ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

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

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

"ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΣΟΥΛΦΥΔΡΙΛΟΞΕΙΔΑΣΗΣ Erv1 ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ"

ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ ΚΑΛΛΕΡΓΗ

Τριμελής επιτροπή:

Χ. Σπηλιανάκης (Υπεύθυνος Καθηγητής)
 Ν. Ταβερναράκης (Μέλος Τριμελούς)
 Κ. Τοκατλίδης (Επιβλέπων Καθηγητής)

Ηράκλειο Κρήτης Σεπτέμβριος, 2013

Στην οικογένειά μου...

~Ευχαριστίες~

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Κώστα Τοκατλίδη που με δέχτηκε στο εργαστήριό του δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον βιολογικό θέμα. Είμαι ευγνώμων για την αμέριστη υποστήριζή του καθόλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής και για την ουσιαστική συνεργασία που είχαμε όλο αυτό τον καιρό. Ευχαριστώ πολύ για όλα.

Πολλά ευχαριστώ θέλω να πω και στη Νίτσα Κατρακίλη για το ενδιαφέρον της και την προθυμία της να με βοηθήσει σε ό,τι χρειαζόμουν κατα την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Ευχαριστώ για την συνεργασία που είχαμε στην εκπόνηση πολλών πειραμάτων. Οι συμβουλές της πάνω στα πειράματα αλλά και πέρα από αυτά ήταν πολύτιμες για μένα.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την φίλη μου Χατζή Αφροδίτη που ήταν ο συνοδοιπόρος μου όλο αυτόν τον καιρό. Εκτός από την πειραματική βοήθεια που μου έδωσε όποτε χρειάστηκε ήταν πρόθυμη να ακούσει τον κάθε προβληματισμό μου. Πολλά πράγματα που είδαμε και ακούσαμε μαζί θα μου θυμίζουν πάντα αυτά τα όμορφα χρόνια στο εργαστήριο. Είμαι πολύ τυχερή που τη γνώρισα, δεν θα μπορούσα να έχω καλύτερη παρέα!

Πολλά ευχαριστώ και στις Ειρήνη Λιονάκη, Μαρία Ανδρεαδάκη, Παρασκευή Κριτσιλίγκου και στον Μπάμπη Ποζίδη, για την ενεργή συμμετοχή τους και τη συνεργασία τους σε πειράματα της συγκεκριμένης διατριβής. Ευχαριστώ τα κορίτσια του εργαστηρίου, Έστερ, Βίβιαν, Έρση, Esther, ιδιαιτέρως τη Φανή και την Κατερίνα, τα παιδιά από τα «διπλανά» εργαστήρια, κυρίως την Κλαίρη και την Ελβίρα, και τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Τζένη, Γιωργία, Γιολάντα και Εύη, για την όποια βοήθεια και για την όμορφη ατμόσφαιρα που έδινε η παρέα τους..

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου, εκτός εργαστηριακού χώρου, Πέρσα, Αναστασία, Άρτεμις, Ιωάννα, Μακρίνα, Μαρία Κ, Μαρία Μ, Μαίρη και Σοφία που με στηρίζουν και με εμψυχώνουν σε ό, τι και αν κάνω, τη θεία μου Μαρία που πάντα πιστεύει σε μένα, και κυρίως τους γονείς μου Γιώργη και Μαρίνα και τις αδερφές μου Μαρία και Αλεξία, που χωρίς την δική τους συμπαράσταση, θα μου ήταν πολύ πιο δύσκολο να προχωρήσω. Η αγάπη σας μου δίνει δύναμη να συνεχίζω..σας ευχαριστώ...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	ii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	X
ПЕРІАНҰН	xii
ABSTRACT	xiv
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και η σημασία τους	2
2. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα	3
3.Μονοπάτια εισαγωγής και μεταφοράς πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο	του
σακχαρομύκητα	4
4. Η οζειδορεδουκτάση Mia40/Tim40	10
5. Τα υποστρώματα του MIA μονοπατιού	12
6. Αλληλεπίδραση Mia40-υποστρώματος	14
7. Η FAD-εζαρτώμενη σουλφυδριλοζειδάση Erv1	15
8. Η ομόλογη πρωτεΐνη Erv1, ALR, στον άνθρωπο	16
9. Αλληλεπίδραση Mia40-Erv1/ALR στο μονοπάτι MIA	18
10. Παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία του μονοπατιού ΜΙΑ	21
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΟΠΟΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	24
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας	28
1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA	28
1.2 Κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακούς φορείς	28
1.3 Μεταλλαζιγένεση γονιδίων	30
2. In organello τεχνικές (Χειρισμός μιτοχονδρίων)	31
2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από τα στελέχη αγρίου τύπου, galErv1και galMia4	0 του
σακχαρομύκητα	31
2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων στα μιτοχόνδρια	του
σακχαρομύκητα	.32
2.3 Ανοσοκατακρήμνιση μετά από πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια	33
2.4 Είσοδος ραδιοσημασμένου πρόδρομου μορίου σε galErv1 μιτοχόνδρια σε	δύο
στάδια	33
2.5 Δημιουργία μιτοπλαστών	34

2.6 Εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο (carbonate extraction)35
3. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών35
3.1 Έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια
3.2 Καθαρισμός πρωτεϊνών
3.3 In vitro αλληλεπίδραση των Erv1 και Mia40 πρωτεϊνών37
3.4 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών Mia40, Ervl και κυτοχρώματος c σε μιτοχόνδρια
αγρίου τύπου
3.5 Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το in vitro σύστημα σύζευζης
μεταγραφής- μετάφρασης (Coupled Transcription / Translation, $T_N T$)
3.6 Μέθοδος πρόσδεσης σε συστοιχία ακινητοποιημένων πεπτιδίων
4. Χειρισμός κυττάρων σακχαρομύκητα
4.1 Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη
4.2 Πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας (Complementation test)40
ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ
κεφαλαίο \mathbf{I} : είσοδος και ωριμανσή της πρωτεινής erv1/alr στο
ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ
(ΣΤΑΔΙΟ Α)44
1. Εισαγωγή-Σκοπός
2. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα
2.1 Είσοδος της πρωτεΐνης Erv1 στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου του
σακχαρομύκητα46
2.1.1 Οι κυστεΐνες του δομικού μοτίβου CX16C της Erv1 παίζουν σημαντικό ρόλο στην
είσοδό της στο μιτοχόνδριο in organello46
2.1.2 Οι κυστεΐνες C159 και C176 επηρεάζουν την είσοδο της Erv1 στα μιτοχόνδρια
σακχαρομύκητα in organello48
2.1.3 Οι δομικές κυστεΐνες C159 και C176 της Ervl είναι σημαντικές για την
βιωσιμότητα του σακχαρομύκητα in vivo49
2.1.4 Το υπόστρωμα Erv1 αλληλεπιδρά με τη Mia40 μέσω μιας συγκεκριμένης περιοχής
43 αμινοζέων στο καρβοζυτελικό της μέρος51
2.2Μηχανισμός ωρίμανσης της Erv1/ALR πρωτεΐνης (δομική ανάλυση)
2.2.1 Δομική μελέτη της αποδιαταγμένης και ανηγμένης sf-ALR in vitro
2.2.2 Η ωρίμανση της Erv1/ALR πρωτεΐνης απαιτεί τη δράση της Mia40 σε πρώτο
στάδιο και την πρόσδεση FAD μορίου ακολούθως54
3. Σύνοψη κεφαλαίου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ	II:	ΜΕΛΕΤΗ	TOY	MOPIAKOY	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡ	ΑΣΗΣ	των πρωτε	ÏNΩN Mi	ia40 KAI Erv1/A	LR OTAN H Erv1
ΕΠΑΝΟΞΕΙΔΩ	NEI TH	I Mia40 (ΣΤΑ/	4IO B)		
1. Εισαγωγή-Σκα	οπός				60
2. Αποτελέσματα	-Συζήτι	<i>ιση</i>			61
2.1 Συγκεκριμέν	α υδρό	ροβα αμινοξέα	της Ervl	/ALR αλληλουχία	ς είναι αναγκαία για
την επανοξείδωσ	η της Ν	lia40 in vitro			61
2.2 Μελέτη της μ	οριακή	ς αλληλεπίδρασ	της Mia40	-Erv1 in organelle	o63
2.2.1. Τα υδρόφ	οβα μετ	αλλάγματα της	Erv1, LL	.F/E, LLFQ/A кал	: LLQ/Α μπορούν να
εισέλθουν στο μ	τοχόνδ	ριο του σακχαμ	οομύκητα,	όπως η αγρίου τ	ύπου Ervl πρωτεΐνη
(στάδιο Α)					63
2.2.2 Τα υδρόφο	βα μετ	αλλάγματα της	Ervl, LL	F/E, LLFQ/A και	LLQ/Α έχουν χάσει
την ικανότητα επ	ανοζεία	δωσης της Mia-	40 in orga	nello (στάδιο B)	65
2.3 Μελέτη αλ	ληλεπίδ	ρασης των υ	δρόφοβων	ν μεταλλαγμάτων	της Erv1, LLF/E,
LLFQ/A каı LLQ	<u>)</u> /Α με τ	την Μia40 πρω	τεΐνη in vi	tro	67
2.4 Μελέτη των	υδρόφο	βων μεταλλαγμ	ιάτων της	Erv1, LLF/E, LL	FQ/A και LLQ/A in
vivo					69
2.5 Ποσοτικοποί	ηση τω	ν πρωτεϊνών Μ	lia40, Erv	1 και κυτοχρώματ	ος c στο μιτοχόνδριο
του σακχαρομύκι	ητα (in	organello)			71
3. Σύνοψη κεφαλ	αίου				73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ	III:	ΔOMIKH	KAI A	ΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ	ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ
ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚ	OY Ak	ΈΡΟΥ ΤΗΣ Ει	rv1/ALR	ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑ	ΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ
ΣΤΗ ΣΤΟΧΕΥΣ	Η ΤΗΣ	ΣΤΟ ΜΙΤΟΧ	ΟΝΔΡΙΟ	ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟ	МҮКНТА77
1 Εισαγωγή-Σκο	πός				
2. Αποτελέσματα	-Συζήτι	<i>ιση</i>	, 		79
2.1 Δομική και	in sili	co μελέτη του	αμινοτελι	κού άκρου της α	<i>σουλφυδριλο</i> ξειδάσης
Erv1/ALR					79
2.2 Μελέτη το	υ αμι	νοτελικού μέρ	ους της	σουλφυδριλοξειδο	άσης Erv1/ALR in
organello	•••••				81
2.3 Το αμινοτε.	λικό με	έρος της σουλ	φυδριλοξε	ιδάσης Erv1/ALK	^χ φέρει πληροφορία
στόχευσης για τη	ν μη μι	τοχονδριακή πρ	οωτεΐνη Di	HFR in organello.	
2.4 Υπομιτοχονδ	ριακός	εντοπισμός του	πρωτεϊνικ	κού μορίου N72-D	HFR84
2.5 Μελέτη των	, δομικ	ών υποπεριοχ	ών N72 i	και ΔΝ72 της Εί	rv1 όσον αφορά τη
στόχευση του μο	ρίου στα	ο μιτοχόνδριο τ	ου σακχαρ	ομύκητα	86

2.6 Μελέτη της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης των Erv1-Mia40 χρησ	σιμοποιώντας
συστοιχία ακινητοποιημένων πεπτιδίων	88
3.Σύνοψη κεφαλαίου	
ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	94
ВІВЛІОГРАФІА	100
ПАРАРТНМАТА	123

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ανταλλαγή θειόλης-δισουλφιδίου μεταξύ μιας πρωτεΐνης και ενός οξειδοαναγωγικού παράγοντα

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του μιτοχονδρίου και η διαμερισματοποίησή του

Εικόνα 3: Μονοπάτια εισόδου και αντίστοιχα σύμπλοκα μεταφορείς για την ταξινόμηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο εκάστοτε υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα

Εικόνα 4: Η Μία40/ΜΙΑ40 πρωτεΐνη

Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης CHCH για τη (a) Mia40, (b) Cu(I)Cox17 και (c) Tim9

Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του MISS/ITS σήματος των τυπικών υποστρωμάτων της Mia40 (Tims, Cox)

Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της αναγνώρισης του υποστρώματος απο τη Mia40 στο IMS

Εικόνα 8: Οι πρωτεΐνες Erv1/ALR

Εικόνα 9: Διάγραμμα κορδέλας των πρωτεϊνών Erv1 του σακχαρομύκητα και sf-ALR του ανθρώπου

Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του οξειδοαναγωγικού συστήματος Mia40-Erv1

Εικόνα 11: Η διττή (δύο φάσεων) αλληλεπίδραση Mia40-Erv1 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα

Εικόνα 12: Αυτοραδιογραφία της αγρίου τύπου Erv1 και των μεταλλαγμάτων της C30//33S, C130/133S και C159/176S

Εικόνα 13: Αυτοραδιογραφία μετά από είσοδο των ραδιενεργών μονών κυστεϊνικών μεταλλαγμάτων C159S και C176S της Erv1 σε αγρίου τύπου απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα

Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *Erv1* χρησιμοποιώντας τον υποκινητή Gal1-10

Εικόνα 15: In vivo δοκιμασία γενετικής συμπλήρωσης στα galErv1 κύτταρα σακχαρομύκητα τα οποία φέρουν το αντίστοιχο πλασμίδιο έκφρασης της εκάστοτε Erv1 εκδοχής

Εικόνα 16: Η Erv1 ως υπόστρωμα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Mia40 μέσω μιας περιοχής 43 αμινοξέων

Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα

Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των υδρόφοβων μεταλλάξεων που πραγματοποιήθηκαν καθοδικά του CRSC μοτίβου των κυστεϊνών κίνησης της πρωτεΐνης Erv1

Εικόνα 19: Αυτοραδιογραφία μετά απο ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE που δείχνει την είσοδο και αλληλεπίδραση των ραδιενεργών εκδοχών της Erv1

Εικόνα 20: Αυτοραδιογραφία μετά απο SDS-PAGE κάτω απο μη αναγωγικές συνθήκες του πειράματος εισόδου δύο σταδίων σε galErv1 απομονωμένα μιτοχόνδρια

Εικόνα 21: Αυτοραδιογραφία της αγρίου τύπου Erv1 και των μεταλλαγμάτων της C30//33S, C130/133S και C159/176S

Εικόνα 22: Σύγκριση της κυτταρικής ανάπτυξης του galErv1 στελέχους S. cerevisiae που φέρει τα πλασμίδια έκφρασης των Erv1 αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων (LLQ/A, LLFQ/A και LLF/E)

Εικόνα 23: Δοκιμασία γενετικής συμπλήρωσης *in vivo* για τα μονά υδρόφοβα μεταλλάγματα F/A και F/E σε galErv1 κύτταρα σακχαρομύκητα

Εικόνα 24: Ανοσοαποτύπωση μετά από Tricine SDS-PAGE ανάλυση των πρωτεϊνών Mia40, Erv1 και κυτοχρώματος c *in organello*

Εικόνα 25: Ο μηχανισμός "μίμησης του υποστρώματος" της αλληλεπίδρασης Mia40-Erv1

Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση των δομικών χαρακτηριστικών του αμινοτελικού άκρου N80 της lf-ALR

Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση των δομικών χαρακτηριστικών του αμινοτελικού άκρουυ του N72 της Erv1

Εικόνα 28: Πείραμα εισότου του πεπτιδίου Ν72 της Εrv1

Εικόνα 29: Αυτοραδιογραφία μετά απο SDS-PAGE ανάλυση του πειράματος εισόδου του χιμερικού πρωτεϊνικού μορίου N72-DHFR σε αγρίου τύπου και galMia40 μιτοχόνδρια και του DHFR-N72 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για 10 λεπτά

Εικόνα 30: Υπομιτοχονδριακός εντοπισμός του πρωτεϊνικού μορίου N72-DHFR

Εικόνα 31: Αυτοραδιογραφία μετά απο πείραμα εισόδου των Erv1-DHFR και DHFR-Erv1 σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια

Εικόνα 32: Διαγραμματική απεικόνιση της δοκιμασίας πρόσδεσης της πρωτεΐνης Mia40 πάνω στη μεμβράνη ακινητοποιημένων πεπτιδίων της πρωτεΐνης Erv1

Εικόνα 33: Ανοσοαποτύπωση με α-Mia40 της συστοιχίας ακινητοποιημένων πεπτιδίων της Erv1 για την εύρεση των περιοχών του Erv1 πρωτεϊνικού μορίου που αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με τη Mia40

Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου του αμινοτελικού άκρου της Erv1/ALR στην στόχευση-βιογένεση της πρωτεΐνης Erv1/ALR στα μιτοχόνδρια και στην επανοξείδωση της Mia40 Εικόνα 35: Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Erv1 και Ssa1

Εικόνα 36: Η είσοδος της Erv1 πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο εξαρτάται απο το σύμπλοκο TOM

Πίνακας 1: Περιγραφή πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Πίνακας 2: Παρουσίαση των 13-μερών πεπτιδίων της πρωτεΐνης Erv1 που εμφάνισαν την ισχυρότερη πρόσδεση με τη πρωτεΐνη ΔΝ290Mia40 αγρίου τύπου

Πίνακας 3: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη Erv1

Πίνακας 4: Ποσοτικοποίηση της Erv1 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια

Πίνακας 5: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη Mia40

Πίνακας 6: Ποσοτικοποίηση της Mia40 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια

Πίνακας 7: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη κυτόχρωμα c

Πίνακας 8: Ποσοτικοποίηση του κυτοχρώματος c σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια

Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Erv1

Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Mia40

Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης κυτόχρωμα c

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAC2	ATP/ADP Carrier 2
ALR	Augmenter of Liver Regeneration
Сср1	Cytochrome c peroxidase 1
CK2	Casein Kinase 2
Cox19	Cytochrome c oxidase 19
СРС	μοτίβο ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης Mia40
CHCH	Coiledcoli, Helix, Coiledcoil, Helix
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DTT	Dithiothreitol - διθειοθρεϊτόλη
Erv1	Essential for respiration and viability 1
Erv1 ^{sub}	Erv1 ως υπόστρωμα της Mia40
Erv1 ^{act}	Erv1 ως σουλφυδριλοξειδάση της Mia40
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide – Φλάβινο αδένινο δινουκλεοτίδιο
GFER	Growth Factor Erv1
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hot13	Helper of Tim 13
HSS	Hepatic Stimulator Substance
IMP	Inner Membrane Peptidase
IM	Inner Membrane – Εσωτερική μεμβράνη
IMS	Intermebrane Space – Διαμεμβρανικός χώρος
ITS	Intermembrane space Targeting Signal – Σήμα στόχευσης στο IMS
lf-ALR	long form ALR- μεγάλου μήκους ALR
Mia40	Mitochondrial Import and Assembly, Saccharomyces cerevisiae Mia40-
H Mia40 c	στο σακχαρομύκητα
MIA40	Homo sapiens MIA40- Ανθρώπινη Mia40
MINOS	Mitochondrial Inner-membrane Organizing System
MISS	Mitochondrial IMS Sorting Signal
MPP	Matrix Presequence Peptidase
MTS	Mitochondrial targeting signal- Σήμα στόχευσης στο μιτοχόνδριο
mtHsp70.	mitochondrial Heat shock protein 70
NEM	N-ethyl maleimide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide – Νικοτινοαμιδο αδενινο
δινουκλεο	τίδιο
NMR	Nuclear Magnetic Resonance - Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
OM	Outer Membrane- εξωτερική μεμβράνη
PAGE	Polyaclylamide Gel Electrophoresis – Ηλεκροφόρηση πηκτής
πολυακριλ	αμιδίου
PAM	Presequence translocase Associated Motor complex
PCR	Polymerase Chain Reaction – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PK	Proteinase K – Πρωτεϊνάση K
PKA	protein kinase A- Κινάση A
PMSF	PhenylMethaneSulphonylFluoride
SAM	Sorting and Assembly Machinery
SBTI	Soybean trypsin inhibitor
SDS	Sodium Docecyl Sulfate
st-ALK	short form ALR- Μικρού μήκους ALR
Suy	Subunit 9 of the ATP synthase- Υπομονάδα 9 της ATP συνθάσης
ТСА	TriCloroAcetic Acid – Τριχλωροοξικό οξύ

Tim..... Translocase of the inner membrane

TIM.....Translocase of the Inner Membrane – Μεταθετάση της εσωτερικής μεμβράνης

ΤΟΜTranslocase of the Outer Membrane – Μεταθετάση της εξωτερικής μεμβράνης

Tris.....tris(hydroxymethyl)aminomethane

wt..... Wild Type – αγρίου τύπου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως στην αναπνοή, στην παραγωγή ATP και στην απόπτωση. Η βιογένεση των μιτοχονδρίων εξαρτάται από την εισαγωγή πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο που πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών μονοπατιών εισόδου. Πρόσφατα, το μονοπάτι MIA (Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly) έχει περιγραφεί ως ένα σύστημα οξείδωσης δισουλφιδίων στον οργανισμό Saccharomyces cerevisiae που δίνει δισουλφιδικούς δεσμούς σε μια ποικιλία διαφορετικών πρωτεϊνών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (IMS). Η λειτουργία αυτού του μονοπατιού εξαρτάται από δύο πρωτεΐνες: την σουλφυδριλοξειδάση Erv1/ALR και την οξειδορεδουκτάση Mia40, που μαζί οδηγούν την είσοδο πρόδρομων πρωτεϊνικής τους αναδίπλωσης.

Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή, μελετάμε την διττή αλληλεπίδραση μεταξύ των Mia40-Erv1 με βιοχημικές, in organello, in vitro και in vivo προσεγγίσεις, η οποία συμβαίνει σε δύο στάδια: (α) η Erv1, αναγνωρίζεται και οξειδώνεται απο τη Mia40, ως υπόστρωμα του ΜΙΑ μονοπατιού (Στάδιο Α) και (β) η αναδιπλωμένη και λειτουργική Erv1 οξειδώνει το ενεργό κέντρο της Mia40 (Στάδιο B). Μελετώντας την είσοδο και την ωρίμανση της Erv1 (Στάδιο A) χαρακτηρίσαμε την ελάχιστη περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο που απαιτείται για την αναγνώριση και την οξείδωσή της από τη Mia40 πριν από την μεταγενέστερη πρόσδεση ενός μορίου FAD ανά μονομερές. Απο την άλλη πλευρά, μελετώντας το ρόλο της Erv1 στην επανοξείδωση της Mia40 (Στάδιο B) βρήκαμε ότι συγκεκριμένα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα καθοδικά του CRSC μοτίβου κυστεϊνών στο αμινοτελικό άκρο της Erv1, απαιτούνται για την ανακύκλωση της Mia40, αλλά όχι για την εισαγωγή της στο μιτοχόνδριο. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το σε μεγάλο βαθμό αδόμητο κομμάτι των πρώτων 72 αμινοξέων της Erv1 (N72) εμφανίζεται στο κυτοσόλιο να παίζει ρόλο στη στόχευση της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, πέρα απο το ρόλο του στην επανοξείδωση της Mia40. Αυτός ο εξαρτώμενος απο το υποκυτταρικό διαμέρισμα οξειδοαναγωγικός έλεγχος του αμινοτελικού κομματιού της Erv1 γεννά πρόσθετα ερωτήματα σχετικά με την αλληλεπίδρασή του με την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων καθώς και με σαπερόνες του κυτοσολίου. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας δίνουν περισσότερη πληροφορία στο πεδίο της εισόδου πρωτεϊνών στο

μιτοχόνδριο προκειμένου να μελετήσουμε σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια την αλληλεπίδραση Mia40-Erv1, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη βιογένεση της Erv1, τη λειτουργία του MIA μονοπατιού και επομένως για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

ABSTRACT

Mitochondria are essential organelles of eukaryotic cells as they play a central role in many cellular procedures as respiration, ATP production and apoptosis. Biogenesis of mitochondria depends on mitochondrial protein import performed by different import pathways. Recently, MIA pathway has been described as a disulfide oxidative system in *Saccharomyces cerevisiae* that gives disulfides in a variety of different proteins in the mitochondrial intermembrane space (IMS). Functionallity of this pathway depends on two proteins: the sulfhydryl oxidase Erv1/ALR and the oxidoreductase Mia40, that together drive the import of preproteins with conserved cysteines, into the IMS through their oxidative folding.

In this PhD thesis, we study the Mia40-Erv1 bimodal interaction by mainly biochemical, in organello, in vitro and in vivo approaches, that occurs in two different steps: (a) Erv1, gets recognized and oxidized by Mia40, as a substrate of MIA pathway (Step A) and (b) folded and functional Erv1 oxidizes the active site of Mia40 (Step B). Studying the import and maturation of Erv1 (Step A) we characterized the minimal region in its carboxyl-terminal part that is required for its recognition and oxidation by Mia40 before the subsequent binding of FAD molecule per its monomer. On the other hand, studying the role of Erv1 in Mia40 re-oxidation (Step B) we found that certain hydrophobic residues downstream of the cysteine motif CRSC Nterminally of Erv1 are required for Mia40 recycling, but not for its mitochondrial import. Moreover, our results showed the part of the first 72 largely unstructured amino acids of Erv1 (N72) shows a targeting role in cytosol, apart from its role in Mia40 re-oxidation. This compartment-dependent redox control of the amino-terminal part of Erv1 raises additional questions concerning its interaction with the outer mitochondrial membrane as well as cytosolic chaperones. The above results give us more information in the field of mitochondrial import in order to study in more detail the Mia40-Erv1 molecular interaction which is crucial for the Erv1 biogenesis, the function of the MIA pathway and hence for the mitochondrial biogenesis and cell viability.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και η σημασία τους

Οι πρωτεΐνες είναι βιολογικά μόρια που συντίθενται ως γραμμικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες αμινοξέων από τα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος του κυττάρου και στη συνέχεια αναδιπλώνονται ραγδαία στην κατάλληλη τριτοταγή τους δομή. Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης που αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων της πολυπετιδικής αλυσίδας είναι αυτή που καθορίζει τη σωστή διαμόρφωσή της στο χώρο.

Οι περισσότερες εκκρινόμενες πρωτεΐνες, μετά την παραγωγή τους απο τα ριβοσώματα, τροποποιούνται ομοιοπολικά με το σχηματισμό των κατάλληλων δισουλφιδικών δεσμών που τελικά φέρουν. Η διαδικασία αυτή που συμβαίνει στις περισσότερες περίπτωσεις μετα-μεταφραστικά, κατά την διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Σε περίπτωση που η δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών συμβεί λανθασμένα, η πρωτεΐνη οδηγείται σε σχηματισμό συσσωματωμάτων και αποικοδομείται από πρωτεάσες του κυττάρου (Mamathambika & Bardwell, 2008).

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

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί πέρα απο τον σημαντικό τους ρόλο στην σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση είναι απαραίτητοι για τη σταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, καθώς μειώνουν την εντροπία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με αποτέλεσμα να ευνοείται η αναδίπλωσής της (Thornton, 1981). Πέρα όμως απο το ρόλο τους στη σταθερότητα των πρωτεϊνών υπάρχουν περιπτώσεις που έχουν και έναν επιπρόσθετο λειτουργικό ρόλο. Έτσι, οι δισουλφιδικοί δεσμοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε καταλυτικούς, που μπορούν να βρεθούν στο ενεργό κέντρο

2



Εικόνα 1: Ανταλλαγή θειόληςδισουλφιδίου μεταξύ μιας πρωτεΐνης και ενός οξειδοαναγωγικού παράγοντα. (a) Σε πρώτο στάδιο το θειολικό ανιόν (S⁻), που σχηματίζεται από αποπρωτονίωση μιας ελεύθερης θειόλης της πρωτεΐνης, σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με τον οξειδοαναγωγικό παράγοντα και σε δεύτερο στάδιο (b) το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο πρωτεΐνης-παράγοντα προσβάλλεται απο ένα θειολικό ανιόν και ακολουθεί ο σχηματισμός του

δισουλφιδικού δεσμού στην πρωτεΐνη (οξείδωση) (Mamathambika & Bardwell, 2008).

ενζύμων και να υποκινήσουν ανταλλαγή ηλεκτρονίων, και αλλοστερικούς, οι οποίοι ρυθμίζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης χωρίς ενζυμική μεσολάβηση, αλλάζοντας την πρωτεΐνική δομή (Hogg, 2003; Schmidt *et al*, 2006).

2. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα

Τα μιτοχόνδρια (Εικόνα 2), για τα οποία έχει προταθεί ότι προέρχονται απο την ενδοσυμβίωση ενός α-πρωτεοβακτηριδίου σε ένα αρχέγονο ευκαρυωτικό κύτταρο πριν 1.5-2 δισεκατομύρια χρόνια (ενδοσυμβιωτική θεωρία) (Gray *et al*, 1999; Margulis, 1975; Margulis & Bermudes, 1985; Martin *et al*, 2007), είναι σημαντικά οργανίδια για τη ζωή των ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς παίζουν κεντρικό ρόλο σε μία ποικιλία διαφορετικών βιολογικών διεργασιών όπως είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, ο κύκλος του κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs) και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση).

Στον οργανισμό Saccharomyces cerevisiae, οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αριθμούν περίπου τις 1000 (στον άνθρωπο ~1500) και έχει υπολογιστεί ότι αποτελούν το 15%-20% του συνολικού κυτταρικού προτεώματος (Pfanner & Geissler, 2001). Παρ' όλ' αυτά, μόνο 8 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το μικρό σε μέγεθος βάσεων μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Jensen *et al*, 2004; Sickmann *et al*, 2003), 13 στον άνθρωπο (Anderson *et al*, 1981), ενώ η πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (~99%) κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA (Attardi & Schatz, 1988; Hartl *et al*, 1989; Neupert & Schatz, 1981; Schatz & Mason, 1974) και μεταφράζεται σε ελεύθερα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος (Hoogenraad & Ryan, 2001; Neupert, 1997). Ως απόρροια των παραπάνω, οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα πρέπει να εισαχθούν στα μιτοχόνδρια (Leonard &

Schapira, 2000; Neupert, 1997). Αυτό συμβαίνει μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μηχανών-μεταφορέων που εδράζονται στο οργανίδιο (Εικόνα 3). Τα νεοσυντιθέμενα πρόδρομα μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά υποστρώματα, συνήθως φέρουν στην αμινοξική τους αλληλουχία συγκεκριμένα σήματα στόχευσης που ονομάζονται MTSs (Mitochondrial Targeting Signals) (Chacinska et al, 2009; Herrmann & Neupert, 2003) μέσω των οποίων μπορούν και ακολουθούν στη συνέχεια το κατάλληλο μονοπάτι εισόδου τους στα τέσσερα υπομιτοχονδριακά διαμερίσματα: εξωτερική μεμβράνη (outer membrane, OM), εσωτερική μεμβράνη (inner membrane, IM) με τις πολυάριθμες πτυχώσεις (ακρολοφίες, cristae) που σχηματίζει, διαμεμβρανικός χώρος (intermembrane space, IMS) και μήτρα (matrix). Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι ενώ για την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών αληθεύει η μεταμεταφραστική μεταφορά τους στο οργανίδιο, υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες μεταφέρονται συν-μεταφραστικά, όπως δείγνουν αρκετές μελέτες που αναφέρονται στη σύνδεση των μιτογονδρίων με ριβοσώματα και mRNAs που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (Ades & Butow, 1980; Kellems et al, 1975; Kellems & Butow, 1972; Weis et al, 2013). Περίπου τα μισά σε αριθμό mRNAs που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες εντοπίζονται στην ΟΜ με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν να εισέρχονται στο οργανίδιο συν-μεταφραστικά (Lionaki & Tavernarakis, 2013; Marc *et al*, 2002). Ανεξάρτητα, όμως, απο το αν η είσοδος των πρωτεϊνών αυτών συμβαίνει μετα- ή συν-μεταφραστικά, σήμερα γνωρίζουμε ότι η παραπάνω διαδικασία είναι κρίσιμη καθώς καθορίζει την ακεραιότητα του οργανιδίου και συνεπώς την ζωτικότητα του κυττάρου (Chacinska et al, 2009; Lill & Muhlenhoff, 2008; Neupert & Herrmann, 2007) (Εικόνα 2).

3.Μονοπάτια εισαγωγής και μεταφοράς πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα

Για τη στόχευση των μιτοχονδριακών πρόδρομων μορίων αναγκαία είναι η διατήρησή τους σε μία μη δομημένη κατάσταση. Μελέτες για την είσοδο μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που έφεραν κυστεϊνικά κατάλοιπα σε οξειδωμένη κατάσταση (οικογένεια των πρωτεϊνών Tim, <u>T</u>ranslocase of the <u>inner membrane</u>) έδειξε οτι η είσοδός τους στο οργανίδιο εμποδίζονταν (Ceh-Pavia *et al*, 2013; Morgan & Lu, 2008). Το σύμπλοκο TOM (<u>T</u>ranslocase of the <u>O</u>uter mitochondrial <u>M</u>embrane)

4



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του μιτοχονδρίου και η διαμερισματοποίησή του. Η εσωτερική μιρτοχονδριακή μεμβράνη που εμφανίζει αναδιπλώσεις (ακρολοφίες) διαχωρίζει τα δύο υδάτινα διαμερίσματα, μήτρα και διαμεμβρανικό χώρο. Η εξωτερική μεμβράνη περιβάλει και προστατεύει το διαμεμβρανικό χώρο του οργανιδίου (http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem ATP.htm)

αποτελεί τη γενική πύλη εισόδου των παραπάνω πρωτεϊνών για τον

υπομιτοχονδριακό τους εντοπισμό (Hill *et al*, 1998) στην ΟΜ, στο IMS, στην ΙΜ ή στη μήτρα.

(i) Στόχευση στην ΟΜ (Εικόνα 3, διαδρομές 1 και 2). Για την εμπέδωσή τους στην ΟΜ, τα μιτοχονδριακά πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να ακολουθήσουν δύο μονοπάτια εισόδου: (1) το μονοπάτι πρωτεϊνών β-βαρελιού και (2) το μονοπάτι πρωτεϊνών α-έλικας.

Το πρώτο μονοπάτι (Εικόνα 3, διαδρομή 1) περιλαμβάνει τα σύμπλοκα TOM και SAM (Sorting and Assembly Machinery) που αναγνωρίζουν ένα ειδικό σήμα στόχευσης πάνω στο υπόστρωμα το οποίο ονομάζεται β-σήμα και αποτελείται απο μια λυσίνη ή αργινίνη, μία γλυκίνη και δύο υδρόφοβα αμινοξέα (Kutik *et al*, 2008). Για την είσοδο των πρωτεϊνών που φέρουν αυτό το σήμα, αρχικά, αναγκαία είναι η δράση των μικρών Tim πρωτεϊνών Tim9 και Tim10 (και Tim8-Tim13) που δρουν ως σαπερόνες στο IMS σχηματίζοντας ένα εξαμερές σύμπλοκο (Tim9-Tim10) που αποτελείται απο τρία Tim9 και τρία Tim10 μόρια (Becker *et al*, 2008b; Bolender *et al*, 2008; Wiedemann *et al*, 2004). Το εξαμερές αυτό σύμπλοκο τελικά οδηγεί το πρωτεϊνικό υπόστρωμα απο το TOM στο σύμπλοκο SAM που εδράζεται στην OM για την εμπέδωση και αναδίπλωσή του εκεί (Gentle *et al*, 2004; Kutik *et al*, 2008; Paschen *et al*, 2003; Wiedemann *et al*, 2003).

Το δεύτερο μονοπάτι (πρωτεϊνών α-έλικας) (Εικόνα 3, διαδρομή 2) περιλαμβάνει το σύμπλοκο TOM και την πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης Mim1 (<u>Mitochondrial Import 1</u>) (Becker *et al*, 2008a; Hulett *et al*, 2008; Popov-Celeketic *et al*, 2008). Τα υποστρώματα που ακολουθούν το συγκεκριμένο μονοπάτι περιέχουν υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα, που φέρονται ως σήματα στόχευσης (Becker *et al*, 2012; Becker *et al*, 2011; Hulett *et al*, 2008; Papic *et al*, 2011) μέσω των οποίων ενσωματώνονται τελικά στην OM. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι το σύμπλοκο TOM αλλά και η πρωτεΐνη Mim1 μπορούν να φωσφορυλιωθούν από ειδικές κυτταροπλασματικές κινάσες όπως η CK2 (<u>Casein Kinase 2</u>) και η PKA (<u>Protein Kinase A</u>). Η συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη ρύθμιση της λειτουργίας του συμπλόκου TOM η οποία είναι κρίσιμη για το ρόλο του καναλιού σε κάθενα από τα μονοπάτια εισοδου που συμμετέχει (Dudek *et al*, 2013; Rao *et al*, 2011; Rao *et al*, 2012; Schmidt *et al*, 2011).

(ii) Στόχευση στην ΙΜ (Εικόνα 3, διαδρομές 3 και 5). Η στόχευση στην ΙΜ περιλαμβάνει κυρίως το σύμπλοκο TIM22 (<u>Translocase of the Inner Membrane 22</u>) για τα υποστρώματα που στοχεύονται από το κυτταρόπλασμα, αλλά και την πρωτεΐνη Oxal για τα υποστρώματα που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA και εισάγονται στην ΙΜ φερόμενα από τη μήτρα (Dolezal et al, 2006; Neupert & Herrmann, 2007). Τα πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια που ακολουθούν το μονοπάτι TIM22 (carrier pathway) περιέχουν εσωτερικά σήματα στόχευσης (όχι στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο) τα οποία αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς του συμπλόκου ΤΟΜ (κυρίως απο την υπομονάδα του, Tom70) (Brix et al, 1999; Hofmann et al, 2005; Stojanovski et al, 2012; Young et al, 2003b). Αυτά διασγίζουν κανάλι ΤΟΜ και φτάνουν στο σύμπλοκο ΤΙΜ22 μέσω παροδικών το αλληλεπιδράσεων με τις μικρές Tim σαπερόνες (Tim9 και Tim10) στο IMS οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκο με το Tim12 επιπρόσθετα, πριν τη στόχευση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στο IM (Gebert et al, 2008; Sirrenberg et al, 1998). Η παραπάνω διαδικασία εμπέδωσής τους στην ΙΜ εξαρτάται από το μεμβρανικό δυναμικό της (Δψ), αλλά δεν απαιτείται ΑΤΡ ενώ ο μηγανισμός με τον οποίο τα υποστρώματα απελευθερώνονται απο το ΤΙΜ22 για την εμπέδωσή τους στη μεμβράνη παραμένει ακόμα άγνωστος (Herrmann & Neupert, 2003; Paschen & Neupert, 2001; Pfanner & Geissler, 2001). Άλλα πρωτεϊνικά υποστρώματα που δε γρησιμοποιούν το σύμπλοκο ΤΙΜ22 για την είσοδό τους στην ΙΜ ενσωματώνονται εκεί μέσω του συμπλόκου TIM23 (Translocase of the Inner Membrane 23) (βλέπε παρακάτω).

