

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
“ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ”**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ  
*Tim12* ΤΟΥ *Sacharomyces cerevisiae***

**ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ : ΒΟΥΓΙΟΥΚΑΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Κ. ΤΟΚΑΤΛΙΔΗΣ  
ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ : Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	5
ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ.....	7
<i>ΣΙΝΙΑΛΑ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΠΡΟ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....</i>	7
<i>ΕΙΣΟΔΟΣ ΠΡΟ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.....</i>	9
<i>ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΟ – ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ TIM23.....</i>	10
<i>ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΠΟΛΥΤΟΠΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ .....</i>	12
ΟΙ ΜΙΚΡΕΣ TIM ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ .....	15
Η «ΜΙΚΡΗ» Tim12.....	17
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
<b>ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	22
<i>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ Tim12 ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ.....</i>	22
<i>ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ.....</i>	24
<i>ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ .....</i>	24
<i>ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΠΙΠΛΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΑΖΙ ΜΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ .....</i>	25
<i>ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΤΡΥΨΙΝΟΛΥΣΗ ΤΗΣ Tim12 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ.....</i>	26
<b>IN ORGANELLO ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ.....</b>	26
<i>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ .....</i>	26
<i>ΕΙΣΟΔΟΣ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ....</i>	27
<i>ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΙΤΟΠΛΑΣΤΩΝ.....</i>	27
<i>ΕΞΑΓΩΓΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΛΚΑΛΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ.....</i>	28
<i>ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΓΓΕΝΟΥΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ.....</i>	28
<b>IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ.....</b>	29
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>30</b>
<i>ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Tim12 .....</i>	31
<i>IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ.....</i>	32
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΟΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΩΝ Tim12 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ .....</b>	<b>33</b>
<i>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Tim12 ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ.....</i>	34
<i>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Tim12 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ Tim9 .....</i>	36
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Tim12 ΜΕ ΤΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΔΙΠΛΟΣΤΙΒΑΛΑ ....</b>	<b>38</b>
<i>ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ HISTim12 ΜΕ ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΚΥΣΤΙΔΙΑ.....</i>	38
<i>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ HISTim12 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΚΥΣΤΙΔΙΑ .....</i>	40
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ .....</b>	<b>42</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>43</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Tim12 αποτελεί μέλος της οικογένειας των μικρών Tim πρωτεϊνών και βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. Είναι απαραίτητη για τη ζωή του σακχαρομύκητα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη βιογένεση του οργανιδίου. Βρίσκεται περιφερικά προσδεδεμένη στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ως μέλος του συμπλόκου ένθεσης πολυτοπικών μεμβρανικών πρωτεϊνών, TIM22. Δεδομένα συνηγορούν για τη δράση της ως συνδετικού κρίκου μεταξύ του διαλυτού συμπλόκου Tim9/Tim10 - που δρα ως μοριακός συνοδός των υδρόφοβων μεταφερούμενων πρωτεϊνών – και του καναλιού Tim22 – το οποίο τις ενθέτει στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ο ακριβής, όμως, ρόλος της Tim12 κατά την είσοδο και συγκρότηση των προ-πρωτεϊνών στη μεμβράνη παραμένει άγνωστος. Για τον χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης Tim12 του σακχαρομύκητα, μελετήθηκαν μεταλλάγματα έλλειψης περιοχών στα άκρα του πρωτεϊνικού μορίου, ώστε να ταυτοποιηθούν περιοχές σημαντικές για τη βιογένεση ή/και τη λειτουργία του. Τα τέσσερα μεταλλάγματα έλλειψης που δημιουργήθηκαν δεν φαίνεται να επηρεάζουν την είσοδο και υπομιτοχονδριακή στόχευση της Tim12. Το μετάλλαγμα έλλειψης 39 αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο της Tim12 είναι θνησιγόνο, καθώς δεν μπορεί να συμπληρώσει το φαινότυπο έλλειψης της ενδογενούς πρωτεΐνης, ενώ μεταλλάγματα με περισσότερο ακραίες ελλείψεις δεν προκαλούν πρόβλημα στην επιβίωση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, το μετάλλαγμα αυτό φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδραση της Tim12 με την Tim9, σε *in vitro* πειράματα. Σε αντίθεση με τα μεταλλάγματα ακραίων ελλειψεων, πιο εσωτερικές του μορίου ελλείψεις καταργούν την ικανότητα της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες λιποσωμάτων. Η φυσιολογική σημασία, όμως, της ικανότητας αυτής της Tim12 να αλληλεπιδρά με τη λιπιδική διπλοστιβάδα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης δεν είναι ξεκάθαρη. Φαίνεται ότι περιοχές κοντά στα άκρα του πρωτεϊνικού μορίου είναι σημαντικές και μάλιστα η περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο εμφανίζεται απαραίτητη για τη λειτουργία της Tim12.

## **ABSTRACT**

Tim12 is a member of the family of small Tim proteins and resides in the mitochondrial intermembrane space. Tim12 is essential for life and plays a major part in the biogenesis of the organelle. It is peripherally bound to the mitochondrial inner membrane, as a constituent of the polytopic membrane protein insertion complex, TIM22. There is evidence for its role as a link between the soluble chaperone complex Tim9/Tim10 and Tim22 channel - that inserts the pre-proteins in the inner membrane. The exact role, though, of Tim12 during the stages of transport and membrane insertion of pre-proteins is still largely unknown. For the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Tim12, deletion mutants were studied, carrying deletions at amino- and carboxy – termini, in order to identify regions important for the biogenesis and function of the protein. The four deletion mutants that were studied do not seem to affect import and proper sub-mitochondrial localization of Tim12. Deletion of C – terminal 39 amino acids of Tim12 is lethal, as it fails to complement the deletion phenotype of the endogenous protein, while mutants with more extreme terminal deletions do not affect the growth of cells lacking chromosomally expressed Tim12. Furthermore, *in vitro* experiments showed that this mutant appears to affect the interaction between Tim12 and Tim9. In contrast with the deletions at extreme N- and C- termini, deletions involving more internal regions of the protein molecule abolish the ability of Tim12 to interact with liposomal membranes. The physiological relevance of the ability of Tim12 to interact with inner mitochondrial lipid bilayer is not clear. It seems that regions close to both N- and C- termini of Tim12 are necessary and in particular, the one close to C-terminal part is important for protein function.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Για την επιβίωση και σωστή λειτουργία των ευκαρυωτικών κυττάρων σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η οργάνωσή τους σε διαμερίσματα – υποκυτταρικά οργανίδια - κάθε ένα από τα οποία έχει επιφορτιστεί με μια ή περισσότερες, αλλά μοναδικές για το κάθε διαμέρισμα, λειτουργίες. Τα διαμερίσματα αυτά, αποτελούν επιλεγμένα σύνολα πρωτεϊνών που κατά ομάδες εργάζονται για την εκπλήρωση ενός κοινού στόχου. Τα διακριτά αυτά πρωτεϊνικά σύνολα, τα οποία καθορίζουν την ταυτότητα κάθε οργανιδίου, οριοθετούνται και διαχωρίζονται από τα άλλα με τη βοήθεια μίας ή και περισσότερων μεμβρανών.

Το μιτοχόνδριο ως υποκυτταρικό οργανίδιο εμπλέκεται σε μια πληθώρα μεταβολικών και βιοσυνθετικών διεργασιών, όπως η σύνθεση μεταβολιτών, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η τελευταία ευθύνεται και για την ονομασία του ως το ενεργειακό εργοστάσιο του κυττάρου. Στο σύνολό τους, τα μιτοχόνδρια ενός κυττάρου παράγουν το 95% του ATP που χρειάζεται το κύτταρο. Οι πρωτεΐνες που επιτελούν τις σημαντικές για το κύτταρο μιτοχονδριακές λειτουργίες οριοθετούνται με την ύπαρξη διπλής λιπιδικής διλοστιβάδας. Η διπλή αυτή μεμβράνη υποδιαιρεί το ίδιο το οργανίδιο σε τέσσερα διακριτά διαμερίσματα – δύο μεμβρανικά : εξωτερική και εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και δύο υδατικά : διαμεμβρανικός χώρος και μιτοχονδριακή μήτρα.

Ειδοποιός διαφορά των μιτοχονδρίων αναφορικά με άλλα υποκυτταρικά οργανίδια είναι ότι φέρουν το δικό τους γενετικό υλικό (mtDNA), το οποίο εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό κωδικοποιεί για μεταφορικά και ριβοσωμικά RNAs ξεχωριστά για το μιτοχόνδριο, αλλά οι διαδικασίες της αντιγραφής και μεταγραφής του εξαρτώνται από πρωτεΐνες, των οποίων τα γονίδια βρίσκονται στον πυρήνα. Η βιογένεση, λοιπόν, των μιτοχονδρίων βρίσκεται υπό τον έλεγχο δύο γονιδιωμάτων, του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού.

Η συνεισφορά του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στο σύνολο του μιτοχονδριακού πρωτεώματος είναι ιδιαίτερα περιορισμένη και δεν ξεπερνά το 1% του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνών. Λεπτομερής ανάλυση του μιτοχονδριακού πρωτεώματος ανέδειξε ότι τα οργανίδια αυτά περιέχουν περίπου 1000 διαφορετικές πρωτεΐνες (Sickmann et al., 2003). Στην πλειοψηφία τους κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, ενώ μόνο 8 από αυτές εκφράζονται από γονίδια του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού (στον σακχαρομύκητα). Σχεδόν όλες, δηλαδή, οι πρωτεΐνες του οργανιδίου πρέπει να εισέρθουν σε αυτό αφού παραχθούν στο κυτταρόπλασμα. Επιπρόσθετα, καθώς κάθε πρωτεΐνη αναλαμβάνει δράση σε συγκεκριμένο από τα τέσσερα υπο-οργανιδιακά διαμερίσματα, πρέπει να στοχευθεί σωστά στην κατάλληλη θέση.

Οι κατάλληλοι μηχανισμοί για τη μεταφορά αυτών των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον κατάλληλο προορισμό μέσα στα μιτοχόνδρια υπάρχουν τόσο στο μιτοχόνδριο, όσο και στο κυτταρόπλασμα – με την επιστράτευση σαπερονών που μεταφέρουν υπό την προστασία τους τις πρόδρομες, μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στο μιτοχόνδριο (Pfanner and Geissler, 2001; Schnell and Hebert, 2003). Το έργο της εισαγωγή και στόχευσης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στην κατάλληλη θέση τους μέσα στο οργανίδιο έχουν αναλάβει πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα – μετατοπάσες – που σχηματίζουν πόρους στη εξωτερική και την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Endo et al., 2003; Koehler, 2004a; Neupert, 1997; Rehling et al., 2004). Μέχρι σήμερα, έξι πολυ-πρωτεϊνικές μηχανές έχουν γίνει γνωστές. Κάποιες από αυτές ταυτοποιήθηκαν μόλις τα τελευταία έτη και ο αριθμός των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα σύμπλοκα αυτά ολοένα και αυξάνεται.

Αξίζει να σημειωθεί πως η ανάλυση της γενωμικής αλληλουχίας του *Saccharomyces cerevisiae* μέσω συστηματικής απαλοιφής γονιδίων οδήγησε στην αποκάλυψη των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη ζωή του σακχαρομύκητα και την κατηγοριοποίηση αυτών σε ορισμένες λειτουργικές κατηγορίες. Ο αριθμός των πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου που είναι απαραίτητες για τη ζωή είναι πολύ μικρότερος από τον αναμενόμενο και περιλαμβάνει συστατικά μηχανισμών βιογένεσης Fe-S πρωτεϊνών και εισόδου και αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο.

## **ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ**

### **ΣΙΝΙΑΛΑ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΠΡΟ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

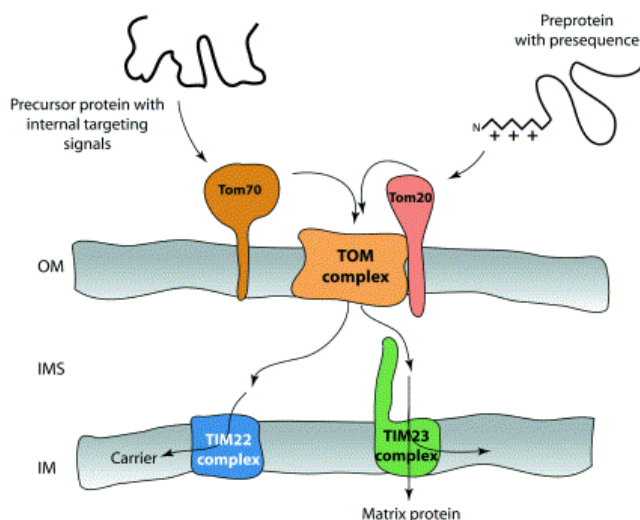
Οι πρόδρομες μορφές των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στοχεύονται στο οργανίδιο μέσω της ύπαρξης σηματοδοτικών αλληλουχιών κατά μήκος της αμινοξικής τους αλυσίδας. Δύο κατηγορίες σηματοδοτικών αλληλουχιών έχουν διακριθεί που οδηγούν τις μιτοχονδριακές προ-πρωτεΐνες στο οργανίδιο : αλληλουχίες σινιάλο στο αμινοτελικό άκρο πρωτεϊνών και αλληλουχίες που βρίσκονται στο εσωτερικό του πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου.

Η πρώτη κατηγορία αφορά τα πρώτα 10 – 80 αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης και χαρακτηρίζονται από αυξημένη πιθανότητα να σχηματίζουν αμφιπαθείς α-έλικες που περιέχουν θετικά φορτισμένα και υδροξυλιμένα αμινοξέα (Abe et al., 2000; Roise et al., 1988; von Heijne, 1986). Τέτοιου είδους σινιάλο χρησιμοποιούν κυρίως πρωτεΐνες που προορίζονται για τη μιτοχονδριακή μήτρα και πολλές που στοχεύονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποκόπτονται

από τις προ-πρωτεΐνες μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας από ειδικές πρωτεάσες της μιτοχονδριακής μήτρας (Matrix Processing Peptidase) (Taylor et al., 2001). Οι πρωτεΐνες με τέτοιες προ-αλληλουχίες – όπως αποκαλούνται - χρησιμοποιούν τη μετατοπίαση της εξωτερικής μεμβράνης (TOM σύμπλοκο) για τη μεταφορά τους διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και το σύμπλοκο μετατόπισης TIM23 για τη μεταφορά τους διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Η δεύτερη κατηγορία σινιάλων στόχευσης δεν είναι τόσο χαρακτηρισμένη όσο η πρώτη και αφορά προ-πρωτεΐνες που δε φέρουν προ-αλληλουχίες. Αντίθετα, για τη στόχευση στο οργανίδιο αναγνωρίζονται διάφορα τμήματα κατά μήκος του πρωτεϊνικού μορίου. Αποτελεί πεδίο έντονης έρευνας η μελέτη και ο χαρακτηρισμός τέτοιων εσωτερικών περιοχών σινιάλων. Μέχρι τώρα υπάρχουν ενδείξεις πως οι αλληλουχίες αυτές δρουν συνεργατικά, όσον αφορά την αναγνώρισή τους και πως αναγνωρίζονται με βάση αλλαγές στη διαμόρφωσή τους και όχι με βάση συγκεκριμένες αμινοξικές αλληλουχίες (de Marcos-Lousa et al., 2006). Πρωτεΐνες με αυτού του είδους τα σήματα στόχευσης είναι πολυτοπικές μεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, όπως για παράδειγμα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών μεταφορέων (εμπλέκονται στη μεταφορά μεταβολιτών) (Nelson et al., 1998). Ένα από αυτά τα μέλη, η AAC (ATP/ADP Carrier), αποτελεί το εκτενέστερα μελετημένο «μοντέλο» μεταφοράς πρόδρομων πρωτεϊνικών μορίων που φέρουν εσωτερικά σινιάλα (Pfanner et al., 1987a) (Vergnolle et al., 2005) και έχει βοηθήσει στον χαρακτηρισμό του μονοπατιού που ακολουθούν τέτοιου είδους προ-πρωτεΐνες κατά την μεταφορά τους εντός του μιτοχονδρίου στην εσωτερική μεμβράνη (Pfanner and Neupert, 1987). Έχει βρεθεί ότι χρησιμοποιούν το σύμπλοκο μετατόπισης TOM για την είσοδό τους διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης, αλλά ο δρόμος που ακολουθούν διαφοροποιείται κατά την στόχευσή τους στην εσωτερική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν το σύμπλοκο TIM22, το οποίο δρα για την ένθεσή τους στη λιπιδική διπλοστιβάδα.

