδυασμός των δύο μεταλλαγμάτων θα βοηθήσει τη ροή των ηλεκτρονίων από το ζεύγος του αμινοτελικού άκρου του ενός (C30-C33) στο ενεργό κέντρο του άλλου (C130-C133), και από κει στους επόμενους αποδέκτες. Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πείραμα. Απομονωμένα μιτοχόνδρια GalErv1 συμπληρώθηκαν με είτε Erv1 αγρίου τύπου (εικόνα 42A, θέσεις 1-4 από αριστερά)

Από τα δεδομένα έως τώρα, φάνηκε η τάση της Erv1 να σχηματίζει διμερή, εντούτοις δεν είναι γνωστό εάν ο διμερισμός αυτός παίζει κάποιο λειτουργικό ρόλο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 40, το μετάλλαγμα Erv1C30/33S, είναι εντελώς ανενεργό στο σχηματισμό

δισουλφιδικού δεσμού

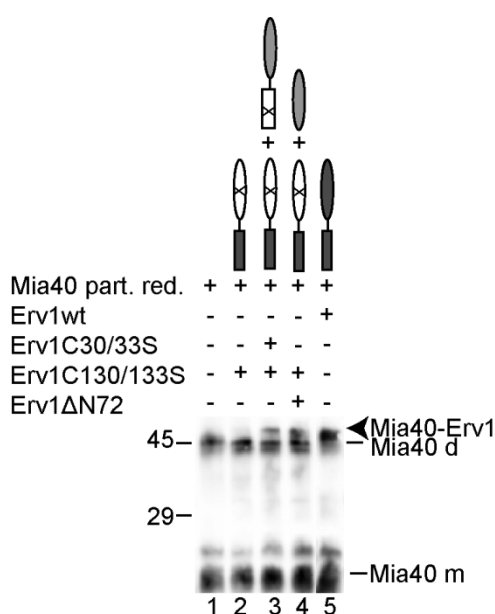
με τη Mia40, ενώ το

μετάλλαγμα

Erv1C130/133S, το

είτε με συνδυασμούς του μεταλλάγματος C130/133S με δύο διαφορετικά μεταλλάγματα. Στους συνδυασμούς αυτούς πάντα συγκρίνεται ένα μετάλλαγμα με λειτουργικό το αμινοτελικό άκρο (το Ern1C130/133S) με ένα μετάλλαγμα με λειτουργικό ενεργό κέντρο (είτε το Ern1C30/33S, θέσεις 5-8, είτε το Ern1ΔN72, θέσεις 9-12). Τα μεταλλάγματα που χρησιμοποιούνται αναπαρίστανται σχηματικά πάνω από τις αντίστοιχες θέσεις. Τα λειτουργικά τμήματά τους υποδηλώνονται με γκρι χρωματισμό, ενώ τα μη λειτουργικά, είναι κενά χρώματος και περιέχουν ένα x. Τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν ξανά με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα εισόδου ραδιενεργής Mia40SPC, σε προοδευτικά αυξανόμενα χρονικά διαστήματα (2, 10, 20 και 30 λεπτά). Η αντίδραση εισόδου σταμάτησε ξανά με την προσθήκη 20mM NEM. Τα δείγματα αναλύονται σε SDS-PAGE υπό μη αναγωγικές συνθήκες και αυτοραδιογραφία. Οι ραδιενεργές ζώνες που μας ενδιαφέρουν ποσοτικοποιούνται και τα ποσοστά τους φαίνονται κάτω από την εικόνα αυτοραδιογραφίας στην εικόνα 42A. Αυτό που παρατηρείται τόσο από την εικόνα όσο και από τα ποσοστά που παρατίθενται από κάτω, και στις δύο περιπτώσεις συνδυασμού των μεταλλαγμάτων, είναι μία αποκατάσταση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου η οποία αγγίζει τα επίπεδα που δίνει η Ern1 αγρίου τύπου. Χρησιμοποιώντας το μετάλλαγμα C130/133S μόνο του σε αρκετά ανεξάρτητα πειράματα, παρατηρήθηκε ότι μικτό ενδιάμεσο με τη Mia40 που έδινε αυτό το μετάλλαγμα βρισκόταν στο 50% του ενδιάμεσου της αγρίου τύπου Ern1. Τώρα που αυτό το μετάλλαγμα συνδυάζεται είτε με το Ern1C30/33S, είτε με το ΔN72Ern1, (δηλαδή με ένα άλλο μόριο που περιλαμβάνει ένα λειτουργικό ενεργό κέντρο με το ζευγάρι κυστεϊνών άθικτο), το ποσοστό του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου αυξάνεται, ενώ και η οξειδωση του μονομερούς της ραδιενεργής Mia40 στο διπλό μοτίβο CX9C αποκαθίσταται. Ένα επιπλέον πείραμα ελέγχου παρατίθεται στην εικόνα 42B. Εκεί το πείραμα εισόδου των διαφορετικών μορίων Ern1 επαναλαμβάνεται και ακολουθείται από συγκατακρήμιση του ραδιενεργού υποστρώματος με την Ern1His. Συγκεκριμένα στη θέση 1, δεν εισέρχεται κανένα μόριο Ern1 στα GalErn1 μιτοχόνδρια, πριν από την είσοδο της ραδιενεργής Mia40. Στην θέση 2 τα GalErn1 μιτοχόνδρια έχουν συμπληρωθεί με αγρίου τύπου Ern1, στη θέση 3 με το μετάλλαγμα Ern1C130/133S, στη θέση 4 με το συνδυασμό Ern1C130/133S + Ern1C30/33S ενώ στη θέση 5 με το συνδυασμό Ern1C130/133S +Ern1ΔN72. Μετά την είσοδο και του ραδιενεργού υποστρώματος, τα μιτοχόνδρια υπόκεινται λύση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (8M ουρία, 1% Triton-X100), και

το διαλυτό κλάσμα τους επωάζεται με σφαιρίδια νικελίου για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα μόρια Erv1 φέρουν τον επίτοπο έξι ιστιδινών που τους επιτρέπει να προσδένονται στα ιόντα νικελίου, παρασέρνοντας και ό,τι είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο μαζί τους, καθώς η ουρία και το απορρυπαντικό Triton-X100, δεν μπορούν να διασπάσουν ομοιοπολικούς δεσμούς. Με αυτόν τον τρόπο απομονώνουμε μόνο την ραδιενεργή Mia40 που είναι συνδεδεμένη με δισουλφιδικό δεσμό με κάθε ένα από τα διαφορετικά μόρια Erv1. Το υλικό που εκλούστηκε από τα σφαιρίδια νικελίου αναλύεται με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία στην εικόνα 12B. Παρατηρείται ότι όταν δεν υπάρχει κάποιο μόριο Erv1His μέσα στα GalErv1 μιτοχόνδρια προφανώς δεν βλέπουμε ραδιενέργεια να κατακρημνίζεται με τα σφαιρίδια νικελίου. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει μη ειδική πρόσδεση της Mia40 με τα σφαιρίδια υπό αυτές τις συνθήκες επώασης, επομένως όλη η ραδιενεργή Mia40 που βρίσκεται πάνω στα σφαιρίδια οφείλεται στην παρουσία της Erv1. Στη θέση 2 βρίσκεται η Mia40 που είναι προσδεμένη με την Erv1 αγρίου



Εικόνα 41 Η διαμοριακή επικοινωνία μεταξύ των μορίων της Erv1 *in vitro*, κατά την αλληλεπίδραση με το υποστρώμα Mia40, αποτελεί εγγενή ιδιότητα της πρωτεΐνης. Πείραμα αλληλεπίδρασης *in vitro* μεταξύ της μερικώς ανηγμένης Mia40ΔN290 με την αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένη στις κυστεΐνες, Erv1

τύπου. Στη θέση 3 παρατηρείται η Mia40 που είναι προσδεμένη με το μετάλλαγμα του ενεργού κέντρου Erv1C130/133S, και φαίνεται ότι αποτελεί περίπου το 50% της ζώνης στη θέση 2. Εντούτοις, όταν αυτό το μετάλλαγμα συνδυάζεται είτε με το Erv1C30/33S (θέση 4) είτε με το ΔN72Erv1 (θέση 5) μέσα στα GalErv1 μιτοχόνδρια τότε η ποσότητα της ραδιενεργούς Mia40 που μπορεί να προσδεθεί φτάνει στα επίπεδα της αγρίου τύπου Erv1.

Εάν η δυνατότητα της Erv1 να αλληλεπιδρά με τη Mia40 ως διμερές, μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια του υποστρώματος από το αμινοτελικό ζευγάρι του ενός μονομερούς στο ζευγάρι του ενεργού κέντρου του άλλου μονομερούς, είναι μία εγγενής ιδιότητά της,

τότε θα πρέπει να μπορεί να πραγματοποιηθεί και *in vitro* παρουσία μόνο των αντιδρώντων μορίων. Η πραγματοποίηση της αντίδρασης *in vitro* έγινε με τη βοήθεια

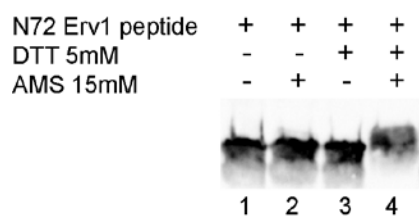
ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Mia40ΔN290 που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την Ern1, ανηγμένη μόνο στις κυστεΐνες του ενεργού κέντρου της (Mia40 par. red.). Η ανηγμένη Mia40ΔN290 (εικόνα 43, θέση 1) επωάζεται με τα Ern1C130/133S (θέση 2), Ern1C130/133S + Ern1C30/33S (θέση 3), Ern1 C130/133S + Ern1ΔN72 (θέση 4) ή Ern1 αγρίου τύπου (θέση 5). Όπως φαίνεται, και στις δύο περιπτώσεις συνδυασμού του μεταλλάγματος Ern1C130/133S με άλλα μεταλλάγματα του αμινοτελικού άκρου, παρατηρείται μία σαφής αύξηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου Mia40-Ern1 (σύγκρινε θέσεις 2 με 3 και 4). Το πρωτεϊνικό υλικό της Mia40 ΔN290, παρότι επωάζεται με 2mM DTT για 15 λεπτά στους 30°C έτσι ώστε να επιτευχθεί η αναγωγή των κυστεϊνών του ενεργού κέντρου, διατηρεί ένα μη λειτουργικό (abortive), διμερές το οποίο φαίνεται να υπάρχει σε όλα τα δείγματα (Mia40 d). Το διμερές αυτό σχηματίζεται με την πάροδο του χρόνου, κατά τη φύλαξη της πρωτεΐνης στους -20°C, και μπορεί να αναχθεί μόνο υπό πολύ ισχυρές αναγωγικές συνθήκες.

Τα παραπάνω δεδομένα συγκεντρωτικά, υποδεικνύουν ότι η Ern1 χρειάζεται ένα λειτουργικό ζευγάρι κυστεϊνών στο αμινοτελικό άκρο προκειμένου να αντιδράσει αρχικά ομοιοπολικά με την Mia40. Εντούτοις, για να ολοκληρωθεί η αντίδραση, μεταξύ τους, απαραίτητη είναι η ύπαρξη και του ζευγαριού κυστεϊνών του ενεργού κέντρου της Ern1. Το ζευγάρι κυστεϊνών του ενεργού κέντρου μπορεί να βρίσκεται και σε ένα διαφορετικό μόριο, δηλαδή *in trans*. Η συνεργασία αυτή μεταξύ δύο διαφορετικών μορίων Ern1, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Ern1 μπορεί να δρα και ως διμερές κατά την οξειδωση του υποστρώματος Mia40.

### **3.2.5 Μελέτη του ρόλου των δύο τμημάτων της Ern1 (αμινοτελικό πεπτίδιο και καρβοξυτελικό τμήμα) κατά την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα Mia40**

Όπως έχει φανεί μέχρι τώρα, το αμινοτελικό τμήμα της Ern1 (και συγκεκριμένα το πεπτίδιο που περιλαμβάνει τα πρώτα 72 αμινοξέα - N72 Ern1 peptide) είναι υπεύθυνο τόσο για τη μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα όσο και για τον σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού, καθώς φέρει το ζεύγος κυστεϊνών που είναι υπεύθυνο για το δεσμό αυτό. Είναι όμως το πεπτίδιο αυτό αναγκαίο και ικανό για το σχηματισμό αυτού του δεσμού και ποιος είναι ο ρόλος της καρβοξυτελικής περιοχής της Ern1 στην όλη αντίδραση; Για να μελετηθεί ο ρόλος κάθε τμήματος της Ern1 ξεχωριστά, τόσο το αμινοτελικό πεπτίδιο όσο και το καρβοξυτελικό τμήμα

εκφράστηκαν σε βακτήρια και απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Προκειμένου να ελεγχθεί η οξειδωτική κατάσταση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε πείραμα παγίδευσης ελεύθερων θειολικών ομάδων με τον παράγοντα AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid). Ο παράγοντας αυτός προσδένεται σε ελεύθερες θειολικές ομάδες (-SH), που υπάρχουν σε ανηγμένες κυστεΐνες και προσδίδει στο μέγεθος της πρωτεΐνης άλλα 500Da. Έτσι, ανάλογα με το πόσες ανηγμένες κυστεΐνες έχει ένα μόριο, τόσο περισσότερα μόρια AMS προσδένονται και τόσο περισσότερο αυξάνεται το μοριακό του βάρος. Προκειμένου να ελεγχθεί η οξειδωτική κατάσταση του πεπτιδίου της Ern1 που απομονώθηκε, χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα απομονωμένου πεπτιδίου. Το ένα επωάζεται με 5mM DTT για 15 λεπτά στους 30°C (εικόνα 44, θέσεις 3 και 4) και το άλλο

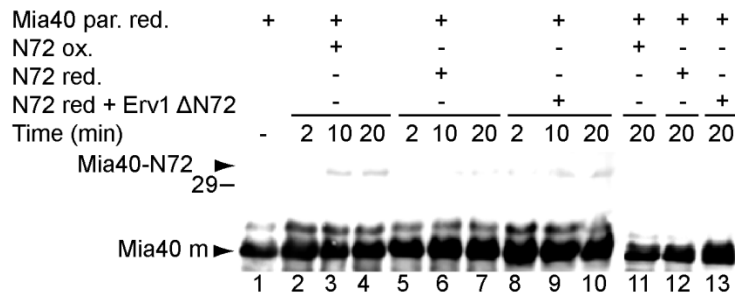


Εικόνα 42 Πείραμα παγίδευσης ελεύθερων θειολικών ομάδων στο πεπτίδιο N72 της Ern1 (N72 Ern1 peptide) από τον αλκυλιωτικό παράγοντα AMS.

παραμένει ως έχει (εικόνα 44, θέσεις 1 και 2). Κατόπιν, κάθε ένα από τα δείγματα αυτά χωρίζεται σε δύο ίσα μέρη. Στο ένα από αυτά προστίθεται ο παράγοντας AMS (15mM) (θέσεις 2 και 4) ενώ στο άλλο όχι (θέσεις 1 και 3). Όλα τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένα από το φως.

Κατόπιν αναλύονται σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την Ern1. Παρατηρείται ότι όταν το πεπτίδιο έχει επωαστεί πρώτα με αναγωγικό παράγοντα, επομένως οι κυστεΐνες του είναι ανηγμένες, ο παράγοντας AMS μπορεί να προσδεθεί σε αυτό επηρεάζοντας το μοριακό του βάρος (η ζώνη στη θέση 4 βρίσκεται λίγο ψηλότερα απ' ότι η ζώνη στη θέση 3). Εντούτοις, το δείγμα πεπτιδίου που δεν είχε αναχθεί εκ των προτέρων, δεν μπόρεσε να προσδέσει κάποιο μόριο AMS. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι στο πεπτίδιο της Ern1 που απομονώθηκε το ζευγάρι κυστεϊνών (C30/C33) ήταν ενωμένο με δισουλφιδικό δεσμό.

Γνωρίζοντας ότι το πεπτίδιο της Erv1 είναι οξειδωμένο, προκύπτει το ερώτημα εάν



Εικόνα 43 Πείραμα in vitro αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου της Erv1 παρουσία ή απουσία του καταλυτικού πυρήνα της Erv1, με το μερικώς ανηγμένο υπόστρωμα Mia40. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για Mia40. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο μεταξύ του πεπτιδίου της Erv1 και της Mia40 (Mia40-N72), είναι ευαίσθητο σε DTT, αφού όταν τα δείγματα στις θέσεις 4, 7 και 10 «φορτώνονται» παρουσία αναγωγικού παράγοντα (β-μερκαπτοαιθανόλη) στις θέσεις 11, 12 και 13, αυτό καταργείται.

από μόνο του είναι ικανό

να αντιδράσει με το ενεργό κέντρο του υποστρώματος, απουσία του καταλυτικού πυρήνα.

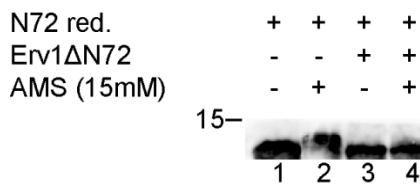
Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για να

απαντηθεί είναι ίδια με αυτήν που περιγράφεται

στο πείραμα της εικόνας 33. Έτσι, το μερικώς

ανηγμένο υπόστρωμα (Mia40 par. red.) (μετά

από επώαση με 1mM TCEP για 15 λεπτά στους 30°C, εικόνα 45 θέση 1) επωάζεται,



Εικόνα 44 Πείραμα παγίδευσης ελεύθερων θειολικών ομάδων από τον αλκυλιωτικό παράγοντα AMS. Το πεπτίδιο της Erv1 οξειδώνεται παρουσία του καταλυτικού πυρήνα της πρωτεΐνης Erv1ΔN72

για προοδευτικά αυξανόμενα χρονικά διαστήματα, είτε με το οξειδωμένο πεπτίδιο (N72 ox.- θέσεις 2-4), είτε με τα ανηγμένο πεπτίδιο

(N72 red. - θέσεις 5-7), είτε με το ανηγμένο πεπτίδιο παρουσία του καταλυτικού πυρήνα της Erv1 (N72 red + Erv1ΔN72 - θέσεις 8-10).