(iii) Στόχευση στη μήτρα (Εικόνα 3, διαδρομή 4). Τα 2/3 των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στοχεύονται στη μήτρα (Tokatlidis et al, 2000) μέσω του συμπλόκου TOM αρχικά (διέλευση απο την OM) και του συμπλόκου TIM23 (διέλευση απο την IM) (Alder et al, 2008). Τα περισσότερα απο αυτά τα υποστρώματα φέρουν ειδικά θετικά φορτισμένα σήματα στόχευσης στο αμινοτελικό τους άκρο που αναγνωρίζονται ειδικά απο τους υποδοχείς του TOM συμπλόκου, Tom20 και Tom22

(Abe et al, 2000). Το ειδικό αυτό σήμα τους έχει μήκος περίπου 10-60 αμινοξέων και τελικά αποκόπτεται απο το υπόλοιπο μόριο στη μήτρα μέσω της δράσης της πεπτιδάσης MPP (Matrix Processing Peptidase) (Hawlitschek et al, 1988). Σε αυτό το μονοπάτι απαιτείται και το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης αλλά και ATP (Nelson & Schatz, 1979) για την ενεργοποίηση του συμπλόκου PAM (Presequence translocase-Associated Motor) στο τελικό στάδιο της στόχευσης του μορίου στην μήτρα, στο οποίο η πρωτεΐνη mtHsp70 (mitochondrial Heat shock protein 70) παίζει κεντρικό ρόλο (φέρει ενεργότητα ATPάσης) (Liu et al, 2003; Mapa et al, 2010; Voisine et al, 1999). Με αυτό τον τρόπο, οι πρωτεΐνες που ακολουθούν αυτό το μονοπάτι εισόδου (presequence pathway), τελικά καταλήγουν στην ώριμη δομή τους (Chacinska et al, 2009).

(iv) Στόχευση στο IMS (Εικόνα 3, διαδρομές 6 και 7). Η παρουσία δισουλφιδικών δεσμών στο IMS δεν ήταν αναμενόμενη καθώς αυτό βρίσκεται σε ισορροπία με το αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος (Benz, 1994). Παρόλα αυτά, πολλά δεδομένα υποστηρίζουν πως ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών στο IMS είναι μια συνήθης αρχή για τη λειτουργία του. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι παρόντες σε πολλές πρωτεΐνες που εντοπίζονται μέσα ή προβάλλονται προς το συγκεκριμένο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα.

Όλες οι πρωτεΐνες του IMS κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα (de Marcos-Lousa *et al*, 2006; Koehler & Tienson, 2009; Neupert & Herrmann, 2007) και ο υπομιτοχονδριακός τους εντοπισμός αρχικά θεωρούνταν ότι περιλάμβανε μόνο το σύμπλοκο TOM (Lutz *et al*, 2003). Σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτό συμβαίνει κυρίως μέσω δύο μονοπατιών μεταφοράς: (1) το μονοπάτι διακοπής μεταφοράς (TIM23 *stop-transfer*) (Εικόνα 3, διαδρομή 6) και (2) το μονοπάτι MIA (<u>M</u>itochondrial <u>I</u>mport and <u>A</u>ssembly) (Εικόνα 3, διαδρομή 7) (Chacinska *et al*, 2004).

Σύμφωνα με το μονοπάτι διακοπής μεταφοράς, τα πρόδρομα μόρια εισέρχονται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου μέσω του συμπλόκου ΤΟΜ και αναγνωρίζονται απο το σύμπλοκο TIM23 της IM μέσω ενός θετικά φορτισμένου σήματος που φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο. Το σήμα αυτό ακολουθείται απο υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία μετά την αποκοπή του θετικά φορτισμένου μέρους του σήματος, αγκυροβολούν το υπόστρωμα στην IM (Neupert & Herrmann, 2007). Στη συνέχεια, το σήμα στόχευσής στην IM κόβεται ξανά από μία ειδική πεπτιδάση που ονομάζεται IMP (Inner Membrane Peptidase) η οποία βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, γεγονός που οδηγεί στην

απελευθέρωση των ώριμων πρωτεϊνών μέσα στο IMS (Gakh et al, 2002; Glick et al, 1992).

Από την άλλη πλευρά, πρόσφατα ανακαλύφθηκε στο σακχαρομύκητα το μονοπάτι εισόδου πρωτεϊνών MIA στο οποίο συμμετέχουν δύο κυρίως πρωτεΐνες: η FAD-εξαρτώμενη σουλφυδριλοξιδάση Erv1 (Essential for respiration and viability 1) και η οξειδορεδουκτάση Mia40 (Mitochondrial import assembly 40) (Mesecke et al, 2005; Rissler et al, 2005; Tokatlidis, 2005). Αυτό το μονοπάτι οδηγεί στο IMS, κυρίως πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια που φέρουν ειδικά κυστεϊνικά μοτίβα μέσω των οποίων αναδιπλώνονται οξειδωτικά (βλέπε παρακάτω) ανεξάρτητα απο το μεβρανικό δυναμικό της IM αν και *in vivo* πρόσφατα φάνηκε να ισχύει το αντίστροφο για το ανθρώπινο Cox19 (Cytochrome c oxidase 19) μιτοχονδριακό υπόστρωμα (Fischer et al, 2013).

Και οι δύο πρωτεΐνες του μονοπατιού MIA, είναι απαραίτητες για την επιβίωση του σακχαρομύκητα (Chacinska *et al*, 2004; Lisowsky, 1992; Naoe *et al*, 2004; Terziyska *et al*, 2005). Συγκεκριμένα, η απουσία των ενδογενών Mia40 και Erv1 ή η ελαττωματική τους λειτουργία μετά απο μεταλλαξιγένεσή τους έχει σαν αποτέλεσμα την ελαττωματική είσοδο πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους πλούσιων σε κυστεϊνικά μοτίβα (πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών Tim, Cox17 και Cox19) χωρίς να επηρεάζει την είσοδο πρωτεϊνών που καταλήγουν στο μιτοχόνδριο μέσω των άλλων μονοπατιών εισόδου (Allen *et al*, 2005; Chacinska *et al*, 2004; Herrmann & Hell, 2005; Naoe *et al*, 2004; Stojanovski *et al*, 2012).

Τα περισσότερα υποστρώματα του μονοπατιού ΜΙΑ φαίνεται να φέρουν στην αμινοξική τους αλληλουχία, ένα ειδικό σήμα στόχευσης, μη αποκοπτώμενο, το οποίο ονομάζεται MISS (<u>Mitochondrial IMS-Sorting Signal</u>) ή ITS (<u>IMS-Targeting Signal</u>) (Milenkovic *et al*, 2009; Sideris *et al*, 2009) (βλέπε παρακάτω). Η σημαντική δράση των πρωτεϊνών Mia40 και Erv1 φαίνεται απο το γεγονός ότι και οι δύο εντοπίζονται στους ευκαρυώτες και έχουν διατηρηθεί εξελικτικά, από το μύκητα έως τα φυτά και τα ζώα (Hell, 2008) ενώ για το Erv1 πρόσφτα βρέθηκε το ορθόλογό του στον οργανισμό *Trypanosoma brucei* των πρωτίστων (Basu *et al*, 2013).



Εικόνα 3: Μονοπάτια εισόδου και αντίστοιχα σύμπλοκα μεταφορείς για την ταξινόμηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο εκάστοτε υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα. Τα πρωτεϊνικά υποστρώματα εκφράζονται απο τα ριβοσώματα του κυτοσολίου (καφέ χρώμα) και στη συνέχεια αναλόγως το ειδικό σήμα στόχευσης που φέρουν στοχεύονται τελικά στην εσωτερική μεμβράνη (διαδρομές 3 & 5), στην εξωτερική μεμβράνη (διαδρομές 1 & 2), στο διαμεμβρανικό χώρο (διαδρομές 6 & 7) ή στην μιτοχονδριακή μήτρα (διαδρομή 4) (τροποποιημένη εικόνα απο (Kallergi *et al*, 2013).

4. Η οξειδορεδουκτάση Mia40/Tim40

Η πρωτεΐνη Mia40 (ή Tim40) έχει μοριακό βάρος 44kDa (404 αμινοξέα) (Chacinska *et al*, 2004; Naoe *et al*, 2004) αλλά φέρει πολλά αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα που την κάνουν να μετατοπίζεται στα ~66 kDa κατα την ηλεκτροφόρησή της σε πήκτωμα ακρυλαμίδης κάτω απο αποδιατακτικές συνθήκες. Η βιογένεση της Mia40 στο διαμεμβρανικό χώρο στη ζύμη απαιτεί την είσοδο της πρωτεΐνης μέσω του μονοπατιού "διακοπής μεταφοράς" (Naoe *et al*, 2004; Neupert & Herrmann, 2007; Terziyska *et al*, 2005). Μετά τη διέλευσή της απο το TOM σύμπλοκο, στοχεύεται μέσω του TIM23 στην IM όπου και εμπεδώνεται εξαρτώμενη από το μεμβρανικό δυναμικό της. Η πρόσδεσή της στην IM συμβαίνει μέσω του αμινοτελικού της άκρου, απο το οποίο αποκόπτεται στη συνέχεια το σήμα στόχευσης (Hofmann *et al*, 2005). Πρόσφατα έχει χαρακτηρισθεί σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια η είσοδος και ωρίμανση της Mia40, όπου και η ενδογενής Mia40 αλλά και η Erv1 σε δεύτερο στάδιο, είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της διαδικασίας (Chatzi *et al*, 2013).

Η Mia40, απαντάται ως διαλυτή πρωτεΐνη στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων των φυτών και των ζώων (ΜΙΑ40) ή βρίσκεται προσδεδεμένη μέσω του αμινοτελικού της άκρου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη του σακχαρομύκητα όπως προαναφέρθηκε (Chacinska et al, 2004; Hofmann et al, 2005; Naoe et al, 2004; Terziyska et al, 2007). Το αμινοτελικό αυτό κομμάτι της Mia40 δεν είναι σημαντικό για τη λειτουργία της καθώς η ΜΙΑ40 που είναι διαλυτή μπορεί να είναι λειτουργική πλήρως στο σακχαρομύκητα (Hofmann et al, 2005; Naoe et al, 2004; Terziyska et al, 2005). Το καρβοξυτελικό κομμάτι της Mia40 περίπου 60 αμινοξέων είναι συντηρημένο ενώ το αμινοτελικό της μέρος ποικίλει σε μέγεθος και αλληλουχία αμινοξέων (Hofmann et al, 2005; Naoe et al, 2004; Terziyska et al, 2005). Σε αυτό το συντηρημένο μέρος της (~8 kDa), η Mia40 του S. cerevisiae φέρει τρία κυστεϊνικά μοτίβα στην αμινοξική της αλληλουχία: το CPC μοτίβο (περιλαμβάνει τις κυστεΐνες C296 και C298, όπου αναμεσά τους υπάρχει μία προλίνη) στο αμινοτελικό της μέρος και ένα διπλό CX9C μοτίβο (όπου Χ οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός κυστεΐνης) στο οποίο συμμετέχουν οι κυστεΐνες C307/C317 και C330/C340 του καρβοξυτελικού της άκρου (Εικόνα 4Α).

Η δομή της Mia40 έχει μελετηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X για την πρωτεΐνη του σακχαρομύκητα (Εικόνα 4A) και με φασματοσκοπία NMR για την



Εικόνα 4: Η Μia40/MIA40 πρωτεΐνη. (Α) Αμινοξικές αλληλουχίες της πρωτεΐνης MIA40/Mia40 στον άνθρωπο και τον σακχαρομύκητα, αντίστοιχα, και η μεταξύ τους συντήρηση. Οι κυστεΐνες σε κάθε περίπτωση σημειώνονται με κίτρινο χρώμα. Οι αγκύλες αντιστοιχούν στις κυστεΐνες μεταξύ των οποίων δημιουργείται δισουλφιδικός δεσμός. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται τα συντηρημένα αμινοξέα μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (τροποποιημένη εικόνα απο Sideris & Tokatlidis, 2010) (B) Διάγραμμα κορδέλας της ανθρώπινης MIA40 (ροζ χρώμα) και Mia40 του σακχαρομύκητα (πορτοκαλί χρώμα). Τα άτομα θείου και οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί παρουσιάζονται ως κίτρινες σφαίρες σε κάθε περίπτωση (Endo *et al*, 2010).

ανθρώπινη πρωτεΐνη (MIA40) (Banci et al, 2010; Banci et al, 2009a; Kawano et al, 2009) (Εικόνα 4B). Η δομή της Mia40/MIA40 στο χώρο είναι τύπου έλικα-θηλειάέλικα. Οι δύο α-έλικες της πρωτεΐνης συνδέονται μεταξύ τους μέσω δύο δισουλφιδικών δεσμών: μεταξύ της τρίτης (C3) και έκτης (C6) κυστεΐνης της (C307-C340 στη Mia40 της ζύμης και C64-C97 στην ανθρώπινη MIA40) και μεταξύ της τέταρτης (C4) και πέμπτης (C5) (C317-C330 στην Mia40 και C74-C87 στην MIA40) οι οποίοι σταθεροποιούν τις δύο έλικες στη δομή (δομικοί δισουλφιδικοί δεσμοί). Απο την άλλη πλευρά, το αμινοτελικό μέρος του πυρήνα της Mia40/MIA40 περιέχει την πρώτη (C1) και δεύτερη (C2) κυστεΐνη της αμινοξικής της αλληλουχίας της (C296-C298 στην Mia40 και C53-C55 στην MIA40), οι οποίες σχηματίζουν μεταξύ τους το δισουλφιδικό δεσμό του ενεργού της κέντρου (CPC) που είναι εκτεθειμένο στο διαλύτη. Το συγκεκριμένο μοτίβο, που ανήκει σε μία μικρή α-έλικα της πρωτεΐνης, έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναχθεί in vitro και in vivo (Grumbt et al, 2007) γεγονός που φανερώνει τη συμμετοχή του σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και όχι τόσο στη σταθερότητα της δομής της πρωτεΐνης. Πιο συγκεριμένα, αποτελεί το μοτίβο κυστεϊνών μέσω του οποίου επιτελείται η μεταφορά δισουλφιδικών δεσμών στα υποστρώματά της παίζοντας σημαντικό ρόλο στην παγίδευση και οξείδωση τους κατα την είσοδό τους στο IMS (βλέπε παρακάτω) (Banci et al, 2010; Kawano et al, 2009). Τέλος, οι δύο α-έλικες που περιλαμβάνουν το διπλό CX9C σχηματίζουν μία υδρόφοβη περιοχή (κοιλότητα) πρόσδεσης κοντά στην οποία φέρεται και το CPC μοτίβο της πρωτεΐνης. Αυτή η κοιλότητα λειτουργεί ως περιοχή πρόσδεσης των υποστρωμάτων της Mia40 μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων της περιοχής αυτής και των ειδικών σημάτων εισόδου (MISS/ITS) που φέρουν τα υποστρώματά της (Sideris et al, 2009).

Η δράση της Mia40 πραγματοποιείται σε δύο στάδια που είναι συζευγμένα μεταξύ τους: α) λειτουργεί ως υποδοχέας των υποστρωμάτων του ΜΙΑ μονοπατιού, που προσδένονται σε αυτή μέσω σχηματισμού παροδικών δισουλφιδικών ενδιαμέσων (Milenkovic *et al*, 2007; Milenkovic *et al*, 2009; Sideris *et al*, 2009; Sideris & Tokatlidis, 2007) και β) ως οξειδορεδουκτάση και σαπερόνη καθώς είναι υπεύθυνη για την ολοκλήρωση της οξειδωτικής αναδίπλωσης του υποστρώματος στη συνέχεια (Banci *et al*, 2009a; Chacinska *et al*, 2004; Grumbt *et al*, 2007; Muller *et al*, 2008). Πέρα απο το ρόλο της στην οξείδωση και τη βιογένεση των υποστρωμάτων της, η Mia40 πρόσφατα βρέθηκε ότι μπορεί να προσδένει σύμπλοκα σιδήρου/θείου στο ενεργό κέντρο της όντας ως διμερής, γεγονός που ίσως φανερώνει μια επιπλέον λειτουργία της στην ωρίμανση πρωτεϊνών που φέρουν τα παραπάνω σύμπλοκα στο μόριό τους (Spiller *et al*, 2013).

5. Τα υποστρώματα του MIA μονοπατιού

Τα μέχρι τώρα γνωστά υποστρώματα του μονοπατιού Mia40-Erv1 μπορούν να χωριστούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με συγκεκριμένα μοτίβα κυστεϊνών που περιέχουν στην αμινοξική τους αλληλουχία:

(i) υποστρώματα που φέρουν ένα διπλό μοτίβο CX3C, όπως τα μικρά Tims (Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 και Tim13) που λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί στο IMS για τη μεταφορά υδρόφοβων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Chacinska *et al*, 2004; Lu *et al*, 2004a; Naoe *et al*, 2004) στην OM ή IM (Hoppins & Nargang, 2004; Koehler, 2004; Koehler *et al*, 1998; Sirrenberg *et al*, 1998; Wiedemann *et al*, 2004). Οι πρωτεΐνες αυτές, φέρουν το διπλό κυστεϊνικό μοτίβο τους σε δύο α-έλικες οι οποίες είναι αντιπαράλλλες στο χώρο και σχηματίζουν δομή φουρκέτας (Allen *et al*, 2003; Webb *et al*, 2006) (Banci *et al*, 2009b). Οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των κυστεϊνών των CX3C μοτίβων και ενώνουν τις δύο έλικες

είναι σημαντικοί για την συμμετοχή των παραπάνω πρωτεϊνών στα εξαμερή σύμπλοκα (Tim9-Tim10 και Tim8-Tim13) που σχηματίζουν (Curran *et al*, 2002a; Curran *et al*, 2002b; Lu *et al*, 2004a; Lu *et al*, 2004b) τα οποία συμμετέχουν στη στόχευση μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών υποστρωμάτων προς το TIM22 ή το SAM σύμπλοκο.

(ii) υποστρώματα με ένα διπλό CX9C μοτίβο, όπως οι πρωτεΐνες της οικογένειας Cox (Cox17, Cox19 και Cox23) οι οποίες είναι απαραίτητες για την βιογένεση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Beers *et al*, 1997; Glerum *et al*, 1996). Οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν CHCH (coiledcoil, helix, coiledcoil, helix) διάταξη στο χώρο με δύο αντιπάραλλες έλικες που η καθεμιά περιέχει ένα κυστεϊνικό μοτίβο CX9C και ενώνονται με δύο δισουλφιδικούς που σχηματίζονται μεταξύ των κυστεϊνών των δύο μοτίβων (Εικόνα 5) (Arnesano *et al*, 2005; Voronova *et al*, 2007). Ακόμα, άλλα υποστρώματα είναι οι πρωτεΐνες: Mdm35, που είναι σημαντική για την εισοδο των Ups1, Ups2 και Ups3 μορίων στο IMS τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ομοιόσταση των λιπιδίων των μιτοχονδρίων, αλλά και οι πρωτεΐνες Mic14, Mic17, Som1, CMC2, CMC3, CMC4 και Sco1 (Gabriel *et al*, 2007; Longen *et al*, 2009).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης CHCH για τη (a) Mia40, (b) Cu(I)Cox17 και (c) Tim9. Οι πλευρικές αλυσίδες των δύο δομικών δισουλφιδικών δεσμών στα μοτίβα CX3C και CX9C, και των αμινοτελικών κυστεϊνικών καταλοίπων, που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγή ή τη μεταφορά χαλκού (I) ή και στις δύο διαδικασίες, παρουσιάζονται με κίτρινο χρώμα (τροποποιημένη εικόνα από Banci *et al*, 2009b)

(iii) υποστρώματα που περιέχουν άλλα κυστεϊνικά μοτίβα όπως είναι η Erv1,
η Dre2, οι CHCHD5 και CHCHD7, η Ccs1 και η Cmc1 (Chatzi & Tokatlidis, 2013;
Gabriel *et al*, 2007; Kawamata & Manfredi, 2008; Terziyska *et al*, 2007; Zhang *et al*,
2008; Banci *et al*, 2012b; Horn *et al*, 2008). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη
ChChd3, η οποία αγκυροβολείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και φέρει

<u>Εισαγωγή</u>

ένα διπλό CX9C μοτίβο που προβάλει προς το IMS, επίσης αλληλεπιδρά με τη Mia40 για την είσοδό της στο συγκεκριμένο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα (Darshi *et al*, 2012). Ακόμα, οι Wrobel *et al*. έδειξαν ότι συμμετέχει και στη βιογένεση της υπομονάδας Tim22 του συμπλόκου TIM22 της IM, μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει με αυτό (Wrobel *et al*, 2013). Η περίπτωση αυτή διαφέρει απο αυτή των τυπικών υποστρωμάτων της Mia40 που στοχεύονται στο IMS, καθώς το Tim22 καταλήγει στην IM του μιτοχονδρίου. Ένα άλλο υπόστρωμα της Mia40 είναι η πεπτιδάση του IMS Atp23, που φέρει δέκα κυστεΐνες οι οποίες οξειδώνονται απο τη Mia40. Η οξείδωσή τους δεν είναι απαραίτητη για την είσοδό του μορίου στο IMS ενώ οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Mia40 και του Atp23 φαίνεται να είναι πιο σημαντικές (Weckbecker *et al*, 2012).