**ΕΙΚΟΝΑ 1** Δύο κατηγορίες σινιάλων στόχευσης πρόδρομων πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο. Μετά τη διέλευση μέσα από το σύμπλοκο TOM και την εξωτερική μεμβράνη, οι προ-πρωτεΐνες με αμινοτελικό πεπτίδιο σινιάλο μεταφέρονται διαμέσω της εσωτερικής μεμβράνης μέσω του συμπλόκου TIM23, ενώ αυτές με εσωτερικές περιοχές σινιάλο μεταφέρονται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω της TIM22 μετατοπίασης. IMS: InterMembrane Space (Rehling et al., 2003)





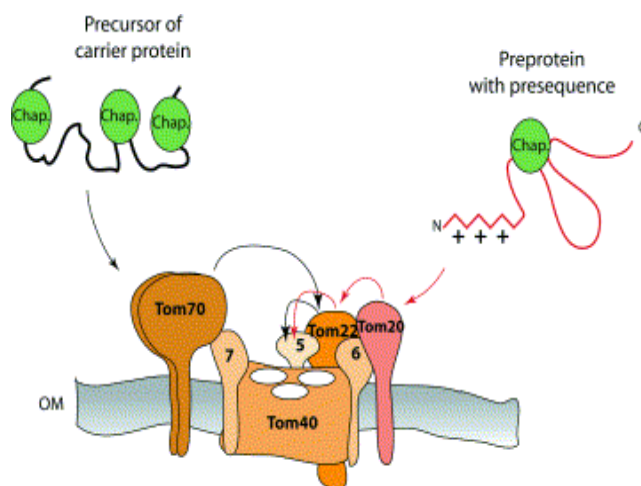
## ΕΙΣΟΔΟΣ ΠΡΟ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Όπως αναφέρθηκε, τα διαφορετικά σινιάλα που μπορεί να φέρει κάποια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αναγνωρίζονται από συστατικά του συμπλόκου TOM, που βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του συμπλόκου έχουν ταυτοποιηθεί ως υποδοχείς και έχουν χαρακτηριστεί αναφορικά με την εξειδίκευση στην αναγνώριση των προς μεταφορά υποστρωμάτων, οι Tom20 (Ramage et al., 1993; Sollner et al., 1989), Tom22 (Kiebler et al., 1993; Lithgow et al., 1994; Nakai and Endo, 1995) και Tom70 (Hase et al., 1984; Hase et al., 1983; Hines et al., 1990; Sadler et al., 1984; Sollner et al., 1990; Steger et al., 1990).

Οι Tom20 και Tom70 θεωρούνται ότι είναι οι πρωταρχικοί υποδοχείς για τα δύο είδη πρόδρομων πρωτεϊνών (με προ-αλληλουχία και μη). Πρόδρομες πρωτεΐνες με προ-αλληλουχία δεσμεύονται αρχικά στην Tom20 μέσω του υδρόφοβου τμήματος της έλικας του πεπτιδίου σινιάλου. Έπειτα, η Tom22 δρα ως δεύτερος υποδοχέας για τις πρωτεΐνες αυτές. Αντίθετα, πρωτεΐνες με εσωτερικά σινιάλα αναγνωρίζονται αρχικά από την Tom70 και έπειτα μεταφέρονται στην Tom22 (van Wilpe et al., 1999). Οι υποδοχείς αυτοί, μεταφέρουν τις προ-πρωτεΐνες στο κανάλι μετατόπισης του συμπλόκου TOM διαμέσω του οποίου οι προ-πρωτεΐνες περνούν την εξωτερική μεμβράνη. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Tom40 σχηματίζει το κανάλι, γνωστό ως γενικός πόρος εισόδου (**general import pore, GIP**) (Ahting et al., 1999; Hill et al., 1998). Επιπρόσθετα, οι μικρές Tom πρωτεΐνες : Tom5, Tom6 και Tom7 έχουν βρεθεί να είναι ισχυρά προσδεδεμένες στην Tom40 (Dietmeier et al., 1997; Honlinger et al., 1996). Οι Tom40, Tom22, μαζί με τις μικρές Tom πρωτεΐνες σχηματίζουν το κύριο σύμπλοκο του γενικού πόρου εισόδου της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ οι Tom20 και Tom70 είναι ασθενέστερα προσδεδεμένοι με το παραπάνω κύριο σύμπλοκο (Ahting et al., 1999; Dekker et al., 1998; Kunkele et al., 1998; Meisinger et al., 2001).

Ηλεκτρονική μικρογραφική ανάλυση έδειξε πως το παραπάνω σύμπλοκο σχηματίζει δύο με τρεις πόρους διαμέτρου περίπου 22Å , ο κάθε ένας (Ahting et al., 1999; Kunkele et al., 1998; Model et al., 2002). Η ανάλυση αυτή συμφωνεί με προηγούμενα δεδομένα από ηλεκροφυσιολογικές μελέτες (Hill et al., 1998). Με βάση το μέγεθος του πόρου, το οποίο δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς πρωτεϊνικού τμήματος αποτελούμενο από μέχρι δύο α-έλικες, συμπεραίνεται ότι οι προ-πρωτεΐνες μεταφέρονται από το κανάλι ως μη αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες - πρωτεΐνες με προ-αλληλουχία - ή σε διαμόρφωση θηλιάς - πρωτεΐνες με εσωτερικά σηματοδοτικά τμήματα (Eilers and Schatz, 1986; Rassow et al., 1990; Wiedemann et al., 2001).

Για τη μεταφορά όλων των υπολοίπων μιτοχονδριακών προ-πρωτεϊνών το σύμπλοκο TOM συνεργάζεται με άλλες μιτοχονδριακές μετατοπίσεις. Για παράδειγμα, το σύμπλοκο TOB (Topogenesis of the Outer Membrane) ή το σύμπλοκο SAM (Sorting and Assembly Machinery) μεσολαβεί – σε συνεργασία πάντα με το σύμπλοκο TOM για την είσοδο, την ενσωμάτωση και τη σωστή συγκρότηση των β – κυλινδρικών (β – barrel) πρωτεϊνών (Paschen et al., 2003; Pfanner et al., 2004).



**ΕΙΚΟΝΑ 2** Είσοδος προ-πρωτεϊνών μέσω του συμπλόκου TOM της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα διαφορετικά σινιάλα στόχευσης αναγνωρίζονται από διαφορετικές πρωτεΐνες – υποδοχείς του συμπλόκου. Η Tom40 σχηματίζει τον πόρο μεταφοράς. (Rehling et al., 2003)

## ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΟ – ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ TIM23

Αφού περάσου το σύμπλοκο TOM, οι προ-πρωτεΐνες που φέρουν αμινοτελικό σινιάλο στόχευσης οδηγούνται στο σύμπλοκο TIM23 (**presequence translocase**). Τα συστατικά του συμπλόκου μετατόπισης TIM23 μπορεί να διακριθούν δομικά και λειτουργικά σε αυτά που σχηματίζουν το διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό κανάλι και σε αυτά που αποτελούν τη «μηχανή» μετατόπισης. Τα τελευταία εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή μήτρα και απαιτούνται για την ολοκλήρωση της μεταφοράς των προ – πρωτεϊνών μέσα στη μήτρα.

Τα γνωστά πρωτεϊνικά συστατικά του συμπλόκου που είναι ενσωματωμένα στη μεμβράνη είναι οι Tim17, Tim21, Tim23, Tim50. Η «μηχανή» μετατόπισης αποτελείται από τουλάχιστον πέντε πρωτεΐνες : Tim14, Tim16, Tim44, Mge1 και mtHsp70.

Το ενσωματωμένο στη μεμβράνη τμήμα του συμπλόκου Tim23 φέρει υποδοχείς που αναγνωρίζουν τις πρόδρομες πρωτεΐνες, καθώς αυτές εμφανίζονται στην «έξοδο» του συμπλόκου TOM και τις μεταφέρουν στο κανάλι μετατόπισης

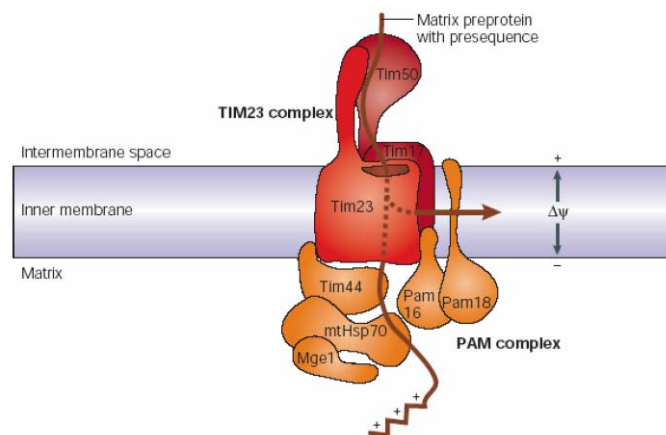
Tim23. Η πρωτεΐνη Tim50 είναι η πρώτη που έρχεται σε επαφή με τα προς μεταφορά υποστρώματα (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Βρίσκεται «αγκυροβολημένη» στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω ενός διαμεμβρανικού τμήματος, με το καρβοξυτελικό τμήμα της να εκτίθεται στο διαμεμβρανικό χώρο. Αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης θεωρείται υπεύθυνο για τη δέσμευση των προς μεταφορά υποστρωμάτων και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την Tim23 (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η Tim50, αλληλεπιδρώντας με την Tim23 επάγει το κλείσιμο του πόρου και διατηρεί το φράγμα στη διαπερατότητα της εσωτερικής μεμβράνης, γεγονός αναγκαίο για τη διατήρηση του μεμβρανικού δυναμικού και τη φυσιολογική λειτουργία του μιτοχονδρίου (Meinecke et al., 2006).

Η ακριβής μοριακή φύση του καναλιού μετατόπισης του συμπλόκου TIM23 παραμένει, έως σήμερα, άγνωστη. Δύο πρωτεΐνες έχουν βρεθεί και προταθεί να αποτελούν τα κύρια συστατικά του καναλιού : οι Tim23 και Tim17. Είναι και οι δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες με τέσσερις πιθανές διαμεμβρανικές έλικες και σχηματίζουν σύμπλοκο 90kDa (Bauer et al., 1996; Dekker et al., 1997). Έρευνες έχουν δείξει ότι η Tim23 μόνη της μπορεί να σχηματίσει πόρο διαμέτρου  $\sim 13\text{\AA}$  στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω του οποίου μπορούν να περάσουν προ-πρωτεΐνες (Truscott et al., 2001). Υπεύθυνο για την αναγνώριση των υποστρωμάτων που θα μεταφερθούν είναι η εκτιθέμενη στον διαμεμβρανικό χώρο αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία επιπρόσθετα θεωρείται ότι μεσολαβεί στο διμερισμό της Tim23 απουσία υποστρώματος (Bauer et al., 1996; Komiyama et al., 1998).

Το μεμβρανικό δυναμικό δημιουργεί ένα ηλεκτροφορητικό φαινόμενο στην θετικά φορτισμένη αλληλουχία σινιάλο, αλλά η δράση του φαίνεται να περιορίζεται μόνο σε αυτήν (Martin et al., 1991; Pfanner and Neupert, 1985). Επιπρόσθετες δυνάμεις χρειάζεται να ενεργήσουν για την ολοκλήρωση της μεταφοράς ενός πρωτεϊνικού υποστρώματος. Οι προ-πρωτεΐνες που φέρουν μία διαμεμβρανική περιοχή αμέσως μετά το αμινοελικό σινιάλο στόχευσης μπορούν να στοχευθούν στην εσωτερική μεμβράνη χωρίς την βοήθεια της «μηχανής» μετατόπισης του συμπλόκου. Η «μηχανή» μετατόπισης του συμπλόκου χρησιμοποιεί την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για την ολοκλήρωση της μεταφοράς των υποστρωμάτων στη μιτοχονδριακή μήτρα. Οι Tim44 και mtHsp70 είναι τα δύο απαραίτητα πρωτεϊνικά συστατικά που βοηθούν στην ολοκλήρωση της διαδικασίας μετατόπισης (Herrmann and Neupert, 2000; Neupert and Brunner, 2002; Voos et al., 1999). Η πρώτη είναι περιφερική της μεμβράνης πρωτεΐνη και αποτελεί την «άγκυρα» της δεύτερης στη μεμβράνη (Kronidou et al., 1994; Rassow et al., 1994; Schneider et al., 1994). Η mtHsp70 δεσμεύει μη αναδιπλωμένες περιοχές της μεταφερούμενης προπρωτεΐνης καθώς εμφανίζεται στην έξοδο του πόρου, από την πλευρά της μήτρας (Kang et al.,

1990; Scherer et al., 1990). Η mtHsp70 αποτελεί τον πυρήνα του συμπλόκου PAM (**Presequence – translocase – Associated import Motor**). Στο σύμπλοκο PAM (mHsp70, Tim44, Mge1, Pam18/Tim14, Pam16), η Pam18 ενεργοποιεί τη δραστηριότητα ATPάσης της mtHsp70 (Truscott et al., 2003), η Mge1 αποτελεί τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίου (Dekker and Pfanner, 1997; Schneider, 1996; Westermann et al., 1995), ενώ η Pam16 ρυθμίζει τη λειτουργία της Pam18 (Frazier et al., 2004).

Έχουν προταθεί δυο μοντέλα, όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο μεταφέρει η mtHsp70 τις πρωτεΐνες υποστρώματα. Το ένα, “Brownian ratchet model”, υποστηρίζει ότι η δέσμευση της προ-πρωτεΐνης στην mtHsp70 έχει ως συνέπεια την απόδοση κατεύθυνσης – προς τη μήτρα - στην Brownian κίνηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Gaume et al., 1998; Okamoto et al., 2002; Ungermann et al., 1994). Το δεύτερο – translocation motor model – υποστηρίζει ότι η ενέργεια της υδρόλυσης του ATP από την mtHsp70 «τραβάει» την πολυπεπτιδική αλυσίδα από τη μεμβράνη (Horst et al., 1996; von Ahlsen et al., 1995). Τα δύο παραπάνω μοντέλα δεν αλληλοαποκλείονται και κατά πάσα πιθανότητα συμβάλλουν από κοινού για την μεταφορά και την εκδίπλωση των προ-πρωτεϊνών.



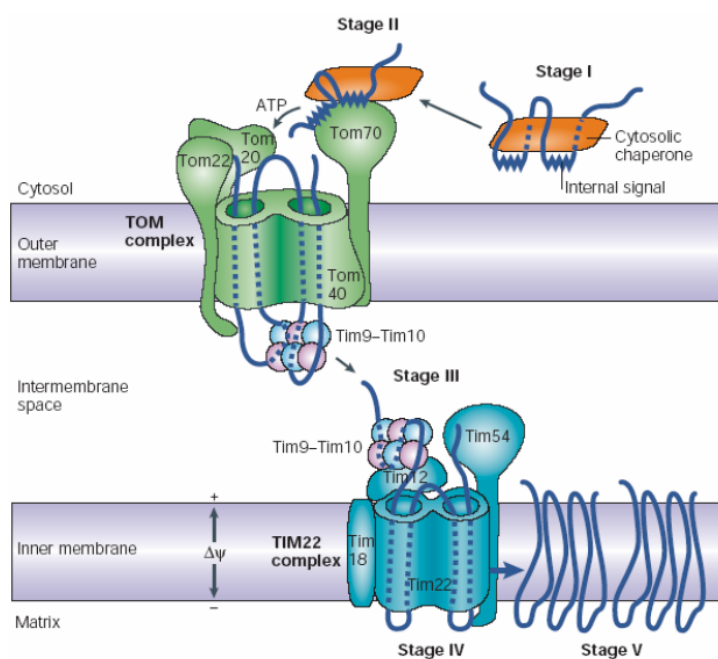
**ΕΙΚΟΝΑ 3 Το κανάλι Tim23 και το σύμπλοκο PAM συμμετέχουν στην είσοδο πρωτεϊνών που εντοπίζονται στη μιτοχονδρική μήτρα (Rehling et al., 2004)**

## **ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΠΟΛΥΤΟΠΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ**

Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης που φέρουν πολλές διαμεμβρανικές περιοχές χρησιμοποιούν διαφορετικό μονοπάτι για την στόχευσή και συγκρότησή τους στη μεμβράνη. Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν εσωτερικά σινιάλα μιτοχονδριακής στόχευσης. Η μεταφορά πρωτεϊνών με πολλές

διαμεμβρανικές περιοχές είναι μια ιδιαίτερα απαιτητική διαδικασία για το κύτταρο. Τα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης πρέπει να προστατευτούν από το υδατικό περιβάλλον, κατά τη μεταφορά τους, έτι ώστε να μη δημιουργήσουν συσσωματώματα. Για το σκοπό αυτό επιστρατεύονται ειδικές σαπερόνες (Dekker et al., 1996; Hachiya et al., 1993; Hachiya et al., 1995; Komiyama et al., 1997; Zimmermann and Neupert, 1980).