Παρατηρείται ότι όταν το πεπτίδιο N72 είναι

οξειδωμένο (N72 ox.), είναι ικανό να σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με το ανηγμένο υπόστρωμα, ήδη μετά από 10 λεπτά επώασης (Mia40-N72). Αντίθετα, όταν το πεπτίδιο είναι ανηγμένο (N72 red.) η αντίδραση με το ανηγμένο υπόστρωμα δεν πραγματοποιείται, γεγονός που είναι αναμενόμενο. Στην περίπτωση που το ανηγμένο υπόστρωμα επωάζεται με επίσης ανηγμένο πεπτίδιο Erv1, αλλά παρουσία του καταλυτικού πυρήνα της *erv1* (N72 red+ΔN72Erv1), τότε φαίνεται να αποκαθίσταται ο σχηματισμός μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ του πεπτιδίου και της Mia40. Επομένως είναι εμφανές ότι το αμινοτελικό πεπτίδιο N72 της Erv1, όταν είναι οξειδωμένο, είναι αναγκαίο και ικανό για την αντίδραση με το ανηγμένο υπόστρωμα. Ο καταλυτικός πυρήνας της Erv1 γίνεται απαραίτητος όταν το πεπτίδιο βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή. Αυτό το γεγονός παραπέμπει στην υπόθεση ότι ο καταλυτικός



πυρήνας της Ern1 ουσιαστικά οξειδώνει το αμινοτελικό πεπτίδιο καθιστώντας το ενεργό πάνω στο υπόστρωμα. Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση είναι και πάλι πείραμα παγίδευσης ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων από τον αλκυλιωτικό παράγοντα AMS (όπως το πείραμα της εικόνας 44). Συγκεκριμένα, το πεπτίδιο της Ern1 αρχικά ανάγεται πλήρως με 10mM DTT για 30 λεπτά στους 30°C. Στη συνέχεια το DTT απομακρύνεται με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, και το ανηγμένο πεπτίδιο επώαζεται για 20 λεπτά στους 30°C, παρουσία ή απουσία ισομοριακής ποσότητας του καταλυτικού πυρήνα Ern1ΔN72. Στη συνέχεια τα δείγματα χωρίζονται στη μέση και στα μισά προστίθεται AMS. Ακολουθεί ανάλυση με SDS-PAGE και ενώ το πεπτίδιο παρακολουθείται με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την Ern1 (εικόνα 46). Όπως φαίνεται στην εικόνα 46 θέση 2, το πεπτίδιο ήταν αρχικά ανηγμένο (προυσία AMS μετατοπίζεται ψηλότερα στο πήκτωμα πολύ-ακρυλαμίδης), αλλά κατά την επώαση με τον καταλυτικό πυρήνα, το πεπτίδιο οξειδώνεται (κανένα μόριο AMS δεν μπορεί να προσδεθεί πάνω του, άρα δεν περιέχει ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες) (εικόνα 46, θέση 4). Συμπερασματικά, ο ρόλος του καταλυτικού πυρήνα της πρωτεΐνης Ern1, και συγκεκριμένα του ζευγαριού κυστεϊνών C130-C133, φαίνεται να είναι η οξείδωση του ζεύγους που βρίσκεται στο αμινοτελικό πεπτίδιο το οποίο μένει ανηγμένο μετά από κάθε αλληλεπίδραση με το ανηγμένο υπόστρωμα. Η οξείδωση του αμινοτελικού πεπτιδίου το καθιστά ξανά ενεργό για μία επόμενη αντίδραση με ανηγμένη Mia40.

### 3.2.6 Συζήτηση

Η αλληλεπίδραση μεταξύ Ern1 και Mia40 βρίσκεται στον πυρήνα του μηχανισμού οξειδωτικής αναδίπλωσης πρωτεϊνών που στοχεύουν το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Μέχρι τώρα τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η Ern1 οξειδώνει το ενεργό κέντρο της οξειδάσης Mia40 και συγκεκριμένα το μοτίβο CPC, καθιστώντας της ξανά ενεργή για να δράσει πάνω σε ένα νέο μόριο υποστρώματος. Εντούτοις, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η αλληλεπίδραση δεν ήταν γνωστός.

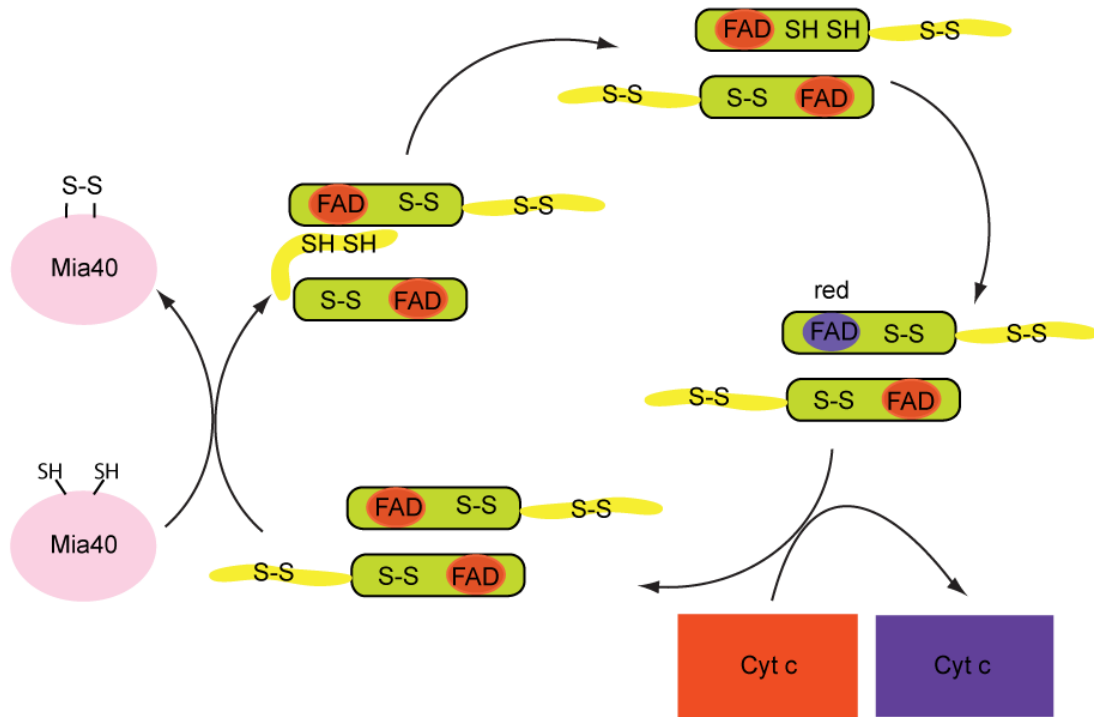
Σε αυτήν την μελέτη κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός της αντίδρασης αυτής σε τρία σημαντικά βήματα. Στο πρώτο βήμα, το ευέλικτο αμινοτελικό τμήμα/πεπτίδιο της Ern1, αναγνωρίζει το υπόστρωμα μέσω μη ομοιοπολικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η ανάλυση των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των Ern1 και Mia40SPS, οδήγησε στον προσδιορισμό της

σταθεράς διάστασης στα επίπεδα των 25μM. Το μέγεθος της σταθεράς διάστασης παραπέμπει σε μία ειδική αλλά παροδική αλληλεπίδραση. Η τιμή αυτή είναι μία τάξη μεγέθους κάτω από την σταθερά διάστασης μεταξύ Mia40SPS και υποστρώματος Tim10 (2-3μM). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η Ern1 δεν έχει αυστηρή εξειδίκευση για την Mia40, και αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο να υπάρχουν και άλλα υποστρώματα για την Ern1. Παράλληλα, η ευελιξία του αμινοτελικού άκρου της Ern1 προδίδει ότι μπορεί να προσδένεται σε διαφορετικά υποστρώματα παροδικά. Τα ακριβή κατάλοιπα της Ern1 που συμμετέχουν στην μη ομοιοπολική αναγνώριση του υποστρώματος, μελετώνται τώρα, με δομική ανάλυση της αλληλεπίδρασης μέσω NMR (Banci et al., Nat Struct Mol Biol, submitted ).

Στο δεύτερο βήμα, πραγματοποιείται η ομοιοπολική αλληλεπίδραση και δημιουργία του μικτού δισουλφιδικού ενδιάμεσου μεταξύ των δύο μορίων. Σε αυτήν την αντίδραση, συμμετέχει το ζεύγος κυστεϊνών που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο (C30-C33) της Ern1, και το ενεργό κέντρο της Mia40, με τη δεύτερη κυστεϊνή του μοτίβου CPC (Banci, Bertini et al. 2009). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι για την αντίδραση αυτή το αμινοτελικό πεπτίδιο, όταν είναι οξειδωμένο (με το ζευγάρι κυστεϊνών του ενωμένο με δισουλφιδικό δεσμό) είναι αναγκαίο και ικανό για την πραγματοποίηση της αντίδρασης με το υπόστρωμα. Εντούτοις, είναι γνωστό ότι ο καταλυτικός πυρήνας της πρωτεΐνης διατηρεί την ικανότητα οξείδωσης σε μικρά τεχνητά υποστρώματα όπως το DTT. Στα ανθρώπινα κύτταρα, όλες οι ισομορφές (23kDa, 21kDa, και 15kDa) διατηρούν το συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, είναι ενζυμικά ενεργές απέναντι σε μικρά τεχνητά υποστρώματα, και εκφράζονται σε σχεδόν όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα (μάλιστα η ισομορφή των 15kDa εκκρίνεται και δρα σαν αυξητικός παράγοντας κατά την αναγέννηση του συκωτιού). Επομένως, γίνεται σαφές ότι αυτό το ένζυμο μπορεί να δρα σε πολλά διαφορετικά διαμερίσματα, πάνω σε διαφορετικά υποστρώματα χρησιμοποιώντας πιθανώς διαφορετικό μοριακό μηχανισμό δράσης για κάθε ένα από αυτά.

Τέλος, στο τρίτο βήμα, το ζευγάρι κυστεϊνών C30-C33 της Ern1, έχοντας αλληλεπιδράσει με το υπόστρωμα βρίσκεται πλέον σε ανηγμένη μορφή, και μεταδίδει το ζεύγος ηλεκτρονίων που παρέλαβε στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό συντηρημένο τμήμα της. Σε αυτήν την μελέτη δείχτηκε για πρώτη φορά ποιος είναι ο ρόλος του καρβοξυτελικού συντηρημένου τμήματος της Ern1 στην αντίδραση, δεδομένου ότι το αμινοτελικό τμήμα είναι από μόνο του αναγκαίο και ικανό για την αλληλεπίδραση με το φυσιολογικό υπόστρωμα Mia40.

Αυτός είναι να επανοξειδώνει το ζευγάρι κυστεϊνών C30-C33, το οποίο μετά την αλληλεπίδραση με το ανηγμένο υπόστρωμα παραμένει σε ανηγμένη και άρα ανενεργή μορφή. Αυτό μπορεί να συμβαίνει και *in trans*, όταν τα δύο τμήματα βρίσκονται πάνω σε διαφορετικά μόρια πλήρους μεγέθους, είτε είναι εκφρασμένα το κάθε ένα μόνο του σαν ξεχωριστό μόριο. Η πρώτη περίπτωση παραπέμπει στην ικανότητα της Ern1 να δρα ως διμερές, σε συμφωνία με την ομολογή της από το ενδοπλασματικό δίκτυο Ern2. Σύμφωνα με το μοντέλο που επικρατεί για τις σουλφυδρυλοξειδάσες που προσδέουν FAD και ανήκουν στην οικογένεια της Ern1, τα ηλεκτρόνια από το υπόστρωμά τους μεταφέρονται στο ζευγάρι κυστεϊνών του ενεργού κέντρου που βρίσκεται στον συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα της πρωτεΐνης και από κει στο μόριο FAD, πιθανώς όχι ως ζεύγος αλλά ένα-ένα διαδοχικά. Από το FAD τα ηλεκτρόνια περνούν σε επόμενους αποδέκτες ηλεκτρονίων. Ο συνήθης αποδέκτης είναι το μοριακό οξυγόνο αλλά υπάρχουν και άλλοι, όπως στην περίπτωση της Ern1, που είναι το κυτόχρωμα c, με πιο θετικά οξειδοαναγωγικά δυναμικά από το FAD. Συνοπτικά, το μοντέλο που προτείνεται για τη ροή των ηλεκτρονίων από το ανηγμένο υπόστρωμα (Mia40) μέχρι το κυτόχρωμα c, περιγράφεται στο σχήμα της εικόνας 47. Στο σχήμα αυτό τα δύο ξεχωριστά λειτουργικά τμήματα της Ern1 αναπαρίστανται με διαφορετικό χρώμα (κίτρινο το αμινοτελικό τμήμα και πράσινο το καρβοξυτελικό). Τα ανηγμένα κατάλοιπα κυστεϊνών δηλώνονται ως SH, ενώ τα οξειδωμένα που συμμετέχουν σε δισουλφιδικό δεσμό δηλώνονται ως S-S. Τέλος, η οξειδωμένη κατάσταση του FAD και του κυτοχρώματος c δηλώνονται με χρώμα (κόκκινο: οξειδωμένο, μπλε: ανηγμένο). Φαίνεται λοιπόν, ότι τα ηλεκτρόνια από το ανηγμένο ενεργό κέντρο της Mia40 περνούν στο οξειδωμένο ζευγάρι κυστεϊνών του αμινοτελικού άκρου του ενός μονομερούς στο διμερές της Ern1. Η αντίδραση αυτή αφήνει τις κυστεΐνες C30-C33 ανηγμένες. Από εκεί τα ηλεκτρόνια μεταδίδονται στο ζευγάρι ηλεκτρονίων που αποτελεί το ενεργό κέντρο του άλλου μονομερούς. Από το ενεργό κέντρο τα ηλεκτρόνια περνούν σταδιακά στο μόριο FAD το οποίο βρίσκεται πολύ κοντά και το ανάγουν. Το FAD οξειδώνεται ξανά μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια στο οξειδωμένο κυτόχρωμα c. Το ανηγμένο κυτόχρωμα c με τη σειρά του οξειδώνεται από την κυτοχρωμική οξειδάση και έτσι τα ηλεκτρόνια των υποστρωμάτων του μονοπατιού οξειδωτικής αναδίπλωσης περνούν στην αναπνευστική αλυσίδα για να ενωθούν με το μοριακό οξυγόνο.



Εικόνα 45 Σχηματική αναπαράσταση της ροής των ηλεκτρονίων από τη ανηγμένη Mia40 ως το κυτόχρωμα c.

### 3.3 Μελέτη της στόχευσης και του μοριακού μηχανισμού δράσης της τοξίνης του *Enteropathogenic E. Coli* , EspF, στο μιτοχόνδριο του ξενιστή

#### 3.3.1 Εισαγωγή – Σκοπός

Πολλά παθογόνα βακτήρια που προσβάλλουν το γαστρεντερικό σωλήνα μοιράζονται κοινή στρατηγική δράσης, κατά την οποία διάφοροι παράγοντες τοξικότητας εκκρίνονται από το σύστημα έκκρισης 3 (Type III Secretion System – T3SS) απευθείας μέσα στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, όπου και διαταράσσουν την κυτταρική λειτουργία και προωθούν την παθογονικότητα. Το εντεροπαθογόνο στέλεχος *E. coli* (*Enteropathogenic E. coli* – *EPEC*) είναι υπεύθυνο για βρεφική διάρροια, που στις μέρες μας αποτελεί μάλιστα, στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Αποικεί στον βλεννογόνο του λεπτού εντέρου, όπου προσκολλάται ισχυρά στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, προκαλώντας ιστοπαθολογικές μορφολογικές τροποποιήσεις γνωστές ως βλάβες προσκόλλησης και εξάλειψης (attaching and effacing (A/E) lesions). Οι βλάβες αυτές περιλαμβάνουν την εξάλειψη των μικρολαχνών στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων γύρω από την βακτηριακή μικροαποικία και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού του επιθηλιακού κυττάρου αμέσως κάτω από την περιοχή της προσκόλλησης, με ταυτόχρονο σχηματισμό μιας προεκβολής (pedestal) στην κορυφή της οποίας εντοπίζεται η μικροαποικία. Πολλοί από τους παθογόνους βακτηριακούς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση των παραπάνω μορφολογικών τροποποιήσεων, κωδικοποιούνται σε έναν γονιδιακό τόπο του βακτηρίου, μεγέθους 35kb γνωστό ως LEE locus (*locus of enterocyte effacement*). Ο LEE locus κωδικοποιεί τα συστατικά του εκκριτικού συστήματος Type III. Οι παθογόνοι παράγοντες ενύονται στο κυτταρόπλασμα του προσβεβλημένου κυττάρου και επεμβαίνουν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τροποποιώντας τα προς όφελος του βακτηρίου. Δύο από αυτούς τους παράγοντες, οι Map και EspF έχει δειχθεί ότι στοχεύονται και στα μιτοχόνδρια του κυττάρου-ξενιστή, όπου πραγματοποιούν, τουλάχιστον εν μέρει, την παθογονική τους δράση.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην τοξίνη EspF (EPEC Secreted Protein F). Η EspF έχει αναφερθεί να παίζει ρόλο στην αντίσταση σε φαγοκύτωση των