6. Αλληλεπίδραση Mia40-υποστρώματος

Τα υποστρώματα της Mia40 εισέρχονται στο IMS μέσω της αναγνώρισης των ειδικών σημάτων στόχευσής τους MISS/ITS (IMS-Targeting Signal) (Milenkovic et al, 2009; Sideris et al, 2009) απο την υδρόφοβη κοιλότητα που φέρει η οξειδορεδουκτάση. Τα σήματα αυτά είναι συντηρημένα στις πρωτεΐνες Tim και Cox και φέρονται ανοδικά ή καθοδικά μιας συγκεκριμένης κυστεΐνης που είναι σημαντική για την πρόσδεσή τους στη Mia40 (κυστεΐνη πρόσδεσης). Ακόμα, τα συγκεκριμένα σήματα σχηματίζουν μια αμφιπαθή α-έλικα όπου στη μία πλευρά της φέρεται η παραπάνω κυστεΐνη με υδρόφοβα αμινοξέα ενώ η άλλη πλευρά της έλικας φέρει κυρίως φορτισμένα αμινοξέα (Εικόνα 6). Το σήμα MISS/ITS είναι ικανό για τη στόχευση μη μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο IMS.

Η υδρόφοβη αλληλεπίδραση Mia40-υποστρώματος, μεταξύ της υδρόφοβης κοιλότητας της οξειδορεδουκτάσης και του σήματος στόχευσης των υποστρωμάτων, ενισχύεται στη συνέχεια με την αλληλεπίδραση του CPC μοτίβου της Mia40 (Milenkovic *et al*, 2009; Sideris *et al*, 2009) και συγκεκριμένα της δεύτερη κυστεΐνης της (C298 στη Mia40 και C55 στη MIA40) με την κυστεΐνη πρόσδεσης του υποστρώματος στο MISS/ITS μοτίβο του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός παροδικού μικτού δισουλφιδικού ενδιαμέσου (Chacinska *et al*, 2004; Mesecke *et al*, 2005) ώστε να επιτευχθεί στη συνέχεια η μεταφορά ενός δισουλφιδικού δεσμού απο την Mia40 προς το υπόστρωμα. Τελικά το υπόστρωμα απομακρύνεται οξειδωμένο και παγιδεύεται στο IMS χωρίς να μπορεί να επιστρέψει πίσω στο

κυτοσόλιο μέσω του συμπλόκου TOM ενώ το CPC μοτίβο της Mia40 ανάγεται ("folding trap hypothesis") (Lu *et al*, 2004a; Lutz *et al*, 2003; Tokatlidis, 2005) (Εικόνα 7). Μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρο αν η Mia40 αλληλεπιδρά με τα υποστρώματά της κατα τη διάρκεια ή μετά την είσοδό τους στο οργανίδιο (Riemer *et al*, 2011).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της αναγνώρισης του υποστρώματος απο τη Mia40 στο IMS. Το ανηγμένο υπόστρωμα (μπλε χρώμα) αναγνωρίζεται απο τη Mia40 μέσω του ειδικού σήματος MISS/ITS που φέρει το οποίο περιλαμβάνει και την κυστεΐνη πρόσδεσης. Η α-έλικα του υποστρώματος στην οποία φέρεται το σήμα στόχευσης προσδένεται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην υδρόφοβη κοιλότητα της Mia40 και η κυστεΐνη πρόσδεσης προτάσεται προς το μοτίβο CPC του ενεργού κέντρου της (στάδιο 1). Ακολουθεί σχηματισμός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της κυστεΐνης πρόσδεσης του υποστρώματος και της δεύτερης κυστεΐνης του CPC μοτίβου της Mia40 (μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο, στάδιο 2) και το υπόστρωμα απελευθερώνεται απο την οξειδορεδουκτάση στο IMS όντας αναδιπλωμένο (Sideris *et al*, 2009).

7. Η FAD-εξαρτώμενη σουλφυδριλοξειδάση Erv1

Η πρωτεΐνη Erv1 είναι μία FAD-εξαρτώμενη σουλφυδριλοξειδάση με μοριακό βάρος 22kDa. Ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο σακχαρομύκητα S.

cerevisiae το 1992 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Lange et al, 2001; Lisowsky, 1992) και αποτελεί υπόστρωμα της Mia40 όπως προαναφέρθηκε (Mesecke et al, 2005; Rissler et al, 2005). Η δράση της Erv1 πρωτεΐνης ως οξειδάση θειολών έχει δειχθεί in vitro για ένα πλήθος τεχνητών υποστρωμάτων της όπως λυσοζύμη, θειορεδοξίνη, TCEP και DTT (Ang & Lu, 2009; Hofhaus et al, 2003; Lee et al, 2000; Levitan et al, 2004; Tienson et al, 2009; Vitu et al, 2006). Η πρωτεΐνη σχηματίζει διμερές με κάθε μονομερές της να περιέχει έξι (6) κυστεϊνικά κατάλοιπα (C30, C33, C130, C133, C159 και C176) όπου, στο σακχαρομύκητα, τα τέσσερα πρώτα οργανώνονται σε δύο μοτίβα CX₂C (Hofhaus *et al*, 2003) (C30/33 και C130/133) (Εικόνα 8Α). Απο την άλλη πλευρά, τα κυστεϊνικά κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου της (C159 και C176), σχηματίζουν το αντίστοιχο κυστεϊνκό ζεύγος τύπου CX16C που σταθεροποιεί το χώρο στον οποίο προσδένεται μη ομοιοπολικά ένα μόριο FAD ανα μονομερές (FAD-binding domain) (Εικόνα 8A) (Ang & Lu, 2009; Hofhaus et al, 2003). Οι παραπάνω κυστεΐνες συμμετέχουν σε δισουλφιδικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα, ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεϊνών C130 και C133 είναι μέρος του οξειδοαναγωγικού ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης, ενώ ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεϊνικών καταλοίπων C159 και C176 (δομικές κυστεΐνες) είναι σημαντικός για τη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης. Από την άλλη πλευρά, το ζεύγος κυστεϊνών C30-C33 στο αμινοτελικό άκρο της Erv1 λειτουργεί ως "ζεύγος κίνησης" που μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από το εκάστοτε υπόστρωμα στο ζεύγος C130-C133 του δεύτερου μονομερούς, πριν αυτά μεταφερθούν στο FAD το οποίο γειτνιάζει το συγκεριμένο κυστεϊνικό ζεύγος (Fass, 2008).

8. Η ομόλογη πρωτεΐνη Erv1, ALR, στον άνθρωπο

To ομόλογο της Erv1 στα θηλαστικά ονομάζεται ALR (<u>Augmenter of Liver</u> <u>Regeneration</u>), GFER (<u>Growth Factor Erv1</u>), HSS (<u>Hepatic Stimulator Substance</u>) ή HPO (<u>Hepatopoietin</u>) και ανακαλύφθηκε ως ένας πρωτεϊνικός παράγοντας υπεύθυνος για την αναγέννηση του συκωτιού μετά από καταστροφή του (Hagiya *et al*, 1994), μέσω ενός αγνώστου μηχανισμού δράσης (Pawlowski & Jura, 2006).

Η πρωτεΐνη ALR εντοπίζεται σε δύο ισομορφές: (1) τη μεγάλου μήκους (long form, lf-ALR μεγέθους 23kDa) που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων που παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση των μιτοχονδριακών

πρωτεϊνών και στην ωρίμανση των κυτταροπλασματικών με σύμπλοκα Fe/S πρωτεϊνών, όπως συμβαίνει με το ομόλογο της στο σακχαρομύκητα (Lange *et al*, 2001), και (2) τη μικρού μήκους (short form, sf-ALR μεγέθους 15kDa) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τον εξωκυττάριο χώρο όπου δρα ως κυτοκίνη (Pawlowski & Jura, 2006; Gatzidou *et al*, 2006) και συμμετέχει στην αναγέννηση του συκωτιού και του πάγκρεας (LaBrecque & Pesch, 1975), στη σπερματογένεση (Chen *et al*, 2007), στην καρκινογένεση (Todd *et al*, 2010; Yu *et al*, 2010) και στην απόπτωση (Kallergi *et al*, 2013). Οι δύο πρωτεΐνες διαφέρουν μεταξύ τους στο αμινοτελικό τους άκρο καθώς η If-ALR εμφανίζει 80 επιπλέον αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία απουσιάζουν απο την αμινοξική αλληλουχία της sf-ALR (Li *et al*, 2002).

Τα κυστεϊνικά μοτίβα της πρωτεΐνης ALR είναι τα ακόλουθα: (1) το CRAC μοτίβο, που περιλαμβάνει τις κυστεΐνες του "ζεύγους κίνησης" (C71 και C74 στη lf-ALR), (2) το CEEC μοτίβο, που αφορά τις κυστεϊνες του ενεργού κέντρου της (C142/C145 στη lf-ALR και C62/C65 στη sf-ALR) και το CX16C μοτίβο των δομικών κυστεϊνών της (C171/C188 στη lf-ALR και C91/C108 στη sf-ALR). Επιπρόσθετα των παραπάνω κυστεϊνικών μοτίβων και σε αντίθεση με την Erv1 της ζύμης, οι δύο ισομορφές της ALR φέρουν ανα μονομερές δύο κυστεΐνες (C15/C124 στη lf-ALR και C95/C204 στη sf-ALR) που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό δύο δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των μονομερών, στο διμερές που σχηματίζει η πρωτεΐνη. Και η ALR, ομοίως με την Erv1, προσδένει FAD στη δομή της το οποίο είναι απαραίτητο για το ρόλο της ως σουλφυδριλοξειδάση (Εικόνα 8Α). Επιπρόσθετα, στην ALR το κυστεϊνικό "ζεύγος κίνησης" βρίσκεται 30 αμινοξέα πιο κοντά στην περιοχή πρόσδεσης FAD του μορίου, συγκριτικά με την περίπτωση της Erv1 πρωτεΐνης (Daithankar et al, 2009). Τέλος, οι κυστεΐνες C154/165 στη lf-ALR και C74/85 στη sf-ALR είναι ελεύθερες (δε συμμετέχουν σε δισουλφιδικό δεσμό ενδομοριακά) και δεν έγει βρεθεί να έγουν κάποιο ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης ενώ απουσιάζουν απο την Erv1 στο σακχαρομύκητα (Εικόνα 8A). Ενώ οι παραπάνω κυστεΐνες δεν είνα συντηρημένες στα δύο είδη, οι Erv1 και η ALR, εμφανίζουν 40% ομολογία στο καρβοξυτελικό τους κομμάτι ενώ τα αμινοτελικά τους μέρη φαίνεται να είναι αρκετά διακριτά μεταξύ τους (Εικόνα 8B) (Gandhi, 2012).



Εικόνα 8: Οι πρωτεΐνες Erv1/ALR. (Α) Σχηματική απεικόνιση των σουλφυδριλοξειδασών Erv1 και ALR όπου φαίνονται και τα κυστεϊνικά τους μοτίβα με διαφορετικά χρώματα. Με κόκκινο συμβολίζεται το κυστεϊνικό ζεύγος κίνησης, με κίτρινο το ζεύγος κυστεϊνών του ενεργού κέντρου, με ροζ το ζεύγος δομικών κυστεϊνών και με μαύρο οι κυστεΐνες στις δύο ισομορφές της ALR που είναι σημαντικές για το διμερισμό της πρωτεΐνης. Οι δύο κυστεΐνες C74/C85 για τη μικρού μήκους και C154/C165 για τη μεγάλου μήκους ισομορφή της πρωτεΐνης ALR είναι μη συντηρημένες (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2011a) (B) Σύγκριση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών Ιf-ALR (1-125), Erv1 (1-189) και η συντήρηση στο καρβοζυτελικό τους κομμάτι (42%).

9. Αλληλεπίδραση Mia40-Erv1/ALR στο μονοπάτι ΜΙΑ

Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης Erv1/ALR έχει λυθεί για το ομόλογο της στους οργανισμούς: *R. Norvegicus* (Wu *et al*, 2003), *A. Thaliana* (Vitu *et al*, 2006), *H. sapiens* (Daithankar *et al*, 2010; Banci *et al*, 2011a) and *S. Cerevisiae* (Guo *et al*,

2012). Ο πυρήνας της δομής της πρωτεΐνης αποτελείται απο πέντε α-έλικες, τέσσερις εκ των οποίων φέρονται ως δέσμη που σχηματίζουν μία χοάνη η οποία φιλοξενεί το FAD μόριο στο εσωτερικό της. Η στερεοδιαμόρφωση αυτή αποτελεί μία κλασσική περιοχή πρόσδεσης FAD. Στην Erv1/ALR πρωτεΐνη, η πέμπτη α-έλικα φέρεται κάθετα προς την παραπάνω δέσμη α-ελίκων (Εικόνα 9). Η πρωτεΐνη στην οξειδωμένη της κατάσταση συμμετέχει στο μονοπάτι ΜΙΑ για την επανοξείδωση του CPC μοτίβου της Mia40, το οποίο ανάγεται μετά την αλληλεπίδρασή της με το εκάστοτε υπόστρωμα (Mia40_{2SS}). Σε αυτήν την περίπτωση η Erv1/ALR ανακυκλώνει την Mia40, μέσω του ακραίου ζεύγους κυστεϊνών του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης (CRSC για την Erv1 και CRAC μοτίβο για την lf-ALR) το οποίο παραλαμβάνει τα ηλεκτρόνια (Ang & Lu, 2009; Bien et al, 2010; Daithankar et al, 2010; Lionaki et al, 2010; Mesecke et al, 2005). Και στην περίπτωση της Erv1 αλλά και στην περίπτωση της lf-ALR πρωτεΐνης, το συγκεκριμένο κυστεϊνικό ζεύγος βρίσκεται σε ένα αρκετά ευλύγιστο κομμάτι αμινοτελικά της πρωτεΐνης (N72 και N80, αντίστοιχα) (Bien et al, 2010; Vitu et al, 2006; Wu et al, 2003). Απο το παραπάνω ζεύγος κυστεϊνών, τα ηλεκτρόνια περνούν στο μοτίβο κυστεϊνών του ενεργού κέντρου του άλλου μονομερούς στο διμερές της πρωτεΐνης Erv1/ALR και απο εκεί στο FAD μόριο του ίδιου μονομερούς (Ang & Lu, 2009; Bien et al, 2010; Daithankar et al, 2009; Lionaki et al, 2010).



Εικόνα 9: Διάγραμμα κορδέλας των πρωτεϊνών Erv1 του σακχαρομύκητα και sf-ALR του ανθρώπου. (A) Δομή της πλήρου μήκους Erv1 στο χώρο. Τα δύο μονομερή συμβολίζονται με γαλάζιο και μωβ χρώμα ενώ η διακεκομένη γραμμή αντιστοιχεί στα αμινοξέα που δεν μπόρεσαν να χαρακτηριστούν

δομικά (Guo et al, 2012) (B) Δομή του διμερούς της sf-ALR. Οι δύο κυστεΐνες C95 και C204 σχηματίζουν τους δύο δισουλφιδικούς δεσμούς που ενώνουν τα δύο μονομερή στο διμερές (κίτρινο χρώμα). Ο δεσμός μεταξύ των κυστεϊνών C142 και C145 του ενεργού κέντρου και ο δεσμός που ενώνει τις κυστεΐνες δομικές C171 και C188 επίσης παρουσιάζονται. Το FAD μόριο ανα μονομερές συμβολίζεται με κίτρινο χρώμα (Daithankar et al, 2010).

Ως αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας, το CPC μοτίβο της Mia40 επανοξειδώνεται η Erv1 ανάγεται. Για επανοξείδωση ενώ την της σουλφυδριλοξειδάσης ώστε να δράσει ξανά ανακυκλώνοντας τη Mia40, τα ηλεκτρόνια που φέρει μεταφέρονται στο οξυγόνο (Lee et al, 2000) προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Εναλλακτικά, τα ηλεκτρόνια μπορούν να μεταφερθούν στο κυτόχρωμα c της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς οι Farrel και Thorpe έδειξαν in vitro ότι το κυτόχρωμα c μπορεί να είναι 100 φορές καλύτερος αποδέκτης ηλεκτρονίων συγκριτικά με το οξυγόνο (Farrell & Thorpe, 2005) Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και απο τους Allen et al. που πραγματοποίησαν αντίστοιχη μελέτη σε κύτταρα σακχαρομύκητα (Allen et al, 2005). Η σύνδεση της Erv1 με την αναπνευστική αλυσίδα έχει επιβεβαιωθεί και in vivo στο σακχαρομύκητα με την Erv1 να σχηματίζει σύμπλοκο με το κυτόχρωμα c σε αναλογία 1:1 στο οποίο οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα (Dabir et al, 2007). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η Erv1 μπορεί να επανοξειδωθεί απο το κυτόχρωμα c και έμμεσα καθώς στους μύκητες, η περοξειδάση του κυτοχρώματος c (Ccp1, Cytochrome c peroxidase 1) μετατρέπει το H₂O₂ που προκύπτει απο τη μεταφορά των ηλεκτρονίων της Erv1 προς το οξυγόνο, σε νερό (Dabir et al, 2007) ενώ τελικά η οξειδωμένη περοξειδάση ανάγεται απο το κυτόχρωμα c (Εικόνα 10).