Η πρωτεΐνη που έχει αναλυθεί εκτενέστερα, όσον αφορά το μονοπάτι στόχευσής της στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι ο μεταφορέας νουκλεοτιδίων AAC (ATP/ADP Carrier). Η AAC είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη πολυτοπική πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης. Η βιοχημική ανάλυση της μεταφοράς της AAC *in vitro* αποκάλυψε έναν αριθμό από διαδοχικά στάδια κατά το μονοπάτι προς και μέσα στην μιτοχονδριακή μεμβράνη (Pfaller et al., 1988; Pfanner and Neupert, 1987; Pfanner et al., 1987b; Rassow and Pfanner, 1991), τα οποία συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα.



**ΕΙΚΟΝΑ 4 Στάδια μεταφοράς πρόδρομων μεταφορέων στο μιτοχόνδριο.** Πέντε στάδια έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά. Στάδιο I : μεταφορά των προ-πρωτεϊνών με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών σαπερονών. Στάδιο II: δέσμευση προ-πρωτεϊνών στους κατάλληλους υποδοχείς της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στάδιο III: ATP – εξαρτώμενη αποδέσμευση από τους υποδοχείς και είσοδος στον γενικό πόρο εισόδου. Στάδιο IV: εξαρτώμενη από το μεμβρανικό δυναμικό μεταφορά της προ-πρωτεΐνης από την εξωτερική στην εσωτερική μεμβράνη (βοήθεια ειδικευμένων σαπερονών του διαμεμβρανικού χώρου) και ένθεση στην εσωτερική μεμβράνη. Στάδιο V: συγκρότηση του πρόδρομου μορίου σε διμερές στην εσωτερική μεμβράνη.(Rehling et al., 2004)

Οι προ-πρωτεΐνες που φέρουν εσωτερικά σινιάλα στόχευσης εισέρχονται στο μιτοχόνδριο μέσω του TOM συμπλόκου, αναγνωριζόμενες από το κυτταροπλασματικό τμήμα της Tom70 (Hines et al., 1990; Schlossmann et al., 1994; Sollner et al., 1990; Sollner et al., 1992). Φαίνεται πως εκτός από την Tom70 και η Tom20 είναι ικανή να αναγνωρίσει πρωτεΐνες της οικογένειας των μεταφορέων (Steger et al., 1990). Μετά το αρχικό πέρασμα μέσα από το κανάλι Tom40 και καθώς εμφανίζεται τον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, το πρόδρομο μόριο παραλαμβάνεται από δύο διαλυτές πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού διαμερίσματος, οι οποίες σχηματίζοντας σύμπλοκο δρουν ως σαπερόνες για την μεταφορά της προ-πρωτεΐνης. Οι Tim9 και Tim10 είναι και οι δύο απαραίτες για τη ζωή πρωτεΐνης. Στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου συγκροτούνται μαζί σε ένα εξαμερές σύμπλοκο – σύμπλοκο TIM10 – το οποίο δεσμεύει τα υδρόφοβα τμήματα των προ-πρωτεϊνών (Koehler et al., 1998b) και τα προστατεύει κατά τη μεταφορά τους προς το σύμπλοκο TIM22 (Curran et al., 2002), το κανάλι μέσα από το οποίο θα περάσουν και θα εμποδωθούν στη μεμβράνη. Μάλιστα, το σύμπλοκο TIM10 φαίνεται απαραίτητο και για την ελευθέρωση της μεταφερούμενης προ-πρωτεΐνης από το κανάλι της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, δηλαδή διαδραματίζει ενεργό ρόλο κατά τη μεταφορά (Truscott et al., 2002).

Το σύμπλοκο ένθεσης στη μεμβράνη, TIM22, αποτελείται από τις : Tim12, Tim22, Tim54 και Tim18, οι οποίες συγκροτούνται σε ένα σύμπλοκο 300kDa στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η πρωτεΐνη Tim12 παρουσιάζει σημαντική ομολογία με τις Tim9 και Tim10, αλλά είναι περιφερικά συνδεδεμένη με τη μεμβράνη και θεωρείται υπεύθυνη για τον παρατηρούμενο μεμβρανικό εντοπισμό του συμπλόκου TIM10, ως το συστατικό που μεσολαβεί για την «παράδοση» της προ-πρωτεΐνης στο σύμπλοκο ένθεσης (Adam et al., 1999b; Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1998).

Για τις Tim18 και Tim54 λίγα είναι γνωστά, αναφορικά με τη δράση τους ως μέλη του συμπλόκου ένθεσης. Η πρώτη εμφανίζεται επουσιώδης για το κύτταρο (Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000), ενώ η έλλειψη της δεύτερης – χωρίς να είναι θνησιγόνος - προκαλεί σοβαρά προβλήματα κατά την ανάπτυξη των κυττάρων (Kovermann et al., 2002).

Η πρωτεΐνη Tim22 είναι αυτή που σχηματίζει το κανάλι εισόδου και ένθεσης των μεταφερούμενων πρωτεϊνικών μορίων (Kovermann et al., 2002; Sirrenberg et al., 1996). Η Tim22 σχηματίζει ένα κανάλι με διακριτές καταστάσεις αγωγιμότητας, εμφανίζοντας πόρους μεγέθους μεταξύ 11.5 και 18Å. Ο πόρος μεγάλου μεγέθους θεωρείται ότι μπορεί να μεταφέρει μέχρι και δύο α-έλικες, ενώ ο μικρότερης διαμέτρου πόρος ίσως είναι χρήσιμος για την πλευρικά του καναλιού απελευθέρωση του μεταφερούμενου τμήματος μέσα στη λιπδική διπλοστιβάδα. Για την μέγιστη

ενεργοποίηση του Tim22 καναλιού *in vitro* απαιτείται η ύπαρξη υψηλού μεμβρανικού δυναμικού, το οποίο αποτελεί και τη μόνη εξωτερική δύναμη που κινεί τη διαδικασία της μεταφοράς (Pfanner et al., 1987b; Wachter et al., 1992).

Αξίζει να αναφερθεί ότι το σύμπλοκο ένθεσης TIM22 είναι μοναδικό μεταξύ των διαφόρων γνωστών κυτταρικών «μηχανών» μετατόπισης πρωτεϊνών, καθώς λειτουργεί αποκλειστικά για την μεταφορά πρωτεϊνών που ενσωματώνονται στη μεμβράνη.

## ΟΙ ΜΙΚΡΕΣ Tim ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

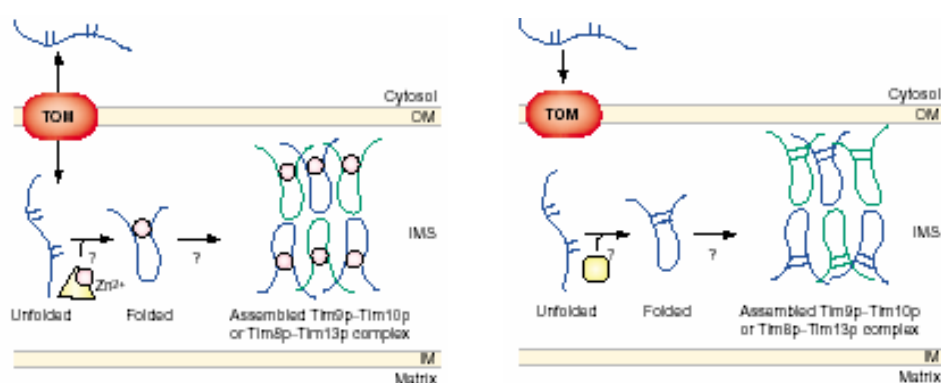
Οι μικρές Tim πρωτεΐνες βρίσκονται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται σε συνεργασία με το σύμπλοκο TIM22, συμμετέχοντας στη βιογένεση των πολυτοπικών πρωτεϊνών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν επίσης στη βιογένεση των συμπλόκων μετατόπισης της εσωτερικής μεμβράνης, Tim23 και Tim22 (Rehling et al., 2004). Η σημασία τους κατά το μονοπάτι συζητήθηκε παραπάνω.

Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μοριακό βάρος περίπου 10kDa και είναι συντηρημένες από το σακχαρομύκητα έως τον άνθρωπο (Koehler, 2000). Στον σακχαρομύκητα, η οικογένεια των μικρών Tim περιλαμβάνει 5 μέλη: τις Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 και Tim13 (ο αριθμός υποδεικνύει κατά προσέγγιση το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης). Σε άλλους οργανισμούς η σύσταση αυτή διαφοροποιείται.

Οι μικρές Tim είναι κατα ~25% πανομοιότυπες και κατά 40-50% παρόμοιες. Η Tim9 αλληλεπιδρά με την Tim10 και η Tim8 αλληλεπιδρά με την Tim13 και σχηματίζουν τα διαλυτά σύμπλοκα TIM10 και Tim8/Tim13, αντίστοιχα (Adam et al., 1999b; Koehler et al., 2000; Paschen et al., 2000). Τα σύμπλοκα, που συγκροτούνται από ισομοριακές ποσότητες των πρωτεϊνών, έχουν μοριακό βάρος 70kDa. Το σύμπλοκο TIM10 είναι, περίπου, 10 φορές πιο άφθονο από το Tim8/Tim13 και το ~25% του συνολικού ποσού του TIM10 συμπλόκου περιλαμβάνεται στο σύμπλοκο ένθεσης μοριακού βάρους 300kDa (TIM22) (Adam et al., 1999b).

Τα σύμπλοκα που σχηματίζουν οι μικρές Tim έχουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Το σύμπλοκο TIM10 διαμεσολαβεί την είσοδο των πολυτοπικών μεμβρανικών πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης καθώς και των Tim22 και Tim17 (Endres et al., 1999; Leuenberger et al., 1999; Leuenberger et al., 2003), ενώ για το σύμπλοκο Tim8/Tim13 το μόνο υπόστρωμα που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα είναι η Tim23 (Davis et al., 2000).

Χαρακτηριστική ιδιότητα των πρωτεϊνών αυτών είναι η ύπαρξη ενός συντηρημένου, διπλού CX<sub>3</sub>C μοτίβου στην αμινοξική τους αλληλουχία (Koehler et al., 1999). Το διπλό μοτίβο CX<sub>3</sub>C φαίνεται να είναι μοναδική ιδιότητα των μικρών Tim και συμμετέχει στην αναδίπλωσή τους μετά την είσοδό τους στο μιτοχόνδριο. Μέχρι στιγμής, δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί όσον αφορά τη συμμετοχή του μοτίβου στην αναδίπλωση και λειτουργία των μικρών Tim πρωτεϊνών. Ο πρώτος κάνει λόγο για σύνδεση κάποιου μετάλλου και αναδίπλωση γύρω από αυτό και ο δεύτερος για οξειδωτική αναδίπλωση, δηλαδή αναδίπλωση που μεσολαβείται από την οξείδωση και δημιουργία διουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κυστεϊνών του διπλού CX<sub>3</sub>C μοτίβου.



**Εικόνα 5. Τα δύο εναλλακτικά μοντέλα για την αναδίπλωση και συγκρότηση των μικρών Tim στα λειτουργικά σύμπλοκα. Δεξιά:** Το μοντέλο που προτάθηκε από τους Lutz et al. σύμφωνα με το οποίο οι μικρές Tim εισέρχονται ανηγμένες μέσω του συμπλόκου Tom, και εκεί τα κατάλοιπα κυστεϊνης που περιέχουν προσδέουν ιόντα ψευδαργύρου αποκτώντας μία σταθερή διαμόρφωση. **Αριστερά:** Οι Curran et al., υπέθεσαν ότι οι μικρές Tim περιέχουν διουλφιδικούς δεσμούς. Οι Allen et al., πρότειναν ότι οι μικρές Tim μετά την είσοδό τους μέσω του συμπλόκου TOM, σχηματίζουν δύο ενδομοριακούς διουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων κυστεϊνης του διπλού μοτίβου CX<sub>3</sub>C. (Koehler, 2004b)

Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, οι τέσσερις κυστεϊνες του διπλού CX<sub>3</sub>C μοτίβου αλληλεπιδρούν με δισθενή ιόντα ψευδαργύρου (Zn<sup>+2</sup>) (Sirrenberg et al., 1998). Τα ιόντα φαίνονται να επηρεάζουν την διαμόρφωση των Tim10 και Tim12, την είσοδο των διαμεμβρανικών μεταφορέων της εσωτερικής μεμβράνης (και όχι των πρωτεϊνών της μήτρας) και την αλληλεπίδραση των Tim10 και Tim12 με το υπόστρωμα (AAC) (πειράματα με χημικούς προσδέτες - crosslinking). Δεδομένα που αφορούν την πρωτεΐνη Tim13 υποδεικνύουν ότι η παγίδευση του πρωτεϊνικού μορίου μέσα στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου εξαρτάται από την αναδίπλωσή του γύρω από ένα ιόν ψευδαργύρου (Lutz et al., 2003).

Ο δεύτερος μηχανισμός, η οξειδωτική αναδίπλωση των μικρών Tim, φαίνεται να είναι και ο πιο πιθανός. Υπάρχουν δεδομένα που συνηγορούν στο ότι τα φυσικά



σύμπλοκα Tim9/Tim10 και Tim8/Tim13 δεν αλληλεπιδρούν με ιόντα ψευδαργύρου, αλλά σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, προκειμένου να αναδιπλωθούν σωστά και να σχηματίσουν σύμπλοκο (Allen et al., 2003; Curran et al., 2004; Lu et al., 2004). Με τη διαδικασία της περιορισμένης τρυψινόλυσης ακολουθούμενη από ανάλυση με φασματομετρία μάζας εδείχθη ότι η Tim10 αναδιπλώνεται με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που προβλέπεται για την αλληλεπίδραση με ιόντα ψευδαργύρου με τη διαφορά ότι οι κυστεΐνες του διπλού CX3C μοτίβου δεν δεσμεύουν ιόν αλλά ζευγαρώνουν έτσι, ώστε να σχηματίζονται δύο ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί (Allen et al., 2003). Δεν αποκλείεται οι πλήρως ανηγμένες μορφές των Tim να προσδέουν ιόντα  $Zn^{+2}$ , το γεγονός αυτό όμως δεν είναι το κρίσιμο βήμα που προωθεί το σχηματισμό των συμπλόκων. Η πρόσφατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου TIM10 επιβεβαίωσε την δημιουργία δύο ενδομοριακών δισουλφιδίων μέσω των κυστεϊνών του μοτίβου CX3C (Webb et al., 2006).

Η οξειδάση που φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την οξειδωτική αναδίπλωση των μικρών Tim πρωτεϊνών στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Πρόκειται για την Mia40/Tim40. Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε (Mesecke et al., 2005), η Mia40 – που φέρει έξι συντηρημένες κυστεΐνες – παγιδεύει τις μικρές Tim που μόλις εισήχθησαν στο μιτοχόνδριο, ακόμα σε ανηγμένη κατάσταση, σχηματίζοντας μαζί τους διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Μία αντίδραση ισομερίωσης που ακολουθεί έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδομοριακών δεσμών στο υπόστρωμα της Mia40. Η οξείδωση της – ανηγμένης πλέον – Mia40 – πραγματοποιείται μέσω της δράσης της Ern1, η οποία είναι οξειδάση σουλφυδρυλομάδων, έτσι ώστε να είναι δυνατός ένας νέος κύκλος οξείδωσης.