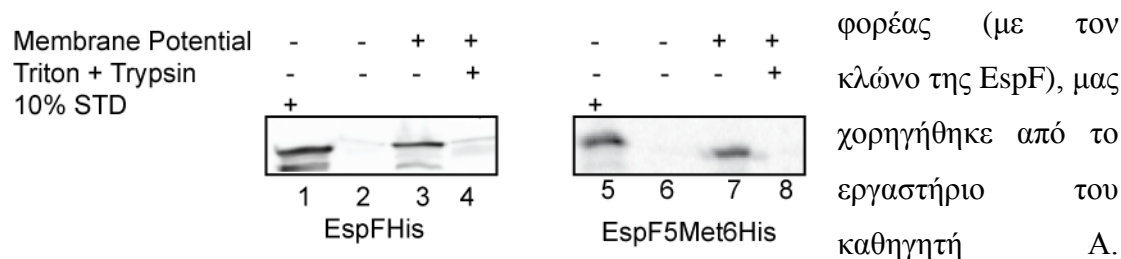
μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων (Quitard, Dean et al. 2006), στη διακοπή των στενοσυνδέσμων μεταξύ των επιθηλικών κυττάρων (McNamara, Koutsouris et al. 2001), στην αποικοδόμηση των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροσκελετού (Viswanathan, Lukic et al. 2004), στη μείωση της δράσης της αντλίας ιόντων νατρίου και υδρογόνου (Sodium Hydrogen Exchanger 3) (Hodges, Alto et al. 2008), στην εισβολή των βακτηρίων EPEC μέσα στον ξενιστή χρησιμοποιώντας το μονοπάτι της ενδοκύττωσης (Weflen, Cell Microbiol 2010) και στην απόπτωση του κυττάρου – ξενιστή, μέσω της στόχευσης και δράσης της στα μιτοχόνδρια (Nagai, JBC 2005). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 206 αμινοξέων, που περιλαμβάνει 3 μοτίβα προλίνης (Proline Rich Motifs, PRM) που καλύπτουν περίπου τα 2/3 της πρωτεΐνης καρβοξυτελικά και περιλαμβάνουν περιοχές που συμμετέχουν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Οι ευκαρυωτικές πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με τη τοξίνη EspF είναι οι κυτοκερατίνη 18 (Viswanathan, Lukic et al. 2004), η Sortin Nexin 9 (SN9), που συμμετέχει στην ενδοκύττωση (Marches, Batchelor et al. 2006), η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη ABCF2 (Nougayrede, Foster et al. 2007), και η WASP (Alto, Weflen et al. 2007). Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Εντούτοις, η EspF έχει βρεθεί να στοχεύει και τα μιτοχόνδρια του επιθηλιακού κυττάρου προκαλώντας διακοπή του μεμβρανικού δυναμικού τους, και απελευθέρωση κυτοχρώματος c από αυτά, οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση (Nagai, Abe et al. 2005). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της τοξίνης στα μιτοχόνδρια παραμένει άγνωστος.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο εντοπισμός της ακριβούς θέσης-στόχευσης της EspF μέσα στο μιτοχόνδριο του ξενιστή καθώς και ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που μεσολαβούν, προκειμένου να πραγματοποιήσει το έργο της. Το οργανίδιο-μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το μιτοχόνδριο του *Saccharomyces cerevisiae*. Το μοντέλο του *Saccharomyces cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί κι άλλες φορές στο παρελθόν σε μελέτες που αφορούν παθογόνους βακτηριακούς παράγοντες που προσβάλλουν ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Κι αυτό γιατί αυτοί οι παράγοντες συνήθως στοχεύουν συντηρημένες κυτταρικές λειτουργίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση (Slagowski, Kramer et al. 2008). Στο πρώτο μέρος της ανάλυσης που ακολουθεί, ελέγχεται εάν ο οργανισμός αυτός, και ιδιαίτερα τα απομονωμένα μιτοχόνδριά του, είναι κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της δράσης της EspF. Αφού εδραιωθεί η χρήση του οργανιδίου του σακχαρομύκητα, η μελέτη προχωράει στον προσδιορισμό της υπο-μιτοχονδριακής στόχευσης της τοξίνης.

Τέλος, γίνεται προσπάθεια εντοπισμού των πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου που βρίσκονται σε αλληλεπίδραση με την τοξίνη, αφού αυτή έχει φτάσει στον προορισμό της, και κατ' επέκταση στον μοριακό μηχανισμό δράσης της.

### 3.3.2 Η EspF εισέρχεται ειδικά σε απομονωμένα yeast μιτοχόνδρια

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν το μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα είναι κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της δράσης της τοξίνης EspF, πρέπει να διαπιστωθεί εάν η τοξίνη μπορεί να εισέρχεται ειδικά μέσα σε αυτό, όπως είναι γνωστό για μιτοχόνδρια επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου. Το γονίδιο της τοξίνης EspF κλωνοποιήθηκε σε δύο διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς, τον pET22 όπου του προστέθηκε ο επίτοπος έξι (6) ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο και στον pET28 όπου πριν από τον επίτοπο έξι ιστιδινών προστέθηκαν και 5 κατάλοιπα μεθειονίνης. Ο πρώτος



Εικόνα 46 Πειράματα εισόδου της τοξίνης EspF, απομονωμένης από βακτήρια ή ραδιενεργής, σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.

Οικονόμου-IMBB  
(παρασκευασμένο

από τη Βασιλεία Μπαλαμπανίδου), και χρησιμοποιήθηκε για υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* προκειμένου να απομονωθεί. Η δεύτερη κατασκευή χρησιμοποιήθηκε σε σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης *in vitro*, ώστε να παραχθεί η πρωτεΐνη φέροντας κατάλοιπα μεθειονίνης με ραδιενεργό θείο  $S^{35}$ . Τα πειράματα εισόδου της απομονωμένης από βακτήρια EspFHis και της ραδιενεργής EspF5Met6His, σε απομονωμένα yeast μιτοχόνδρια, φαίνονται στην εικόνα 48. Τα δείγματα στις θέσεις 1-4 αναλύονται με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-His, ενώ αυτά στις θέσεις 5-8 με αυτοραδιογραφία. Στις θέσεις 1 και 5 φαίνεται το 10% του πρόδρομου μορίου που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση εισόδου. Όταν τα απομονωμένα μιτοχόνδρια επωάζονται με τον παράγοντα CCCP (carbonyl cyanide *m*-chloro phenyl hydrazone) ο οποίος είναι ένα αμφιπαθές μόριο, το οποίο διαχέεται μέσα στη λιπιδική στιβάδα και αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης από πρωτόνια, η διαφορά δυναμικού που υπάρχει μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μεμβράνης εξαλείφεται. Όταν η τοξίνη EspF επωάζεται με μιτοχόνδρια χωρίς μεμβρανικό δυναμικό (membrane potential), δεν καταφέρνει να εισέλθει στα

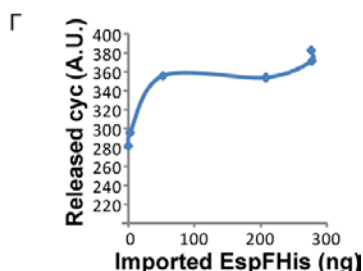
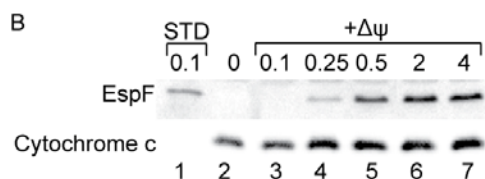
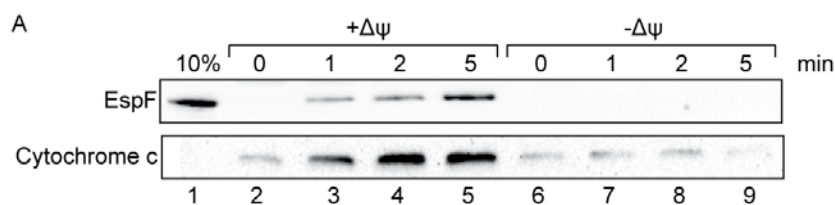
μιτοχόνδρια και έτσι πρωτεολύεται από την πρωτεάση τρυψίνη (θέσεις 2 και 6). Αντίθετα, όταν επώαζεται με μιτοχόνδρια που έχουν μεμβρανικό δυναμικό, τότε ένα σημαντικό ποσοστό του πρόδρομου μορίου καταφέρνει να εισέλθει στα μιτοχόνδρια και να προστατευτεί από την τρυψίνη (θέσεις 3 και 7). Στην περίπτωση που η επώαση με την τρυψίνη γίνεται παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100 (1%), τότε, το σήμα χάνεται και στις 2 περιπτώσεις (θέσεις 4 και 8), δείχνοντας ότι το πρόδρομο μόριο μπορεί να αποικοδομηθεί από την τρυψίνη και επομένως τα σήματα που φαίνονται είναι ειδικά και αφορούν την είσοδο στα μιτοχόνδρια. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η βακτηριακή τοξίνη EspF εισέρχεται ειδικά μέσα σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα και μάλιστα η είσοδός της εξαρτάται από την ύπαρξη μεμβρανικού δυναμικού.

### **3.3.3 Η είσοδος της EspF στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα προκαλεί απελευθέρωση κυτοχρώματος c.**

Το μιτοχόνδριο αποτελεί ετερόλογο σύστημα για την τοξίνη του EPEC, που προσβάλλει επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου θηλαστικών. Εντούτοις, η EspF μπαίνει εισέρχεται στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα, και μάλιστα με τρόπο που εξαρτάται από το μεμβρανικό δυναμικό του. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η στόχευση της EspF στα μιτοχόνδρια του ξενιστή συνοδεύεται από διακοπή του μεμβρανικού δυναμικού και απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Crane, McNamara et al. 2001). Το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η EspF προκαλεί απελευθέρωση κυτοχρώματος c σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, πραγματοποιήθηκε πείραμα εισόδου της τοξίνης σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Στη συνέχεια, το εναιώρημα μιτοχονδρίων φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο κατακρημνίστηκε με διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος 10% και ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση για την ποσότητα κυτοχρώματος c που περιείχε (εικόνα 49). Η επώαση των μιτοχονδρίων με την τοξίνη έγινε για προοδευτικά αυξανόμενα χρονικά διαστήματα και σταματούσε με την προσθήκη CCCP, το οποίο διακόπτει το μεμβρανικό δυναμικό (εικόνα 49A, θέσεις 2-5). Στο πείραμα ελέγχου η διαδικασία επαναλαμβάνεται πανομοιότυπα αλλά τα μιτοχόνδρια έχουν υποστεί διακοπή του μεμβρανικού δυναμικού πριν από την επώασή τους με την τοξίνη (θέσεις 6-9). Το ποσό της τοξίνης που έχει εισαχθεί στα μιτοχόνδρια καθώς και η ποσότητα του κυτοχρώματος c που έχει εκλυθεί στο υπερκείμενο σε κάθε χρονική στιγμή,



παρακολουθούνται με ανοσοαποτύπωση. Η τοξίνη αρχίζει να μπαίνει στα μιτοχόνδρια πολύ νωρίς. Μετά από μόλις 1 λεπτό επώασης, ανιχνεύεται ήδη σημαντική ποσότητά της μέσα στα μιτοχόνδρια. Παρατηρείται ότι στο χρόνο 0 (θέση 2) ή στις περιπτώσεις που τα μιτοχόνδρια δεν έχουν δυναμικό (εικόνα 49A, θέσεις 6-9) υπάρχει ένα μικρό ποσό κυτοχρώματος που εντοπίζεται στο υπερκείμενο. Αυτό όμως αυξάνει σημαντικά ήδη μετά από 1 λεπτό επώασης με την τοξίνη, όταν μόλις ένα μικρό ποσοστό της έχει εισαχθεί σε λειτουργικά μιτοχόνδρια. Με την πάροδο του χρόνου, το ποσοστό της τοξίνης αυξάνεται και παράλληλα αυξάνει το ποσοστό του κυτοχρώματος c που απελευθερώνεται (μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα δεν παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στην ποσότητα του κυτοχρώματος c που έχει απελευθερωθεί ενώ παραμένει ακόμη αρκετή ποσότητα κυτοχρώματος μέσα στα



Εικόνα 47 Απελευθέρωση κυτοχρώματος c κατά την είσοδο Erv1 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Α. Είσοδος της EspFHis σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για προοδευτικά αυξανόμενα χρονικά διαστήματα (από 0 έως 5 λεπτά), παρουσία (+Δψ) ή απουσία (-Δψ) μεμβρανικού δυναμικού. Β. Επώαση μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα με προοδευτικά αυξανόμενα ποσά τοξίνης (από 0 έως 4 μg) για χρονικό διάστημα 5 λεπτών. Γ. Γραφική παράσταση της μεταβολής του κυτοχρώματος c που εκλύεται (released cytochrome c) σε συνάρτηση με την ποσότητα της εισαγμένης τοξίνης (Imported EspFHis) σε ng, μετά από 5 λεπτά επώασης. Οι τιμές για την γραφική παράσταση προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των ζωνών της εικόνας Β.

φορά ο χρόνος επώασης με την τοξίνη ήταν σταθερός (5 λεπτά), ενώ κάθε δείγμα μιτοχονδρίων επώαστηκε με διαφορετική ποσότητα τοξίνης. Η ποσότητα της τοξίνης που προστέθηκε εξωτερικά στα μιτοχόνδρια (σε μg) αναγράφεται πάνω από την εικόνα ανοσοαποτύπωσης (εικόνα 49B, θέσεις 2-7). Η ποσότητα της εισαγμένης

μιτοχόνδρια). Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν η αύξηση του κυτοχρώματος c εξαρτάται από την ποσότητα της τοξίνης ή εάν είναι ανάλογη με το χρόνο.

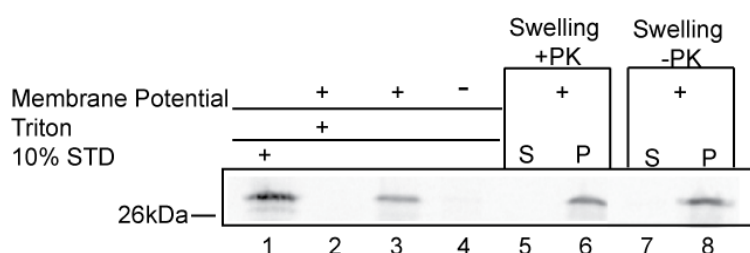
Προκειμένου να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, επαναλήφθηκε η πειραματική διαδικασία μόνο που αυτή τη

τοξίνης υπολογίζεται από ποσοτικοποίηση των ζωνών και σύγκριση με τη ζώνη στη θέση 1 όπου έχουν φορτωθεί 100ng τοξίνης. Παρατηρείται ότι στη θέση 4 ανιχνεύεται για πρώτη φορά ποσότητα τοξίνης μέσα στα μιτοχόνδρια (αντιστοιχεί περίπου σε 53ng τοξίνης σε 30μg μιτοχονδρίων). Στη θέση 5 η ποσότητα της εισαγμένης τοξίνης αυξάνεται σε ~200ng, ενώ στις θέσεις 6 και 7 παραμένει σταθερή στα 280ng. Επομένως, το *in organello* σύστημα έχει φτάσει σε κορεσμό με την προσθήκη 2μg τοξίνης, έτσι ώστε η αύξηση της εξωτερικά προστιθέμενης τοξίνης πάνω από 2μg, δεν αυξάνει το ποσό της εισαγμένης πρωτεΐνης. Αντίστοιχα, η έκλυση κυτοχρώματος c παρατηρείται ήδη με την είσοδο ~53ng τοξίνης σε 30μg μιτοχονδρίων (θέση 4). Η περαιτέρω αύξηση στην εισαγμένη EspF-His από 52ng στη θέση 4 σε 200 και 280 ng στις θέσεις 5 και 6 αντίστοιχα, δεν προκαλούν ανάλογη αύξηση στο εκκλύμενο κυτόχρωμα c. Το γράφημα στην εικόνα 49Γ απεικονίζει την ποσότητα του εκκλύμενου κυτοχρώματος σε σχέση με την ποσότητα της εισαγμένης τοξίνης. Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι, μικρές ποσότητες τοξίνης (1.67ng τοξίνης/μg μιτοχονδρίων) είναι ικανές να προκαλέσουν έκλυση κυτοχρώματος c σε πολύ σύντομα χρονικά διαστήματα (1-2 λεπτά). Εντούτοις, το σύστημα φτάνει γρήγορα σε ένα σημείο κορεσμού, πέρα από τον οποίο ούτε παραπάνω ποσότητα τοξίνης αλλά ούτε και περισσότερος χρόνος επώασης έχει σημαντική επίδραση στην έκλυση του κυτοχρώματος. Σύμφωνα με τους (Scorrano, Ashiya et al. 2002), επώαση μιτοχονδρίων απομονωμένων από ηπατοκύτταρα ποντικού με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη tBid, οδηγεί σε 100% απελευθέρωση του κυτοχρώματος c που περιέχουν. Εντούτοις, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει με την τοξίνη, καθώς η ποσότητα κυτοχρώματος που εκλύεται από τα μιτοχόνδρια φτάνει πολύ γρήγορα σε κορεσμό, ενώ υπάρχει ακόμη αρκετό κυτόχρωμα c μέσα στα μιτοχόνδρια. Επομένως, η τοξίνη EspF φαίνεται να μην έχει τόσο ισχυρή αποπτωτική επίδραση σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα όσο η tBid σε μιτοχόνδρια ηπατικών κυττάρων ποντικού, αλλά αντίθετα να οδηγεί σε μία περιορισμένη, ελεγχόμενη απελευθέρωση κυτοχρώματος c.

### 3.3.4 Η EspF εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μήτρα, όπου αλληλεπιδρά περιφερικά με την εσωτερική μεμβράνη.

Όπως προαναφέρθηκε, η είσοδος της τοξίνης στα μιτοχόνδρια απαιτεί το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η τοξίνη ακολουθεί ένα μονοπάτι εισόδου που απαιτεί το δυναμικό. Γνωστά τέτοια μονοπάτια είναι το αυτό που οδηγεί στη μήτρα του μιτοχονδρίου (μέσω του συμπλόκου TIM23) καθώς και αυτά που οδηγούν σε ενσωμάτωση στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (μέσω των συμπλόκων TIM23, για πρωτεΐνες με μία διαμεμβρανική περιοχή και μέσω TIM22, για πρωτεΐνες με πολλαπλές διαμεμβρανικές περιοχές). Προκειμένου να διαπιστωθεί ο ακριβής υπομιτοχονδριακός προορισμός της EspF πραγματοποιήθηκε το πείραμα της εικόνας 50.