Καθώς τα τυπικά υποστρώματα του μονοπατιού ΜΙΑ αναδιπλώνονται οξειδωτικά, φέρουν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς στη διομή τους. Η Mia40 οξειδώνει τον ένα απο τα δύο κυστεϊνικά ζεύγη τους ενώ *in vitro* είναι ικανή να δώσει και τον δεύτερο δισουλφιδικό δεσμό για την πλήρη οξείδωσή τους (Banci *et al*, 2009a; Bien *et al*, 2010; Grumbt *et al*, 2007). Παρ' όλα αυτά, δεν είναι γνωστό πως εισάγεται ο δεύτερος δισουλφιδικός δεσμός *in vivo*, αλλά προτείνεται ότι αυτό μπορεί να συμβεί μέσω του μοριακού οξυγόνου (Banci *et al*, 2009a; Sideris & Tokatlidis, 2007), της Mia40 σε ένα δεύτερο κύκλο οξείδωσης του υποστρώματος (Mesecke *et al*, 2005), μέσω μετάλλων ή της γλουταθειόνης (Sideris & Tokatlidis, 2007) ή μέσω της Εrv1 (Allen *et al*, 2005; Mesecke *et al*, 2005; Muller *et al*, 2008; Stein & Lisowsky, 1998). Για την τελευταία περίπτωση, οι Bottinger *et al*. αναφέρουν την ύπαρξη ενός παροδικού τριαδικού συμπλόκου (μεταξύ των Mia40, Erv1 και υποστρώματος), όπου

η πρωτεΐνη Erv1 υποκινεί τη μεταφορά δισουλφιδικών δεσμών προς το υπόστρωμα (Stojanovski *et al*, 2008) καθώς συνδέεται παροδικά με το ενδιάμεσο Mia40υπόστρωμα (Bottinger *et al*, 2012). Μεταγενέστερη μελέτη απο την ίδια επιστημονική ομάδα, αναφέρει το σχηματισμό του παραπάνω συμπλόκου και *in vivo* (Bottinger *et al*, 2012).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του οξειδοαναγωγικού συστήματος Mia40-Erv1. Η Mia40 (πορτοκαλί χρώμα) καταλύει την αναγνώριση, την είσοδο και την οξειδωτική αναδίπλωση του υποστρώματος (μωβ χρώμα) στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου με το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών ακολουθούμενων από αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού στο ενεργό κέντρο της Mia40 πρωτεΐνης (CPC μοτίβο). Η Erv1 ανακυκλώνει τη Mia40 στο ενεργό κέντρο της για ένα επόμενο κύκλο οξείδωσης υποστρώματος. Ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης Mia40-Erv1, η Erv1 ανάγεται και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο οζυγόνο προς παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο μετατρέπεται σε νερό μέσω της CCP1 πρωτεΐνης (γαλάζιο χρώμα), ή στο οξείδωμένο κυτόχρωμα c (πράσινο χρώμα) και απο εκεί στην οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX, καφέ χρώμα). Με αυτόν τον τρόπο, η Erv1 επανοξειδώνεται στις κυστεΐνες του CRSC μοτίβου της, οι οποίες συμμετέχουν στην οξείδωση του CPC μοτίβου της Mia40.

10. Παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία του μονοπατιού MIA

Πρόσφατα, η οξείδωση των υποστρωμάτων του μονοπατιού ΜΙΑ, βρέθηκε να ρυθμίζεται απο τη γλουταθειόνη του διαμεμβρανικού χώρου. Συγκεκριμένα, οι Bien et al παρατήρησαν ότι η γλουταθιόνη μπορεί να επάγει την οξείδωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων της Mia40. Αυτό που φάνηκε in vitro ήταν ότι η Mia40 σχημάτιζε μερικώς οξειδωμένα μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα τα οποία διατηρούνται στο χρόνο. Η Mia40 μπορούσε να ελευθερωθεί απο αυτά με τη δράση της γλουταθειόνης η οποία έχει ρόλο ισομεράσης/αναγωγάσης (Bien et al, 2010; Mesecke et al, 2005). Με αυτόν τον τρόπο, η Mia40 οδηγείται στη σωστή εγγενή της
αναδίπλωση. Επιπρόσθετα των παραπάνω, οι Kojer *et al.*, πρόσφατα έδειξαν ότι το περιβάλλον γλουταθειόνης στο κυτταρόπλασμα αλλά και στο IMS είναι παρόμοιο καθώς τα δύο διαμερίσματα επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των πορινών (πρωτεϊνών της OM) με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η οξειδοαναγωγική κατάσταση της Mia40 *in vivo* (Kojer *et al*, 2012).

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη Hot13 (<u>H</u>elper <u>of</u> <u>T</u>im , <u>13</u>kDa), μικρή IMS πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνες, προσδένει μέταλλα και είναι ένας επιπλέον παράγοντας που ρυθμίζει τη λειτουργία του οξειδωτικού μονοπατιού MIA. Ενώ δεν είναι απαραίτητη για τη ζωτικότητα του κυττάρου έχει βρεθεί οτι μπορεί *in vitro* να αφαιρεί τον ψευδάργυρο απο τα νεοεισερχόμενα υποστρώματα του μονοπατιού και απο τη Mia40 με αποτέλεσμα αυτά να μπορούν να οξειδωθούν καλύτερα απο την Erv1, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταφορά ηλεκτρονίων Mia40υποστρώματος και Mia40-Erv1 (Curran *et al*, 2004; Mesecke *et al*, 2008; Morgan *et al*, 2009).

Ακόμα, οι van der Laan *et al.* έδειξαν ότι η βιογένεση των μιτοχονδρίων εξαρτάται απο το σύμπλοκο MINOS (mitochondrial inner-membrane organizing system) το οποίο εδράζεται στην ΙΜ των μιτοχονδρίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην οξείδωσή της. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το σύμπλοκο αυτό φαίνεται να επηρεάζει την είσοδο των υποστρωμάτων του μονοπατιού ΜΙΑ μέσω αλληλεπίδρασής του με το κανάλι ΤΟΜ και τη Mia40 (van der Laan *et al*, 2012). Πιο συγκεκριμένα, η Mia40 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Fcj1, η οποία βρίσκεται στην ΙΜ ως συστατικό του συμπλόκου MINOS, και είναι σημαντική για τη διατήρηση των ακρολοφιών της (von der Malsburg *et al*, 2011). Η αλληλεπίδραση της Fcj1 τόσο με το σύμπλοκο ΤΟΜ όσο και με Mia40 ίσως βοηθάει στην στρατολόγηση της Mia40 προς τα πρωτεϊνικά υποστρώματα καθώς αυτά εισέρχονται στο IMS διαμέσου του ΤΟΜ συμπλόκου.

Η δράση της ανθρώπινης ΜΙΑ40 στα υποστρώματά της για την οξειδωτική τους αναδίπλωση αλλά και η βιογένεσή της πρόσφατα φάνηκε να καθορίζεται απο την ανθρώπινη ALR. Ο έλεγχος του μιτοχονδριακού εντοπισμού της MIA40 απο την ALR και επομένως η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είναι σημαντικός παράγοντας για τη σωστή λειτουργία του μονοπατιού MIA στον άνθρωπο (Sztolsztener *et al*, 2013). Τέλος, η οξειδωτική κατάσταση της Mia40 εξαρτάται απο το σύστημα γλουταρεδοξίνης (Grx1) και θειορεδοξίνης (Trx1) στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων κυττάρων (Banci *et al*, 2013a) γεγονός που φανερώνει το σημαντικό ρόλο των δύο αυτών συστημάτων στην ωρίμανση της Mia40 και άρα στη σωστή της λειτουργία. Το σύστημα της θειορεδοξίνης στο κυτταρόπλασμα έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την οξειδωτική κατάσταση και των μικρών Tim πρωτεϊνών, διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την είσοδό τους στο IMS καθώς τα κρατάει σε μια ξεδίπλωτη διαμόρφωση κατάλληλη για την είσοδό τους στο οργανίδιο (Durigon *et al*, 2012).

.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ:

$\Sigma KOΠO \Sigma - MEΘO ΔΟ ΛΟΓΙΑ$

Σκοπός παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν μελέτη της η της σουλφυδρυλοξειδάσης Erv1 στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου του καθοριστικών σακγαρομύκητα και 0 χαρακτηρισμός των περιογών της αλληλεπίδρασής της με την οξειδορεδουκτάση Mia40: κατα το στάδιο (A) της βιογένεσής της (είσοδος στο μιτογόνδριο, οξείδωση απο τη Mia40, πρόσδεση FAD) και (B) κατα το στάδιο όπου δρά ενζυμικά πάνω στην οξειδορεδουκτάση Mia40 για να την επανοξειδώσει. Επιπρόσθετα, απο τα παραπάνω, μελετήθηκε πιο αναλυτικά το αμινοτελικό μέρος της Erv1/ALR πρωτεΐνης στη στόχευση του μορίου στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης χωρίζονται σε τρία κεφάλαια:

Στο κεφάλαιο Ι μελετήθηκε η αλληλεπίδραση Mia40-Erv1 στο σακχαρομύκητα κατα το στάδιο της εισόδου της Erv1 πρωτεΐνης στο διαμεμβρανικό χώρο του οργανιδίου. Με *in vivo* και *in organello* πειράματα εισόδου της Erv1 και των κυστεϊνικών μεταλλαγμάτων της, βρέθηκε ότι η ελάχιστη αμινοξική περιοχή αλληλεπίδρασής της με τη Mia40 εδράζεται στο καρβοξυτελικό μέρος της, χωρίς το αμινοτελικό της μέρος να είναι αναγκαίο (στάδιο A). Η στόχευση και η ωρίμανση της Erv1 μελετήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο του καθηγητή Ivano Bertini (Magnetic Resonance Center CERM, University of Florence, Italy) όπου πραγματοποιήθηκε η δομική ανάλυση *in vitro* της ALR πρωτεΐνης, του ομολόγου της Erv1 στον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και η πρόσδεση του FAD μορίου στην Erv1/ALR είναι σημαντική για να πάρει η πρωτεΐνη τη τελική της διαμόρφωση και λειτουργία.

Στο κεφάλαιο ΙΙ η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μελετήθηκε στο στάδιο όπου η Erv1 πρωτεΐνη, μετά την είσοδό της στο οργανίδιο, επανοξειδώνει τη Mia40, ανακυκλώνοντάς την πίσω στην ενεργή της μορφή (στάδιο B). Η αλληλεπίδραση αυτή μελετήθηκε παρατηρώντας το σχηματισμό ή όχι μικτού δισουλφιδικού ενδιαμέσου μεταξύ των πρωτεϊνών σε πειράματα εισόδου *in organello* και *in vitro*, αλλά και με *in vivo* δοκιμασίες γενετικής συμπληρωματικότητας που πραγματοποήθηκαν για να μελετηθεί η σημασία της στη βιωσιμότητα του σακχαρομύκητα. Τα παραπάνω πειράματα ακολούθησαν μετά απο μεταλλαξιγένεση της Erv1 σε συγκεκριμένα υδρόφοβα αμινοξέα καθοδικά του CRSC μοτίβου των κυστεϊνών ζεύγους κίνησης, όπου χαρακτηρίστηκε μια συγκεκριμένη περιοχή 12 αμινοξέων κατάλληλη και αναγκαία για την αλληλεπίδραση Mia40-Erv1/ALR. Απο την *in vitro* μελέτη των συνεργατών μας για τον ίδιο σκοπό καταλήξαμε στο γεγονός

25

ότι το συγκεκριμένο αμινοτελικό μέρος της Erv1/ALR φαίνεται να παίζει ρόλο στο στάδιο αυτό, και στο μηχανισμό μίμησης της αλληλεπίδρασης Mia40-υποστρώματος που μαζί προτείνουμε.

Τέλος, στο κεφάλαιο ΙΙΙ μελετήθηκε η δομή και ο ρόλος του αμινοτελικού Ν72 μέρους της Erv1 το οποίο φάνηκε να είναι εγγενώς αποδιαταγμένο και να φέρει πληροφορία στόχευσης της πρωτεΐνης απο το κυτταρόπλασμα προς το μιτοχόνδριο. Mε in vitro (δομική) ανάλυση, in silico μελέτη και βιοχημικά πειράματα in organello, και στηριζόμενοι επιπρόσθετα στη δομική μελέτη του αμινοτελικού κομματιού της ανθρώπινης ALR (N80), που πραγματοποιήθηκε από τους συνεργάτες μας με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR), καταλήξαμε στο γεγονός ότι αυτό το μέρος της Erv1/ALR φέρει σημαντική πληροφορία στόχευσης μη μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα (πειράματα κατασκευής χιμερικής πρωτεΐνης). Το γεγονός αυτό φανερώνει το διττό ρόλο που έχει το αμινοτελικό μέρος της πρωτεΐνης ανάλογα με το υποκυτταρικό διαμέρισμα που βρίσκεται κάθε φορά. Στο κυτταρόπλασμα (στάδιο Α) το αμινοτελικό μέρος μπορεί να στοχεύει την πρωτεΐνη Erv1 στο μιτοχόνδριο χωρίς να είναι αναγκαίο για την αλληλεπίδραση με τη Mia40, ενώ στο διαμεμβρανικό χώρο (στάδιο B) το μέρος αυτό είναι απαραίτητο για την επανοξείδωση της Mia40. Τέλος, με μία ανεξάρτητη in vitro προσέγγιση (χρήση συστοιχίας Erv1 πεπτιδίων) μελετήσαμε τις πιθανές περιοχές της αλληλεπίδρασης Erv1-Mia40, οι οποίες στο σύνολό τους επαλήθευσαν τα αποτελέσματα των κεφαλαίων Ι και ΙΙ, φανερώνοντας το σημαντικό τους ρόλο στη βιογένεση και στην ενζυμική δράση της Erv1 πρωτεΐνης.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ:

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας

1.1 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA

Οι μοριακές τεχνικές της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν με βάση τα εγχειρίδια του εργαστηρίου: 'Molecular Cloning' (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis) και 'Current Protocols in Molecular Biology' (F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, K. Struhl).

Για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιήθηκαν επιδεκτικά βακτήρια στελέχους DH5a και κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς, για τις κλωνοποιήσεις των εκάστοτε γονιδίων: pET24b(+) και pET16bHis₁₀MBPTEV (Novagen), pSP64 και pSP65 (Promega) καθώς και ο pRS316up40 (ο οποίος φέρει τον ενδογενή υποκινητή της Mia40 (up40) κλωνοποιημένο 340 βάσεις ανοδικά του 5' άκρου, χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα XbaI/BamHI (κατασκευή απο Τζένη Σιδέρη).

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

1.2 Κλωνοποιήσεις σε πλασμιδιακούς φορείς

Για τα πειράματα εισόδου ραδιενεργών πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, τα μεταλλάγματα του *Erv1* γονιδίου: *LLQ/A*, *LLFQ/A*, *LLF/E*, *N72*, *N72*+3Meth (περιέχει 3 επιπλέον μεθειονίνες στο καρβοξυτελικό του άκρο του N72 πρωτεϊνικού μορίου οι οποίες φέρονται στον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίησή του), *ΔN72* και *ΔN133* κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pSP64 με περιοριστικές θέσεις BamHI/EcoRI. Ομοίως, και για το αγρίου τύπου *Erv1* και τα μεταλλάγματα του: *C30/33S*, *C130/133S*, *C159/176S*, *C159S*, *C176S* και *ΔC13* που κατασκευάστηκαν απο προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση του ΔN133 προστέθηκαν πέντε επιπλέον μεθειονίνες καρβοξυτελικά του για την ενίσχυση του σήματός του κατα την *in vitro* έκφρασή του σε κυτταρικό εκχύλισμα πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων από κουνέλι (rabbit reticulocyte lysate). Για την παραγωγή των ραδιενεργών πρωτεϊνών DHFR-Erv1 και DHFR-N72 in vitro, οι αντίστοιχες κασέτες κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pSP64-DHFR-Tim10 (Sideris et al, 2009) αντικαθιστώντας το γονίδιο Tim10 που είχε κλωνοποιηθεί μέσω BamHI/EcoRI θέσεων περιοριστικής κοπής. Για την κατασκευή των κασετών: Erv1-DHFR και N72-DHFR, τα γονιδιακά κομμάτια Erv1 και N72 αρχικά πολλαπλασιάσηκαν φέροντας τις περιοριστικές θέσεις EcoRI/BamHI και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pSP65 ανοδικά του DHFR γονιδίου.

Για τα πειράματα *in vitro* γενετικής συμπληρωματικότητας σε κύτταρα σακχαρομύκητα τα μεταλλάγματα της Erv1: LLQ/A, LLFQ/A, LLF/E, F/A και F/E κλωνοποιήθηκαν με περιοριστικές θέσεις BamHI/EcoRI στο φορέα pRS316up40 όπως έγινε και με την αγρίου τύπου Erv1 και τα μεταλλάγματά της: C159S και C176S (κατασκευές απο προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου).

Για την έκφραση της πρωτεΐνης Erv1 αγρίου τύπου χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pET24b(+)Erv1 (Lionaki *et al*, 2010) όπου το γονίδιο *Erv1* είχε κλωνοποιηθεί με τις περιοριστικές θέσεις NdeI/XhoI στο συγκεκριμέο φορέα. Τα μεταλλάγματα της Erv1: LLQ/A, LLFQ/A, LLF/E κλωνοποιήθηκαν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Για την έκφραση του N72 σε βακτήρια, το κομμάτι αυτό της Erv1 κλωνοποιήθηκε απο τον φορέα pSP64 (Lionaki *et al*, 2010) στον φορέα pET16BHis₁₀MBPTEV ως NdeI/EcoRI. Τέλος, για την έκφραση του N80 κομματιού της lf-ALR πρωτεΐνης το ανίστοιχο γονίδιο κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό φορέα pET16BHis₁₀MBPTEV με τις περιοριστικές θέσεις NdeI/EcoRI μετά απο πολλαπλασιασμό του με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα την κασέτα pET16BHis₁₀MBPTEV- lf-hALR (το lf-hALR γονίδιο έχει κλωνοποιηθεί επίσης ως NdeI/EcoRI).

Φορέας	Ένθεμα	Αναφορά
pET24b(+)	Erv1	προηγούμενη μελέτη
pET24b(+)	LLF/E	παρούσα μελέτη
pET24b(+)	LLQ/A	παρούσα μελέτη
pET24b(+)	LLFQ/A	παρούσα μελέτη
pSP64	Erv1	προηγούμενη μελέτη
pSP64	LLF/E	παρούσα μελέτη
pSP64	LLQ/A	παρούσα μελέτη

Οι παραπάνω κλωνοποιήσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί:

pSP64	LLFQ/A	παρούσα μελέτη
pSP64	ΔΝ133	παρούσα μελέτη
pSP64	ΔC13	προηγούμενη μελέτη
pSP64	C30/33S	προηγούμενη μελέτη
pSP64	C130/133S	προηγούμενη μελέτη
pSP64	C159/176S	προηγούμενη μελέτη
pSP64	C159S	προηγούμενη μελέτη
pSP64	C176S	προηγούμενη μελέτη
pSP64	N72	προηγούμενη μελέτη
pSP64	DN72	προηγούμενη μελέτη
pSP64	N72-DHFR	παρούσα μελέτη
pSP64	Erv1-DHFR	παρούσα μελέτη
pSP65	DHFR- Erv1	παρούσα μελέτη
pSP65	DHFR-N72	παρούσα μελέτη
pRS316up40	F/E	παρούσα μελέτη
pRS316up40	F/A	παρούσα μελέτη
pRS316up40	LLF/E	παρούσα μελέτη
pRS316up40	LLQ/A	παρούσα μελέτη
pRS316up40	LLFQ/A	παρούσα μελέτη
pRS316up40	C159S	προηγούμενη μελέτη
pRS316up40	C176S	προηγούμενη μελέτη
pET16BHis ₁₀ MBPTEV	lf-hALR	παρούσα μελέτη
pET16BHis ₁₀ MBPTEV	N72	παρούσα μελέτη
pET16BHis ₁₀ MBPTEV	N80	παρούσα μελέτη

Πίνακας 1: Περιγραφή πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

1.3 Μεταλλαζιγένεση γονιδίων

Οι σημειακές μεταλλαγές που αφορούν οποιοδήποτε γονίδιο της παρούσας διατριβής, ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, πραγματοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο

"QuikChange site-directed mutagenesis" και τις οδηγίες του κατασκευαστή (Stratagene). Πιο αναλυτικά:

- Τα Erv1 μεταλλάγματα LLFQ/A, LLQ/A, LLF/E, F/A και F/E προέκυψαν μεταλλάσοντας το αγρίου τύπου Erv1 γονίδιο του σακχαρομύκητα που είχε κλωνοποιηθεί προηγουμένως στους φορείς pSP64 και pET24b(+).
- Τα μεταλλάγματα C30/33S, C130/133S, C159/176S, C159S και C176S προέκυψαν απο μεταλλαξιγένεση του αντίστοιχου αγρίου τύπου Erv1 γονιδίου στο φορέα pSP64, απο δουλειά που διεξήγαγαν προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου (Ειρήνη Λιονάκη και Παρασκευή Κριτσιλίγκου).