## **Η «ΜΙΚΡΗ» Tim12**

Η πρωτεΐνη Tim12 είναι η μόνη από τις μικρές Tim που βρίσκεται προσδεμένη στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μέρος του συμπλόκου της μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης TIM22. Ο ακριβής ρόλος που παίζει κατά την είσοδο των προς μεταφορά πρωτεϊνών στο σύμπλοκο TIM22, είναι ασαφής, αν και θεωρείται ότι αναλαμβάνει δράση μετά την αναγνώριση και την πρόσδεση του υποστρώματος στο σύμπλοκο TIM10 (Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1998). Πολύ λίγες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την Tim12 παρόλο που πρόκειται για μια πρωτεΐνη απαραίτητη για την επιβίωση του σακχαρομύκητα.

Η Tim12 ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά σε ένα γενετικό screen για την ανεύρεση καταστολέων αναπνευστικών ανεπαρκειών. Οι Jarosch et al., (1996) (Jarosch et al., 1996) απομόνωσαν το πυρηνικό γονίδιο του σακχαρομύκητα που καταστέλλει την ήδη χαρακτηρισμένη μεταλλαγή *mrs2-1* όταν βρίσκεται σε φορέα πολλών αντιγράφων (multicopy plasmid). Το νέο αυτό γονίδιο, *MRS5* βρέθηκε να καταστέλλει και τον φαινότυπο που προκαλείται από μεταλλαγή που επηρεάζει το μάτισμα (splicing) των μιτοχονδριακών ιντρονίων της ομάδας II (Waldherr et al., 1993). Απαλοιφή του γονιδίου αυτού είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση μη επεξεργασμένων πρόδρομων μορφών της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης Hsp60 και ανεπάρκειες σε όλα τα σύμπλοκα των κυτοχρωμάτων (Jarosch et al., 1996). Τα παραπάνω οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MRS5*, είναι απαραίτητη για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων.

Επειδή, πρόκειται για μία πρωτεΐνη απαραίτητη για την επιβίωση του σακχαρομύκητα, η μελέτη της έγινε είτε με τη βοήθεια θερμοευαίσθητων μεταλλαγμάτων (Koehler et al., 1998a) είτε με τεχνητή ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της μέσω του συστήματος επαγόμενου υποδοχέα GAL (Sirrenberg et al., 1998). Ανάλυση μιτοχονδρίων που απομονώθηκαν από κύτταρα που είχαν μεγαλώσει μερικές ώρες στη μη επιτρεπτή θερμοκρασία ή σε μέσο χωρίς λακτόζη αντίστοιχα, έδειξε ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών που εισέρχονται στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου TIM22 (οικογένεια μεταφορέων και Tim22), ήταν σημαντικά μειωμένα. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες που προορίζονται στη μήτρα ή την εξωτερική μεμβράνη βρίσκονταν σε φυσιολογικά επίπεδα σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Αντίστοιχα, πειράματα εισόδου ραδιενεργών πρόδρομων πρωτεϊνών σε *tim12ts* μιτοχόνδρια έδειξαν ότι μόνο η είσοδος των μεταφορέων της εσωτερικής μεμβράνης επηρεαζόταν.

Η πρωτεΐνη Tim12, όπως προαναφέρθηκε, είναι η μόνη μικρή Tim που βρίσκεται προσδεσμένη με την εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης (όπως φαίνεται σε πειράματα δημιουργίας μιτοπλαστών και επίδρασης με πρωτεάση). Η πρωτεΐνη Tim22 φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της Tim12 με τους μιτοπλάστες (Sirrenberg et al., 1998). Οι ακριβείς, όμως, αλληλεπιδράσεις στις οποίες οφείλεται η ύπαρξη της Tim12 στους μιτοπλάστες δεν είναι γνωστές. Η πρωτεΐνη Tim12 επίσης έχει βρεθεί να συμμετέχει σε σύμπλοκο που περιλαμβάνει ακόμη τις Tim9, Tim10 και Tim22 (Adam et al., 1999a; Sirrenberg et al., 1998). Τα σύμπλοκα αυτά συνεκλούνται από στήλες χρωματογραφίας συγγένειας ή/και εκλούνται στο ίδιο κλάσμα μετά από χρωματογραφία διήθησης. Ειδικότερα η Tim12, μετά από ήπια λύση μιτοχονδρίων από κύτταρα αγρίου τύπου (με digitonin) φαίνεται να συμμετέχει σε ένα σύμπλοκο, με μοριακό βάρος ~300kD (που κατά πάσα πιθανότητα αντιστοιχεί στο σύμπλοκο TIM22). Σε μιτοχόνδρια όπου υποεκφράζεται

το Tim22, το Tim12 συμμετέχει σε ένα μικρότερο σύμπλοκο, των 70kD (που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο TIM10) (Adam et al., 1999a; Sirrenberg et al., 1998).

Η πρωτεΐνη Tim12 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά επίσης με το προς μεταφορά υπόστρωμα. Οι μελέτες έχουν διεξαχθεί με την πρόδρομη μορφή της AAC. Η αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα υποδεικνύεται έμμεσα από την δυνατότητα χημικής πρόσδεσης (χημική διασύνδεση, που ακολουθείται από ανοσοκατακρήμνιση της Tim12) του τελευταίου με την Tim12 (Sirrenberg et al., 1998). Άμεση απόδειξη αλληλεπίδρασης μέχρι στιγμής δεν έχει επιτευχθεί. Παράλληλα, πειράματα με θερμοευαίσθητα μεταλλάγματα των πρωτεϊνών Tim10 και Tim12 έδειξαν ότι η Tim12 απαιτείται σε στάδιο μεταγενέστερο από αυτό στο οποίο δρα το σύμπλοκο TIM10 κατά την είσοδο των μεταφορέων της εσωτερικής μεμβράνης (Koehler et al., 1998a; Sirrenberg et al., 1998). Συγκεκριμένα, η Tim12 απαιτείται για την ένθεση του προδρόμου μορίου στην εσωτερική μεμβράνη, ενώ το Tim10 για την μετατόπισή του διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της μικρής Tim12 πρωτεΐνης του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου, αναφορικά με το σημαντικό της ρόλο στη βιογένεση του οργανιδίου. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε να χαρακτηριστούν περιοχές της πρωτεΐνης σημαντικές για τη βιογένεση και λειτουργία της. Η Tim12, όπως όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών Tim, φέρει στην αμινοξική της αλληλουχία διπλό μοτίβο CX3C, το οποίο μεσολαβεί την οξειδωτική αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Κατά την αναδίπλωση αυτή σχηματίζεται ένα μόριο το οποίο φέρει μια κεντρική περιοχή που παραμένει αναδιπλωμένη μέσω των δισουλφιδικών δεσμών και δύο περιοχές στα άκρα – αμινοτελικό και καρβοξυτελικό – που εκτείνονται σαν «κεραίες» και θεωρητικά δεν είναι τόσο σταθερές όσο η κεντρική περιοχή του μορίου που φέρει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ελλείψεις στα άκρα του πρωτεϊνικού μορίου της Tim12, ώστε να διαλευκανθεί το εάν και κατά πόσο αυτά συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως ο μιτοχονδριακός εντοπισμός της και η αλληλεπίδρασή της με συστατικά του μιτοχονδριακού βιογενετικού μονοπατιού.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τέσσερα μεταλλάγματα έλλειψης της Tim12 – δύο που φέρουν ελλείψεις στο αμινοτελικό και δύο που φέρουν ελλείψεις στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης - και χαρακτηρίστηκαν όσον αφορά : την ικανότητά τους να υποστηρίζουν την επιβίωση κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* ελλείπει ενδογενούς αγρίου τύπου Tim12, την ικανότητα εισόδου στο μιτοχόνδριο και σωστού υπομιτοχονδριακού εντοπισμού τους, την ικανότητά αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Tim9 *in vitro*, σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ικανότητα αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου Tim12 με μεμβρανικά κυστίδια και χαρακτηρίστηκαν τα μεταλλάγματα έλλειψης αναφορικά με την ικανότητά τους να δεσμεύονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυστιδίων ομοίως με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ TIM12 ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ

Η απομόνωση της Tim12 καθώς και των μεταλλαγμάτων έλλειψης πραγματοποιήθηκε μετά από υπερέκφρασή τους σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* B121(DE3).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για την αγρίου τύπου Tim12 καθώς και τα μεταλλάγματα έλλειψης βρίσκονται κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακό φορέα υπό τον έλεγχο T7 υποκινητή. Στον υποκινητή αυτό προσδένεται η T7 RNA πολυμεράση και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των downstream γονιδίων. Το βακτηριακό στέλεχος, στο οποίο κλωνοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έχει ενσωματωμένο στο γενετικό υλικό του, το γονίδιο για την T7 RNA πολυμεράση, τον υποκινητή lac (*lac promoter*) και τον χειριστή lac (*lac operator*). Παρουσία IPTG (ανάλογο της λακτόζης) το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης ενεργοποιείται και ξεκινάει η μεταγραφή του προς μελέτη γονιδίου.

Από μία κορεσμένη βακτηριακή προ-καλλιέργεια (16 ώρες επώαση στους 37°C), εμβολιάζεται μία νέα, μέσα σε LB παρουσία καναμυκίνης (γονίδιο επιλογής πάνω στον pET28). Πραγματοποιείται αραίωση 1/50 της προ-καλλιέργειας. Η νέα καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί μέχρι την εκθετική φάση (O.D. 0,4-0,8) και τότε προστίθεται 0,4mM IPTG. Τα κύτταρα επωάζονται παρουσία του IPTG για 3 ώρες στους 37°C, και κατόπιν συλλέγονται με φυγοκέντρηση (20m, 5000g, 4°C). Τα κυτταρικά ιζήματα φυλάσσονται στους -20°C μέχρι την ημέρα του καθαρισμού. Κάθε μετάλλαγμα ελέγχθηκε για έκφραση πρώτα σε μία μικρής κλίμακας καλλιέργεια και κατόπιν ακολούθησε υπερέκφρασή του σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια.

Η Tim12 και τα μεταλλάγματα έλλειψης είναι κλωνοποιημένα στον φορέα έκφρασης pET28 και εκφράζονται φέροντας στο αμινοτελικό άκρο τους εξαϊστιδινικό επίτοπο (6His tag). Ο επίτοπος αυτός επιτρέπει τον καθαρισμό της πρωτεΐνης σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (σφαιρίδια νικελίου). Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Ni<sup>+2</sup> – NTA Agarose Beads της QIAGEN.

Τα βακτήρια [*E. Coli*, B121 (DE3)] αρχικά επαναδιαλύονται σε buffer A (50mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl) όπου έχει προστεθεί 0,1mg.ml λυσοζύμη (~100ml για κύτταρα από καλλιέργεια δύο λίτρων) και επωάζονται στους 4°C για 15m. Κατόπιν τα κύτταρα σπάζουν με τη χρήση υπερήχων (4 φορές x 3m μέσα σε παγωμένη αιθανόλη για να μην ανεβαίνει η θερμοκρασία). Μετά από φυγοκέντρηση (21000g, 30min, 4°C) χωρίζονται τα διαλυτά μέρη των κυττάρων (υπερκείμενο) από τα αδιάλυτα (ίζημα). Φυλάσσεται δείγμα από το υπερκείμενο (sup after lysis). Το ίζημα διαλυτοποιείται μέσα σε buffer B (50mM Tris-HCl (pH 8), 150mM NaCl, 8M ουρία) με την βοήθεια ομογενοποιητή, και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Φυλάσσεται αντίστοιχο δείγμα για ηλεκτροφόρηση (pellet after lysis). Ακολουθεί φυγοκέντρηση (21000g, 30min, 20°C). Το υπερκείμενο αραιώνεται με buffer A ώστε να φτάσει τελική συγκέντρωση ουρίας 6M και προστίθεται 5mM ιμιδαζόλιο (έτσι μειώνονται οι μη ειδικές προσδέσεις). Φυλάσσεται αντίστοιχο δείγμα για ηλεκτροφόρηση (L: loading). Το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 10 όγκους buffer A + 5mM ιμιδαζόλιο. Αφού το υλικό περάσει μία φορά από τη στήλη, συλλέγεται και φορτώνεται για δεύτερη φορά. Φυλάσσεται το υλικό για έλεγχο σε ηλεκτροφόρηση (FT: Flow through). Κατόπιν, η στήλη ξεπλένεται με διαλύματα διαδοχικά ελαττούμενης συγκέντρωσης ουρίας, έτσι ώστε, η πρωτεΐνη να αποκτήσει σταδιακά τη φυσιολογική διαμόρφωσή της. Τα διαλύματα αυτά είναι:

A) 5 όγκοι buffer A + 5mM ιμιδαζόλιο + 6M ουρία (W1)

B) 5 όγκοι buffer A + 15mM ιμιδαζόλιο + 4M ουρία (W2)

Γ) 5 όγκοι buffer A + 15mM ιμιδαζόλιο + 2M ουρία (W3)

Δ) 5 όγκοι buffer A + 15mM ιμιδαζόλιο (W4)

Η πρωτεΐνη εκλούεται αρχικά με buffer A και 300mM ιμιδαζόλιο. Η ποσότητά της ελέγχεται με mini-bradforfs. (Bradford/H<sub>2</sub>O = ¼. Σε 20μl αυτού του διαλύματος προστίθενται 5μl κλάσματος έκλουσης, πάνω σε parafilm, και παρατηρείται το χρώμα). Όταν σταματήσει σχεδόν η έκλουση με αυτό το διάλυμα, συνεχίζουμε με buffer A + 150mM ιμιδαζόλιο + 6M ουρία. Οπότε αποδιατάσσεται ξανά η πρωτεΐνη που έμεινε στη στήλη και εκλούεται ευκολότερα, καθώς προφανώς οι θέσεις πρόσδεσης με τα ιόντα νικελίου γίνονται πιο προσιτές στο ιμιδαζόλιο.

Συλλέγονται κλάσματα ίσου όγκου με τη στήλη (E1,2,3...). Τα κλάσματα αυτά απαλλάσσονται από την περίσσεια ιμιδαζολίου με διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης (διάμετρος πόρων 3000Da), μέσα σε διάλυμα 50mM Tris-HCl (pH 7,4),

150mM NaCl, 10% γλυκερόλη. Κατόπιν, το μέρος που παραμένει διαλυτό (υπερκείμενο) συλλέγεται και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Μετά την διαπίδυση των κλασμάτων έκλουσης που δεν περιέχουν ουρία προκύπτει, στην διαλυτή φάση κυρίως, το διμερές της Tim12.

## **ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ**

Για την κατασκευή του διαλύματος βαθμίδωσης συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν 4 διαλύματα με διαφορετική συγκέντρωση σουκρόζης μέσα σε buffer A (50mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl): 2,5%, 7,5%, 12,5% και 17,5%. Κατόπιν, 500μl από κάθε διάλυμα τοποθετούνται μέσα σε σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης όγκου 2ml, έτσι ώστε το αραιότερο διάλυμα να βρίσκεται πάντα πάνω από το πιο πυκνό.

Τα διαλύματα με κλίση συγκέντρωσης, μόλις κατασκευάζονταν, τοποθετούνταν για 2 ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Εν τω μεταξύ ετοιμάζονται οι αντιδράσεις αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούνται ~20μg από κάθε πρωτεΐνη, και μάλιστα από κλάσμα έκλουσης απαλλαγμένο από ιμιδαζόλιο που περιέχει 6M ουρία (τα κλάσματα αυτά περιείχαν μίγμα μονομερούς και διμερούς μορφής). Η συγκέντρωση της ουρίας στην τελική αντίδραση πρέπει να μην ξεπερνάει τα 0,6M. Όλες οι αντιδράσεις πρέπει να έχουν ακριβώς την ίδια σύσταση σε ουρία. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης πρέπει να είναι παντού ίδιος και να μην ξεπερνάει τα 200μl. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το μίγμα τριών πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, η λυσοζύμη (14kD), η οβαλβουμίνη (45kD) και η αλβουμίνη (68kD). Τα δείγματα υπερφυγοκεντρήθηκαν για 14 ώρες, 50000g,  $4^{\circ}\text{C}$ . Κατόπιν, δημιουργήθηκαν από κάθε διάλυμα κλίσης συγκέντρωσης 14 κλάσματα όγκου 150μl το καθένα, τα οποία αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Οι ζώνες που προέκυψαν ποσοτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα ImageQuant 5.2, της Molecular Dynamics.