Ραδιενεργής τοξίνη EspF5Met6His επώαστηκε με απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, με ή χωρίς μεμβρανικό δυναμικό. Κατόπιν, το υλικό που δεν έχει εισαχθεί πρωτεολύεται με τρυψίνη. Τα μιτοχόνδρια απομονώνονται εκ νέου με φυγοκέντρηση και

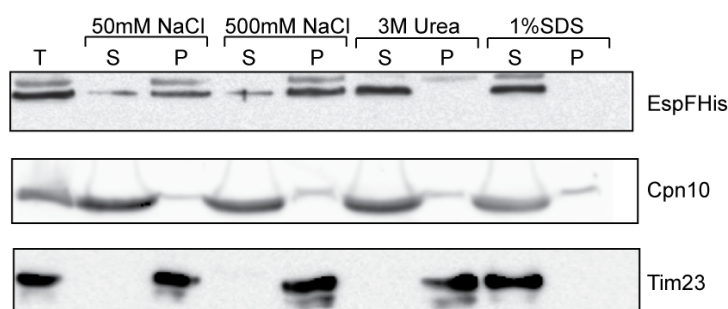


Εικόνα 48 Προσδιορισμός της υπομιτοχονδριακής στόχευσης της τοξίνης EspF5Met6His με πείραμα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, που κατόπιν υπόκεινται ωσμωτικό σοκ (θέσεις 5-8). Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

δύο από τα δείγματα όπου η EspF έχει εισαχθεί κανονικά παρουσία δυναμικού, επωάζονται σε υποτονικό διάστημα Hepes 20mM (pH7.4) για μισή ώρα (swelling), παρουσία ή απουσία πρωτεΐνάσης K (PK). Κατά την επώαση αυτή διαρρηγνύεται η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και απελευθερώνονται τα διαλυτά υλικά του διαμεμβρανικού χώρου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπου χωρίζονται τα διαλυτά μέρη (υπερκείμενο - S) από τους μιτοπλάστες που πέφτουν σε ίζημα (P). Οι πρωτεΐνες από το υπερκείμενο κατακρημνίζονται με 10% TCA και όλα τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. Όπως φαίνεται η τοξίνη εντοπίζεται στους μιτοπλάστες, όπου και προστατεύεται από πρωτεόλυση PK. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η EspF βρίσκεται μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα και προστατεύεται από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία παραμένει άθικτη στους μιτοπλάστες. (Η ακεραιότητα της εσωτερικής μεμβράνης ελέγχεται κάθε φορά σε

τέτοια πειράματα με ανοσοαποτύπωση εναντίον πρωτεϊνών δεικτών της μήτρας και του διαμεμβρανικού χώρου). Η τοξίνη μπορεί είτε να είναι διαλυτή μέσα στη μήτρα είτε σε αλληλεπίδραση με την εσωτερική μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να σημαίνει είτε ότι η τοξίνη μπορεί να έχει ένα ή περισσότερα διαμεμβρανικά τμήματα, χωρίς να προεξέχει κάποιο τμήμα της προς το διαμεμβρανικό χώρο είτε ότι αλληλεπιδρά περιφερικά με την μεμβράνη μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ή αλληλεπιδράσεων με λιπίδια.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ακριβής τοπολογία της τοξίνης μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κλασμάτωσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μετά από διάρρηξη των μιτοχονδριακών μεμβρανών και φυγοκέντρηση που χωρίζει τα διαλυτά από τα μεμβρανικά μέρη. Συγκεκριμένα, τα απομονωμένα μιτοχόνδρια επωάζονται αρχικά με καθαρισμένη EspFHis πρωτεΐνη για 30 λεπτά στους 30°C. Στη συνέχεια, και αφού απομακρυνθεί η μη εισαγμένη πρωτεΐνη με πρωτεόλυση, τα μιτοχόνδρια χωρίζονται σε ίσα τμήματα των 50μg και φυγοκεντρούνται. Κατόπιν, το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα των μιτοχονδρίων επαναδιαλύεται είτε σε αποδιατακτικό διάλυμα για κατάλληλο για ηλεκτροφόρηση (Laemmli sample buffer) (T), είτε σε 50mM Tris pH8.0 συμπλωμένο με: 50mM NaCl, 500mM NaCl, 3M urea + 150mM NaCl, 1%SDS+150mM NaCl. Ακολουθούν 3 κύκλοι πάγωμα (μέσα σε αιθανόλη και ξηρό πάγο / ξεπάγωμα (μέσα σε υδατόλουτρο υπερήχων). Τα δείγματα υπερφυγοκεντρούνται στα 55000g και χωρίζεται το υπερκείμενο (διαλυτό) από το



Εικόνα 49 Προσδιορισμός της τοπολογίας της τοξίνης EspF μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα. Μετά από πείραμα εισόδου της τοξίνης σε μιτοχόνδρια, ακολουθεί κλασμάτωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σε διαλυτές και μη, υπό διαφορετικές συνθήκες διαλυτοποίησης

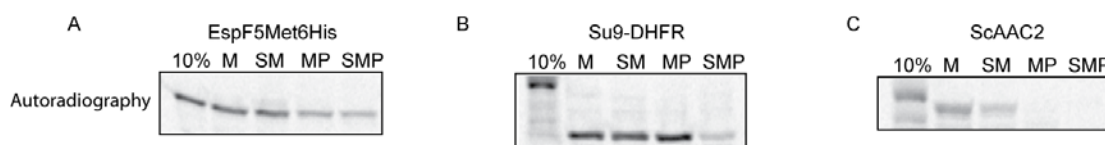
ίζημα (μεμβρανικό τμήμα). Κατόπιν ανάλυσης με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση παρακολουθείται η αλληλεπίδραση της EspF με τις μεμβράνες, σε σύγκριση με μία γνωστή διαλυτή πρωτεΐνη της μήτρας (Crp10) και

μία γνωστή διαμεμβρανική πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης (Tim23) (εικόνα

51). Παρατηρείται ότι η EspF είναι συνδεδεμένη με τη μεμβράνη τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συνθήκες αλατότητας. Επομένως η πρόσδεση αυτή δεν στηρίζεται σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Συνήθως ιοντικές είναι οι αλληλεπιδράσεις με τις φορτισμένες κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Θα μπορούσε η EspF να έχει κάποιο διαμεμβρανικό κομμάτι, όπως η Tim23 ή αλληλεπιδρά με κάποια άλλη πρωτεΐνη που βρίσκεται στην μεμβράνη; Η κλασμάτωση μέσα σε διάλυμα ουρίας 3M, διαφοροποιεί την EspF από τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Tim23, καθώς η τοξίνη διαλυτοποιείται ενώ η Tim23 παραμένει στη μεμβράνη. Θεωρείται ότι το διάλυμα ουρίας 3M δεν είναι αρκετά ισχυρό ώστε να αποσπάσει μία μεμβρανική πρωτεΐνη από τα λιπίδια. Αντίθετα, το διάλυμα αυτό μπορεί να αποδιατάξει ελαφρώς τα διαλυτά μέρη μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τοξίνη με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή της από τη μεμβράνη στο υπερκείμενο. Συμπερασματικά, η EspF αλληλεπιδρά με τη εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη από την πλευρά της μήτρας, πιθανώς μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Το μονοπάτι εισόδου στη μιτοχονδριακή μήτρα είναι ίσως το πιο μελετημένο μονοπάτι από όλα τα μονοπάτια στόχευσης σε μιτοχόνδρια. Είναι γνωστό ότι συμμετέχει το σύμπλοκο TOM40 στην εξωτερική μεμβράνη, ενώ ο υποδοχέας που κυρίως χρησιμοποιείται από τα υποστρώματα που στοχεύουν τη μήτρα είναι ο Tom20 (Haucke, Lithgow et al. 1995). Αφού περάσουν την εξωτερική μεμβράνη τα υποστρώματα παραλαμβάνονται από το υδατοδιαλυτό τμήμα του καναλιού Tim23 και με τη βοήθεια του διαμεμβρανικού δυναμικού αλλά και της ενέργειας από υδρόλυση του ATP μέσα στη μήτρα, διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη και φτάνουν στη μήτρα όπου και ωριμάζουν. Τα υποστρώματα που στοχεύουν τη μήτρα συχνά φέρουν σηματοδοτική αλληλουχία στο αμινοτελικό τους άκρο, η οποία κόβεται από μία εξειδικευμένη πεπτιδάση της μήτρας, την MPP (Mitochondrial Presequence Peptidase). Ένα τυπικό υπόστρωμα που στοχεύει τη μήτρα είναι η υπομονάδα 9 της συνθάσης του ATP (Subunit 9 - Su9). Η κατασκευή που χρησιμοποιείται παρακάτω περιλαμβάνει μόνο την σηματοδοτική αλληλουχία της Su9, ενωμένη με την πρωτεΐνη DHFR (Dehydrofolate Reductase), η οποία δεν είναι μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αλλά φτάνει στη μήτρα με τη βοήθεια της αλληλουχίας της Su9. Μόλις το ραδιενεργό υπόστρωμα Su9-DHFR φτάσει στην μήτρα πρωτεολύεται από την MPP με αποτέλεσμα να προκύπτει το ώριμο κομμάτι της, που μεταναστεύει χαμηλότερα σε SDS-PAGE. Τα υποστρώματα που εισέρχονται στη μήτρα, μπορούν

να εισαχθούν και όταν παρουσιαστούν σε μιτοπλάστες (MP) και επομένως απευθείας στο σύμπλοκο TIM23, καθώς το διαλυτό τμήμα του δρα ως υποδοχέας για τα αυτά. Δεν μπορούν να εισαχθούν σε μιτοπλάστες που έχουν υποστεί πρωτεόλυση εξωτερικά (shaved mitoplasts – SMP) και από τους οποίους λείπει το διαλυτό τμήμα της Tim23. Ένα τυπικό υπόστρωμα που στοχεύει την εσωτερική μεμβράνη είναι ο μεταφορέας ATP/ADP (ATP/ADP Carrier – AAC). Το υπόστρωμα αυτό εισέρχεται στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου TOM40, αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα του Tom70. Κατόπιν, μεταφέρεται από τις σαπερόνες του διαμεμβρανικού χώρου, και αποδίδεται στο σύμπλοκο TIM22 για ενσωμάτωση στην εσωτερική μεμβράνη. Ένα τέτοιο υπόστρωμα δεν μπορεί να εισαχθεί απευθείας στους μιτοπλάστες, γιατί χρειάζεται τα διαλυτά συστατικά του διαμεμβρανικού χώρου που λείπουν από αυτούς, προκειμένου να αποδοθεί σωστά στο TIM22. Προκειμένου να διαπιστώσουμε το μονοπάτι εισόδου της τοξίνης EspF στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα, πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου ραδιενεργής EspF5Met6His σε μιτοχόνδρια (M) που δεν έχουν υποστεί κανενός είδους κατεργασία, μιτοχόνδρια που έχουν υποστεί τρυψινόλυση εξωτερικά (SM) ώστε να απομακρυνθούν οι εξωτερικοί υποδοχείς των υποστρωμάτων, σε μιτοπλάστες (MP), και σε μιτοπλάστες που έχουν υποστεί τρυψινόλυση εξωτερικά (SMP). Παράλληλα με την τοξίνη, εισάγονται στα μιτοχόνδρια η Su9DHFR και η AAC, σαν μάρτυρες, προκειμένου να συγκριθεί άμεσα η συμπεριφορά της τοξίνης με τα γνωστά υποστρώματα της μήτρας και της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία (εικόνα 52).

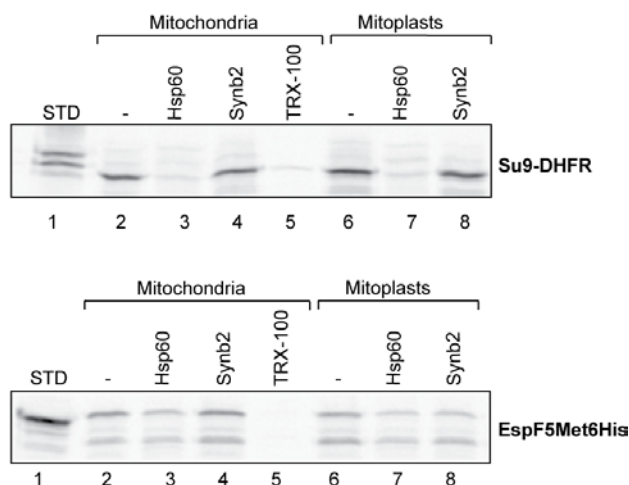


Εικόνα 50 Πείραμα εισόδου ραδιενεργών υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια ή μιτοπλάστες. Είσοδος των ραδιενεργών υποστρωμάτων EspF5Met6His (A), Su9-DHFR (B) και ScAAC2 (C), σε μιτοχόνδρια και μιτοπλάστες που είτε δεν έχουν υποστεί κατεργασία (M και MP αντίστοιχα) είτε έχουν τρυψινολυθεί εξωτερικά (SM και SMP αντίστοιχα). Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

Όπως, είναι γνωστό, η Su9DHFR (εικόνα 52B) δεν μπορεί να εισαχθεί στη μήτρα σε μιτοπλάστες που έχουν υποστεί τρυψινόλυση, ενώ η AAC (εικόνα 52C) δεν εισάγεται μπορεί να εισαχθεί στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όταν παρουσιάζεται απ'ευθείας σε μιτοπλάστες. Η τοξίνη Espf (εικόνα 52A) δεν παρουσιάζει το ίδιο μοτίβο συμπεριφοράς ούτε με την μία ούτε με την άλλη πρωτεΐνη ελέγχου, αλλά

εισέρχεται με ευκολία τόσο σε μιτοχόνδρια όσο και σε μιτοπλάστες, ακόμη και μετά από τρυψινόλυση.

Προκειμένου να μελετηθεί εάν η espF πράγματι χρησιμοποιεί το σύνηθες μονοπάτι στόχευσης στην μήτρα (TIM23) πραγματοποιήθηκε και το παρακάτω πείραμα ανταγωνισμού. Συγκεκριμένα, η είσοδος στα μιτοχόνδρια του σηματοδοτικού πεπτιδίου της mtHsp60, το οποίο είναι γνωστό ότι χρησιμοποιεί το μονοπάτι TIM23, οδηγεί σε αναστολή της ταυτόχρονης εισόδου ραδιενεργού υποστρώματος που χρησιμοποιεί το ίδιο μονοπάτι. Στο πείραμα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο Synb2 (MLSRQQSQRQSRQQSQRQSRYL), το οποίο περιέχει τον ίδιο αριθμό θετικά φορτισμένων αμινοξέων με τις σηματοδοτικές αλληλουχίες των υποστρωμάτων της μήτρας αλλά σε τυχαία σειρά, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να



Εικόνα 51 Πείραμα ανταγωνισμού της εισόδου των ραδιενεργών υποστρωμάτων Su9DHFR και EspF5Met6His σε μιτοχόνδρια και μιτοπλάστες, παρουσία του πεπτιδίου της Hsp60 που εισάγεται στη μήτρα και του τυχαίου πεπτιδίου SynB2 που δεν μπορεί να εισαχθεί. Τα δείγματα αναλύονται σε SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

εισαχθεί στα μιτοχόνδρια, και επομένως να μην αναστέλλει την είσοδο υποστρωμάτων (Allison and Schatz 1986). Το πείραμα ανταγωνισμού της εισόδου πραγματοποιήθηκε τόσο σε μιτοχόνδρια όσο και σε μιτοπλάστες, που όπως φαίνεται στην προηγούμενη εικόνα (εικόνα 52), τόσο η

Su9DHFR όσο και η EspF μπαίνουν κανονικά. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία (εικόνα 53). Όπως φαίνεται, η είσοδος του πρόδρομου μορίου Su9-DHFR αναστέλλεται από το σηματοδοτικό πεπτίδιο της Hsp60, αλλά όχι από το πεπτίδιο SynB2. Η αναστολή αυτή συμβαίνει τόσο σε επίπεδο μιτοχονδρίων όσο και σε επίπεδο μιτοπλαστών (εικόνα 53 σύγκρισε θέσεις 2 με 3-4 και 6 με 7-8 αντίστοιχα). Όταν η τρυψινόλυση μετά την είσοδο του ραδιενεργού μορίου, γίνεται παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100 (TRX-100) τότε όλη η ποσότητα της ραδιενεργούς πρωτεΐνης, εισαγμένη ή μη, αποδομείται από την

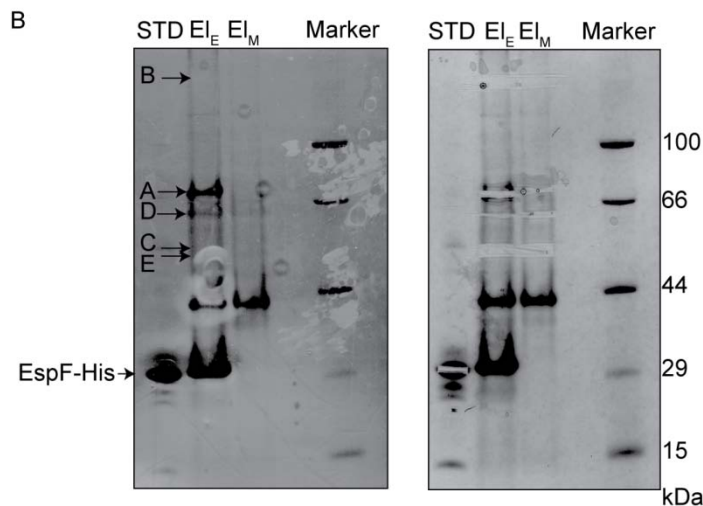
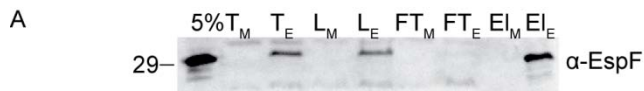
πρωτεάση (θέση 5). Όπως είναι γνωστό οι σηματοδοτικές αλληλουχίες των μορίων που στοχεύουν τη μήτρα (όπως και το πεπτίδιο της Hsp60 που χρησιμοποιείται σε αυτό το πείραμα) αλληλεπιδρούν με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω του υποδοχέα Tom20 (Haucke, Lithgow et al. 1995), και ακολούθως με την εσωτερική μεμβράνη μέσω του διαλυτού τμήματος της Tim23 (Truscott, Kovermann et al. 2001). Στη συνέχεια με τη βοήθεια του διαμεμβρανικού δυναμικού και της ενέργειας από την υδρόλυση του ATP στη μήτρα, τα μόρια αυτά διέρχονται από το κανάλι που σχηματίζει το σύμπλοκο TIM23 και φτάνουν στη μήτρα. Όταν παρουσιάζεται το πεπτίδιο σε ακέραια μιτοχόνδρια, τότε ανταγωνίζεται το ραδιενεργό πρόδρομο μόριο τόσο κατά την πρόσδεση στον υποδοχέα Tom20, όσο και κατά την αναγνώριση από το διαλυτό τμήμα της Tim23 που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο. Αντίστοιχα όταν παρουσιάζεται σε μιτοπλάστες, τότε ο ανταγωνισμός συμβαίνει μόνο σε επίπεδο εσωτερικής μεμβράνης πάνω στο κανάλι Tim23. Παρατηρείται ότι η τοξίνη EspF5Met6His, δεν αναστέλλεται πλήρως από το πεπτίδιο της Hsp60, ούτε όταν παρουσιάζεται σε ακέραια μιτοχόνδρια ούτε όταν παρουσιάζεται σε μιτοπλάστες, σε αντίθεση με την ραδιενεργή Su9DHFR η οποία αναστέλλεται πλήρως και στις δύο περιπτώσεις. Συνοπτικά τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η είσοδος της EspF ακολουθεί μία μάλλον ανορθόδοξη οδό, σε σύγκριση με άλλα υποστρώματα που στοχεύουν τη μήτρα.