2. In organello τεχνικές (Χειρισμός μιτοχονδρίων)

2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων από τα στελέχη αγρίου τύπου, galErv1και galMia40 του σακχαρομύκητα

Για τα πειράματα εισόδου ραδιενεργής πρόδρομης πρωτεΐνης, απομονώθηκαν μιτοχόνδρια αγρίου τύπου στελέχους D273-10B του Saccharomyces cerevisiae, το οποίο αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιείχε γαλακτικό οξύ (YPLac) σε θερμοκρασία 30°C. Η πηγή άνθρακα του συγκεκριμένου μέσου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ενέργειας μέσω γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα του σακχαρομύκητα. Συνεπώς, μόνο τα κύτταρα που διαθέτουν λειτουργικά μιτοχόνδρια επιβιώνουν. Τα κύτταρα αυτά φέρουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων τα οποία απομονώνονται στη συνέχεια.

Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων galMia40 galErv1, και χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αγρίου τύπου σακχαρομύκητα FT5 που έχει τροποποιηθεί κατάλληλα γενετικά έτσι ώστε η έκφραση των ενδογενών γονιδίων Mia40 και Erv1 να υπόκειται στη ρύθμιση του υποκινητή γαλακτόζης (Gal10-1) αντί του ενδογενούς υποκινητή της Erv1 (Lionaki et al, 2010; Sideris et al, 2009) Συγκεκριμένα, τα galErv1 και galMia40 κύτταρα αρχικά αναπτύσσονται παρουσία γαλακτόζης και στη συνέχεια αλλάζουμε την πηγή άνθρακα χρησιμοποιώντας γαλακτικό οξύ εμπλουτισμένο με 0,2% γλυκόζη για τη διαττήρηση της σίγησης της έκφρασης των ενδογενών γονιδίων, για 24 ώρες.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η διαδικασία απομόνωσης των μιτοχονδρίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Daum *et al*, του 1982, όπου τελικά, μέσω της

χρήσης του χημικού Nycodenz, απομονώνονται καθαρά μιτοχόνδρια και αποθηκεύονται στους -80°C.

2.2 Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα

Για την είσοδο ³⁵S ραδιοσημασμένου πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου στα μιτοχόνδρια, αυτά αρχικά επαναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο διάλυμα κατάλληλο για την είσοδό τους στο εσωτερικό των οργανιδίων (import buffer), σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη του ραδιενεργού πρόδρομου υποστρώματος και η επώαση των μιτοχονδρίων με αυτό στους 30°C, η οποία συνεχίστηκε για τόσο χρόνο όσο είχε καθοριστεί για το εκάστοτε πείραμα.

Σε πειράματα κινητικής τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για να σταματήσει η αντίδραση στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, με την προσθήκη τελικής συγκέντρωσης 25mM NEM (N-ethylmaleimide) για την ανίχνευση του μικτού δισουλφιδικού Erv1-Mia40 ενδιαμέσου. Ο αλκυλιωτικός αυτός παράγοντας δεσμεύει τις ελεύθερες σουλφυδριλομάδες και παγώνει τα πρωτεϊνικά ενδιάμεσα. Στη συνέχεια, ακολούθησε η απομόνωση των μιτοχονδρίων με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 16.100 στροφές g στους 4°C, όπου το πρόδρομο μόριο που δεν εισήχθη απομακρύνθηκε με αφαίρεση του υπερκειμένου και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ισοτονικό διάλυμα, 0.6M sorbitol and 20mM Hepes-KOH, pH 7,4, παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης πρωτεϊνάσης K (0.1 mg/ml ή 20µg/ml) ή τρυψίνης (0,1mg/ml). Το ποσό του μη εισαγμένου ραδιενεργού μορίου, απομακρύνθηκε με επώαση του δείγματος στους 4°C για 30 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη PMSF τελικής συγκέντρωσης 4mM (ή SBTI τελικής συγκέντρωσης 1mg/ml για την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε τρυψίνη), για 10 λεπτά στους 4°C και τα μιτογόνδρια απομονώθηκαν ξανά με φυγοκέντρηση. Η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 15 μl 2x Laemmli sample buffer με ή χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη, αναλόγως το πείραμα, ενώ το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Τα δείγματα βράστηκαν σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 10% ή 12% Tris-Tricine πήκτωμα ακρυλαμίδης ή 12% SDS-PAGE ανάλυση. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης βάφτηκαν με Coomassie brilliant blue (R-250), στέγνωσαν σε χαρτί whatmann στη συσκευή Biorad Gel Dryer και τοποθετήθηκαν σε κασέτα για έκθεση τους σε φιλμ απο 1-2 μέρες. Η εμφάνιση του αποτελέσματος της

αυτοραδιογραφίας έγινε χρησιμοποιώντας το μηχάνημα phospho-imager (Molecular dynamics). Τα διαλύματα της παραπάνω διαδικασία είναι τα ακόλουθα:

Import buffer (2x)(100 mM Hepes, pH 7.1, 1.2 M sorbitol, 4 mM KH₂PO₄, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM Na₂EDTA, 10 mM L-Methionine, 2 mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), 2 mM ATP, 2.5 mM NADH), *Ισοτονικό διάλυμα* επαναδιάλυσης μιτοχονδρίων (Breaking Buffer) (0.6 M sorbitol, 20 mM Hepes pH 7.4), 10 x Laemmli sample buffer (SB) (0.5 M Tris, 8 mM EDTA, 0.4% SDS pH 6.8, 5 % glycerol, (200 mM DTT), 0.001% Bromophenol blue), *Coomassie* (30% methanol, 10% acetic acid & 0,2% R-250) *Destaining buffer* (15% methanol, 10% acetic acid)

2.3 Ανοσοκατακρήμνιση μετά από πείραμα εισόδου σε μιτοχόνδρια

Για την ανοσοκατακρήμνιση του Mia40-Erv1 συμπλόκου, μετά την αντίδραση εισόδου ραδιενεργής Erv1 σε 100μg μιτοχονδρίων, αυτά επαναδιαλύθηκαν σε lysis buffer (150mM NaCl, 10mM Tris pH 7.4, 0,5% Triton X-100, 1% SDS και 1mM PMSF) και βράστηκαν για 5 λεπτά στους 95°C. Στη συνέχεια, αραιώθηκαν 15 φορές με IP buffer (150mM NaCl, 10mM Tris pH 7,4, 0,1% Triton X-100 και 1mM PMSF) και επωάστηκαν με το α-Mia40 αντίσωμα ή ορό πριν την ανοσοποίηση (preimmune serum) και Protein A σφαιρίδια (Amersham) για 2 ώρες στους 4°C. Το προσδεμένο υλικό ξεπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα IP και τέλος επαναδιαλύθηκε σε Laemmli sample buffer με ή χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Το ανοσοκατακρημνισμένο υλικό αναλύθηκε με SDS-PAGE και ελέγχθηκε με αυτοραδιογραφία (Sideris *et al*, 2009).

2.4 Είσοδος ραδιοσημασμένου πρόδρομου μορίου σε galErv1 μιτοχόνδρια σε δύο στάδια

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των Mia40 και Erv1 στο στάδιο όπου η Erv1 επανοξειδώνει το ενεργό κέντρο της Mia40, χρησιμοποιήθηκαν καθαρά απομονωμένα galErv1 μιτοχόνδρια τα οποία είχαν προηγουμένως εμπλουτιστεί με τις καθαρισμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Erv1 αγρίου τύπου, Erv1 LLFQ/A και Erv1 LLF/E ή όχι. Οι πρωτεΐνες αυτές διαλύθηκαν σε τρεις όγκους κορεσμένου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου και επωάστηκαν για 30 λεπτά στις 25.000g σε

θερμοκρασία δωματίου και οι πελέτες που προέκυψαν επαναδιαλύθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα (8M urea, 50mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 20mM DTT) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Τελικά, οι πρωτεΐνες επωάστηκαν με τα galErv1 μιτοχόνδρια παρουσία 2 mM ATP και 2.5 mM NADH για 30 λεπτά στους 30°C.

Μετά από αυτή την πρώτη αντίδραση εισαγωγής των πρόδρομων μορίων στα μιτοχόνδρια, αυτά απομονώθηκαν ξανά με φυγοκέντρηση σε φρέσκο import buffer για την εισαγωγή της ραδιενεργής πρόδρομης πρωτεΐνης Mia40SPC (μεταλλαγμένη στην πρώτη κυστεΐνη του CPC μοτίβου της). Η πρόδρομη ³⁵S-σημασμένη Mia40SPC παρήχθη *in vitro* και στη συνέχεια εισήχθη στα galErv1 μιτοχόνδρια για 5, 10 και 20 λεπτά στους 30°C. Η αντίδραση της εισαγωγής σταμάτησε στο στάδιο του μικτού δισουλφιδικού ενδιαμέσου προσθέτοντας 25mM NEM και το υλικό που δεν εισήχθη απομακρύνθηκε με επώαση των μιτοχονδρίων παρουσία πρωτεϊνάσης K (0,1mg/ml) για 30 λεπτά στον πάγο. Η πρωτεϊνάση K απενεργοποιήθηκε, στη συνέχεια, με τη χρήση 4mM PMSF και τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση και τελικά επαναδιαλύθηκαν σε 2x Laemmli sample buffer με ή χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα δείγματα τελικά βράστηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και φορτώθηκαν στο πήκτωμα ακρυλαμίδης.

2.5 Δημιουργία μιτοπλαστών

Για την δημιουργία μιτοπλαστών (μιτοχόνδρια απαλλαγμένα από την εξωτερική τους μεμβράνη), τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση, μετά το πείραμα εισόδου ραδιενεργού πρόδρομου μορίου σε αυτά και επαναδιαλύθηκαν χρησιμοποιώντας υποτονικό διάλυμα 1x import buffer αραιωμένου σε 9 όγκους 20mM Hepes-KOH pH 7,4 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση μιτοχονδρίων να είναι 0.5mg/ml. Η επαναδιάλυση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία 0,1 mg/ml τελικής συγκέντρωσης τρυψίνης για 30 λεπτά στον πάγο και ακολούθησε προσθήκη SBTI τελικής συγκέντρωσης 1mg/ml για 10 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000g στους 4°C για 5 λεπτά όπου: το υπερκείμενο (διαμεμβρανικός χώρος) διαχωρίζεται από την πελέτα (μιτοπλάστες και θραύσματα της εξωτερικής μεμβράνης). Η πελέτα επαναδιαυτοποιήθηκε σε 2x Laemmli sample buffer με β-μερκαπτοαιθανόλη ενώ στο υπερκείμενο προστέθηκε TCA (trichloro acetic acid) τελικής συγκέντρωσης 10% για την κατακρήμνιση του πρωτεϊνικού του περιεχομένου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και

34

ηλεκτροαποτύπωση σε μεβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε αυτοραδιογραφία τοποθετώντας τη μεμβράνη σε κασέτα με φιλμ. Για τον έλεγχο της διαδικασίας, η μεμβράνη στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για επώασή της με κατάλληλα αντισώματα συγκεκριμένων πρωτεϊνών ελέγχου του διαμεμβρανικού χώρου (a-cytb2) και της μήτρας (a-Cpn10).

2.6 Εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο (carbonate extraction)

Για την εξέταση του υπομιτοχονδριακού εντοπισμού ραδιενεργού υποστρώματος, μετά από πείραμα εισόδου του σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και επεξεργασία τους με πρωτεάση, τα οργανίδια επαναδιαλύθηκαν σε 0,1M φρέσκο και παγωμένο ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) και επωάστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά παρουσία ή απουσία τρυψίνης. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 55.000g και στους 4°C για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο κατακρημνίστηκε με προσθήκη 10% TCA σε αυτό και στη συνέχεια το κατακρημνισμένο υλικό επαναδιαλύθηκε όπως και το κλάσμα της πελέτας σε διάλυμα 2x Laemmli buffer. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE μετα απο βράσιμο τους 5 λεπτά στους 95°C.

3. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών

3.1 Έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια

Η έκφραση των πρωτεϊνών των μεταλλαγμάτων της Erv1, LLF/E, LLQ/A και LLFQ/A, έγινε από το φορέα pET24a(+) οι οποίοι περιέχουν τον υποκινητή της RNA πολυμεράσης του ιού T7, ανοδικά του εκάστοτε κλωνοποιημένου γονιδίου. Το κλωνοποιημένο γονίδιο δεν εκφράζεται απουσία της T7 RNA πολυμεράσης. Γι' αυτό, αυτή η πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* BL21 (DE3 rare) όπου το στέλεχος αυτό έχει ενσωματωμένο στο γενετικό υλικό του, το γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση κάτω από τον υποκινητή lac (*lac* promoter) και τον χειριστή lac (*lac* operator). Μόνο παρουσία IPTG (ανάλογο της λακτόζης) το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης ενεργοποιείται και ξεκινάει η μεταγραφή του προς μελέτη γονιδίου.

Αρχικά, μοναδιαίες αποικίες που έφεραν την κατάλληλη κατασκευή έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό μικρού όγκου καλλιεργειών με θρεπτικό υλικό LB (Luria-Bertani) εμπλουτισμένου με τα κατάλληλα αντιβιοτικά στα οποία τα βακτήρια έφεραν αντίσταση. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επωάστηκαν O/N στους 37°C και αραιώθηκαν 1/50 σε φρέσκο θρεπτικό ανάπτυξης έως οι καλλιέργειες να φτάσουν στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους, οπτική πυκνότητα (optical density, O.D) 0.4 - 0.7, με επώασή τους στους 37°C. Ακολούθησε προσθήκη 0,1mM IPTG για την έκφραση των Erv1 αγρίου τύπου και LLQ/A, LLFQ/A και LLF/E μεταλλαγμάτων και τα κύτταρα αφέθηκαν για επώαση 4 ώρες στους 30°C ή O/N στους 18°C, αντίστοιχα. Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντρηση των καλλιεργειών για 15 λεπτά στις 5.000g και σε θερμοκρασία 4°C όπου οι πελέτες των κυττάρων συλλέχθησαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι τον καθαρισμό των πρωτεϊνών.

Η έκφραση των πεπτιδίων N72 της Erv1 και N80 της lf-ALR, έγινε χρησιμοποιώντας τον πλασμιδιακό φορεά pET16BHis₁₀MBPTEV, όπου τα πεπτίδια παρήχθησαν σημασμένα με δέκα ιστιδίνες στο αμινοτελικό τους άκρο απο κύτταρα Origami 2 και BL21 (DE3) gold cells (Stratagene), αντίστοιχα. Για το N72, η έκφραση έγινε στους 37°C για 4 ώρες με 0,4Mμ IPTG ενώ οι πρώτες προσπάθειες έκφρασης του N80, στο εργαστήριο μας, έγιναν σε Origami 2 κύτταρα για 4 ώρες στους 37°C με 0,4mM IPTG.

3.2 Καθαρισμός πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες Erv1 LLF/E, LLQ/A και LLFQ/A, απομονώθηκαν σημασμένες με εξαϊστιδινικό σήμα (His-tag) από 4 λίτρα καλλιέργειας βακτηρίων *E. coli* BL21 (DE3 rare) που έφεραν τα αντίστοιχα πλασμίδια σε pET24b(+) φορέα (απομόνωση απο τον Χαράλαμπο Ποζίδη). Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (50mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο και 10% γλυκερόλη) με επιπλέον 0.5M NaCl και 30μM FAD και έπειτα ακολούθησε διάρρηξή τους με τη χρήση υπερήχων. Τα διαρρηγμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 25.000 στροφές (rpm) για μία ώρα στους 4°C. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από το υπερκείμενο (στο οποίο κατεληξε το 80% της πρωτεΐνης) το οποίο πέρασε απο σφαιρίδια νικελίου-αγαρόζης (Ni-NTA beads, Qiagen) που είχαν εξισορροπηθεί με διάλυμα A και 0.5M NaCl, ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη σε αυτά. Κατόπιν, τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα A και 50mM NaCl. Τελικά, οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια χρησιμοποιώντας διάλυμα

Α και 300 mM ιμιδαζόλιο. Τέλος, ο καθαρισμός του πεπτιδίου N80 πραγματοποιήθηκε απο τους συνεργάτες μας στην Ιταλία (Banci *et al*, 2013b).

3.3 In vitro αλληλεπίδραση των Erv1 και Mia40 πρωτεϊνών

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των Mia40 και Erv1 *in vitro*, χρησιμοποιήσαμε 7 μg καθαρής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Mia40 αγρίου τύπου απο την οποία απουσιάζουν τα πρώτα 290 αμινοξέα του αμινοτελικού της μέρους (DN290Mia40) ή των μεταλλαγμάτων ΔN290Mia40CPC, SPS, ή το υδρόφοβο εξαπλό LMFFFM/A μετάλλαγμα της Mia40 όπου χρειαζόνταν, καθώς και 7 μg της αγρίου τύπου Erv1 και των μεταλλαγμάτων της LLF / E, LLQ / A και LLFQ / A.

Η Mia40 επωάστηκε με 2 mM DTT για 30 λεπτά στους 30°C για την αναγωγή στο CPC τους μοτίβο και στη συνέχεια αριώθηκε 10-φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα A (50 mM Tris, 150 mM NaCI ρH 7,4) πριν από την επώασή της με τις διαφορετικές εκδοχές της ανασυνδυασμένης Erv1 πρωτεΐνης. Ως πείραμα ελέγχου, οι ανηγμένες Mia40 εκδοχές επωάστηκαν απουσία Erv1. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στους 25 ° C για 10 και 20 λεπτά και στη συνέχεια οι αντιδράσεις σταμάτησαν με προσθήκη 10% TCA και επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρησή τους στους 4°C για 30 λεπτά και επαναδιάλυση των πελετών σε 2x Laemmli buffer χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη παρουσία 20mM NEM. Τα δείγματα αναλύθηκαν με Tris-Tricine SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο Mia40-Erv1 ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας α-Mia40 αντίσωμα.

3.4 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών Mia40, Ervl και κυτοχρώματος c σε μιτοχόνδρια αγρίου τύπου

Για την ποσοτικοποίηση των Mia40, Erv1 και κυτοχρώματος c (cytc) σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια χρησιμοποιήθηκαν οι καθαρές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες: ΔN67SPCMia40, Erv1 αγρίου τύπου και η πρωτεΐνη κυτόχρωμα c (cytc) αγρίου τύπου (από το στέλεχος *S. cerevisiae*, Sigma). Η αρχική συγκέντρωση των καθαρισμένων πρωτεϊνών ΔN67SPCMia40 και Erv1 που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίστηκε με βάση την απορρόφηση τους στα 280nm με τη χρήση του προγράμματος NanoDrop και σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους από το πρόγραμμα ProtParam, όπου για την εκάστοτε μέτρηση χρησιμοποιήθηκε: το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και η θεωρητική σταθερά απόσβεσης (ε ή extinction coefficient) που υπολογίζεται από την εξίσωση: ε (280nm) = 5500 (#W) + 1490 (#Y) + 125 (#C), όπου #W = η περιεκτικότητα σε τρυπτοφάνες, #Y = η περιεκτικότητα σε τυροσίνες και #C = ο αριθμός των οξειδωμένων κυστεϊνών.