## **ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ**

Για τη δημιουργία λιποσωμάτων, τα οποία μιμούνται τη σύσταση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης αναμιγνύονται φωσφατιδυλογολίνη και



καρδιολιπίνη σε αναλογία 5:1. Το χλωροφόρμιο στο οποίο είναι διαλυμένα τα λιπίδια απομακρύνεται με εξάτμιση κάτω από συνεχή ροή αερίου N<sub>2</sub>. Τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε διάλυμα 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl και ακολουθούν πέντε κύκλοι ψύξης (με υγρό N<sub>2</sub>) / θέρμανσης – τήξης (σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50<sup>0</sup>C). Η τελευταία διαδικασία έχει σαν αποτέλεσμα τα MLVs (Multilamellar Vesicles) – κυστίδια με παραπάνω από μία λιπιδική διπλοστιβάδα – που δημιουργήθηκαν με την επαναδιάλυση των λιπιδίων, να ανασυσταθούν και να δημιουργηθούν ULVs (Unilamellar Vesicles) – κυστίδια με μία λιπιδική διπλοστιβάδα. Τέλος, για τη δημιουργία ενός ομοιόμορφου μίγματος λιποσωμάτων, στο οποίο όλα τα κυστίδια θα έχουν την ίδια διάμετρο, το δείγμα περνά μέσα από δύο φίλτρα πολυανθρακικού άλατος, τα οποία έχουν πόρους καθορισμένης διαμέτρου.

## **ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΠΙΠΛΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΑΖΙ ΜΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ**

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της Tim12 και των μεταλλαγμάτων έλλειψης με τη λιπιδική διπλοστιβάδα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης πραγματοποιήθηκε πείραμα επίπλευσης λιποσωμάτων σε διάλυμα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης. Εφόσον η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τα λιποσώματα, τότε θα επιπλεύσει και η ίδια στο ίδιο ή στα ίδια κλάσματα με τα λιποσώματα κατά τη φυγοκέντρωση.

Τα λιποσώματα, που είχαν δημιουργηθεί σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στη προηγούμενη ενότητα φυγοκεντρώνται για μία ώρα στις 100.000rpm, 25 <sup>0</sup>C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα λιποσώματα επαναδιαλύονται σε 50ml διαλύματος σύστασης : 20mM HEPES pH7.4, 100mM NaCl. Στο δείγμα, προστίθεται 0,5μg της προς μελέτη πρωτεΐνης και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 22 <sup>0</sup>C. Στο δείγμα αυτό προστίθενται άλλα 50ml διαλύματος σουκρόζης συγκέντρωσης 2.4M, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση σουκρόζης να είναι 1.2M. Το διάλυμα σουκρόζης επικαλύπτεται με διάλυμα σουκρόζης 0,25M προς δημιουργία της βαθμίδωσης συγκέντρωσης. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στις 55000 rpm για 3 ώρες στους 22 <sup>0</sup>C για να επιτευχθεί η επίπλευση των λιποσωμάτων. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης λαμβάνονται δείγματα των 50ml από την κορυφή

της βαθμίδωσης και προς τα κάτω, τα οποία αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα που αναγνωρίζει την Tim12.

## **ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΤΡΥΨΙΝΟΛΥΣΗ ΤΗΣ Tim12 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ**

Λιποσώματα ετοιμάζονται και επωάζονται με την Tim12, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα. Έπειτα, προστίθεται στο δείγμα Τρυψίνη σε αναλογία μάζας 3 προς 1 με την πρωτεΐνη. Η τελική συγκέντρωση της Τρυψίνης στο δείγμα ήταν 0,01mg/mL. Τα δείγματα επωάζονται με την πρωτεάση για συγκεκριμένους χρόνους : 0, 1, 2, 5 και 15 λεπτά. Η αντίδραση τρυψινολύσης τερματίζει με την προσθήκη του αναστολέα Refabloc, σε τελική συγκέντρωση 2mM και τα δείγματα αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση, με αντίσωμα που αναγνωρίζει την Tim12.

## **IN ORGANELLO ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

### **ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ**

Για την *in organello* μελέτη των Tim12 μεταλλαγμάτων έλλειψης απομονώθηκαν μιτοχόνδρια από το αγρίου τύπου στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, D273-10B. Η απομόνωση των μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την δημοσιευμένη διαδικασία (Daum, 1982; Glick and Schatz, 1991).

## ΕΙΣΟΔΟΣ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ

### ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Η προς μελέτη πρωτεΐνη συντίθεται από πλασμιδιακό φορέα, όπου το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι ενσωματωμένο, σε rabbit reticulocyte lysate παρουσία [ $S^{35}$ ] μεθειονίνης με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής/μετάφρασης χρησιμοποιώντας την κατάλληλη RNA πολυμεράση (Promega, T<sub>N</sub>T SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System).

Η αντίδραση εισαγωγής περιλαμβάνει επώαση του δείγματος με τη ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη με 100-200 µg απομονωμένων μιτοχόνδριων στους 30<sup>0</sup> C για 15min. Τα μιτοχόνδρια διαλυτοποιούνται σε διάλυμα κατάλληλο για την αντίδραση (import buffer), αποτελούμενο από 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, 2mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), παρουσία 2.0 mM ATP και 2.5 mM NADH. Μετά την αντίδραση εισαγωγής, τα μιτοχόνδρια απομονώνονται με φυγοκέντρηση για 5min, στις 14000 στροφές σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup>C. Το μη εισαγόμενο πρόδρομο μόριο απομακρύνεται με επαναδιάλυση του ιζήματος στο BB, pH 7.4 (0.6 M sorbitol και 20 mM Hepes-KOH), παρουσία τρυψίνης (0,1mg/ml) στους 4<sup>0</sup> C για μισή ώρα. Η αντίδραση πρωτεόλυσης τερματίζει με την προσθήκη SBTI (Soya Bean Trypsin Inhibitor) 1mg/ml, για 10min στους 4<sup>0</sup> C. Μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος για 5min, στις 14000 στροφές σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup> C, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα, που περιέχει τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύεται σε 20 µl 2x sample buffer (0.5 M Tris, 8 mM EDTA, 0.4% SDS pH 6.8, 5% glycerol, 200 mM DTT, 0.001% Bromophenol blue). Ο έλεγχος της εισόδου των πρωτεϊνών πραγματοποιείται μετά από διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.

### ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΙΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Για τη δημιουργία μιτοχονδρίων απαλλαγμένων από την εξωτερική τους μεμβράνη, τα μιτοχόνδρια επωάζονται σε υπότονο διάλυμα, έτσι ώστε σύμφωνα με το φαινόμενο της ώσμωσης, τα μιτοχόνδρια να διογκωθούν και η εξωτερική μεμβράνη να διαρρηχθεί. Συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύονται σε τελική

συγκέντρωση 5mg/ml και έπειτα προστίθενται εννέα όγκοι υπότονου διαλύματος (Mitoplast buffer : 20mM HEPES, pH 7,4). Τα μιτοχόνδρια επωάζονται στον πάγο για μισή ώρα και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται, ώστε να διαχωριστούν οι διαλυτές πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου – υπερκείμενο – από τους μιτοπλάστες – ίζημα.

## **ΕΞΑΓΩΓΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΛΚΑΛΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ**

Για τον διαχωρισμό των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών από τις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη μεμβράνη αλλά δεν φέρουν διαμεμβρανικές περιοχές, τα μιτοχόνδρια – ή οι μιτοπλάστες – επαναδιαλύονται σε αλκαλικό διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1M) και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν περιφερικά με τη μεμβράνη διαχωρίζονται από τις διαμεμβρανικές με υπερφυγοκέντρωση (100.000g, 20min, 4°C).

## **ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΓΓΕΝΟΥΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**

Για την ανάλυση του μιτοχονδριακού πρωτεώματος υπό εγγενείς συνθήκες πραγματοποιείται BN-PAGE. Προτού διαχωριστούν οι πρωτεΐνες τα μιτοχόνδρια διαλυτοποιούνται σε κατάλληλο – μη ιοντικό – απορρυπαντικό ώστε να μη διαταραχθούν οι αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων. Συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύονται σε SB-BN, σε τελική συγκέντρωση 2.5mg/mL και επωάζονται για μισή ώρα στον πάγο. Μετά τη διαλυτοποίηση το δείγμα υπερφυγοκεντρείται (100,000g, 15 min) και στη συνέχεια προστίθεται στο δείγμα 1x BN-SB (sample buffer for blue native gel).

### SB-BN

0.16% N-dodecyl maltoside 50mM

NaCl

10% glycerol 20mM Hepes KOH pH

7.4 2.5mM MgCl<sub>2</sub> 1mM EDTA

1mM PMSF

### BN-SB

5% Coomassie blue G250 brilliant

0.5M 6-aminocaproic acid 100mM

BisTris/HCl pH7.0 1mM PMSF

## **IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ**

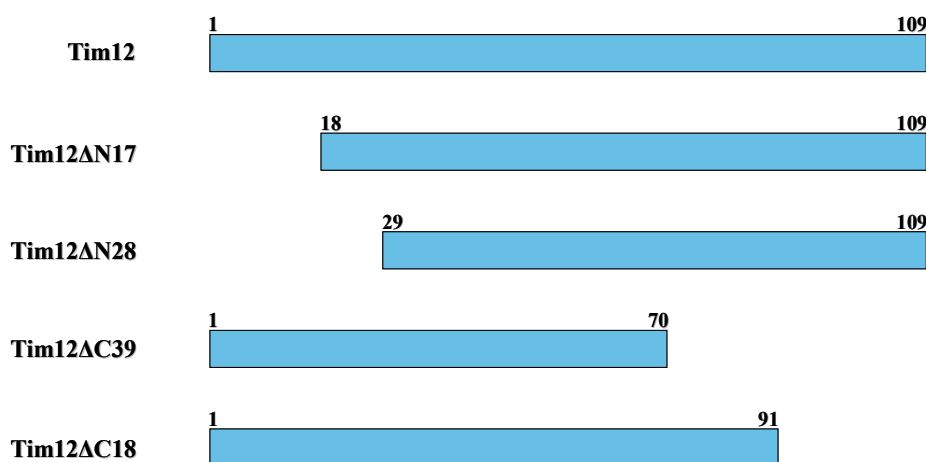
Το στέλεχος σακχαρομύκητα FT5*GALI10TIM12*, μετασχηματίστηκε με πλασμιδιακούς φορείς pRS316, οι οποίοι έφεραν τα αντίστοιχα γονίδια που κωδικοποιούν για την αγρίου τύπου Tim12 και τα μεταλλάγματα. Ο απαραίτητος έλεγχος της ορθότητας της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με τον μετασχηματισμό των κυττάρων με πλασμιδιακό φορέα, που δεν έφερε καμμία κατασκευή. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα του στελέχους, καθώς και μη μετασχηματισμένα κύτταρα και κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου (FT5) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό SClactate –U, με 0.1% γαλακτοζη, για 24 ώρες. Στη συνέχεια έγινε εμβολιασμός νέας καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό SClactate –U, με 0,1% γλυκόζη, για 48 ώρες. Μετά από μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών και υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε δοκιμασία συμπλήρωσης του φαινοτύπου έλλειψης της ενδογενούς Tim12. Διαδοχικές αραιώσεις από δείγμα με 10<sup>4</sup> κύτταρα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξής τους σε στερεό πλούσιο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα (YPD).

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Tim12

Για τη μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης Tim12 στο μονοπάτι εισόδου πολυτοπικών μεμβρανικών πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο και τη βιογένεση του οργανιδίου δημιουργήθηκαν μεταλλάγματα της Tim12, τα οποία φέρουν ελλείψεις περιοχών της αμινοξικής αλληλουχίας στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η μελέτη των μεταλλαγμάτων έλλειψης αναμένεται να βοηθήσει στο χαρακτηρισμό περιοχών της Tim12, που είναι σημαντικές για τη λειτουργία της κατά την στόχευση των προ-πρωτεϊνών στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Συνολικά, δημιουργήθηκαν τέσσερα μεταλλάγματα έλλειψης, δύο μεταλλάγματα που φέρουν ελλείψεις στο αμινοτελικό άκρο της Tim12 – Tim12(18-109) και Tim12(29-109) – και δύο μεταλλάγματα που φέρουν ελλείψεις στο καρβοξυτελικό άκρο της Tim12 – Tim12(1-70) και Tim12(1-91). Τα μεταλλάγματα αυτά είχαν ήδη δημιουργηθεί από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου και βρίσκονται κλωνοποιημένα, όπως και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη στους κατάλληλους φορείς έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα – pET28 (ΔN17, ΔC18) και pRSETa (ΔN28, ΔC39) – καθώς και σε πλασμιδιακούς φορείς για έκφραση των πρωτεϊνών στο σακχαρομύκητα - pRS316.



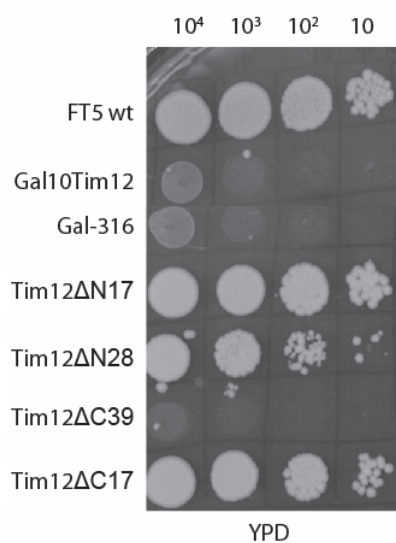
ΕΙΚΟΝΑ 6 Σχηματικά τα μεταλλάγματα έλλειψης στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της Tim12, σε σύγκριση με το πλήρες σε μήκος πρωτεϊνικό μόριο

## IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ

Η μελέτη του φαινοτύπου των μεταλλαγμάτων έλλειψης έγινε με την εξέταση της ικανότητας των truncated πρωτεϊνών να συμπληρώνουν το φαινότυπο έλλειψης της αγρίου τύπου Tim12 σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*.

Η Tim12 είναι μια πρωτεΐνη απαραίτητη για τη ζωή. Για τη δοκιμασία γενετικής συμπλήρωσης φαινοτύπου χρησιμοποιήθηκε στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο ο υποκινητής του γονιδίου που κωδικοποιεί την Tim12 έχει αντικατασταθεί από έναν υποκινητή της οικογένειας GAL, τον GAL10 υποκινητή. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να 'επαχθεί' η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την Tim12 από το χρωμόσωμα. Η παρουσία γαλακτόζης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων επάγει την έκφραση του γονιδίου που βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή της οικογένειας GAL, ενώ με την αλλαγή της πηγής άνθρακα σε γλυκόζη η μεταγραφή του γονιδίου καταστέλλεται.

Για τη δοκιμασία γενετικής συμπλήρωσης φαινοτύπου, πλασμιδιακοί φορείς pRS316, οι οποίοι φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα Tim12 μεταλλάγματα έλλειψης υπό τον έλεγχο του φυσιολογικού τους υποκινητή, χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό του προαναφερθέντος στελέχους σακχαρομύκητα. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα του κάθε μεταλλάγματος να υποστηρίζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων με εξέταση της ανάπτυξης διαδοχικών αραιώσεων αρχικής καλλιέργειας σε πλούσιο θρεπτικό υλικό, με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Η αρχική καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων περιείχε γλυκόζη και γαλακτικό οξύ, ώστε να η ανάγκη των κυττάρων για λειτουργικά μιτοχόνδρια να είναι αυξημένη.



**ΕΙΚΟΝΑ 7** *in vivo* έλεγχος του φαινοτύπου των μεταλλαγμάτων έλλειψης της Tim12. Τα μεταλλάγματα έλλειψης ελέγχθηκαν όσον αφορά την ικανότητα υποστήριξης της ανάπτυξης στελέχους σακχαρομύκητα, που φέρει το γονίδιο *MRS5* υπό τον έλεγχο του Gal10 υποκινητή, σε θρεπτικό υλικό με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μεταλλάγματα βρίσκονται κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακό φορέα pRS316. Ως στοιχεία ελέγχου εξετάστηκε η ανάπτυξη του ίδιου στελέχους που δεν είχε υποστεί μετασχηματισμό καθώς και η ανάπτυξη κυττάρων του στελέχους που είχαν μετασχηματιστεί με πλασμιδιακό φορέα που δεν έφερε κλωνοποιημένο γονίδιο (δεύτερη και τρίτη σειρά από επάνω).