### **3.3.5 Ανίχνευση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τοξίνη Espf μετά τη στόχευσή της στη μιτοχονδριακή μήτρα**

Τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν μέχρι τώρα δείχνουν ότι η τοξίνη EspF, με κάποιον ανορθόδοξο τρόπο, εισέρχεται στην μιτοχονδριακή μήτρα όπου αλληλεπιδρά με την εσωτερική μεμβράνη, πιθανώς μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και προκαλεί την ελεγχόμενη απελευθέρωση κυτοχρώματος c. Προκειμένου να διερευνηθεί ο μοριακός μηχανισμός δράσης της τοξίνης του EPEC, ο οποίος οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, πρέπει να ανιχνευθούν οι πιθανές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της τοξίνης μέσα στην μήτρα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πείραμα κατακρήμνισης της τοξίνης EspFHis πάνω σε σφαιρίδια νικελίου, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, η τοξίνη EspFHis επωάζεται με μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η μη εισαγμένη ποσότητα της τοξίνης απομακρύνεται με πρωτεόλυση (20ng/μl). Δείγμα από 50μg μιτοχονδρίων κρατείται ξεχωριστά ως δείγμα του αρχικού υλικού που



υπάρχει πριν τη διαλυτοποίηση ( $T_E$  : total). Αφού ανασταλεί η πρωτεάση (με 3mM PMSF και 1mM Pefabloc), τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά και διαλυτοποιούνται σε διάλυμα A, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Διάλυμα A: 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 20mM HEPES pH7.4). Στο διαλυτό τμήμα τους (υπερκείμενο μετά από υπερφυγοκέντρωση στα 55000g) προστίθενται 20mM ιμιδαζολίου. Και πάλι αφαιρείται υλικό που αντιστοιχεί σε 50μg μιτοχονδρίων σαν δείγμα του υλικού που θα επωαστεί με τα σφαιρίδια ( $L_E$  : loading). Ακολουθεί η επώαση με σφαιρίδια νικελίου για 1 ώρα στους 4°C, με συνεχή, ήπια ανάδευση. Τα σφαιρίδια απομονώνονται με φυγοκέντρωση (4000g, για 30 δευτερά). Το υπερκείμενο αποτελεί το υλικό που δεν προσδέθηκε στα σφαιρίδια και από αυτό φυλάσσεται



Εικόνα 52 Απομόνωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τοξίνη EspFHis. Πείραμα κατακρήμνισης της EspFHis μετά από είσοδό της σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, πάνω σε σφαιρίδια νικελίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Α. Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την τοξίνη α-EspF. Β. Τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και χρώση με Blue Silver. Οι ζώνες που εμφανίζονται στο δείγμα  $E_E$  και όχι στο  $E_M$ , ονοματίζονται (A – E) και αποκόπτονται από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (δεξί πλαίσιο μετά την εκτομή των ζωνών) και αναλύονται με φασματομετρία μάζας (nLC-ESI-MS/MS).

ποσότητα αντίστοιχη με το  $L$ , προκειμένου να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της πρόσδεσης στα σφαιρίδια ( $FT_E$ : Flow Through). Ακολούθως, τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται στο διάλυμα A + 20mM ιμιδαζολίου. Αφού αναδευτούν ήπια για 5 λεπτά, τα σφαιρίδια απομονώνονται ξανά και ξεπλένονται άλλες δύο φορές

σε διάλυμα A + 20mM ιμιδαζολίου, στο οποίο όμως η συγκέντρωση του απορρυπαντικού Triton X-100 μειώθηκε σε 0.1%. Τέλος, η προσδεμένη στα σφαιρίδια EspFHis εκλούεται

με διάλυμα ίδιας σύστασης με το προηγούμενο μόνο που η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου αυξάνεται στα 300mM. Από το διάλυμα έκλυσης, το 1/10 που προκύπτει από διαλυτοποίηση 200μg μιτοχονδρίων ( $E_E$  : eluate) αναλύεται μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα σε SDS-PAGE όπου η τοξίνη ανιχνεύεται με ανοσοαποτύπωση

(εικόνα 54A). Ίση ποσότητα μιτοχονδρίων (2mg), τα οποία δεν επωάζονται με τοξίνη, υφίστανται ακριβώς την ίδια κατεργασία, από την οποία προκύπτουν τα ίδια δείγματα (mock). Σε αυτά τα δείγματα παρακολουθείται η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών στα σφαιρίδια απουσία της τοξίνης ( $T_M$ ,  $L_M$ ,  $E_M$ ). Το υπόλοιπο υλικό έκλουσης αναλύεται με SDS-PAGE και χρώση με διάλυμα Coomassie (Blue Silver) συμβατό με φασματομετρία μάζας (εικόνα 54B). Συγκρίνοντας τις πρωτεΐνες που προσδένονται μη ειδικά στα σφαιρίδια (δείγμα  $E_M$ ), με αυτές που συγκρίνονται ειδικά λόγω παρουσίας της τοξίνης EspHis (δείγμα  $E_E$ ), παρατηρούνται πέντε (5) ζώνες που είναι υποψήφια αλληλεπιδρώντα μόρια με την EspF (Α έως Ε). Οι ζώνες αυτές καθώς και οι αντίστοιχες από τα δείγματα ελέγχου  $E_M$ , εκτέμνονται από το πήκτωμα και υφίστανται τρυψινόλυση μέσα στο πήκτωμα (In gel digestion). Τα πεπτιδία που προκύπτουν εκλούνται από το πήκτωμα και αναλύονται με φασματομετρία μάζας (nLC-ESI-MS-MS/MS), προκειμένου να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη από την οποία προήλθαν. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε στις εγκαταστάσεις πρωτεομικής ανάλυσης του IMBB (Proteomics Facility), από τον Μιχάλη Αϊβαλιώτη. Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων έγινε με τη χρήση 2 διαφορετικών αλγορίθμων (Mascot και Sequest) ενώ θετικά θεωρούνται τα αποτελέσματα που επιβεβαιώνονται και από τους δύο. Έτσι, στη ζώνη Α, η οποία είναι η πιο έντονη απ' όλες, ανιχνεύονται 9 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, εκ των οποίων μόνο οι 3 έχουν το σωστό μοριακό βάρος με βάση το ύψος της ζώνης Α στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Από τις τρεις αυτές πρωτεΐνες μόνο η μία ανιχνεύεται ικανοποιητικά και με τους δύο αλγόριθμους, η σαπερόνη της μιτοχονδριακής μήτρας mtHsp70. Αντίστοιχα, σε κάθε ζώνη ανιχνεύθηκαν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες. Αλλά αυτές που πληρούσαν τα κριτήρια της mtHsp70 βρίσκονταν μόνο στις ζώνες C και E, και ήταν οι υπομονάδες της μιτοχονδριακής πεπτιδάσης MPP (ζώνες C και E) και ο παράγοντας επιμήκυνσης της μετάφρασης, EFTu (ζώνη E). Όπως προαναφέρθηκε η MPP αποκόπτει τις σηματοδοτικές αλληλουχίες από τα πρόδρομα μόρια μόλις αυτά φτάσουν στη μήτρα, ενώ, ο EFTu ελέγχει την ορθότητα των tRNAs που εισέρχονται στη θέση Α του ριβοσώματος μεταφέροντας το αντίστοιχο αμινοξύ. Στην περίπτωση, που ένα λάθος tRNA εισέλθει, ο EFTu με τη βοήθεια υδρόλυσης GTP σε GDP αλλάζει διαμόρφωση, απομακρύνοντας το tRNA και εξασφαλίζοντας την πιστότητα της διαδικασίας. Επομένως από τις πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με την τοξίνη EspF, οι τρεις συμμετέχουν στο μονοπάτι στόχευσης στη μιτοχονδριακή μήτρα (mtHSp70,

MPPa και MPPb) ενώ η μία συμμετέχει στη διαδικασία μεταγραφής των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (EF-Tu).

### 3.3.6 Συζήτηση

Στο παρόν κεφάλαιο της μελέτης αναλύθηκε η είσοδος και επίδραση της τοξίνης EspF, του *Enteropathogenic E. coli*, στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Βρέθηκε ότι η τοξίνη μπορεί να εισάγεται ειδικά σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, με τρόπο που εξαρτάται από το δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, όπου με μικροσκοπία φθορισμού η τοξίνη βρέθηκε να συνεντοπίζεται με τα μιτοχόνδρια από κυτταρικές σειρές HeLa και COS-7 (Nagai, Abe et al. 2005), ή να εντοπίζεται με ανοσοαποτύπωση στο μιτοχονδριακό κλάσμα από κύτταρα HeLa (Nougayrede and Donnemberg 2004). Η επιμόλυνση κυττάρων HeLa με βακτήρια EPEC, οδηγεί σε απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, το οποίο ανιχνεύεται ήδη μετά από 1 ώρα (Nougayrede and Donnemberg 2004). Στο ετερόλογο σύστημα που μελετήθηκε εδώ, διαπιστώθηκε ότι η είσοδος της τοξίνης EspF σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο υπερκείμενο. Μάλιστα, η επώαση της τοξίνης απ' ευθείας με απομονωμένα μιτοχόνδρια έδωσε την δυνατότητα για μια πιο λεπτομερή ανάλυση της κινητικής της απόκρισης αυτής. Διαπιστώθηκε ότι το κυτόχρωμα c αρχίζει να απελευθερώνεται σχεδόν ταυτόχρονα με την είσοδο της τοξίνης, και συγκεκριμένα μετά από ένα λεπτό επώασης και αφού έχουν εισαχθεί μόλις 1,67ng τοξίνης /  $\mu\text{g}$  μιτοχονδίων. Ήδη μετά από 5 λεπτά επώασης η απελευθέρωση κυτοχρώματος σταματάει ενώ ακόμη παραμένει αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης μέσα στα μιτοχόνδρια. Επομένως, η τοξίνη EspF φαίνεται να μην έχει τόσο ισχυρή αποπτωτική επίδραση στα μιτοχόνδρια όσο άλλοι προαποπτωτικοί παράγοντες (για παράδειγμα, η tBid, (Scorrano, Ashiya et al. 2002), αλλά αντίθετα να οδηγεί σε μία περιορισμένη, ελεγχόμενη απελευθέρωση κυτοχρώματος c. Όπως προαναφέρθηκε, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι παράγοντες που εκκρίνονται από το EPEC, μεταξύ των οποίων και η EspF, οδηγούν στην εμφάνιση συμπτωμάτων πρώιμου αποπτωτικού θανάτου (εμφάνιση του μάρτυρα φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνεια του κυττάρου, και τεμαχισμός του πυρηνικού DNA). Εντούτοις, είναι αξιοσημείωτο ότι παρά την ύπαρξη αυτών των προαποπτωτικών σημάτων, η αναλογία αποπτωτικών κυττάρων σε μονοστοιβάδες επιθηλιακών κυττάρων που

επιμολύνονται από EPEC αγρίου τύπου είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη σε κύτταρα που επιμολύνονται από *Salmonella* (Crane, Majumdar et al. 1999). Παράλληλα, χαρακτηριστικά όψιμου κυτταρικού θανάτου όπως συρρίκνωση του κυττάρου, και πυρηνική συμπύκνωση και κατακερματισμός δεν παρατηρούνται σαν αποτελέσματα της επιμόλυνσης με EPEC (Crane, McNamara et al. 2001). Επίσης έχει βρεθεί ότι επιμόλυνση με EPEC προκαλεί και σήματα επιβίωσης στα κύτταρα του ξενιστή. Η πρώτη τέτοια αναφορά έγινε πολύ πρόσφατα, το 2007 από τους (Roxas, Koutsouris et al. 2007), και ακολούθησε άλλη μία (Hemrajani, Berger et al. 2010), στην οποία εντοπίζεται ένας παράγοντας με αντιαποπτωτική δράση (NleH) να ενεργοποιείται μετά από επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με EPEC. Η απόπτωση σαν διαδικασία ρυθμίζεται από μία λεπτή ισορροπία μεταξύ προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών σημάτων. Η περιορισμένη και ελεγχόμενη απελευθέρωση κυτοχρώματος c κατά την είσοδο της EspF στα μιτοχόνδρια, πιθανώς να συμβαίνει στα πλαίσια ενός συντονισμού των κυτταρικών λειτουργιών του ξενιστή με σκοπό την επιβίωση και τον επιτυχή εποίκισμό των βακτηρίων στο εντερικό επιθήλιο.

Η εξάρτηση από το μεμβρανικό δυναμικό υποδεικνύει στόχευση είτε στη μήτρα είτε στην εσωτερική μεμβράνη. Πράγματι, η διάρρηξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με ωσμωτικό σοκ και η πρωτεόλυση εξωτερικά των μιτοπλαστών που προκύπτουν, έδειξε ότι η τοξίνη, προστατεύεται από την πρωτεάση, επομένως σίγουρα δεν έχει εκτεθειμένο κάποιο τμήμα της στο διαμεμβρανικό χώρο. Προκειμένου να διαπιστωθεί η τοπολογία της τοξίνης μέσα στην μήτρα πραγματοποιήθηκαν πειράματα εισόδου της τοξίνης και διαχωρισμού των μιτοχονδρίων σε διαλυτό και μεμβρανικό κλάσμα, υπό διαφορετικές συνθήκες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η τοξίνη δεν είναι διαμεμβρανική, αλλά αντιθέτως εισέρχεται στη μήτρα και παραμένει σε αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη πιθανώς μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Παρότι το αμινοτελικό τμήμα της EspF θεωρείται ότι περιλαμβάνει μία τυπική μιτοχονδριακή σηματοδοτική αλληλουχία, και μάλιστα μεταλλαγές σε φορτισμένα κατάλοιπα στα πλαίσια αυτής αναστέλλουν την είσοδο της στα μιτοχόνδρια (Nagai, Abe et al. 2005), η είσοδος της τοξίνης στο μιτοχόνδριο δεν ακολουθείται από πρωτεολυτική ωρίμανση, όπως συμβαίνει με πολλά πρόδρομα μόρια που στοχεύουν τη μήτρα. Σε προηγούμενη μελέτη έχει θεωρηθεί ότι η ύπαρξη ενός μικρότερου τμήματος της EspF (15KDa) μαζί με

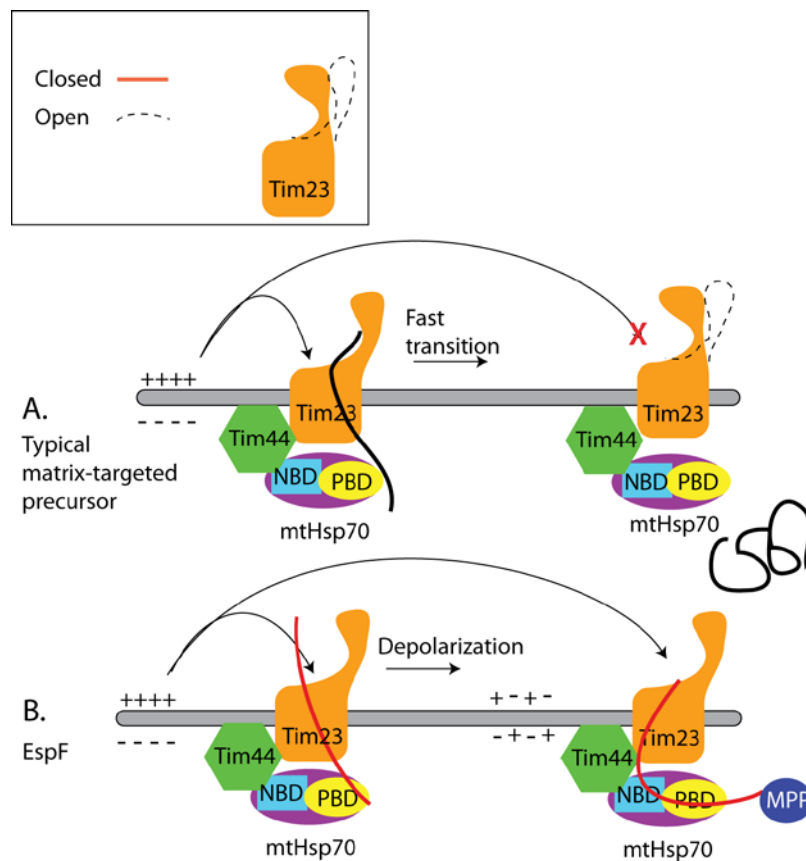
ολόκληρη την πρωτεΐνη (23kDa) στο μιτοχονδριακό κλάσμα των κυττάρων, δείχνει ότι μία τέτοιου είδους ωρίμανση πράγματι συμβαίνει (Nougayrede and Donnenberg 2004). Εντούτοις, είναι γνωστό ότι κατά τη βιογένεση τέτοιων μορίων, μετά την είσοδό τους στο μιτοχόνδριο ανιχνεύεται μόνο η ώριμη «κοντή» μορφή τους, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της Su9DHFR. Η ύπαρξη της μορφής των 15kDa πιθανώς να οφείλεται σε μη ειδική αποδόμηση της πρωτεΐνης που συμβαίνει κατά την κατεργασία των δειγμάτων.