Διαφορετικές ποσότητες των παραπάνω πρωτεϊνών φορτώθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης για ηλεκτροφόρησή τους κάτω απο αποδιατακτικές (SDS-PAGE) παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε σε 20Volt σταθερά για 25 λεπτά και η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του εκάστοτε πρώτου αντισώματος έγινε χρησιμοποιώντας 5% γάλα σε 1x TBST (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.8mM Tween-20) και 1 ώρα ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης γρησιμοποιώντας το κατάλληλο κάθε φορά πρώτο αντίσωμα: α-Mia40 (1-1000), α-Erv1 (1-2000) και α-cytc (1-10000) σε 1% γάλα διαλυμένο σε 1x TBST. Για την μέτρηση των εντάσεων των ζωνών σήματος που προέκυψαν, γρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image Quant 5.2, όπου γνωρίζοντας την ποσότητα της πρωτεΐνης στην οποία αντιστοιχούσε μια συγκεκριμένη τιμή έντασης ζώνης, δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη διαφορετική για κάθε περίπτωση πρωτεΐνης. Μέσω αυτής και γνωρίζοντας τις υπολογισμένες με τον ίδιο τρόπο τιμές των εντάσεων των ζωνών των μιτοχονδρίων αγρίου τύπου, υπολογίστηκε η σχετική ποσότητα της εκάστοτε πρωτεΐνης ανά mg καθαρών μιτογονδρίων.

3.5 Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το in vitro σύστημα σύζευζης μεταγραφής-μετάφρασης (Coupled Transcription / Translation, $T_N T$)

Η ραδιοσήμανση του εκάστοτε πρόδρομου μορίου που επρόκειτο να εισαχθεί σε μιτοχόνδρια, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pSP65 (ή pSP64 για την περίπτωση των DHFR-N72 και DHFR-Erv1). Η μετάφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το εκάστοτε πρόδρομο μόριο, έγινε με το *in vitro* σύστημα σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης σε κυτταρικό εκχύλισμα πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων κουνελιού (rabbit reticulocyte lysate) παρουσία ραδιενεργής ³⁵S μεθειονίνης, χρησιμοποιώντας την SP6 πολυμεράση και με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Promega T_NT). Για την επιτυχή ραδιοσήμανση πρωτεΐνης χρειάστηκε πλασμίδιο υψηλής καθαρότητας απομονωμένο με κολώνα Qiagen. Η διαδικασία

παραγωγής του ραδιενεργού πρωτεϊνικού μορίου έλαβε χώρα για 90 λεπτά στους 30°C όπου στη συνέχεια η ραδιενεργή πρωτεΐνη απομακρύνθηκε από τα ριβοσώματα με φυγοκέντρηση στα 25.000g για 30 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C.

3.6 Μέθοδος πρόσδεσης σε συστοιχία ακινητοποιημένων πεπτιδίων

Για την μελέτη της Mia40-Erv1 αλληλεπίδρασης χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη (JPT Technologies) που έφερε εξήντα ακινητοποιημένα πεπτίδια, μήκους 13 αμινοξέων, τα οποία στο σύνολό τους αφορούσαν την αμινοξική αλληλουχία της Erv1 πρωτεΐνης του οργανισμού S.cerevisiae. Τα 13-μερή πεπτίδια αλληλεπικαλύπτονταν μεταξύ τους ανα 10 αμινοξικά κατάλοιπα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάστηκε με 552nM καθαρισμένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ΔN290Mia40wt ή ΔN290Mia40 LMFFFM/A σε διάλυμα που περιείχε 100mM KCl, 30mM Tris pH 8.0, 5% sucrose, 0.5% Tween-20, 0.5% BSA, με ανάδευση για δύο ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν πλυσίματα της μεμβράνης με 1x T-TBS (50Mm Tris pH 8, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 0,05% Tween 20) καθώς και μεταφορά της προσδεδεμένης Mia40 σε μεμβράνη PVDF, ως εξής: η μεμβράνη τοποθετήθηκε πάνω σε χαρτιά Whatman, εμποτισμένα με Anode buffer II (300mM Tris, 20% (v/v) methanol) και Anode buffer I (30mM Tris, 20% (v/v) methanol) και στη συνέχεια πάνω απο τη PVDF τοποθετήθηκε η μεμβράνη των πεπτιδίων. Πάνω απο αυτή, τέλος, τοποθετήθηκαν χαρτιά Whatman εμποτισμένα με Cathode buffer (25 mM Tris, 40 mM 6-aminohexanoic acid, 20% (v/v) methanol pH 9.2). Η μεταφορά της Mia40 απο την μεμβράνη πεπτιδίων στην PVDF πραγματοποιήθηκε στα 55mA/cm² για 30 λεπτά και η ανίχνευσή της έγινε χρησιμοποιώντας το ειδικό για αυτή αντίσωμα α-Mia40 (αραίωση 1-1000) και το δευτερογενές α-rabbit (Sigma, αραίωση 1-10000). Τα σήματα ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Image Quant 5.2. Σημειώνεται ότι οι κυστεΐνες της Erv1 αντικαταστήθηκαν με σερίνες για την αποφυγή σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πεπτιδίων.

4. Χειρισμός κυττάρων σακχαρομύκητα

4.1 Θρεπτικά διαλύματα, συνθήκες ανάπτυξης και στελέχη

Τα στελέχη *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν: το στέλεχος D273-10B (MATa) για την παραγωγή μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, το στέλεχος FT5 (Tzamarias & Struhl, 1994), το στέλεχος galErv1 (Lionaki *et al*, 2010) και το στέλεχος galMia40 (Banci *et al*, 2009a). Τα δύο τελευταία, προέκυψαν με ομόλογο ανασυνδυασμό των αντίστοιχων γονιδίων στο γονιδίωμα του στελέχους FT5 ώστε η έκφραση των *Erv1* και *Mia40* να βρίσκεται υπο τον έλεγχο του επαγώμενου υποκινητή γαλακτόζης, Gal1-10.

Σε κάθε περίπτωση, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 30°C είτε σε πλούσιο θρεπτικό μέσο είτε σε φτωχό (ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος), η σύσταση των οποίων αναγράφεται παρακάτω:

YPD/YPL/YPGal (πλούσια θρεπτικά)

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

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

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

4.2 Πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας (Complementation test)

Για τα πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας, χρησιμοποιήθηκε το galErv1 στέλεχος σακχαρομύκητα, το οποίο μετασχηματίστηκε στη συνέχεια με πλασμίδιο pRS316up40 (προσδίδει αυξοτροφία στην ουρακίλη) (Banci *et al*, 2009a) που έφερε κλωνοποιημένο το γονίδιο της *Erv1* ή το εκάστοτα μεταλλάγματά του. Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι μεγάλωσαν σε ελάχιστο υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία γαλακτόζης (SG), όπου το ενδογενές γονιδίου *Erv1* εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Στη συνέχεια, η ανάπτυξη των κυττάρων ακολούθησε για 24 ώρες στους 30°C και σε υγρό θρεπτικό παρουσία γλυκόζης (SC), για την καταστολή της έκφρασης του *Erv1* γονιδίου και επακόλουθη έκφραση του γονιδίου που έφερε κάθε φορά το πλασμίδιο. Τέλος, διαφορετικές αραιώσεις της κυτταρικής καλλιέργειας και συγκεκριμένος αριθμός των κυττάρων αναπτύχθηκε σε SC, SG και SL στερεό θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάστηκαν για 2-4 μέρες στους 30°C.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο κύριων πρωτεϊνών του μονοπατιού MIA, που λειτουργεί στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα: της οξειδορεδουκτάσης Mia40 και της σουλφυδριλοξειδάσης Erv1/ALR. Η αλληλεπίδραση Mia40-Erv1 είναι καθοριστικής σημασίας για την σωστή λειτουργία του μηχανισμού οξειδωτικής αναδίπλωσης πολλών διαφορετικών υποστρωμάτων που καταλήγουν στο συγκεκριμένο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα και επομένως απαραίτητη για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων (Mesecke *et al*, 2005).

Οι πρωτεΐνες Mia40 και Erv1 αλληλεπιδρούν σε δύο στάδια, τα οποία είναι δραστικά διαφορετικά μεταξύ τους (Εικόνα 11):

- Στο πρώτο στάδιο (στάδιο Α), η πρωτεΐνη Erv1, συντίθεται απο τα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και εισέρχεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου διαμέσου του συμπλόκου ΤΟΜ της εξωτερικής μεμβράνης. Αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα του μονοπατιού ΜΙΑ από τη Mia40, και μέσω αλληλεπιδράσεων ανταλλαγής θειολών/δισουλφιδίων, οξειδώνεται και παγιδεύεται στο διαμεμβρανικό χώρο όπου δρα ως σουλφυδριλοξειδάση (αλληλεπίδραση: η Mia40 οξειδώνει την Erv1) (Εικόνα 11-Στάδιο Α).
- 2. Στο δεύτερο στάδιο (στάδιο B), η Erv1 (έχει εισέλθει στο διαμεβρανικό χώρο και είναι ενζυμικά λειτουργική) αλληλεπιδρά με τη Mia40 για να οξειδώσει το ανηγμένο ενεργό κέντρο της οξειδορεδουκτάσης (CPC μοτίβο). Η οξείδωση του ανηγμένου CPC μοτίβου, που έχει προκύψει μετά την αλληλεπίδραση Mia40-υποστρώματος, είναι αναγκαία για την οξειδωτική αναδίπλωση του εκάστοτε πρωτεϊνικού μορίου που εισάγεται στο διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού MIA (αλληλεπίδραση: η Erv1 οξειδώνει τη Mia40) (Εικόνα 11-Στάδιο B).

Τα αποτελέσματα στα οποία καταλήξαμε μελετώντας την παραπάνω αλληλεπίδραση αναλύονται στα τρία κεφάλαια (Ι-ΙΙΙ) που ακολουθούν. Πιο ειδικά, το κεφάλαιο Ι αφορά την είσοδο της Erv1/ALR πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο και την ωρίμανσή της στο διαμεμβρανικό χώρο, το κεφάλαιο ΙΙ την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Mia40 και Erv1/ALR για την επανοξείδωση της Mia40 και τέλος το κεφάλαιο ΙΙΙ αναφέρεται στη δομική και λειτουργική μελέτη του αμινοτελικού κομματιού της Erv1/ALR, και πιο συγκεκριμένα στο ρόλο που παίζει στη στόχευση της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο πέρα από το ρόλο που διαδραματίζει στην επανοξείδωση της Mia40.

42

Για την καλύτερη παρακολούθηση της Mia40-Erv1 αλληλεπίδρασης στο υπόλοιπο μέρος της διατριβής, η Erv1 συμβολίζεται ως Erv1^{sub} όταν αποτελεί υπόστρωμα της πρωτεΐνης Mia40 (sub: substrate), και Erv1^{act} στο στάδιο που επανοξειδώνει την Mia40 (act: active).



Εικόνα 11: Η διττή (δύο φάσεων) αλληλεπίδραση Mia40-Erv1 στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζεται η Mia40, με μωβ η Erv1 (μονομερές και διμερές) και με ανοιχτό πράσινο το FAD. Στο στάδιο A, η Erv1 εισέρχεται στο διαμεμβρανικό χώρο ως ανηγμένη, οξειδώνεται απο τη Mia40 στις κυστεΐνες της και αναδιπλώνεται στην ενεργή δομής της προσδένοντας FAD. Στο στάδιο B, η ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη Erv1 δρα ως διμερές πάνω στην Mia40 για την επανοξείδωση του CPC μοτίβου του ενεργού κέντρου της οξειδορεδουκτάσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Erv1/ALR ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (ΣΤΑΔΙΟ Α)

Ta αποτελέσματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου αφορούν τη δημοσίευση: <u>Kallergi E</u>, Andreadaki M, Kritsiligkou P, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K, Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Peruzzini R (2012) Targeting and maturation of Erv1/ALR in the mitochondrial intermembrane space. ACS chemical biology **7:** 707-714 (Παράρτημα 4)

1. Εισαγωγή-Σκοπός

Σημαντική έρευνα έχει γίνει τα τελευταία χρόνια, πάνω στην μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Mia40 και των τυπικών υποστρωμάτων της. Τα υποστρώματα αυτά, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, είναι πρωτεϊνικά μόρια μικρού μοριακού βάρους (<10kDa) που περιέχουν συντηρημένα κυστεϊνικά μοτίβα τύπου CX3C και CX9C. Για τη στόχευσή τους στο μιτοχόνδριο, αρχικά εισέρχονται από τη γενική πύλη εισόδου ΤΟΜ και ακολουθούν το μονοπάτι ΜΙΑ μέσω του οποίου οξειδώνονται. Για την οξείδωσή τους και την αναδίπλωσή τους σημαντικό είναι το πεπτίδιο σήμα ITS/MISS που φέρουν (Milenkovic et al, 2009; Sideris et al, 2009). Αυτό το σήμα αριθμεί 9 αμινοξέα σε μία αλληλουχία τύπου X[Ar]XX[Hy][Hy]XXC, όπου Ar: αρωματικό αμινοξύ, Hy: υδρόφοβο αμινοξύ και X: οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός κυστεΐνης. Το ITS μπορεί να βρίσκεται ανοδικά ή καθοδικά της κυστεΐνης πρόσδεσης του υποστρώματος με τη Mia40 (για τα μικρά Tim αυτό αφορά την πρώτη κυστεΐνη τους, ενώ για τα CX9C υποστρώματα την πρώτη απο το δεύτερο κυστεϊνικό τους μοτίβο) (Banci et al, 2010; Banci et al, 2009a). Το πεπτίδιο στόχευσης οδηγεί τα υποστρώματα διαμέσου του ΤΟΜ πάνω στην Mia40 όπου μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων προσδένονται στην υδρόφοβη κοιλότητα της, αλληλεπιδρώντας στη συνέχεια με το CPC μοτίβο της για το σχηματισμό του μικτού δισουλφιδικού ενδιαμέσου Mia40-CX3/9C. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, τα τυπικά αυτά υποστρώματα της Mia40, αναδιπλώνονται οξειδωτικά και παγιδεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου (Banci et al, 2010; Banci et al, 2009a; Sideris & Tokatlidis, 2010).

Η πρωτεΐνη Erv1, διαφέρει απο τα CX3/9C υποστρώματα όσον αφορά στο μοριακό της βάρος (22kDa) και τα κυστεϊνικά μοτίβα που περιέχει (ένα διπλό CX2C και το CX16C). Απο την άλλη πλευρά, αποτελεί υπόστρωμα της Mia40 όπου εισέρχεται μέσω του TOM και αλληλεπιδρά μαζί της σχηματίζοντας το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο Mia40-Erv1 (Terziyska *et al*, 2007). Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει η παραπάνω αλληλεπίδραση αρχικά για την είσοδο και τελικά για την ωρίμανση της Erv1 στο IMS (στάδιο A) δεν είναι γνωστός και αποτελεί το κεντρικό ερώτημα αυτού του κεφαλαίου. Η μελέτη της Erv1 και Mia40 αλληλεπίδρασης στο στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντική καθώς η σωστή στόχευση και διαμόρφωση της Erv1 στο χώρο καθορίζει τη δράση της ως σουλφυδριλοξειδάση στη συνέχεια (στάδιο B).

2. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

2.1 Είσοδος της πρωτεΐνης Erv1 στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα

2.1.1 Οι κυστεΐνες του δομικού μοτίβου CX16C της Erv1 παίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδό της στο μιτοχόνδριο in organello

Για να μελετήσουμε αν υπάρχει συγκεκριμένη κυστεΐνη πρόσδεσης στην Εrv1 σημαντική για την αλληλεπίδρασή της με τη Mia40 στο στάδιο A, όπως συμβαίνει με τα τυπικά υποστρώματά του MIA μονοπατιού, προχωρήσαμε αρχικά σε μεταλλαξιγένεση των τριών κυστεϊνικών μοτίβων της σε σερίνες. Τα τρία διπλά κυστεϊνικά μεταλλάγματα που προέκυψαν ήταν τα παρακάτω: (i) το μετάλλαγμα C30/33S του αμινοτελικού κυστεϊνικού ζεύγους κίνησης, (ii) το μετάλλαγμα C130/133S του κυστεϊνικό μοτίβων του ενεργού κέντρου της και (iii) το μετάλλαγμα C159/176S του καρβοζυτελικού δομικού ζεύγους κυστεϊνών (Εικόνα 12a). Στη συνέχεια, τα παραπάνω μεταλλάγματα αλλά και η αγρίου τύπου Erv1 (που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό πείραμα ελέγχου) εκφράστηκαν ως ραδιενεργά πρόδρομα μόρια *in vitro* (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι') και στη συνέχεια μελετήθηκε με αυτοραδιογραφία η ικανότητά εισαγωγής τους σε αγρίου τύπου απομονωμένα καθαρά μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (πείραμα εισόδου).



Εικόνα 12: Αυτοραδιογραφία της αγρίου τύπου Erv1 και των μεταλλαγμάτων της C30//33S, C130/133S και C159/176S. (a) Σχηματική απεικόνιση των κυστεϊνικών μοτίβων της Erv1 (μεγέθους 189 αμινοξέων), C30/33, C130/133 και C159/176 (b) Αυτοραδιογραφία πειράματος εισόδου

ραδιενεργής Erv1^{sub} (αγρίου τύπου και διπλών κυστεϊνικών μεταλλαγμάτων της) σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (θέσεις 1-13). Το μιτοχονδριακό υλικό ηλεκτροφορήθηκε κάτω από μη αναγωγικές αποδιατακτικές συνθήκες (Tricine SDS-PAGE), ή αναγωγικές συνθήκες (θέση 13) μετά την είσοδο της ραδιενεργής Erv1^{sub}. Το "10%" εκφράζει το 10% της ποσότητας του ραδιενεργού υλικού που χρησιμοποιήθηκε για είσοδο σε 50μg μιτοχονδρίων. Ο χρόνος 2' και 10' αντιστοιχεί στον χρόνο σε λεπτά που διήρκησε η διαδικασία εισόδου των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια (c) Αυτοραδιογραφία πειράματος ανοσοκατακρήμνισης του μικτού δισουλφιδικού ενδιαμέσου με α-Mia40 αντίσωμα ή ορό (πείραμα ελέγχου, "control") μετά απο πείραμα εισόδου ραδιενεργής Erv1 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν κάτω απο μη αναγωγικές συνθήκες όπου το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο συμβολίζεται με αστερίσκο (*), και με παύλα το μονομερές της Erv1 (τροποποιημένη εικόνα από Kallergi *et al*, 2012).

Το ραδιενεργό αγρίου τύπου Erv1^{sub} πρωτεϊνικό μόριο εισήγθη (ζώνη ~29kDa) στα μιτογόνδρια και αλληλεπίδρασε με την ενδογενή Mia40, όπως αναμένονταν, σχηματίζοντας το παροδικό μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο 'Erv1-Mia40' (ζώνη ~95kDa, συμβολίζεται με αστερίσκο) (Εικόνα 12b, θέσεις 1-3) που είναι ευαίσθητο παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης (Εικόνα 12b, θέση 13) (Terziyska et al, 2007). Για την παγίδευση των δύο πρωτεϊνών στο στάδιο του ενδιαμέσου ώστε να παρατηρηθεί καλύτερα η Mia40-Erv1^{sub} αλληλεπίδραση, χρησιμοποιήθηκε ο αλκυλιωτικός παράγοντας ΝΕΜ, ο οποίος προσδένεται ελεύθερες στις σουλφυδριλομάδες χωρίς να επιτρέπει την ολοκλήρωση της αντίδρασης σχηματισμού δισουλφιδίου. Mε αυτόν τρόπο το υπόστρωμα παραμένει τον προσδεδεμένο/παγιδευμένο πάνω στη Mia40.

Επιπρόσθετα, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης επιβεβαίωσαν το σχηματισμό του δισουλφιδικού ενδιαμέσου Mia40-Erv1^{sub}, που είναι εμφανές μόνο κάτω από μη αναγωγικές συνθήκες (απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης) (Εικόνα 12c, θέση 15). Το ενδιάμεσο ανοσοκατακρημνίστηκε μετά απο είσοδο ραδιενεργής αγρίου τύπου Erv1^{sub} πρωτεΐνης σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-Mia40, ενώ δεν ανοσοκατακρημνίστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ορός κουνελιού που απομονώθηκε πριν την ανοσοποίηση του με τη Mia40 πρωτεΐνη (preimmune serum) (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι') (Εικόνα 12c, θέσεις 14-16).