Για την επαλήθευση της έλλειψης ενδογενούς Tim12, κύτταρα του ιδίου στελέχους μετασχηματίστηκαν και με πλασμιδιακό φορέα pRS316, ο οποίος δεν έφερε κλωνοποιημένο γονίδιο και δεν αναμένετο να μεγαλώσουν υπό συνθήκες απενεργοποίησης του γονιδίου που κωδικοποιεί για την Tim12.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, τα μεταλλάγματα έλλειψης στο αμινοτελικό άκρο της Tim12, καθώς και το μετάλλαγμα Tim12ΔC17, είναι ικανά να συμπληρώσουν το φαινότυπο έλλειψης της ενδογενούς Tim12, αφού τα κύτταρα αναπτύσσονται μέχρι την τελευταία αραίωση, όμοια με το αγρίου τύπου στέλεχος. Αντίθετα, τα κύτταρα που εκφράζουν το μετάλλαγμα Tim12ΔC39 δεν μπορούν να επιβιώσουν, όμοια με τα κύτταρα του στελέχους που δεν φέρουν (Gal10Tim12) ή που φέρουν μη ανασυνδυασμένο (κενό) πλασμιδιακό φορέα (Gal-316). Δηλαδή η καρβοξυτελική αυτή περιοχή της πρωτεΐνης είναι σημαντική για την πρωτεΐνη και απαραίτητη για τη λειτουργία της.

## **ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΟΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΩΝ Tim12 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ**

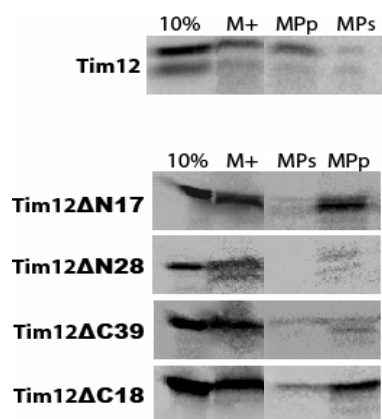
Τα μεταλλάγματα έλλειψης της πρωτεΐνης Tim12 ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εισέρχονται σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και να εντοπίζονται υπομιτοχονδριακά παρόμοια με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

Όπως έχει αναφερθεί, η Tim12 βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο, περιφερικά προσδεδεμένη με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Sirrenberg et al., 1998). Έτσι, μετά από τη δημιουργία μιτοπλαστών και κλασματοποίηση των μιτοχονδρίων, η Tim12 εντοπίζεται στο μεμβρανικό τμήμα των μιτοπλαστών.

Για τη μελέτη της υπομιτοχονδριακής στόχευσης των Tim12 μεταλλαγμάτων έλλειψης, ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν σε *in vitro* πείραμα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από αγρίου τύπου στέλεχος σακχαρομύκητα (στέλεχος D273-10B). Μετά την είσοδο των ραδιοσημασμένων μεταλλαγμάτων ακολούθησε δημιουργία μιτοπλαστών και διαχωρισμός των διαλυτών πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου από αυτές που συνδέονται περιφερικά με τη μεμβράνη των μιτοπλαστών. Ο διαχωρισμός των διαλυτών και μη πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου και η ακεραιότητα των μιτοπλαστών ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας αντισώματα κατά των Cyt b2 και Hsp70, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, κανένα από τα μεταλλάγματα έλλειψης δεν εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο υπομιτοχονδριακής στόχευσης, σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Όλες οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες εμφανίζονται να συνδέονται περιφερικά με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπως ακριβώς η

Tim12. Η αλληλεπίδραση, λοιπόν, της Tim12 με την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου δεν εξαρτάται από τα αμινο- και καρβοξυ- τελικά άκρα της πρωτεΐνης.



**ΕΙΚΟΝΑ 8** Είσοδος και υπομιτοχονδριακή στόχευση ραδιοσημασμένων Tim12 μεταλλαγμάτων έλλειψης σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Τα δείγματα αναλύθηκαν με αυτοραδιογραφία μετά από SDS-PAGE. 10%: το 10% του συνολικού ποσού ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα εισόδου. M+: δείγμα μιτοχονδρίων μετά από επώαση με ραδιοσημασμένα πρόδρομα μόρια και ακόλουθη πρωτεόλυση με Τρυψίνη. MPs: δείγμα που αντιπροσωπεύει τον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, υπερκείμενο μετά τη δημιουργία μιτοπλαστών. MPp: δείγμα που αντιπροσωπεύει τους μιτοπλάστες.

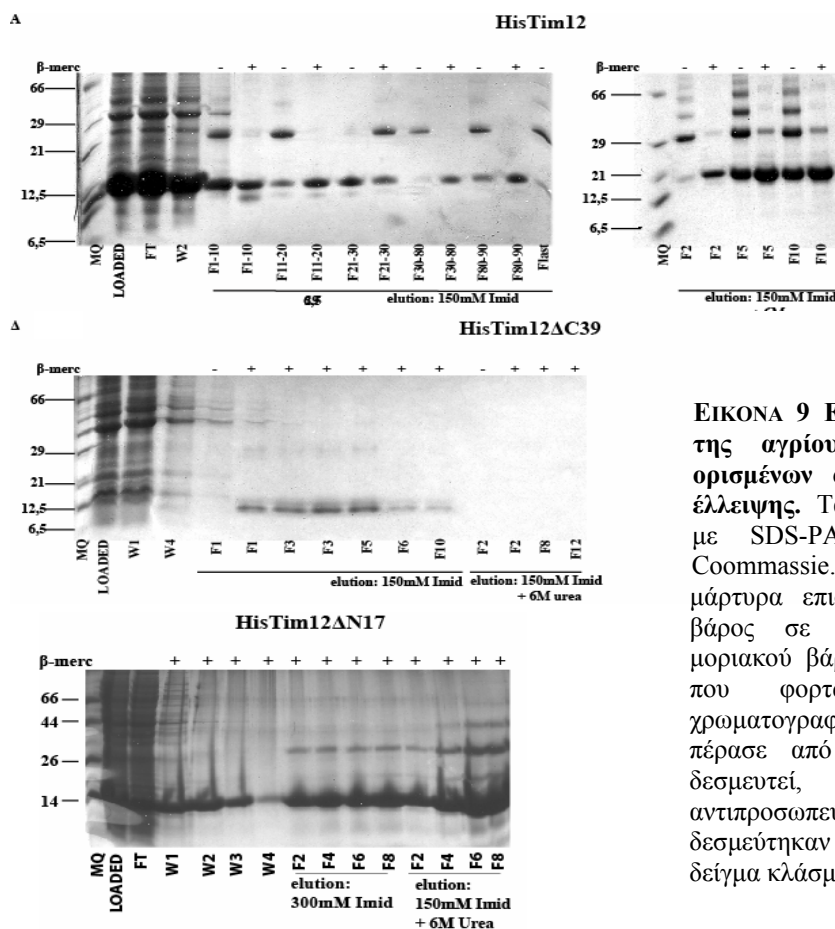
## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Tim12 ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ

Τα Tim12 μεταλλάγματα έλλειψης, καθώς και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη χρειάστηκε να απομονωθούν, για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό τους *in vitro*. Για το σκοπό αυτό ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, των οποίων τα γονίδια είχαν κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους φορείς έκφρασης, υπερεκφράστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* και απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας.

Η διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 'ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ'. Συνοπτικά, οι πλασμιατικοί φορείς έκφρασης που έφεραν τα γονίδια των προς απομόνωση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων, στα οποία έγινε επαγωγή της έκφρασής τους με τη βοήθεια του επαγόμενου από IPTG συστήματος της T7 RNA πολυμεράσης. Οι κωδικοποιούσες αλληλουχίες βρίσκονται κλωνοποιημένες downstream αλληλουχίας που κωδικοποιεί για επίτοπο έξι ιστιδινών. Έτσι, οι πρωτεΐνες που παράγονται φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο εξαϊστιδινικό επίτοπο και η απομόνωσή τους είναι δυνατή με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni<sup>+2</sup>-NTA.

Η πρωτεΐνη Tim12 υπάρχει σε μορφή διμερούς, το οποίο είναι ευαίσθητο σε αναγωγικούς παράγοντες – όπως το DTT (Baud et al. Submitted). Η διμερής αυτή μορφή της Tim12 καθώς και το μονομερές μπορούν να απομονωθούν και να διαχωριστούν, κατά τα διακριτά στάδια του καθαρισμού της πρωτεΐνης (βλ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ). Συγκεκριμένα, κατά το τελευταίο στάδιο πλυσίματος της στήλης χρωματογραφίας, παρατηρείται αποδέσμευση του μονομερούς από τη στήλη, ενώ μετά το στάδιο της διαπίδυσης των κλασμάτων έκλουσης που δεν περιέχουν ουρία, προς απομάκρυνση του ιμιδαζολίου, απομονώνεται μόνο το διμερές – το μονομερές και τα υψηλότερου μοριακού βάρους ολιγομερή, στην πλειοψηφία τους, σχηματίζουν αδιάλυτα συσσωματώματα και κατακρημνίζονται κατά τη διαδικασία της διαπίδυσης.

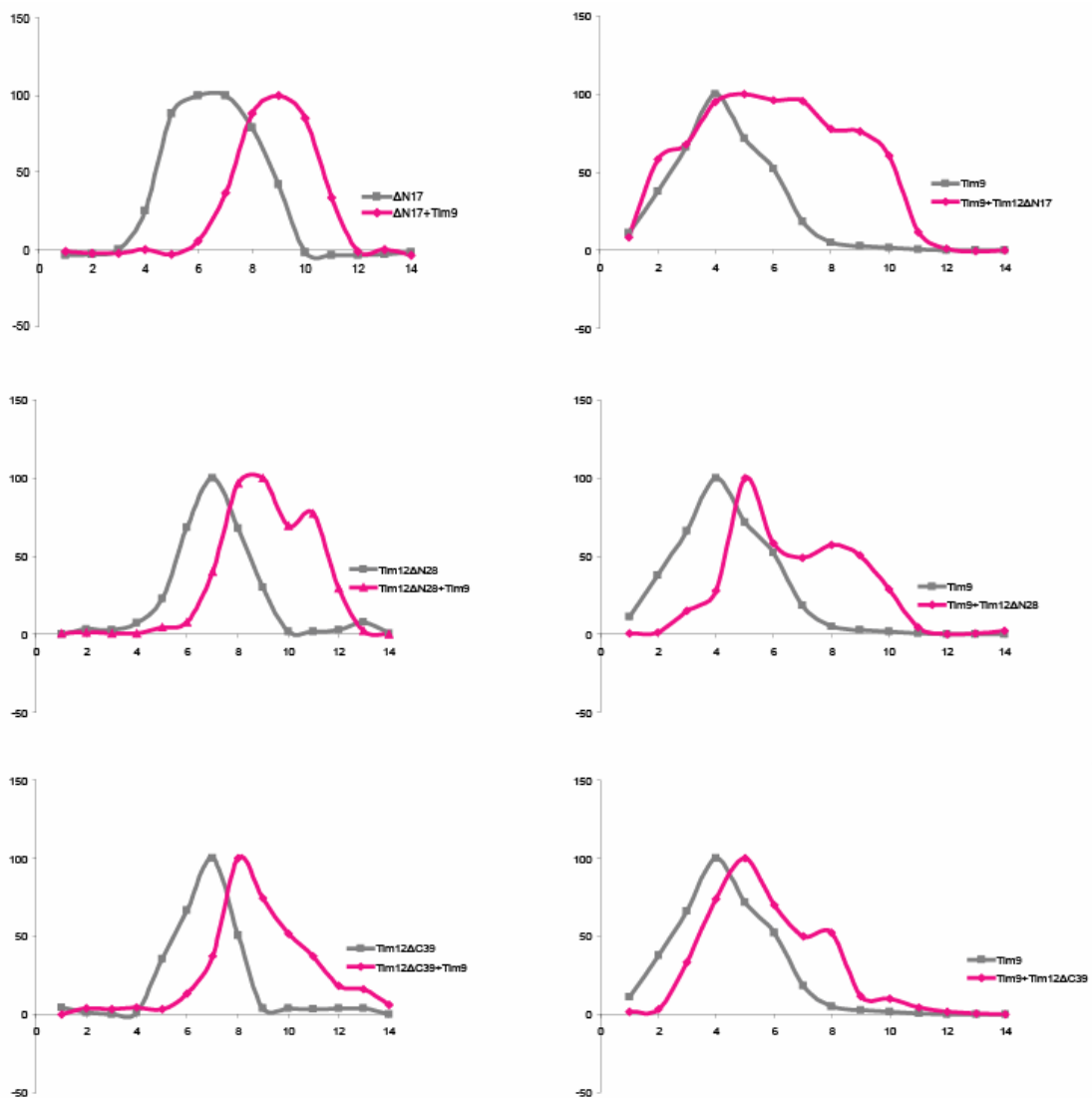
Όπως ήταν αναμενόμενο, οι μεταλλάξεις έλλειψης στα αμινο- και καρβοξυτελικά άκρα της Tim12 δεν επηρεάζουν την ικανότητα σχηματισμού του ευαίσθητου σε DTT διμερούς της πρωτεΐνης, καθώς καμία από τις περιοχές που απαλοιφήσαν δεν περιλαμβάνει κάποια από τις κυστεΐνες του μορίου, που μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών.

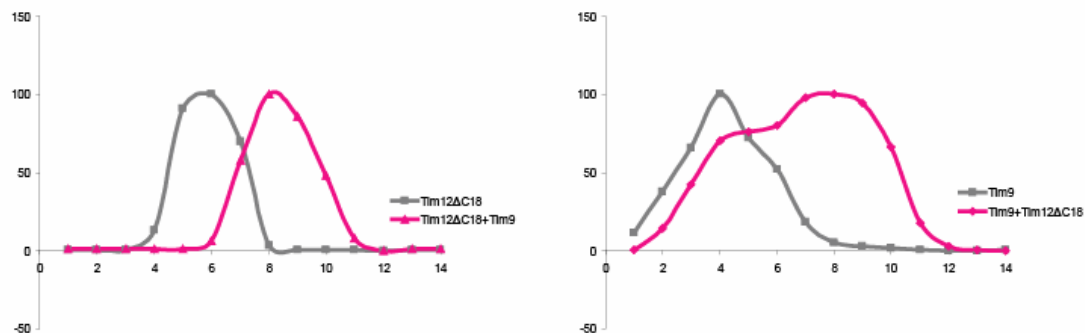


**ΕΙΚΟΝΑ 9** Ενδεικτικοί καθαρισμοί της αγρίου τύπου Tim12 και ορισμένων από τα μεταλλάγματα έλλειψης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Δίπλα στις ζώνες του μάρτυρα επισημαίνεται το μοριακό βάρος σε kDa. MQ: μάρτυρας μοριακού βάρους, LOADED: δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη χρωματογραφίας, FT: δείγμα το οποίο πέρασε από τη στήλη χωρίς να δεσμευτεί, W: δείγμα που αντιπροσωπεύει πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν μη ειδικά στη στήλη, F: δείγμα κλάσματος έκλουσης.

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ **Tim12** ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ **Tim9**

Έχειδειχθεί πως η hisTim12 - και μάλιστα η διμερής μορφή της - αλληλεπιδρά επιλεκτικά με την πρωτεΐνη hisTim9 *in vitro*, σε πειράματα όπου παρατηρείται η μετανάστευση των δύο πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρηση σε διάλυμα (2ml) με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης (2,5% έως 17,5%), (βλ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ) (Baud et al. Submitted). Κατά τη φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης, μια πρωτεΐνη μεταναστεύει από την κορυφή της βαθμίδωσης σε κλάσματα συγκεκριμένης πυκνότητας, ανάλογα με το μοριακό της βάρος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών σε αυτή τη δοκιμασία γίνεται εμφανής από τη μετανάστευσή τους στα ίδια κλάσματα της βαθμίδωσης συγκέντρωσης.