Παράλληλα παρατηρήθηκε ότι η EspF εισέρχεται στα μιτοχόνδρια με έναν ανορθόδοξο τρόπο. Συγκεκριμένα φαίνεται σαν μην χρησιμοποιεί τους γνωστούς υποδοχείς των υποστρωμάτων στην εξωτερική και εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια, όταν συντίθενται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος, ταξιδεύουν μέχρι τους υποδοχείς των μιτοχονδρίων με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών σαπερονών (Komiyama, Sakaguchi et al. 1996). Τα υποστρώματα στη συνέχεια και με την βοήθεια της ενέργειας που εκλύεται από την υδρόλυση ATP, απελευθερώνονται από τις σαπερόνες και αποδίδονται στους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης (Komiyama, Rospert et al. 1997). Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν τις σηματοδοτικές αλληλουχίες πάνω στα πρόδρομα μόρια και τα προσδέουν με προοδευτικά αυξανόμενη συγγένεια (συγγένεια για Tom20 είναι μικρότερη από τη συγγένεια για την διαλυτή περιοχή του Tim23-acid chain hypothesis). Παράλληλα, η πρόσδεση πάνω σε αυτούς τους υποδοχείς αναστέλλεται από περίσσεια σηματοδοτικών πεπτιδίων (Komiyama, Rospert et al. 1998). Το πρόδρομο μόριο Su9DHFR που στοχεύει τη μήτρα παρουσιάζει όλα αυτά τα χαρακτηριστικά (εισάγεται αποτελεσματικότερα σε ακατέργαστους μιτοπλάστες απ' ότι σε μιτοχόνδρια και η είσοδός του αναστέλλεται από περίσσεια του πεπτιδίου της Hsp60). Η πρόσδεση των υποστρωμάτων πάνω στους υποδοχείς αυτούς, εκτός από το ότι δεσμεύει τα υποστρώματα στο μονοπάτι εισόδου, παράλληλα τα διατηρεί σε μια μορφή αποδιαταγμένη και ικανή για εισαγωγή μέσω των εξειδικευμένων καναλιών της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης, παίζοντας το ρόλο σαπερόνης (Mayer, Neupert et al. 1995). Η EspF είναι μία πρωτεΐνη εγγενώς αποδιαταγμένη (natively unfolded) χωρίς κάποια σταθερή δομή. Επομένως, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν χρειάζεται τους υποδοχείς στην εξωτερική και εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προκειμένου να εισαχθεί, πιθανώς να οφείλεται στην ικανότητά της να παραμένει αποδιαταγμένη. Το γεγονός ότι χρειάζεται

λιγότερους παράγοντες για την επιτυχή στόχευσή της την καθιστά ένα ισχυρό και ευέλικτο παράγοντα παθογένειας.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη έγινε μια προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε αλληλεπίδραση με την τοξίνη, αφού αυτή έχει φτάσει στον προορισμό της μέσα στο μιτοχόνδριο. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων αυτών σκοπό έχει να ρίξει φως στον μοριακό μηχανισμό δράσης της EspF. Οι τρεις από τις τέσσερις αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ((mtHsp70, MPPa, MPPb, EF-Tu), μέσω αυτής της αμερόληπτης μεθόδου, συμμετέχουν στο μονοπάτι στόχευσης στη μιτοχονδριακή μήτρα. Το μονοπάτι αυτό ακολουθείται από την τοξίνη EspF προκειμένου να φτάσει εκεί. Η ομόλογη τοξίνη του στελέχους

*Enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC), EspF(U), έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του συνδρόμου Wiskott-Aldrich, nWASP, στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Δομική ανάλυση αυτής της αλληλεπίδρασης έδειξε ότι η τοξίνη αλληλεπιδρά μέσω των μοτίβων προλίνης που περιλαμβάνει, με την περιοχή πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου



Εικόνα 53 Πρωτεινόμενο μοντέλο δράσης της τοξίνης EspF στα μιτοχόνδρια. Α. Ένα τυπικό υπόστρωμα που στοχεύει τη μήτρα διέρχεται γρήγορα μέσω του καναλιού Tim23 με τη βοήθεια της σαπερόνης mtHsp70. Β. Η τοξίνη EspF διέρχεται μέσω του καναλιού Tim23 όμως προσδένεται στο PBD της σαπερόνης mtHsp70, και σταματάει εκεί, «κλειδώνοντας» το κανάλι στην ανοικτή διαμόρφωση. Ακολουθεί γρήγορα η εκπόλωση του δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης (Depolarization), με ό,τι αυτό συνεπάγεται.

GTP (GTP Binding Domain, GBD) της nWASP (Cheng, Skehan et al. 2008). Η πρόσδεση αυτή

μιμείται τον αυτοανασταλτικό τμήμα της nWASP με αποτέλεσμα να εμποδίζει την αυτοαναστολή της πρωτεΐνης και να επάγει τη συνεχή ενεργοποίησή της που οδηγεί στον πολυμερισμό της ακτίνης (Sallee, Rivera et al. 2008). Σε αυτή τη μελέτη, η πιο έντονη ζώνη που κατακρημνίστηκε μαζί με την EspFHis ήταν αυτή της σαπερόνης της μιτοχονδριακής μήτρας mtHsp70. Η σαπερόνη αυτή περιλαμβάνει επίσης ένα τμήμα πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD) όπως και η πρωτεΐνη nWASP. Η EspF μέσω της σηματοδοτικής αλληλουχίας της στο αμινοτελικό άκρο, μπορεί να αλληλεπιδρά με την περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου, PBD (Peptide Binding Domain), πάνω στην mtHsp70. Μόλις, το πρώτο μοτίβο προλίνης φτάσει στη σαπερόνη είναι πιθανό να προσδένεται στο NBD της σαπερόνης, κατ' αντιστοιχία με την πρόσδεση στην nWASP. Η μη λειτουργική αυτή πρόσδεση στην mtHsp70 έχει ως αποτέλεσμα, το υπόστρωμα EspF να παραμένει ενωμένο με την σαπερόνη χωρίς να καταφέρνει να βγει από το κανάλι της Tim23. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το άνοιγμα του καναλιού TIM23 ενεργοποιείται από το μεμβρανικό δυναμικό και την παρουσία του πρόδρομου μορίου (Truscott, Kovermann et al. 2001). Το κανάλι κλείνει γρήγορα με τη βοήθεια της υπομονάδας Tim50, αφού το πρόδρομο μόριο το έχει εγκαταλείψει (Meinecke, Wagner et al. 2006). Το μοντέλο που προτείνεται για τη δράση της τοξίνης είναι ότι η είσοδός της αναστέλλεται στο επίπεδο της mtHsp70, στην οποία προσδένεται, πριν εγκαταλείψει το κανάλι Tim23, με αποτέλεσμα το κανάλι να παραμένει «ανοικτό», για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, οδηγώντας σε διακοπή του ηλεκτροχημικού δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης και ακολούθως σε απελευθέρωση κυτοχρώματος c (εικόνα 55). Οι υπομονάδες της MPP που βρέθηκαν να συγκατακρημνίζονται με την τοξίνη, πιθανώς δρουν πάνω σε αυτό το υπερσύμπλοκο TIM23-EspF-mtHSP70, καθώς η EspF φέρει σηματοδοτική αλληλουχία που μοιάζει με το τυπικό σήμα μιτοχονδριακής στόχευσης (Nagai, Abe et al. 2005) που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση MPP. Εντούτοις, δεν καταφέρνουν να αποκόψουν την σηματοδοτική αλληλουχία από την πρωτεΐνη. Ο EF-Tu είναι ένας παράγοντας επιμήκυνσης της μεταγραφής που επίσης προσδένει GTP και επομένως περιλαμβάνει GBD. Πιθανώς η πρόσδεση σε αυτόν να συμβαίνει επίσης μέσω του GBD τμήματος με συνέπειες στην πιστότητα των νεοσυντιθέμενων πεπτιδικών αλυσίδων των μιτοχονδρίων. Εντούτοις, μία τέτοια επίδραση γίνεται εμφανής πιο μακροπρόθεσμα και δεν μπορεί να εξηγήσει την άμεση απόκριση των απομονωμένων μιτοχονδρίων στην είσοδο της τοξίνης.

Η δομική και ενζυματική φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποστρώματος EspF και της σαπερόνης mtHsp70, πρέπει να καθοριστούν με περαιτέρω πειράματα. Εντούτοις, το προτεινόμενο μοντέλο δράσης της τοξίνης EspF, εφόσον αποδειχθεί, θα αποκαλύψει ένα νέο, έως τώρα άγνωστο μηχανισμό δράσης των παθογόνων βακτηρίων πάνω στα μιτοχόνδρια του ξενιστή. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει τη στόχευση μίας τοξίνης σε ένα από τα σημαντικότερα κανάλια του μιτοχονδρίου, υπεύθυνο για τη βιογένεση της πλειοψηφίας (~70%) των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα το «κλείδωμα» του καναλιού στην ανοιχτή διαμόρφωση, με δραματικές συνέπειες στο δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης και την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 . ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν δύο πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, συντηρημένες στους ανώτερους ευκαρυώτες, που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του οργανισμού. Η πρωτεΐνη Tim12 συμμετέχει στο μονοπάτι εισόδου στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του συμπλόκου TIM22. Πρόκειται για την μόνη πρωτεΐνη από την οικογένεια των μικρών Tim που βρίσκεται περιφερικά προσδεμένη με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, και η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στην εγγενή συνάφεια που έχει για τα λιπίδια της εσωτερικής μεμβράνης, και συγκεκριμένα την καρδιολιπίνη. Παρατηρήθηκε ότι το αμινοτελικό άκρο της Tim12 περιλαμβάνει πληροφορία για τη στόχευση της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο, και συγκεκριμένα για την αλληλεπίδραση με την οξειδάση υποδοχέα Mia40, καθώς και για την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα AAC. Εντούτοις, το αμινοτελικό άκρο δεν είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της πρωτεΐνης, αφού όταν αντικαθίσταται από εναλλακτική αλληλουχία στόχευσης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων η πρωτεΐνη εξακολουθεί να είναι λειτουργική και επομένως τα κύτταρα που την εκφράζουν, επιβιώνουν, αν και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους μειώνεται. Αντίθετα, απαλοιφή του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης ήταν καταστροφική για τη λειτουργία της πρωτεΐνης, αφού τα κύτταρα που έφεραν την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δεν επιβιώνουν. Η λειτουργία που πραγματοποιείται από το καρβοξυτελικό άκρο και καθιστά την Tim12 απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού είναι η ενσωμάτωσή της στα σύμπλοκα 70 και 300kDa πάνω στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η ενσωμάτωση αυτή πιθανώς καθίσταται δυνατή λόγω της αλληλεπίδρασης της Tim12 τόσο με την Tim9 όσο και με τα λιπίδια της εσωτερικής μεμβράνης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η περαιτέρω μελέτη της θέσης της Tim12 στα πλαίσια των συμπλόκων των 70 και 300kDa στα οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχει. Συγκεκριμένα, η στοιχειομετρία των υπομονάδων Tim9, Tim10 και Tim12 στο σύμπλοκο 70kDa είναι σημαντικό να μελετηθεί καθώς θα «ρίξει φως» στον τρόπο λειτουργίας του συμπλόκου και αλληλεπίδρασης μεταξύ των υπομονάδων του και των μορίων του υποστρώματος. Στην παρούσα διατριβή, ανάλυση της κινητικής σχηματισμού των συμπλόκων κατά την είσοδο ραδιενεργής Tim12 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, φαίνεται ότι η ενσωμάτωση στο σύμπλοκο των 70 kDa, προηγείται αυτής στο σύμπλοκο των 300kDa, ενώ παράλληλα δεν εξαρτάται από την

παρουσία υποστρώματος. Εντούτοις, ακόμη και μετά από 1 ώρα επώασης, παραμένει ένα σημαντικός πληθυσμός της πρωτεΐνης στο σύμπλοκο 70kDa, σαν τα δύο σύμπλοκα 70 και 300 kDa να καταλήγουν σε μία ισορροπία. Το ερώτημα που προκύπτει είναι ποιος ακριβώς είναι ο ρόλος του κάθε συμπλόκου κατά την είσοδο του υποστρώματος καθώς και υπό ποιες συνθήκες μεταφέρεται το υπόστρωμα από το ένα στο άλλο. Πραγματοποιείται αυτό με ενσωμάτωση του ενός μέσα στο άλλο; Ποιες μοριακές αλληλεπιδράσεις καθορίζουν αυτήν την ενσωμάτωση;

Στο δεύτερο μέρος αυτής της διατριβής μελετήσαμε την αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών-κλειδιά του μονοπατιού οξειδωτικής αναδίπλωσης που στοχεύει πρωτεΐνες στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη Ern1 αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα μέσω του ευέλικτου αμινοτελικού άκρου του παίρνοντας από αυτό ένα ζευγάρι ηλεκτρονίων. Το αμινοτελικό τμήμα της Ern1, όταν το ζευγάρι κυστεϊνών που φέρει είναι οξειδωμένο, είναι αναγκαίο και ικανό να αλληλεπιδράσει τόσο μη ομοιοπολικά όσο και ομοιοπολικά με το ανηγμένο υπόστρωμα Mia40. Ο ρόλος του καρβοξυτελικού άκρου στην αντίδραση είναι να δρα σε ένα δεύτερο στάδιο επανοξειδώνοντας το αμινοτελικό τμήμα. Έτσι, το ζευγάρι κυστεϊνών του ενεργού κέντρου παραλαμβάνει το ζεύγος ηλεκτρονίων από το ζευγάρι του αμινοτελικού άκρου και το παραδίδει στο μόριο FAD, για να περάσει, στη συνέχεια, σε επόμενους αποδέκτες μέσα στην αναπνευστική αλυσίδα και να καταλήξει στο μοριακό οξυγόνο. Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας επιβεβαιώνουν το μοντέλο που ισχύει για την ομόλογη της Ern1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο, Ern2, και παρέχουν πληροφορίες για τον μοριακό μηχανισμό δράσης πιθανώς και άλλων μελών της οικογένειας των σουλφυδροξειδασών που εξαρτώνται από FAD, Ern.

Αν και τα τελευταία χρόνια έχει προχωρήσει η γνώση μας σχετικά με το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, μερικά πολύ σημαντικά ερωτήματα παραμένουν. Καταρχήν, είναι γνωστό ότι η βασική οξειδάση του μονοπατιού περιλαμβάνει στο ενεργό κέντρο της ένα δισουλφιδικό δεσμό. Εντούτοις, τα υποστρώματα, στην ώριμη, οξειδωμένη μορφή τους, περιλαμβάνουν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Αρχικά προτάθηκε ότι η Ern1, ή κάποια άλλη οξειδάση του διαμεμβρανικού χώρου, πιθανώς να παίζει ρόλο στην εισαγωγή του δεύτερου δισουλφιδικού δεσμού. Εντούτοις, κάτι τέτοιο μέχρι τώρα δεν έχει επιβεβαιωθεί. Κατόπιν προτάθηκε ότι ο δεύτερος δεσμός εισάγεται με τη βοήθεια του μοριακού

οξυγόνου, αφού μετά το σχηματισμό του πρώτου, το επόμενο ζεύγος κυστεϊνών έρχεται σε πολύ στενή γειτνίαση. Εντούτοις, το ερώτημα αυτό παραμένει ανοικτό.

Μια ακόμη ασυμφωνία όσων αφορά τον αριθμό των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται σε κάθε αποδέκτη στα πλαίσια αυτού του μονοπατιού, εμφανίζεται κατά την οξειδοαναγωγική αντίδραση της Ern1 με το κυτόχρωμα c. Συγκεκριμένα, ο συμπαράγοντας FAD που φέρει το μόριο της Ern1 είναι παραλαμβάνει 2 ηλεκτρόνια από το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, ενώ ο επόμενος αποδέκτης στην αλυσίδα, είναι η αίμη του κτοχρώματος c, η οποία μπορεί να φιλοξενήσει μόνο ένα ηλεκτρόνιο τη φορά. Η στοιχειομετρία της αντίδρασης έχει μελετηθεί *in vitro* και είναι 1 : 1. Μένει λοιπόν να αποδειχθεί εάν και *in vivo* ισχύει αυτή η αναλογία και εάν ναι πως εξηγείται αυτή διαφορά στο ισοζύγιο των ηλεκτρονίων κατά την πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης. Πιθανές εξηγήσεις θα μπορούσαν να είναι ότι η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια, σε κάθε ένα από τα οποία μεταφέρεται ένα ηλεκτρόνιο, ή ότι υπάρχει και δεύτερος αποδέκτης των ηλεκτρονίων της Ern1 ταυτόχρονα με το κυτόχρωμα c.