**ΕΙΚΟΝΑ 10** Μετανάστευση των Tim12 μεταλλαγμάτων έλλειψης και της Tim9, μετά από επώαση ισομοριακών ποσοτήτων των δύο πρωτεϊνών, στα διάφορα κλάσματα διαλύματος βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης. Οι γραφικές παραστάσεις αναπαριστούν το επί τοις εκατό ποσοστό της μετατόπισης κάθε αναγραφόμενης πρωτεΐνης στα διάφορα κλάσματα της βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης. Παρατίθενται και τα ποσοστά μετανάστευσης της κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά στα κλάσματα της βαθμίδωσης, προς σύγκριση.

Τα μεταλλάγματα έλλειψης της Tim12 εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Tim9, σε όμοια πειράματα φυγοκέντρωσης σε βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης.

Σύμφωνα με τα γραφήματα που παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα και αναπαριστούν τη μετακίνηση της κάθε πρωτεΐνης στο διάλυμα σε κάθε συνθήκη, όσον αφορά τα μεταλλάγματα με τις πιο ακραίες ελλείψεις στην αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή (Tim12ΔN17, Tim12ΔC18) παρατηρείται ξεκάθαρη μετανάστευση του (διμερούς) κάθε πρωτεΐνης στα ίδια κλάσματα στα οποία μεταναστεύει και η Tim9. Με άλλα λόγια, τα μεταλλάγματα αυτά δεν παρουσιάζουν πρόβλημα αναφορικά με την ικανότητα αλληλεπίδρασής τους με την Tim9.

Από τα μεταλλάγματα με τις μεγαλύτερες ελλείψεις, η Tim12ΔN28 δεν παρουσιάζει ούτε αυτή πρόβλημα στην αλληλεπίδρασή της με την Tim9, καθώς όταν επωάζονται μαζί συμμεταναστεύουν από το κλάσμα οκτώ και πάνω με το μέγιστο να παρουσιάζεται στο όγδοο κλάσμα του διαλύματος βαθμίδωσης. Αντίθετα, το μετάλλαγμα Tim12ΔC38 εμφανίζεται να αλληλεπιδρά ασθενέστερα με την Tim9. Παρά το γεγονός ότι παρατηρείται μετακίνηση του μεταλλάγματος κατά ένα περίπου κλάσμα, δεν παρατηρείται σημαντική μετακίνηση της Tim9 στα κλάσματα στα οποία εντοπίζεται η μεταλλαγμένη Tim12, παρά μόνο ενός πληθυσμού της Tim9. Ίσως, λοιπόν, η περιοχή αυτή, μεταξύ των αμινοξέων 70 και 91 να είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση της Tim12 με την Tim9.

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Tim12 ΜΕ ΤΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΔΙΠΛΟΣΤΙΒΑΔΑ

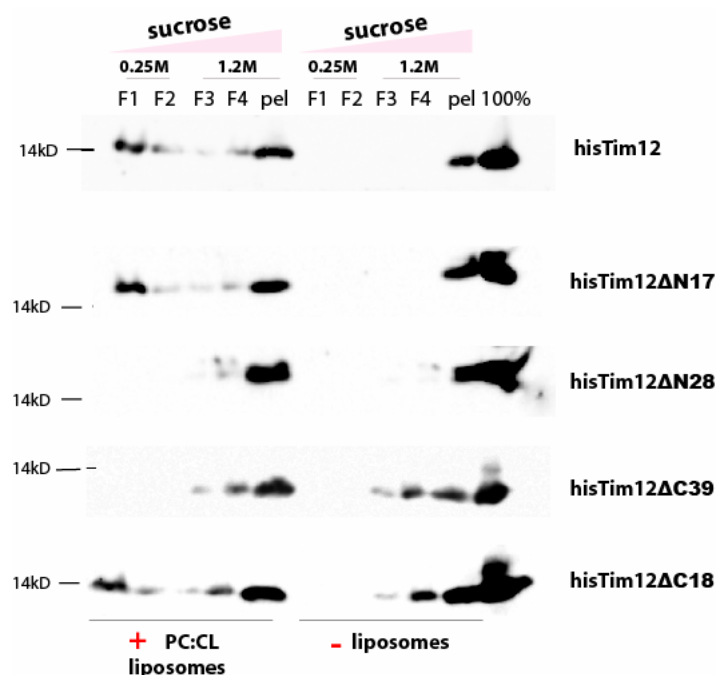
### ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ hisTim12 ΜΕ ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΚΥΣΤΙΑΙΑ

Όπως προαναφέρθηκε, η Tim12 είναι περιφερικά προσδεδεμένη με την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Φαίνεται να συμμετέχει σε σύμπλοκο μοριακού βάρους 300kDa, το οποίο πιθανότατα αντιστοιχεί στο σύμπλοκο TIM22. Μάλιστα, η Tim22 φαίνεται να είναι απαραίτητη για να συγκρατείται η Tim12 στη μεμβράνη (Sirrenberg et al., 1998). Δεν είναι, όμως, γνωστό εάν αυτή η αλληλεπίδραση της Tim12 εξαρτάται αποκλειστικά από διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ή εάν η Tim12 από μόνη της έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τη λιπιδική διπλοστιβάδα. Επιπρόσθετα, καθώς ο ακριβής τρόπος λειτουργίας της κατά τη μεταφορά των υποστρωμάτων παραμένει έως τώρα άγνωστος, η μελέτη της αλληλεπίδρασης της Tim12 με τη λιπιδική διπλοστιβάδα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης θα έδινε στοιχεία σε σχέση με τον μηχανισμό δράσης της πρωτεΐνης.

Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα εξετάστηκε, αρχικά, η ικανότητα της απομονωμένης hisTim12 να αλληλεπιδρά με λιποσώματα, σε πείραμα επίπλευσης λιποσωμάτων, μετά από φυγοκέντρηση σε διάλυμα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης (βλ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ) (Buser et al., 1994; Vergeres et al., 1995; Weiss et al., 1999). Η αρχή, στην οποία βασίζεται η δοκιμασία αυτή είναι ότι σε διάλυμα με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης, λιποσώματα τοποθετημένα στον πάτο του διαλύματος κατά τη διάρκεια υπερφυγοκέντρωσης μεταναστεύουν σε σημεία χαμηλότερης συγκέντρωσης, λόγω της χαμηλής τους πυκνότητας. Εφόσον μια πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες των λιποσωμάτων, αυτή θα συμμεταναστεύσει μαζί με τα λιποσώματα σε κλάσματα χαμηλότερης συγκέντρωσης σουκρόζης.

Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη διαφέρει, όσον αφορά τη λιπιδική της σύσταση, από τις υπόλοιπες μεμβράνες του κυττάρου. Είναι πλούσια σε καρδιολιπίνη (20%) (Hatch, 2004), ένα φωσφολιπίδιο που εντοπίζεται αποκλειστικά σε μεμβράνες στις οποίες διεξάγονται διεργασίες παραγωγής ενέργειας - οξειδωτική φωσφορυλίωση - και που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία πολλών πρωτεϊνικών συστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας και την απόπτωση (Dowhan et al., 2004; McMillin and Dowhan, 2002). Κατά συνέπεια, δημιουργήθηκαν λιποσώματα τα οποία μιμούνται – όσο το δυνατόν – τη λιπιδική σύσταση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αποτελούνται από φωσφατιδυλοχολίνη και καρδιολιπίνη (βλ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ).

Στη δοκιμασία επίπλευσης χρησιμοποιήθηκε το διμερές της Tim12, το οποίο όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4 μπορεί να αλληλεπιδρά με τη λιπιδική διπλοστιβάδα, καθώς εντοπίζεται στα αρχικά κλάσματα του διαλύματος βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης. Σε παρόμοια πειράματα, όπου χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα αποτελούμενα μόνο από φωσφατιδυλοχολίνη, η Tim12 αν και φαίνεται ικανή να δεσμεύεται σε αυτά, η επίπλευση δεν είναι τόσο αποδοτική όσο με τα λιποσώματα που φέρουν και καρδιολιπίνη. Άρα, η Tim12 μπορεί και αλληλεπιδρά με τη λιπιδική διπλοστιβάδα έχοντας μεγάλη συγγένεια για τη σύσταση της διπλοστιβάδας της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.



**ΕΙΚΟΝΑ 11 Επίπλευση της Tim12 δεσμευόμενη σε λιποσώματα κατά τη φυγοκέντρωσή τους σε διάλυμα βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης.** Το διμερές της Tim12 (0,5μg) και των μεταλλαγμάτων έλλειψης επώαστηκε με λιποσώματα τα οποία τοποθετήθηκαν στον πυθμένα διαλύματος (200μL) διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης σουκρόζης. Μετά από υπερφυγοκέντρωση συλλέχτηκαν δείγματα/κλάσματα των 50μL από την κορυφή του διαλύματος προς τον πυθμένα (F1-F4) καθώς και ό,τι είχε παραμείνει στο σωλήνα (pel:pellet). Τα δείγματα φορτώθηκαν σε SDS-PAGE παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με α-Tim12 αντίσωμα. Τα λιποσώματα, λόγω της χαμηλής πυκνότητάς τους ανεβαίνουν κατά τη φυγοκέντρωση, με το μεγαλύτερο ποσοστό τους να εντοπίζεται στο πρώτο κλάσμα (F1).

Η δοκιμασία επίπλευσης των Tim12 μεταλλαγμάτων έλλειψης αποκάλυψε περιοχές της Tim12 που είναι αναγκαίες για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα λιπίδια. Συγκεκριμένα, τα μεταλλάγματα από τα οποία λείπουν τα μικρότερα, ακραία τμήματα του αμινοτελικού ή καρβοξυτελικού άκρου της Tim12 (ΔN17 και ΔC18) διατηρούν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τα λιποσώματα, ενώ τα μεταλλάγματα που φέρουν μεγαλύτερες ελλείψεις έχουν χάσει αυτή τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα ακραία τμήματα του πρωτεϊνικού

μορίου δεν χρειάζονται για την δέσμευση της Tim12 στις μεμβράνες και καθοριστικό ρόλο σε αυτό παίζουν περιοχές που βρίσκονται εσώτερα αυτών των άκρων. Μάλιστα, καθώς και η hisTim12ΔN28 και η hisTim12ΔC39 χάνουν την ικανότητα συνεπίπλευσης με τα λιποσώματα, συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη χρειάζεται περιοχές κοντά και στα δύο άκρα για να μπορεί να δεσμεύεται στη μεμβράνη, οι οποίες φέρουν περίσσεια υδρόφοβων αμινοξέων, σε σύγκριση με τα πιο ακραία αμινο- και καρβοξυτελικά τμήματα.

Η Tim12 μπορεί και αλληλεπιδρά με τη λιπιδική διπλοστιβάδα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όμως κρίσιμες για την αγκυροβόλησή της εκεί είναι διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι μεταλλάξεις που καταργούν την αλληλεπίδρασή της με τα λιποσώματα δεν επηρεάζουν τον εντοπισμό της στους μιτοπλάστες (εικόνα 2). Παρόλα αυτά, με βάση τα παραπάνω, η Tim12 εμφανίζεται ικανή να συνδέεται περιφερικά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης χωρίς την ανάγκη ύπαρξης κάποιας πρωτεΐνης που να τη συγκρατεί εκεί.

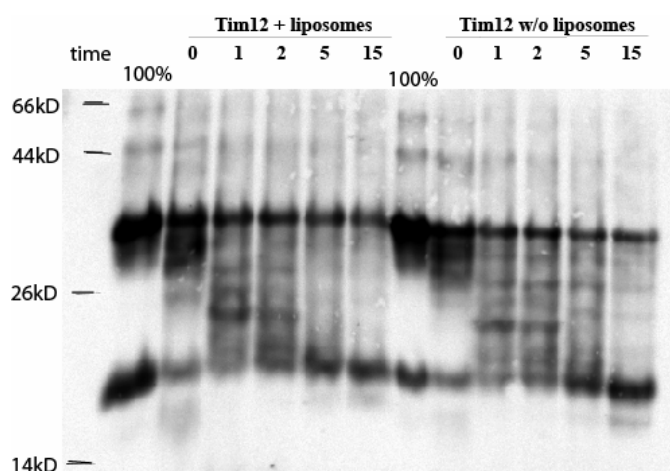
#### **ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ HISTim12 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΚΥΣΤΙΔΙΑ**

Στην προηγούμενη ενότητα έγινε αναφορά στην ικανότητα της Tim12 να αλληλεπιδρά με λιποσώματα – και μάλιστα περισσότερο αποδοτικά με λιποσώματα που περιέχουν καρδιολιπίνη, λιπίδιο χαρακτηριστικό της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Περιοχές κοντά στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης εμφανίζονται κρίσιμες για την αλληλεπίδραση αυτή. Επόμενο της δέσμευσης της hisTim12 στα μεμβρανικά κυστίδια είναι η προστασία περιοχών της από την δράση πρωτεολυτικών ενζύμων - κυρίως περιοχών που μεσολαβούν για την αλληλεπίδραση. Επιπρόσθετα, η διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου είναι πιθανό να αλλάζει κατά τη δέσμευση και κάτι τέτοιο θα ανακλάται στο πρότυπο πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης, το οποίο σε μια τέτοια περίπτωση θα διαφοροποιείται από το πρότυπο πρωτεόλυσης της μη δεσμευμένης στις μεμβράνες πρωτεΐνης.

Με βάση τα παραπάνω και για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ της hisTim12 και των κυστιδίων πραγματοποιήθηκε περιορισμένη τρυψινόλυση της hisTim12, μετά από επώασή της με λιποσώματα, υπό συνθήκες όμοιες με τις συνθήκες επώασης της πρωτεΐνης με τα λιποσώματα πριν την υπερφυγοκέντρωση του δείγματος σε διαβάθμιση συγκέντρωσης σουκρόζης (βλ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ). Υπό αυτές τις συνθήκες, ένα σημαντικό ποσοστό της πρωτεΐνης, σύμφωνα με τα πειράματα επίπλευσης λιποσωμάτων που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα, βρίσκεται προσδεμένο στις μεμβράνες των



λιποσωμάτων. Κατά την αντίδραση λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να αναλυθεί το πρότυπο πρωτεόλυσης με το πέρασμα του χρόνου.



**ΕΙΚΟΝΑ 12 Τρυψινόλυση της Tim12 παρουσία και απουσία λιποσωμάτων.** 1μg διμερούς Tim12 επώαστηκε με Τρυψίνη (1:3 αναλογία μάζας Tim12:Τρυψίνη) για τους ενδεικνυόμενους χρόνους. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-Tim12.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος, όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 5, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στο πρότυπο πρωτεόλυσης του διμερούς της hisTim12 μεταξύ των δύο διαφορετικών συνθηκών. Αυτό, ίσως, σημαίνει πως δεν πραγματοποιούνται σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου κατά την αλληλεπίδραση με τα λιποσώματα.

Αναφορικά με το τρυπτικό πρότυπο της hisTim12 απουσία λιποσωμάτων, γενικά παρατηρείται σημαντική ανθεκτικότητα στην πρωτεολυτική δραστηριότητα της τρυψίνης κάτι που αποδίδεται στην ύπαρξη ενδομοριακών (στο μονομερές) και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών (διμερές) (Baud et al, submitted). Είναι γνωστό πως η ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών σε ένα πρωτεϊνικό μόριο είναι ικανή να το καταστήσει ανθεκτικό στην πρωτεόλυση. Είναι πιθανό, λεπτές διαφορές στην προσβασιμότητα της πρωτεΐνης στην τρυψίνη να μην καθίστανται ορατές λόγω της ενδογενούς ανθεκτικότητας της πρωτεΐνης στην πρωτεάση.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ...

Μελετήθηκαν τέσσερα μεταλλάγματα έλλειψης της πρωτεΐνης Tim12 – δύο που έφεραν ελλείψεις στο αμινοτελικό άκρο και δύο που έφεραν ελλείψεις στο καρβοξυτελικό άκρο του πρωτεϊνικού μορίου, σε κάθε περίπτωση μία μικρότερη και μία μεγαλύτερη περιοχή είχαν απαλειφθεί από κάθε άκρο. Από το πείραμα ελέγχου του φαινοτύπου των μεταλλαγμάτων φάνηκε πως το μετάλλαγμα από το οποίο λείπει μεγάλο τμήμα της καρβοξυτελικής περιοχής δεν μπορεί να υποστηρίξει την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες όπου η ενδογενής Tim12 απουσίαζε. Αντίθετα, τα μεταλλάγματα που έφεραν πιο ακραίες ελλείψεις, τόσο στο καρβοξυτελικό όσο και στο αμινοτελικό άκρο δεν προκαλούν κανένα πρόβλημα αναφορικά με την επιβίωση των κυττάρων. Σε *in vitro* πειράματα, στα οποία εξετάστηκε η ικανότητα αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων με την πρωτεΐνη Tim9, η οποία έχει δείχθει πως αλληλεπιδρά *in vitro* με την Tim12, φάνηκε ότι το μετάλλαγμα αυτό παρουσιάζει την ασθενέστερη αλληλεπίδραση, σύμφωνα με την αδυναμία συμμετανάστευσης των δύο πρωτεϊνών στα ίδια κλάσματα διαλύματος με βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης. Επιπρόσθετα, χαρακτηρίστηκε η ικανότητα αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου Tim12 με μεμβράνες λιποσωμάτων, λιπιδικής σύστασης παρόμοιας με τη λιπιδική σύσταση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Βρέθηκε ότι η Tim12 έχει συγγένεια με τις μεμβράνες και μπορεί να αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Όσον αφορά τα μεταλλάγματα έλλειψης αυτά από τα οποία λείπουν μεγαλύτερα τμήματα δεν είναι πλέον ικανά να αλληλεπιδράσουν με τα λιποσώματα, σε αντίθεση με τα μεταλλάγματα με πιο ακραίες ελλείψεις, τα οποία δεν παρουσίαζαν πρόβλημα. Η σημασία της ικανότητας αλληλεπίδρασης της Tim12 στη λειτουργία της αναμένεται να χαρακτηριστεί καθώς είναι γνωστό ότι η Tim12 συνδέεται περιφερικά με τη μεμβράνη κυρίως μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Sirrenberg et al., 1998). Με βάση το παραπάνω δεδομένο, δεν προκαλεί έκπληξη που όλα τα μεταλλάγματα εισάγονται στο μιτοχόνδριο και εντοπίζονται στη συνήθη υπομιτοχονδριακή τοποθεσία.

Είναι αναγκαίος ο περαιτέρω χαρακτηρισμός τόσο της αγρίου τύπου Tim12 όσο και των μεταλλαγμάτων για την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη λειτουργία της Tim12. Με τα πειράματα που διεξήχθησαν και αναφέρονται σε αυτή την εργασία φαίνεται ότι πιο εσωτερικά τμήματα του μορίου είναι σημαντικά ή και απαραίτητα (κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο) για τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-560.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. and Brunner, M. (1999a) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J*, **18**, 313-319.
- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W. and Brunner, M. (1999b) Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo Journal*, **18**, 313-319.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **147**, 959-968.
- Allen, S., Lu, H., Thornton, D. and Tokatlidis, K. (2003) Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem*, **278**, 38505-38513.
- Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, **87**, 33-41.
- Buser, C.A., Sigal, C.T., Resh, M.D. and McLaughlin, S. (1994) Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH2 terminus of Src. *Biochemistry*, **33**, 13093-13101.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Leverich, E.P., Hwang, D.K., Beverly, K.N. and Koehler, C.M. (2004) The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *J Biol Chem*, **279**, 43744-43751.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2002) The Tim9p--Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J*, **21**, 942-953.
- Daum, G., Boehni, P.C., Schatz, G. (1982) Import of Proteins into Mitochondria. *JBC*, **257**, 13028-13033.
- Davis, A.J., Sepuri, N.B., Holder, J., Johnson, A.E. and Jensen, R.E. (2000) Two Intermembrane Space TIM Complexes Interact with Different Domains of Tim23p during Its Import into Mitochondria. *J. Cell Biol.*, **150**, 1271-1282.
- de Marcos-Lousa, C., Sideris, D.P. and Tokatlidis, K. (2006) Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem Sci*, **31**, 259-267.
- Dekker, P.J., Muller, H., Rassow, J. and Pfanner, N. (1996) Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biological Chemistry*, **377**, 535-538.
- Dekker, P.J. and Pfanner, N. (1997) Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. *J Mol Biol*, **270**, 321-327.
- Dekker, P.J., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1998) Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 6515-6524.
- Dekker, P.J.T., Falk, M., Maarse, A.C., Bømer, U., Møller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J. and Pfanner, N. (1997) The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *The EMBO Journal*, **16**, 5408-5419.

- Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M. and Pfanner, N. (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore [see comments]. *Nature*, **388**, 195-200.
- Dowhan, W., Mileykovskaya, E. and Bogdanov, M. (2004) Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 19-39.
- Eilers, M. and Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature*, **322**, 228-232.
- Endo, T., Yamamoto, H. and Esaki, M. (2003) Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci*, **116**, 3259-3267.
- Endres, M., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *Embo Journal*, **18**, 3214-3221.
- Frazier, A.E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Bilanchone, V., Cumsy, M.G., Truscott, K.N., Pfanner, N. and Rehling, P. (2004) Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 226-233.
- Gaume, B., Klaus, C., Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *Embo J*, **17**, 6497-6507.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N. and Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111**, 507-518.
- Glick, B. and Schatz, G. (1991) Import of Proteins into Mitochondria. *Annual Review of Genetics*, **25**, 21-44.
- Hachiya, N., Alam, R., Sakasegawa, Y., Sakaguchi, M., Mihara, K. and Omura, T. (1993) A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *EMBO J*, **12**, 1579-1586.
- Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G. and Lithgow, T. (1995) Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature*, **376**, 705-709.
- Hase, T., Muller, U., Riezman, H. and Schatz, G. (1984) A 70-kd protein of the yeast mitochondrial outer membrane is targeted and anchored *via* its extreme amino terminus. *The EMBO Journal*, **3**, 3157-3164.
- Hase, T., Riezman, H., Suda, K. and Schatz, G. (1983) Import of proteins into mitochondria: nucleotide sequence of the gene for a 70-kd protein of the yeast mitochondrial outer membrane. *EMBO*, **2**, 2169-2172.
- Hatch, G.M. (2004) Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. *Biochem Cell Biol*, **82**, 99-112.
- Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 210-214.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature*, **395**, 516-521.

- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brutsch, H. and Schatz, G. (1990) Protein Import into Yeast Mitochondria Is Accelerated by the Outer Membrane Protein Mas70. *EMBO J.*, **9**, 3191-3200.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *The EMBO Journal*, **15**, 2125-2137.
- Horst, M., Oppliger, W., Feifel, B., Schatz, G. and Glick, B.S. (1996) The mitochondrial protein import motor: dissociation of mitochondrial hsp70 from its membrane anchor requires ATP binding rather than ATP hydrolysis. *Prot. Sci.*, **5**, 759-767.
- Jarosch, E., Tuller, G., Daum, G., Waldherr, M., Voskova, A. and Schweyen, R.J. (1996) Mrs5p, an essential protein of the mitochondrial intermembrane space, affects protein import into yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **271**, 17219-17225.
- Kang, P.-J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**, 137-143.
- Kerscher, O., Sepuri, N.B. and Jensen, R.E. (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell*, **11**, 103-116.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I., Pfanner, N. and Neupert, W. (1993) The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell*, **74**, 483-492.
- Koehler, C.M. (2000) Protein translocation pathways of the mitochondrion. *Febs Letters*, **476**, 27-31.
- Koehler, C.M. (2004a) New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 309-335.
- Koehler, C.M. (2004b) The small Tim proteins and the twin Cx(3)C motif. *Trends Biochem Sci*, **29**, 1-4.
- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J. and Schatz, G. (1998a) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, **279**, 369-373.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Tokatlidis, K. (1998b) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo Journal*, **17**, 6477-6486.
- Koehler, C.M., Merchant, S. and Schatz, G. (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci*, **24**, 428-432.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. and Or, E. (2000) Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 1187-1193.
- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. and Mihara, K. (1998) Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *The EMBO Journal*, **17**, 3886-3898.

- Komiya, T., Rospert, S., Schatz, G. and Mihara, K. (1997) Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. *The EMBO Journal*, **16**, 4267-4275.
- Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Muller, H., Jensen, R.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2002) Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell*, **9**, 363-373.
- Kronidou, N.G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B.S., Schatz, G. and Horst, M. (1994) Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12818-12822.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019.
- Leuenberger, D., Bally, N.A., Schatz, G. and Koehler, C.M. (1999) Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *Embo Journal*, **18**, 4816-4822.
- Leuenberger, D., Curran, S.P., Wong, D. and Koehler, C.M. (2003) The Role of Tim9p in the Assembly of the TIM22 Import Complexes. *Traffic*, **4**, 144-152.
- Lithgow, T., Junne, T., Suda, K., Gratzer, S. and Schatz, G. (1994) The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**, 11973-11977.
- Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P. and Tokatlidis, K. (2004) Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 18952-18958.
- Lutz, T., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Embo J*, **22**, 4400-4408.
- Martin, J., Mahlke, K. and Pfanner, N. (1991) Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18051-18057.
- McMillin, J.B. and Dowhan, W. (2002) Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1585**, 97-107.
- Meinecke, M., Wagner, R., Kovermann, P., Guiard, B., Mick, D.U., Hutu, D.P., Voos, W., Truscott, K.N., Chacinska, A., Pfanner, N. and Rehling, P. (2006) Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. *Science*, **312**, 1523-1526.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2001) Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol*, **21**, 2337-2348.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. and Herrmann, J.M. (2005) A Disulfide Relay System in the Intermembrane Space of Mitochondria that Mediates Protein Import. *Cell*, **121**, 1059-1069.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kuhlbrandt, W., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2002) Protein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane: Role of Import Receptors in the Structural Organization of the TOM Complex. *J Mol Biol*, **316**, 657-666.

- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W. and Hell, K. (2003) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *Embo J*, **22**, 816-825.
- Nakai, M. and Endo, T. (1995) Identification of yeast MAS17 encoding the functional counterpart of the mitochondrial receptor complex protein MOM22. *FEBS Lett.*, **357**, 202-206.
- Nelson, D.R., Felix, C.M. and Swanson, J.M. (1998) Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J Mol Biol*, **277**, 285-308.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 863-917.
- Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 555-565.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *Embo J*, **21**, 3659-3671.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *Embo Journal*, **19**, 6392-6400.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D. and Neupert, W. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, **426**, 862-866.
- Pfaller, R., Steger, H.F., Rassow, J., Pfanner, N. and Neupert, W. (1988) Import Pathways of Precursor Proteins into Mitochondria: Multiple Receptor Sites Are Followed By a Common Membrane Insertion Site. *J. Cell Biol.*, **107**, 2483-2490.
- Pfanner, N. and Geissler, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 339-349.
- Pfanner, N., Hoeben, P., Tropfschug, M. and Neupert, W. (1987a) The carboxyl-terminal Two thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 14851-14854.
- Pfanner, N. and Neupert, W. (1985) Transport of proteins into mitochondria: a potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier. *Embo J*, **4**, 2819-2825.
- Pfanner, N. and Neupert, W. (1987) Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 7528-7536.
- Pfanner, N., Tropschug, M. and Neupert, W. (1987b) Mitochondrial Protein Import: Nucleoside Triphosphates Are Involved in Conferring Import-Competence to Precursors. *Cell*, **49**, 815-823.
- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C. and Lithgow, T. (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1044-1048.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T. and Schatz, G. (1993) Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J.*, **12**, 4115-4123.
- Rassow, J., Hartl, F.U., Guiard, B., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) Polypeptides Traverse the Mitochondrial Envelope in an Extended State. *FEBS Lett*, **275**, 190-194.
- Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kubrich, M., Muller, H., Meijer, M., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and



- genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol*, **127**, 1547-1556.
- Rassow, J. and Pfanner, N. (1991) Mitochondrial preproteins en route from the outer membrane to the inner membrane are exposed to the intermembrane space. *FEBS Lett.*, **293**, 85-88.
- Rehling, P., Brandner, K. and Pfanner, N. (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 519-530.
- Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour. *J Mol Biol*, **326**, 639-657.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., Allison, D.S. and Schatz, G. (1988) Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J*, **7**, 649-653.
- Sadler, I., Suda, K., Schatz, G., Kaudewitz, F. and Haid, A. (1984) Sequencing of the nuclear gene for the yeast cytochrome c1 precursor reveals an unusual complex amino-terminal presequence. *EMBO J*, **3**, 2137.
- Scherer, P.E., Krieg, U.C., Hwang, S.T., Vestweber, D. and Schatz, G. (1990) A Precursor Protein Partly Translocated into Yeast Mitochondria Is Bound to a 70 kd Mitochondrial Stress Protein. *EMBO J*, **9**, 4315-4322.
- Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N. and Neupert, W. (1994) Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11893-11901.
- Schneider, H.-C. (1996) The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *The EMBO Journal*, **15**, 5796-5803.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/ MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-773.
- Schnell, D.J. and Hebert, D.N. (2003) Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell*, **112**, 491-505.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13207-13212.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, **384**, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912-915.
- Sollner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N. and Neupert, W. (1989) Mom19, an Import Receptor for Mitochondrial Precursor Proteins. *Cell*, **59**, 1061-1070.
- Sollner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell*, **62**, 107-115.
- Sollner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W. and Pfanner, N. (1992) Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates. *Nature*, **355**, 84-87.

- Steger, H.F., Sollner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K.A., Pfaller, R., Trulzsch, K.S., Tropschug, M., Neupert, W. and Pfanner, N. (1990) Import of ADP/ATP Carrier into Mitochondria - Two Receptors Act in Parallel. *J Cell Biol*, **111**, 2353-2363.
- Taylor, A.B., Smith, B.S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A. and Deisenhofer, J. (2001) Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure (Camb)*, **9**, 615-625.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. and Wagner, R. (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*, **8**, 1074-1082.
- Truscott, K.N., Voos, W., Frazier, A.E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Muller, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P. and Pfanner, N. (2003) A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*, **163**, 707-713.
- Truscott, K.N., Wiedemann, N., Rehling, P., Muller, H., Meisinger, C., Pfanner, N. and Guiard, B. (2002) Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 7780-7789.
- Ungermann, C., Neupert, W. and Cyr, D.M. (1994) The role of hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science*, **266**, 1250-1253.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Honlinger, A. and Pfanner, N. (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, **401**, 485-489.
- Vergeres, G., Manenti, S., Weber, T. and Sturzingar, C. (1995) The myristoyl moiety of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein is embedded in the membrane. *J Biol Chem*, **270**, 19879-19887.
- Vergnolle, M.A., Sawney, H., Junne, T., Dolfini, L. and Tokatlidis, K. (2005) A cryptic matrix targeting signal of the yeast ADP/ATP carrier normally inserted by the TIM22 complex is recognized by the TIM23 machinery. *Biochem J*, Vol. 385, pp. 173-180.
- von Ahsen, O., Voos, W., Henninger, H. and Pfanner, N. (1995) The mitochondrial protein import machinery. Role of ATP in dissociation of the Hsp70.Mim44 complex. *J Biol Chem*, **270**, 29848-29853.
- von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*, **5**, 1335-1342.
- Voos, W., Martin, H., Krimmer, T. and Pfanner, N. (1999) Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1422**, 235-254.
- Wachter, C., Schatz, G. and Glick, B.S. (1992) Role of ATP in the intramitochondrial sorting of cytochrome  $c_1$  and the adenine nucleotide translocator. *The EMBO Journal*, **11**, 4787-4794.
- Waldherr, M., Ragnini, A., Jank, B., Teply, R., Wiesenberger, G. and Schweyen, R.J. (1993) A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr Genet*, **24**, 301-306.

- Webb, C.T., Gorman, M.A., Lazarou, M., Ryan, M.T. and Gulbis, J.M. (2006) Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell*, **21**, 123-133.
- Weiss, C., Oppliger, W., Vergeres, G., Demel, R., Jenö, P., Horst, M., de Kruijff, B., Schatz, G. and Azem, A. (1999) Domain structure and lipid interaction of recombinant yeast Tim44. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8890-8894.
- Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W. and Schwarz, E. (1995) The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *The EMBO Journal*, **14**, 3452-3460.
- Wiedemann, N., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (2001) The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *Embo Journal*, **20**, 951-960.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. and Endo, T. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*, **111**, 519-528.
- Zimmermann, R. and Neupert, W. (1980) Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria in vitro. *European Journal of Biochemistry*, **109**, 217-229.