Ο καταλυτικός πυρήνας της Ern1 είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο πρωτεϊνικό τμήμα που υπάρχει σε όλους τους ανώτερους ευκαρυώτες. Παράλληλα είναι γνωστό ότι η ομόλογη της Ern1 στον άνθρωπο, ALR, εντοπίζεται σε πολλά διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, εκτός του μιτοχονδρίου (πυρήνας, κυτταρόπλασμα), ενώ μπορεί να δρα και σαν εκκρινόμενος αυξητικός παράγοντας. Επίσης, είναι γνωστός ο ρόλος της Ern1, και στην ωρίμανση πρωτεϊνών που φέρουν σύμπλοκα σιδήρου/θείου στο κυτταρόπλασμα, και μάλιστα, θεωρείται ότι συμμετέχει στην έξοδο των συμπλόκων αυτών από τη μιτοχονδριακή μήτρα όπου βιοσυντίθενται. Μέχρι στιγμής, το μόνο γνωστό υπόστρωμα της Ern1, είναι η Mia40 και αφορά την μιτοχονδριακή ισομορφή της Ern1 και το ρόλο της στο μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης στο διαμεμβρανικό χώρο. Γίνεται επομένως κατανοητό ότι η εικόνα που έχουμε μέχρι σήμερα γι' αυτήν την πολύ σημαντική πρωτεΐνη, είναι πολύ περιορισμένη σε σχέση με τον πραγματικό ρόλο που πιθανώς αυτή διαδραματίζει στο κύτταρο. Η ανακάλυψη νέων υποστρωμάτων της Ern1 στο μιτοχόνδριο, τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα αλλά και στην επιφάνεια των κυττάρων (όσον αφορά την εκκρινόμενη ισομορφή της), αποτελεί την επόμενη μεγάλη πρόκληση του πεδίου. Ήδη από μη δημοσιευμένα αποτελέσματα συνεργατών μας (Polimeno, Frankavilla, Lisowski) έχει δείχθει η ικανότητα της ανθρώπινης ALR των 15 kDa να αλληλεπιδρά και να οξειδώνει *in*

*in vitro* την πρωτεΐνη STAT3, ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας STAT, που συμμετέχει στη μεταγωγή διαφόρων σημάτων προς τον πυρήνα, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Η STAT3 ενεργοποιείται από κινάσες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, σχηματίζει ομο-ολιγομερή και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση πολλών διαφορετικών γονιδίων-στόχων. Η οξειδωση της STAT3, αλλά και άλλων πιθανών μορίων μεταγωγής σήματος στο ευκαρυωτικό κύτταρο, θα ανοίξει νέους ορίζοντες στους ήδη γνωστούς τρόπους μεταγωγής σημάτων στο κυτταρόπλασμα και των πυρήνα. Η οξειδωση θα μπορούσε να είναι μία ακόμη μέθοδος για την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση πρωτεϊνών-στόχων, ως απόκριση σε κάποιο εξω-ή ενδοκυτταρικό ερέθισμα, όπως έχει δειχθεί μέχρι σήμερα για την φωσφορυλίωση ή την ακετυλίωση. Και η Ern1 μπορεί να αποτελεί ένα πού σημαντικό μόριο ρυθμιστή αυτής της διαδικασίας.

Στο τελευταίο κεφάλαιο αυτής της διατριβής, μελετήθηκε η στόχευση και η δράση μίας βακτηριακής τοξίνης του παθογόνου στελέχους *Enteropathogenic E. coli* - EPEC, της EspF, στο μιτοχόνδριο του ξενιστή. Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι η EspF εκτός από τη δράση που έχει στο κυτταρόπλασμα του επιθηλιακού κυττάρου του εντέρου, που αποτελεί το φυσιολογικό ξενιστή του EPEC, φαίνεται να στοχεύει και τα μιτοχόνδρια και να προκαλεί διακοπή του δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος c. Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, προκειμένου να μελετηθεί το μονοπάτι στόχευσης και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που μεσολαβούν προκειμένου η τοξίνη να πραγματοποιήσει την παθογονική της δράση. Η τοξίνη EspF φαίνεται να εισέρχεται στα απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα με τρόπο που εξαρτάται από το δυναμικό. Η τοξίνη εντοπίστηκε στη μήτρα των μιτοχονδρίων όπου βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με την εσωτερική μεμβράνη, πιθανώς μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η είσοδος της EspF στα μιτοχόνδρια προκαλεί σχεδόν ταυτόχρονη, αλλά περιορισμένη απελευθέρωση κυτοχρώματος c από αυτά. Σε μία προσπάθεια να διαπιστωθεί ο μοριακός μηχανισμός που οδηγεί σε αυτήν την άμεση απόκριση με την είσοδο της τοξίνης στο μιτοχόνδριο, απομονώθηκαν με συγκατακρήμνιση οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τοξίνη αφού αυτή έχει φτάσει στον προορισμό της μέσα στη μήτρα. Ανάλυση των πρωτεϊνών αυτών με φασματομετρία μάζας έδειξε ότι οι τρεις

στις τέσσερις αποτελούν υπομονάδες του μονοπατιού εισόδου στη μήτρα. Το μοντέλο που προτείνουμε για τον μοριακό μηχανισμό δράσης αυτής της τοξίνης στο μιτοχόνδριο είναι ότι προσδένεται για παρατεταμένο διάστημα με την NBD της σαπερόνης mtHsp70 (η οποία ήταν και η πιο άφθονη από τις συγκατακρημιζόμενες πρωτεΐνες), χωρίς να έχει προηγουμένως βγει από το κανάλι TIM23, με αποτέλεσμα τα κανάλια να παραμένει «ανοικτά» για παρατεταμένο χρονικό διάστημα οδηγώντας σε διακοπή του μεμβρανικού δυναμικού.

Το παραπάνω μοντέλο χρίζει επιβεβαίωσης από περαιτέρω πειράματα. Η πειραματική διαδικασία που θα αποδείκνυε ή θα απέρριπτε αυτό το μοντέλο, είναι η *in vitro* ανασύσταση της αντίδρασης μετατόπισης της τοξίνης EspF διαμέσου του καναλιού TIM23 ανασυσταμένου μέσα σε επίπεδη λιπιδική διπλοστοιβάδα (planar lipid bilayer). Η μέτρηση της διαφοράς δυναμικού ανάμεσα στις δύο πλευρές της μεμβράνης και της έντασης του ρεύματος που δημιουργείται όταν παροδικά το κανάλι ανοιγοκλείνει, θα δώσει την απάντηση αναφορικά με το αν η EspF έχει την συμπεριφορά ενός κοινού υποστρώματος του καναλιού ή εάν προκαλεί ραγδαία εκπόλωση της μεμβράνης. Εφόσον επιβεβαιωθεί το παραπάνω μοντέλο περιγράφει μια στρατηγική που δεν έχει αναφερθεί ποτέ ξανά, και αφορά στον επιδέξιο χειρισμό των καναλιών εισόδου στο μιτοχόνδριο, από βακτηριακές τοξίνες, προκειμένου να ελέγξουν το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, με δραματικές συνέπειες στην επιβίωση του κυττάρου-ξενιστή.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adam, A., M. Endres, et al. (1999). "Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria." EMBO J **18**(2): 313-319.
- Allen, S., V. Balabanidou, et al. (2005). "Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c." J Mol Biol **353**(5): 937-944.
- Allen, S., H. Lu, et al. (2003). "Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10." J Biol Chem **278**(40): 38505-38513.
- Allison, D. S. and G. Schatz (1986). "Artificial mitochondrial presequences." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 9011-9015.
- Alto, N. M., A. W. Weflen, et al. (2007). "The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways." J Cell Biol **178**(7): 1265-1278.
- Ang, S. K. and H. Lu (2009). "Deciphering structural and functional roles of individual disulfide bonds of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p." J Biol Chem **284**(42): 28754-28761.
- Baker, M. J., C. T. Webb, et al. (2009). "Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import." Mol Biol Cell **20**(3): 769-779.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (2009). "MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 198-206.
- Bartlett, G. R. (1959). "Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids." J Biol Chem **234**(3): 469-471.
- Baud, C., C. de Marcos-Lousa, et al. (2007). "Molecular interactions of the mitochondrial Tim12 translocase subunit." Protein Pept Lett **14**(6): 597-600.
- Becher, D., J. Kricke, et al. (1999). "A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution." Yeast **15**(12): 1171-1181.
- Becker, T., S. Pfanschmidt, et al. (2008). "Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors." J Biol Chem **283**(1): 120-127.
- Beverly, K. N., M. R. Sawaya, et al. (2008). "The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23." J Mol Biol **382**(5): 1144-1156.
- Bihlmaier, K., N. Mesecke, et al. (2007). "The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain." J Cell Biol **179**(3): 389-395.
- Bohnert, M., N. Pfanner, et al. (2007). "A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins." FEBS Lett **581**(15): 2802-2810.
- Chacinska, A., C. M. Koehler, et al. (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." Cell **138**(4): 628-644.
- Chacinska, A., M. Lind, et al. (2005). "Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17." Cell **120**(6): 817-829.
- Chacinska, A., S. Pfanschmidt, et al. (2004). "Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins." EMBO J **23**(19): 3735-3746.



- Chacinska, A., M. van der Laan, et al. (2010). "Distinct forms of mitochondrial TOM-TIM supercomplexes define signal-dependent states of preprotein sorting." Mol Cell Biol **30**(1): 307-318.
- Chen, H. D. and G. Frankel (2005). "Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis." FEMS Microbiol Rev **29**(1): 83-98.
- Cheng, H. C., B. M. Skehan, et al. (2008). "Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic E. coli effector EspF(U)." Nature **454**(7207): 1009-1013.
- Coppock, D. L. and C. Thorpe (2006). "Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases." Antioxid Redox Signal **8**(3-4): 300-311.
- Crane, J. K., S. Majumdar, et al. (1999). "Host cell death due to enteropathogenic Escherichia coli has features of apoptosis." Infect Immun **67**(5): 2575-2584.
- Crane, J. K., B. P. McNamara, et al. (2001). "Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic Escherichia coli." Cell Microbiol **3**(4): 197-211.
- Curran, S. P., D. Leuenberger, et al. (2002). "The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier." EMBO J **21**(5): 942-953.
- Curran, S. P., D. Leuenberger, et al. (2002). "The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins." J Cell Biol **158**(6): 1017-1027.
- D'Silva, P. R., B. Schilke, et al. (2008). "Interaction of the J-protein heterodimer Pam18/Pam16 of the mitochondrial import motor with the translocon of the inner membrane." Mol Biol Cell **19**(1): 424-432.
- Dabir, D. V., E. P. Leverich, et al. (2007). "A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1." EMBO J **26**(23): 4801-4811.
- Daithankar, V. N., S. R. Farrell, et al. (2009). "Augmenter of liver regeneration: substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space." Biochemistry **48**(22): 4828-4837.
- Daithankar, V. N., S. A. Schaefer, et al. "Structure of the human sulfhydryl oxidase augmenter of liver regeneration and characterization of a human mutation causing an autosomal recessive myopathy." Biochemistry **49**(31): 6737-6745.
- Daum, G., S. M. Gasser, et al. (1982). "Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria." J Biol Chem **257**(21): 13075-13080.
- Davis, A. J., N. N. Alder, et al. (2007). "The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import." Mol Biol Cell **18**(2): 475-486.
- Endo, T., K. Yamano, et al. (2010). "Structural insight into the mitochondrial protein import system." Biochim Biophys Acta.
- Endres, M., W. Neupert, et al. (1999). "Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex." EMBO J **18**(12): 3214-3221.
- Esser, K., B. Tursun, et al. (2002). "A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1." J Mol Biol **323**(5): 835-843.
- Farrell, S. R. and C. Thorpe (2005). "Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity." Biochemistry **44**(5): 1532-1541.

- Fass, D. (2008). "The Erv family of sulfhydryl oxidases." Biochim Biophys Acta **1783**(4): 557-566.
- Gandhi, C. R., R. Kuddus, et al. (1999). "A fresh look at augments of liver regeneration in rats." Hepatology **29**(5): 1435-1445.
- Garmendia, J., G. Frankel, et al. (2005). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation." Infect Immun **73**(5): 2573-2585.
- Gauthier, A., N. A. Thomas, et al. (2003). "Bacterial injection machines." J Biol Chem **278**(28): 25273-25276.
- Geissler, A., A. Chacinska, et al. (2002). "The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel." Cell **111**(4): 507-518.
- Gentle, I. E., A. J. Perry, et al. (2007). "Conserved motifs reveal details of ancestry and structure in the small TIM chaperones of the mitochondrial intermembrane space." Mol Biol Evol **24**(5): 1149-1160.
- Giorda, R., M. Hagiya, et al. (1996). "Analysis of the structure and expression of the augments of liver regeneration (ALR) gene." Mol Med **2**(1): 97-108.
- Glick, B. S. (1991). "Protein import into isolated yeast mitochondria." Methods Cell Biol **34**: 389-399.
- Glick, B. S., A. Brandt, et al. (1992). "Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism." Cell **69**(5): 809-822.
- Glick, B. S. and L. A. Pon (1995). "Isolation of highly purified mitochondria from Saccharomyces cerevisiae." Methods Enzymol **260**: 213-223.
- Gross, E., C. S. Sevier, et al. (2002). "A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p." Nat Struct Biol **9**(1): 61-67.
- Grumbt, B., V. Stroobant, et al. (2007). "Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space." J Biol Chem **282**(52): 37461-37470.
- Guiard, B. (1985). "Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2)." EMBO J **4**(12): 3265-3272.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-1858.
- Hartl, F. U., J. Ostermann, et al. (1987). "Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide." Cell **51**(6): 1027-1037.
- Hauke, V., T. Lithgow, et al. (1995). "The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence." J Biol Chem **270**(10): 5565-5570.
- Heckler, E. J., P. C. Rancy, et al. (2008). "Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases." Biochim Biophys Acta **1783**(4): 567-577.
- Hemrajani, C., C. N. Berger, et al. (2010). "NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic Escherichia coli infection." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3129-3134.
- Herlan, M., F. Vogel, et al. (2003). "Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA." J Biol Chem **278**(30): 27781-27788.

- Hodges, K., N. M. Alto, et al. (2008). "The enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein EspF decreases sodium hydrogen exchanger 3 activity." Cell Microbiol **10**(8): 1735-1745.
- Hofhaus, G., J. E. Lee, et al. (2003). "The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre." Eur J Biochem **270**(7): 1528-1535.
- Hofmann, S., U. Rothbauer, et al. (2005). "Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space." J Mol Biol **353**(3): 517-528.
- Hofmann, S., U. Rothbauer, et al. (2002). "The C66W mutation in the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) affects the formation of functional DDP1.TIM13 complexes in the mitochondrial intermembrane space." J Biol Chem **277**(26): 23287-23293.
- Hoppins, S. C. and F. E. Nargang (2004). "The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes." J Biol Chem **279**(13): 12396-12405.
- Inaba, K. (2009). "Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*." J Biochem **146**(5): 591-597.
- Kadokura, H., F. Katzen, et al. (2003). "Protein disulfide bond formation in prokaryotes." Annu Rev Biochem **72**: 111-135.
- Kenny, B., R. DeVinney, et al. (1997). "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells." Cell **91**(4): 511-520.
- Kispal, G., P. Csere, et al. (1999). "The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins." EMBO J **18**(14): 3981-3989.
- Koehler, C. M., E. Jarosch, et al. (1998). "Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space." Science **279**(5349): 369-373.
- Koehler, C. M. and H. L. Tienson (2009). "Redox regulation of protein folding in the mitochondrial intermembrane space." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 139-145.
- Komiya, T., S. Rospert, et al. (1998). "Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis." EMBO J **17**(14): 3886-3898.
- Komiya, T., S. Rospert, et al. (1997). "Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones." EMBO J **16**(14): 4267-4275.
- Komiya, T., M. Sakaguchi, et al. (1996). "Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria." EMBO J **15**(2): 399-407.
- Kozany, C., D. Mokranjac, et al. (2004). "The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase." Nat Struct Mol Biol **11**(3): 234-241.
- Kutik, S., B. Guiard, et al. (2007). "Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import." J Cell Biol **179**(4): 585-591.
- Kutik, S., D. Stojanovski, et al. (2008). "Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins." Cell **132**(6): 1011-1024.
- Lange, H., T. Lisowsky, et al. (2001). "An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins." EMBO Rep **2**(8): 715-720.

- Lee, J., G. Hofhaus, et al. (2000). "Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase." *FEBS Lett* **477**(1-2): 62-66.
- Levine, M. M., E. J. Bergquist, et al. (1978). "Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive." *Lancet* **1**(8074): 1119-1122.
- Levitan, A., A. Danon, et al. (2004). "Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase." *J Biol Chem* **279**(19): 20002-20008.
- Li, Y., J. Dudek, et al. (2004). "The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18." *J Biol Chem* **279**(36): 38047-38054.
- Li, Y., K. Wei, et al. (2002). "Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription." *Eur J Biochem* **269**(16): 3888-3893.
- Lisowsky, T. (1992). "Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast." *Mol Gen Genet* **232**(1): 58-64.
- Lu, H., S. Allen, et al. (2004). "Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo." *J Biol Chem* **279**(18): 18952-18958.
- Lu, H., A. P. Golovanov, et al. (2004). "The structural basis of the TIM10 chaperone assembly." *J Biol Chem* **279**(18): 18959-18966.
- Marches, O., M. Batchelor, et al. (2006). "EspF of enteropathogenic *Escherichia coli* binds sorting nexin 9." *J Bacteriol* **188**(8): 3110-3115.
- Marom, M., R. Safonov, et al. (2009). "Interaction of the Tim44 C-terminal domain with negatively charged phospholipids." *Biochemistry* **48**(47): 11185-11195.
- Mayer, A., W. Neupert, et al. (1995). "Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding." *Cell* **80**(1): 127-137.
- McBride, H. M., M. Neuspiel, et al. (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse." *Curr Biol* **16**(14): R551-560.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, et al. (1995). "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1664-1668.
- McNamara, B. P., A. Koutsouris, et al. (2001). "Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function." *J Clin Invest* **107**(5): 621-629.
- Meinecke, M., R. Wagner, et al. (2006). "Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane." *Science* **312**(5779): 1523-1526.
- Mesecke, N., N. Terziyska, et al. (2005). "A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import." *Cell* **121**(7): 1059-1069.
- Milenkovic, D., T. Ramming, et al. (2009). "Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria." *Mol Biol Cell* **20**(10): 2530-2539.
- Mokranjac, D., G. Bourenkov, et al. (2006). "Structure and function of Tim14 and Tim16, the J and J-like components of the mitochondrial protein import motor." *EMBO J* **25**(19): 4675-4685.
- Mokranjac, D., M. Sichting, et al. (2009). "Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria." *Mol Biol Cell* **20**(5): 1400-1407.

- Muhlenbein, N., S. Hofmann, et al. (2004). "Organization and function of the small Tim complexes acting along the import pathway of metabolite carriers into mammalian mitochondria." *J Biol Chem* **279**(14): 13540-13546.
- Nagai, T., A. Abe, et al. (2005). "Targeting of enteropathogenic Escherichia coli EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF." *J Biol Chem* **280**(4): 2998-3011.
- Naoe, M., Y. Ohwa, et al. (2004). "Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space." *J Biol Chem* **279**(46): 47815-47821.
- Nougayrede, J. P. and M. S. Sonnenberg (2004). "Enteropathogenic Escherichia coli EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway." *Cell Microbiol* **6**(11): 1097-1111.
- Nougayrede, J. P., G. H. Foster, et al. (2007). "Enteropathogenic Escherichia coli effector EspF interacts with host protein Abcf2." *Cell Microbiol* **9**(3): 680-693.
- Papatheodorou, P., G. Domanska, et al. (2006). "The enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology." *Cell Microbiol* **8**(4): 677-689.
- Popov-Celeketic, D., K. Mapa, et al. (2008). "Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria." *EMBO J* **27**(10): 1469-1480.
- Quitard, S., P. Dean, et al. (2006). "The enteropathogenic Escherichia coli EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting." *Cell Microbiol* **8**(6): 972-981.
- Rissler, M., N. Wiedemann, et al. (2005). "The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins." *J Mol Biol* **353**(3): 485-492.
- Roxas, J. L., A. Koutsouris, et al. (2007). "Enteropathogenic Escherichia coli-induced epidermal growth factor receptor activation contributes to physiological alterations in intestinal epithelial cells." *Infect Immun* **75**(5): 2316-2324.
- Sallee, N. A., G. M. Rivera, et al. (2008). "The pathogen protein EspF(U) hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency." *Nature* **454**(7207): 1005-1008.
- Scorrano, L., M. Ashiya, et al. (2002). "A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis." *Dev Cell* **2**(1): 55-67.
- Senkevich, T. G., C. L. White, et al. (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**(22): 12068-12073.
- Sevier, C. S., J. W. Cuzzo, et al. (2001). "A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation." *Nat Cell Biol* **3**(10): 874-882.
- Sevier, C. S. and C. A. Kaiser (2006). "Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways." *Antioxid Redox Signal* **8**(5-6): 797-811.
- Sideris, D. P., N. Petrakis, et al. (2009). "A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding." *J Cell Biol* **187**(7): 1007-1022.
- Sideris, D. P. and K. Tokatlidis (2007). "Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space." *Mol Microbiol* **65**(5): 1360-1373.

- Sirrenberg, C., M. Endres, et al. (1998). "Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5." Nature **391**(6670): 912-915.
- Slagowski, N. L., R. W. Kramer, et al. (2008). "A functional genomic yeast screen to identify pathogenic bacterial proteins." PLoS Pathog **4**(1): e9.
- Slutsky-Leiderman, O., M. Marom, et al. (2007). "The interplay between components of the mitochondrial protein translocation motor studied using purified components." J Biol Chem **282**(47): 33935-33942.
- Stojanovski, D., B. Guiard, et al. (2007). "Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins." J Cell Biol **179**(5): 881-893.
- Stojanovski, D., D. Milenkovic, et al. (2008). "Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase." J Cell Biol **183**(2): 195-202.
- Terziyska, N., B. Grumbt, et al. (2009). "Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria." J Biol Chem **284**(3): 1353-1363.
- Terziyska, N., T. Lutz, et al. (2005). "Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions." FEBS Lett **579**(1): 179-184.
- Thorpe, C. and D. L. Coppock (2007). "Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family." J Biol Chem **282**(19): 13929-13933.
- Tienon, H. L., D. V. Dabir, et al. (2009). "Reconstitution of the mia40-erv1 oxidative folding pathway for the small tim proteins." Mol Biol Cell **20**(15): 3481-3490.
- Truscott, K. N., P. Kovermann, et al. (2001). "A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23." Nat Struct Biol **8**(12): 1074-1082.
- Tury, A., G. Mairet-Coello, et al. (2005). "Expression of the sulfhydryl oxidase ALR (Augmenter of Liver Regeneration) in adult rat brain." Brain Res **1048**(1-2): 87-97.
- Tzamarias, D. and K. Struhl (1994). "Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex." Nature **369**(6483): 758-761.
- Vallance, B. A. and B. B. Finlay (2000). "Exploitation of host cells by enteropathogenic Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8799-8806.
- van der Laan, M., M. Meinecke, et al. (2007). "Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins." Nat Cell Biol **9**(10): 1152-1159.
- van der Laan, M., M. Rissler, et al. (2006). "Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines." FEMS Yeast Res **6**(6): 849-861.
- van der Laan, M., N. Wiedemann, et al. (2006). "A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria." Curr Biol **16**(22): 2271-2276.
- van Loon, A. P. and G. Schatz (1987). "Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane." EMBO J **6**(8): 2441-2448.

- Vasiljev, A., U. Ahting, et al. (2004). "Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes." Mol Biol Cell **15**(3): 1445-1458.
- Vergnolle, M. A., F. H. Alcock, et al. (2007). "Mutation of conserved charged residues in mitochondrial TIM10 subunits precludes TIM10 complex assembly, but does not abolish growth of yeast cells." J Mol Biol **371**(5): 1315-1324.
- Vergnolle, M. A., C. Baud, et al. (2005). "Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition." J Mol Biol **351**(4): 839-849.
- Verner, K. (1993). "Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view." Trends Biochem Sci **18**(10): 366-371.
- Viswanathan, V. K., S. Lukic, et al. (2004). "Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic *Escherichia coli* secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection." Cell Microbiol **6**(10): 987-997.
- Vitu, E., M. Bentzur, et al. (2006). "Gain of function in an ERV/ALR sulfhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide." J Mol Biol **362**(1): 89-101.
- Walther, D. M., D. Papic, et al. (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**(8): 2531-2536.
- Walther, D. M., D. Rapaport, et al. (2009). "Biogenesis of beta-barrel membrane proteins in bacteria and eukaryotes: evolutionary conservation and divergence." Cell Mol Life Sci **66**(17): 2789-2804.
- Webb, C. T., M. A. Gorman, et al. (2006). "Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller." Mol Cell **21**(1): 123-133.
- Weiss, C., W. Oppliger, et al. (1999). "Domain structure and lipid interaction of recombinant yeast Tim44." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8890-8894.
- Wiedemann, N., N. Pfanner, et al. (2001). "The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria." EMBO J **20**(5): 951-960.
- Wiedemann, N., K. N. Truscott, et al. (2004). "Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway." J Biol Chem **279**(18): 18188-18194.
- Wu, C. K., T. A. Dailey, et al. (2003). "The crystal structure of augments of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase." Protein Sci **12**(5): 1109-1118.
- Wu, Y. and B. Sha (2006). "Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p." Nat Struct Mol Biol **13**(7): 589-593.
- Yamamoto, H., M. Esaki, et al. (2002). "Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes." Cell **111**(4): 519-528.
- Yamano, K., M. Kuroyanagi-Hasegawa, et al. (2008). "Step-size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation." J Biol Chem **283**(40): 27325-27332.
- Young, J. C., V. R. Agashe, et al. (2004). "Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 781-791.

Young, J. C., N. J. Hoogenraad, et al. (2003). "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70." Cell **112**(1): 41-50.

Zara, V., A. Ferramosca, et al. (2009). "Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 and Hsp90." Biochem J **419**(2): 369-375.



## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Εικόνες μιτοχονδρίων.....	10
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας το συμπλόκου της μετατοπάσης Tim23.....	14
Εικόνα 3. Μονοπάτι εισόδου TIM22.....	17
Εικόνα 4. Σύγκριση της κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων Tim8/13 και Tim9/10.....	18
Εικόνα 5. Τα μονοπάτια οξειδωτικής αναδίπλωσης σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα.....	21
Εικόνα 6. Χωροπληροτικό μοντέλο του καταλυτικού πυρήνα της ανθρώπινης Mia40.....	25
Εικόνα 7. Σχηματικό διάγραμμα της δομής ενός μορίου Ern2p .....	27
Εικόνα 8. Σχηματικό διάγραμμα της Ern1 από το <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
Εικόνα 9. Μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης στο μιτοχόνδριο.....	30
Εικόνα 10. Σχηματικό μοντέλου του εκκριτικού συστήματος τύπου 3.....	33
Εικόνα 11. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επιθηλιακών κυττάρων επιμολυσμένων με EPEC.....	34
Εικόνα 12. Πείραμα επίπλευσης μιτοπλαστών.....	49
Εικόνα 13. Πείραμα επίπλευσης μιτοπλαστών.....	49
Εικόνα 14. Συντακτικός τύπος καρδιολιπίνης.....	50
Εικόνα 15. Πείραμα επίπλευσης λιποσωμάτων.....	51
Εικόνα 16. Σχεδιάγραμμα των μεταλλαγμάτων απαλοιφής της Tim12.....	52
Εικόνα 17. Ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών Tim12, 10 και 9.....	52
Εικόνα 18. Test συμπληρωματικότητας <i>in vivo</i> του φαινοτύπου αγρίου τύπου από τα τεσσερα μεταλλάγματα και την αγρίου τύπου Tim12 στο GalErn1.....	53
Εικόνα 19. Πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια.....	54
Εικόνα 20. Πείραμα εισόδου σε μιτοπλάστες.....	55
Εικόνα 21. Test συμπληρωματικότητας <i>in vivo</i> .....	55
Εικόνα 22. Ανάλυση ραδιενεργών συμπλόκων σε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση BN-PAGE.....	56
Εικόνα 23. Ανάλυση ραδιενεργών συμπλόκων σε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση BN-PAGE.....	57

Εικόνα 24. Πείραμα επίπλευσης μιτοπλαστών.....	59
Εικόνα 25. Πείραμα επίπλευσης λιποσωμάτων.....	59
Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης των ακινητοποιημένων πεπτιδίων.....	60
Εικόνα 27. Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με ακινητοποιημένα πεπτίδια της πρωτεΐνης Tim9.....	61
Εικόνα 28. Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με ακινητοποιημένα πεπτίδια της πρωτεΐνης AAC.....	61
Εικόνα 29. Μοντέλο για τη βιογένεση της πρωτεΐνης Tim12.....	66
Εικόνα 30. Μοντέλο του μηχανισμού δράσης της Tim12 κατά τη διάρκεια εισόδου του υποστρώματος AAC.....	66
Εικόνα 31. Θερμοδυναμική ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Ern1 και Mia40.....	70
Εικόνα 32. Αλληλεπίδραση in vitro μεταξύ του ανηγμένου υποστρώματος Mia40, και της Ern1.....	73
Εικόνα 33. Έλεγχος της έκφρασης της Ern1 στο στέλεχος GalErn1.....	74
Εικόνα 34. Έλεγχος της ανάπτυξης του στελέχους σακχαρομύκητα GalErn1.....	74
Εικόνα 35. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της νεοεισερχόμενης Mia40, με την ενδογενή Mia40 και την Ern1.....	75
Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας συμπλήρωσης των μιτοχονδρίων GalErn1 με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Ern1.....	76
Εικόνα 37. Πείραμα εισόδου απομονωμένης πρωτεΐνης Ern1His αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένης σε GalErn1 μιτοχόνδρια.....	76
Εικόνα 38. Έλεγχος της οξειδωτικής κατάστασης της ενδογενούς Mia40.....	77
Εικόνα 39. Πειράματα εισόδου ραδιενεργής Mia40SPC σε GalErn1 μιτοχόνδρια τα οποία έχουν συμπληρωθεί με πρωτεΐνη Ern1His.....	78
Εικόνα 40. Αλληλεπίδραση ραδιενεργού υποστρώματος Mia40SPC προ-εισαγμένα μεταλλάγματα Ern1 σε GalErn1 μιτοχόνδρια.....	80
Εικόνα 41. Χημική πρόσδεση μέσω GA της πρωτεΐνης ΔN72Ern1 in vitro.....	81
Εικόνα 42 Διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών μορίων Ern1 in organello.....	82
Εικόνα 43. Διαμοριακή επικοινωνία μεταξύ των μορίων της Ern1 in vitro.....	84
Εικόνα 44. Πείραμα παγίδευσης ελεύθερων θειολικών ομάδων στο πεπτίδιο N72 της Ern1.....	86

Εικόνα 45 Πείραμα <i>in vitro</i> αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου της Ern1 παρουσία ή απουσία του καταλυτικού πυρήνα της Ern1, με το μερικώς ανηγμένο υπόστρωμα Mia40.....	87
Εικόνα 46. Πείραμα παγίδευσης ελεύθερων θειολικών ομάδων από τον αλκυλιωτικό παράγοντα AMS.....	87
Εικόνα 47 Σχηματική αναπαράσταση της ροής των ηλεκτρονίων από τη ανηγμένη Mia40 ως το κυτόχρωμα c.....	91
Εικόνα 48. Πειράματα εισόδου της τοξίνης EspF, σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.....	94
Εικόνα 49. Απελευθέρωση κυτοχρώματος c κατά την είσοδο Ern1 σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα.....	96
Εικόνα 50. Προσδιορισμός της υπομιτοχονδριακής στόχευσης της τοξίνης EspF5Met6His.....	98
Εικόνα 51. Προσδιορισμός της τοπολογίας της τοξίνης EspF μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα.....	99
Εικόνα 52. Πείραμα εισόδου ραδιενεργών υποστρωμάτων σε μιτοχόνδρια ή μιτοπλάστες.....	101
Εικόνα 53. Πείραμα ανταγωνισμού της εισόδου των ραδιενεργών υποστρωμάτων Su9DHFR και EspF5Met6His σε μιτοχόνδρια.....	102
Εικόνα 54. Απομόνωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τοξίνη EspFHis.....	104
Εικόνα 55. Προτεινόμενο μοντέλο δράσης της τοξίνης EspF στα μιτοχόνδρια.....	109

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

<b>AAC</b>	.....ADT/ATP Carrier
<b>ADP</b>	.....Adenosine di phosphate
<b>ALR</b>	.....Augmenter of liver regeneration
<b>ATP</b>	.....Adenosine tri phosphate
<b>BB</b>	.....Breaking Buffer
<b>BN</b>	.....Blue Native
<b>BSA</b>	.....Bovine Serum Albumin
<b>COX</b>	.....Cytochrome Oxidase
<b>CL</b>	.....Cardiolipin
<b>DHFR</b>	.....Dihydrofolate Reductase
<b>DMSO</b>	.....Dimethyl sulfoxide
<b>DNA</b>	.....Deoxyribose Nucleic Acid
<b>DTT</b>	.....Dithiothreitol
<b>EPEC</b>	..... <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
<b>EspF</b>	.....EPEC secreted protein F
<b>FAD</b>	.....Flavin Adenine Dinucleotide
<b>GST</b>	.....Glutathione S-Transferase
<b>HEPES</b>	.....4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>IM</b>	.....Inner Membrane
<b>IMS</b>	.....Intermebrane space
<b>ITC</b>	.....Isothermal Titration Calorimetry
<b>ITS</b>	.....Intermembrane space Targeting Signal
<b>ScMia40</b>	..... <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mia40
<b>hMia40</b>	.....human Mia40
<b>MISS</b>	.....Mitochondrial Intermembrane space Sorting Signal
<b>MP</b>	.....Mitoplasts
<b>MPP</b>	.....Matrix Presequence Peptidase
<b>NADH</b>	.....Nicotinamide Adenine Dinucleotide
<b>Ni-NTA</b>	.....Nickel- nitrilotriacetic acid
<b>NMR</b>	.....Nuclear Magnetic Resonance
<b>OM</b>	.....Outer Membrane
<b>PAGE</b>	.....Polyaclylamide Gel Electrophoresis
<b>PAM</b>	.....Presequence translocase Associated Motor complex
<b>PCR</b>	.....Polymerase Chain Reaction
<b>PC</b>	.....PhosphatidylCholine
<b>PK</b>	.....Proteinase K
<b>PMSF</b>	.....PhenylMethaneSulphonylFluoride
<b>RT</b>	.....Room Temperature
<b>SAM</b>	.....Sorting and Assembly Machinery
<b>SDS</b>	.....Sodium Docecyl Sulfate
<b>Su9</b>	.....Subunit 9 of the ATP synthase
<b>T3SS</b>	.....Type 3 Secretion System
<b>TCA</b>	.....TriCloroAcetic Acid
<b>TCEP</b>	.....tris(2-carboxyethyl)phosphine
<b>TM</b>	.....Transmembrane domain
<b>TIM</b>	.....Translocase of the Inner Membrane
<b>TOB</b>	.....Topogenesis of Outer membrane beta-Barrel
<b>TOM</b>	.....Translocase of the Outer Membrane

**Tris**.....tris(hydroxymethyl)aminomethane

**WT**..... Wild Type

**NEM**..... N-ethyl maleimide

**DDM** .....dodecyl maltoside

## ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

1. Molecular recognition guiding the electron-transfer process between MIA40 and ALR. Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Kallergi E, Lionaki E, Pozidis C and Kostas Tokatlidis K. Nat Struct Mol Biol, submitted
2. The N-terminal shuttle domain of Erv1 determines the affinity for Mia40 and mediates electron transfer to the catalytic Erv1 core in yeast mitochondria. Lionaki E, Aivaliotis M, Pozidis C and Tokatlidis K. Antioxid Redox Signal, 2010 (in press)
3. The essential function of Tim12 in vivo is ensured by the assembly interactions of its C-terminal domain. Lionaki E, De Marcos Lousa, Baud C, Vougioukalaki M, Panayotou G and Tokatlidis K. J Biol Chem, 283(23), 2008