Τα μεταλλάγματα C30/33S και C130/133S επίσης μπορούσαν να εισαχθούν στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 12b, θέσεις 8, 9, 11 και 12) και να δώσουν το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με τη Mia40, σε αντίθεση με το C159/176S μετάλλαγμα το οποίο δεν εισήχθη και δεν έδωσε αντίστοιχο ενδιάμεσο (Εικόνα 12b, θέσεις 5 και 6). Συμπεραίνουμε επομένως, ότι το καρβοξυτελικό ζεύγος των δομικών κυστεϊνών (C159/176) είναι εκείνο που είναι απαραίτητο για την αναγνώριση της Erv1 από τη Mia40, κατα την είσοδο της πρώτης στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα. 2.1.2 Οι κυστεΐνες C159 και C176 επηρεάζουν την είσοδο της Erv1 στα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα in organello

Δεδομένου του παραπάνω αποτελέσματος, προχωρήσαμε μελετώντας πιο ειδικά τον ρόλο της καθεμιάς κυστεΐνης του δομικού μοτίβου (CX16C). Για το σκοπό αυτό, δημιουργήσαμε τα μονά μεταλλάγματα C159S και C176S. Συνθέτοντας τα ως ραδιενεργά πρωτεϊνικά μόρια *in vitro*, προχωρήσαμε σε πειράματα εισόδου τους σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα αγρίου τύπου και αναλύσαμε τα αποτελέσματα, όπως ακριβώς κάναμε προηγουμένως για τα διπλά κυστεϊνικά μεταλλάγματα C159/176S.

Η ανάλυση έδειξε ελαττωματική είσοδο και για τα δύο μονά μεταλλάγματα στα μιτοχόνδρια συγκριτικά με την αγρίου τύπου Erv1^{sub}. Το μετάλλαγμα C159S φάνηκε να επηρεάζεται περισσότερο στην αλληλεπίδρασή του με τη Mia40 (Εικόνα 13, θέσεις 1-3), ενώ το μετάλλαγμα C176S έδειξε ένα υψηλότερο ποσοστό σχηματισμού Mia40-Erv1^{sub} ενδιαμέσου που φανερώνει στην περίπτωση αυτή την παγίδευσή του Erv1 υποστρώματος πάνω στην ενδογενή Mia40 (Εικόνα 13, θέσεις 4-6). Αυτό θυμίζει την περίπτωση των τυπικών υποστρωμάτων της οξειδορεδουκτάσης, τα οποία όταν μεταλλαχθούν στην κυστεΐνη πρόσδεσης τους με τη Mia40, επηρέαζονται σημαντικά στο σχηματισμό μικτού ενδιαμέσου με αυτή. Από την άλλη



Εικόνα 13: Αυτοραδιογραφία μετά από είσοδο των ραδιενεργών μονών κυστεϊνικών μεταλλαγμάτων C159S και C176S της Erv1 σε αγρίου τύπου απομονωμένα μιτοχόνδρια σακγαρομύκητα. Mε αστερίσκο (*) μικτό συμβολίζεται δισουλφιδικό το ενδιάμεσο που σχηματίζουν με την ενδογενή Mia40 (~95kDa) και με παύλα σημειώνεται το ύψος στο οποίο εντοπίζεται το μονομερές της Erv1 (~29kDa) σε κάθε περίπτωση (Kallergi et al, 2012).

πλευρά, η μετάλλαξη της κυστεΐνης που γειτνιάζει την κυστεΐνη πρόσδεσης παγιδεύει και αυξάνει το σχηματισμό ενδιαμέσου Mia40-υποστρώματος καθώς μετά από την πρόσδεση του υποστρώματος η διαδικασία απελευθέρωσης του πρώτου απο την οξειδορεδουκτάση, δε μπορεί να προχωρήσει (Sideris & Tokatlidis, 2007).

Επομένως, συγκρίνοντας το υπόστρωμα Erv1^{sub} με τα CX3/9C τύπου υποστρώματα του μονοπατιού MIA, συμπεραίνουμε ότι η κυστεΐνη C159 είναι αυτή με την οποία αρχικά αλληλεπιδρά η Mia40 (κυστεΐνη πρόσδεσης) ενώ η γειτονική της κυστεΐνη C176 φαίνεται να βοηθάει το Erv1^{sub} υπόστρωμα στο να απελευθερωθεί από τη Mia40 έτσι ώστε να αναδιπλωθεί και να πάρει την κατάλληλη διαμόρφωση του στο χώρο (Εικόνα 13).

2.1.3 Οι δομικές κυστεΐνες C159 και C176 της Erv1 είναι σημαντικές για την βιωσιμότητα του σακχαρομύκητα in vivo

Καθώς τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο δομικές κυστεΐνες της Erv1 είναι απαραίτητες για την αναγνώρισή και οξείδωση της πρωτεΐνης από τη Mia40, προχωρήσαμε στη μελέτη της αλληλεπίδρασης Mia40-Erv1 σε κύτταρα σακχαρομύκητα *in vivo*.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε *in vivo* πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας για τα μονά μεταλλάγματα C159S και C176S. Το στέλεχος σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό του με τα αντίστοιχα πλασμίδια ήταν το galErv1 (Lionaki *et al*, 2010), στο οποίο ο έλεγχος έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *Erv1* βρίσκεται κάτω από τη ρύθμιση του υποκινητή της γαλακτόζης (GAL1-10). Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φτωχό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με γαλακτόζη 2% (για έκφραση της ενδογενούς Erv1) ή γαλακτικό οξύ εμπλουτισμένο με 0,2% γλυκόζη (για αναστολή της έκφρασής της ενδογενούς Erv1 με παράλληλη έκφραση της Erv1 εκδοχής που έφερε ο πλασμίδιακός φορέας) (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι') (Εικόνα 14).



Εικονα 14: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *Erv1* χρησιμοποιώντας τον υποκινητή Gal1-10. Παρουσία γαλακτόζης έχουμε έκφραση του ενδογενούς *Erv1* γονιδίου ενώ παρουσία γλυκόζης ή γαλακτικού οξέος έχουμε καταστολή της έκφρασης.

Με αυτόν τον τρόπο εξετάσαμε αν τα παραπάνω μεταλλάγματα συμπλήρωναν ή όχι το ρόλο της Erv1, συγκρίνοντάς τα αποτελέσματα κάθε φορά με τα αντίστοιχα της

αγρίου τύπου. Για το μετασχηματισμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας (pRS316up40) που έφερε την εκάστοτε Erv1 εκδοχή. Τέλος, ως αρνητικό πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο παραπάνω πλασμιδιακός φορέας κενός (Εικόνα 15).

Παρακολουθώντας την ανάπτυξη των κυττάρων, στην περίπτωση της Erv1 αγρίου τύπου, είδαμε ότι τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και στα δύο θρεπτικά μέσα, καθώς η πρωτεΐνη όταν εκφραζόταν απο το πλασμίδιο συμπλήρωνε την έλλειψη της ενδογενούς παρουσία γλυκόζης, όπως και αναμενόταν (Lionaki *et al*, 2010). Η παραπάνω συμπληρωματικότητα φανερώνει την ευαισθησία της πειραματικής προσέγγισης για την μετέπειτα εξέταση των όποιων μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης.

Για την περίπτωση του μετασχηματισμού τους με τον κενό πλασμιδιακό φορέα τα κύτταρα φάνηκαν να μην αναπτύσσονται στον ίδιο βαθμό σε σχέση με την αγρίου τύπου Erv1, αλλά σημαντικά λιγότερο. Το μονό μετάλλαγμα C159S έδωσε θνησιγόνο φαινότυπο, όμοιο με την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ο κενός πλασμιδιακός φορέας, δείχνοντας ότι η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη *in vivo*. Το δε C176S μετάλλαγμα επίσης έδειξε ίδια βιωσιμότητα του στελέχους αλλά τα κύτταρα μπορούσαν να επιβιώσουν ελάχιστα καλύτερα συγκριτικά με την περίπτωση του C159S μεταλλάγματος (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: In vivo δοκιμασία γενετικής συμπλήρωσης στα galErv1 κύτταρα σακχαρομύκητα τα οποία φέρουν το αντίστοιχο πλασμίδιο έκφρασης της εκάστοτε Erv1 εκδοχής (Erv1 αγρίου τύπου, C159S μετάλλαγμα, C176S μετάλλαγμα ή

Συμπερασματικά και τα δύο μονά μεταλλάγματα φαίνεται να επηρεάζουν αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη (Farrell & Thorpe, 2005; Muller *et al*, 2008). Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε (α) εξαιτίας της ελλατωματικής εισόδου τους στο μιτοχόνδριο, (β) εξαιτίας αποικοδόμησής τους στο κυτταρόπλασμα, πριν ακόμα μπορέσουν να εισέλθουν στο οργανίδιο ή (γ) εξαιτίας ενός συνδυασμού και των δύο. Προς απάντηση του συγκεκριμένου ερωτήματος και έχοντας όλες τις παραπάνω μορφές της Erv1 σημασμένες με ένα σήμα έξι ιστιδινών (-His₆) στο καρβοξυτελικό τους άκρο (Erv1-His₆, Erv1C159S-His₆ και Erv1C176S-His₆), προχωρήσαμε σε

σκέτος πλασμιδιακός φορέας- "empty"). Απεικονίζονται τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις της κυτταρικής καλλιέργειας όπου συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων κάθε φορά αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο με γαλακτόζη (SG) ή γαλακτικό οξύ (SL) εμπλουτισμένο με 0,2% γλυκόζη (Kallergi *et al*, 2012).

απομόνωση μιτοχονδρίων και παραγωγή κυτταρικών εκχυλισμάτων απο τα τρία μετασχηματισμένα στελέχη. Δεδομένου του ότι η ενδογενής Erv1 δε φέρει τον εξαϊστιδινικό επίτοπο, πραγματοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση με α-His αντίσωμα για το παραπάνω υλικό ώστε να δούμε την έκφραση των μεταλλαγμάτων στο κύτταρο και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Σε κάθε περίπτωση οι προσπάθειες μας να εντοπίσουμε τις Erv1 εκδοχές δεν έδωσαν σαφές αποτέλεσμα καθώς σημαντικός περιοριστικός παράγοντας ήταν η ελαττωματική ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυττάρων. Συνεπώς, και τα τρία ενδεχόμενα που προτάθηκαν παραπάνω παραμένουν.

2.1.4 Το υπόστρωμα Erv1 αλληλεπιδρά με τη Mia40 μέσω μιας συγκεκριμένης περιοχής 43 αμινοζέων στο καρβοζυτελικό της μέρος

Για να χαρακτηρίσουμε πιο πλήρως το μέγεθος της περιοχής της Erv1 που περιλαμβάνει τις δομικές κυστεΐνες C159 και C176 και να εξακριβώσουμε αν το αμινοτελικό μέρος της πρωτεΐνης (N72 κομμάτι) παίζει κάποιο ρόλο ή όχι στην είσοδο της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο, πραγματοποιήσαμε πειράματα εισόδου του μορίου ΔN72 που δε φέρει τα πρώτα 72 αμινοξέα της πρωτεΐνης (Lionaki *et al*, 2010) και μελετήσαμε αν η είσοδός του είναι εφικτή.

Το ΔΝ72 μετάλλαγμα, το οποίο περιλαμβάνει τον καταλυτικό πυρήνα της πρωτεΐνης όπου προσδένεται το FAD, εκφράστηκε *in vitro* ως ραδιενεργό και χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Το καρβοξυτελικό αυτό κομμάτι της Erv1 εισήχθη στα μιτοχόνδρια σε ίδια περίπου ποσοτικά επίπεδα με αυτά της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και επίσης αλληλεπίδρασε με τη Mia40, σχηματίζοντας το αντίστοιχο μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο (~ 80kDa) (Εικόνα 16a, θέσεις 4-6). Με βάση αυτά τα στοιχεία, το αμινοτελικό κομμάτι (N72) της Erv1 δεν φαίνεται να είναι απαραίτητο για την είσοδο της πρωτεΐνης στα οργανίδια. Αυτό σημαίνει ότι το καρβοξυτελικό κομμάτι που ελέγχθηκε, φέρει αρκετή πληροφορία για το πέρασμα της πρωτεΐνης διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης και για την αλληλεπίδρασή της με τη Mia40.

Για να καθορίσουμε την ελάχιστη περιοχή της Erv1 που είναι σημαντική για τη στόχευση της στο μιτοχόνδριο, δημιουργήσαμε επιπρόσθετα το μετάλλαγμα ΔΝ133, από το οποίο απουσιάζουν τα πρώτα 133 αμινοξέα της πρωτεΐνης στα οποία εντοπίζονται τα δύο κυστεϊνικά ζεύγη C30/33 και C130/133 της Erv1. Το 70% της πρωτεΐνης έχει αφαιρεθεί και το κομμάτι ξεκινά αμέσως μετά την τέταρτη κυστεΐνη (C133) (Εικόνα 16b). Το μετάλλαγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα εισόδου με τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρθηκε παραπάνω και έδωσε το ίδιο αποτέλεσμα με το ΔN72 κομμάτι όσον αφορά στην ικανότητά του να εισέρχεται στο μιτοχόνδριο



Εικόνα 16: Η Erv1 ως υπόστρωμα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Mia40 μέσω μιας περιοχής 43 αμινοξέων. (a) εισαγωγή των ραδιενεργών πρόδρομων μορίων άγριου-τύπου (wt) και ΔΝ72 μεταλλάγματος της Erv1 σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια και η ικανότητά τους να σχηματίζουν μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο, παρουσία ΝΕΜ, με την ενδογενή Mia40 (συμβολίζεται με αστερίσκο). Με μπάρες συμβολίζονται τα αντίστοιχα μονομερή (b) σχηματική αναπαράσταση της Erv1 και των δύο μεταλλαγμάτων ΔΝ133 και ΔC13 (c) εισαγωγή του ραδιενεργά σημασμένου ΔΝ133 και ο σχηματισμός μικτού Erv1-Mia40 ενδιαμέσου που ανιχνεύεται μόνο απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης ("bME") (d) είσοδος του μεταλλάγματος ΔC13 στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα, όπως στην περίπτωση (c) (Kallergi *et al*, 2012).

(Εικόνα 16c). Επομένως, το αμινοτελικό μέρος της Erv1^{sub} έως και το 133 αμινοξύ δεν απαιτείται για την είσοδο της πρωτεΐνης *in organello*, ενώ το υπόλοιπο κομμάτι της είναι ικανό να περάσει την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και να αλληλεπιδράσει με τη Mia40 σχηματίζοντας το αντίστοιχο μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο.

Προς την ίδια κατεύθυνση, δημιουργήσαμε και το μετάλλαγμα ΔC13 της Erv1, από το οποίο λείπουν τα τελευταία 13 αμινοξέα (177-189αα) αλλά η κυστεΐνη C176 του δομικού μοτίβου δεν έχει αφαιρεθεί (καθώς είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τη Mia40). Προχωρώντας και για αυτό το μετάλλαγμα σε πειράματα εισόδου, παρατηρήσαμε ότι η είσοδός του και η αλληλεπίδρασή του με τη Mia40 δεν επηρεάστηκε. Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα φάνηκε να είναι περισσότερο παγιδευμένο στο στάδιο του μικτού ενδιαμέσου με την οξειδορεδουκτάση (Εικόνα 16d). Συμπερασματικά, τα 13 αμινοξέα του καρβοξυτελικού κομματιού της πρωτεΐνης Erv1 δεν συμμετέχουν στη στόχευση του υποστρώματος στο διαμεμβρανικό χώρο, δεν είναι σημαντικά για την αλληλεπίδρασή του με τη Mia40 στο στάδιο A αλλά φαίνεται να είναι σημαντικά για την απελευθέρωση του υποστρώματος από αυτή.

Απο όλα τα παραπάνω δεδομένα, προκύπτει ότι το το ελάχιστο μέρος του υποστρώματος Erv1^{sub} για την πρόσδεσή του στη Mia40 είναι η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 134 και 176 (43 αμινοξέα) της αλληλουχίας της (περιοχή στην οποία προσδένεται το μόριο FAD).

2.2Μηχανισμός ωρίμανσης της Erv1/ALR πρωτεΐνης (δομική ανάλυση)

2.2.1 Δομική μελέτη της αποδιαταγμένης και ανηγμένης sf-ALR in vitro

Για τη μελέτη εισόδου της Erv1 και την ωρίμανσή της στο διαμεμβρανικό χώρο, ήταν αναγκαίος ο συνδυασμός των παραπάνω βιοχημικών αποτελεσμάτων με τη δομική μελέτη της πρωτεΐνης *in vitro*. Παράλληλα με εμάς, οι συνεργάτες μας απο το εργαστήριο του Ivano Bertini (Magnetic Resonance Center CERM, Πανεπιστήμιο της Φλωρεντίας, Ιταλία), μελέτησαν *in vitro* την πλήρως ανηγμένη, απαλλαγμένη από FAD, μορφή της μικρού μήκους sf-ALR πρωτεΐνης. Η μελέτη αυτή ουσιαστικά αναφέρεται στο ΔΝ80 κομμάτι της If-ALR (υπόστρωμα του ΜΙΑ μονοπατιού στον άνθρωπο), και επομένως στο ομόλογο ΔΝ72 της Erv1, το οποίο φάνηκε απο τα βιοχημικά μας αποτελέσματα να αποτελεί την περιοχή που αναγνωρίζει η Mia40 κατα την είσοδο της Erv1 στα μιτοχόνδρια.

Η μελέτη της sf-ALR με κυκλικό διχρωϊσμό, έδειξε ότι η πρωτεΐνη όταν είναι πλήρως ανηγμένη χάνει το 25% των α-ελικών που φέρει στην πλήρως αναδιπλωμένη ώριμη δομή της (όταν εκφράζεται και απομονώνεται απο βακτήρια), ενώ παραμένει σε διμερή κατάσταση όπως έδειξαν πειράματα χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Επιπρόσθετα πειράματα NMR έδειξαν ότι το καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο της sf-ALR ήταν αρκετά αποδομημένο. Δεδομένου του ότι η Mia40 είναι ικανή να αναγνωρίζει μη δομημένες (εύκαμπτες) περιοχές πάνω στα υποστρώματά της, η πλήρως ανηγμένη και απαλλαγμένη απο FAD sf-ALR, αποτέλεσε κατάλληλο υπόστρωμα για τη Mia40 στη δομική ανάλυση, αν και τα τυπικά υποστρώματά της είναι πλήρως ξεδίπλωτα (Banci *et al*, 2010; Lu *et al*, 2004a) και μικρότερου μοριακού βάρους (Gabriel *et al*, 2007).

2.2.2 Η ωρίμανση της Erv1/ALR πρωτεΐνης απαιτεί τη δράση της Mia40 σε πρώτο στάδιο και την πρόσδεση FAD μορίου ακολούθως

Επιπρόσθετα της παραπάνω δομικής μελέτης, πήραμε σημαντικά αποτελέσματα για την δράση της Mia40 πάνω στη sf-ALR αλλά και για τον ρόλο του FAD μορίου στην ωρίμανση της σουλφυδρυλοξειδάσης. Συγκεκριμένα, με πειράματα NMR, εξετάστηκε *in vitro* η αλληλεπίδραση της sf-ALR με την οξειδωμένη Mia40 με ακόλουθη προσθήκη FAD. Σε αυτήν την περίπτωση, η αναδιπλωμένη/οξειδωμένη sf-ALR έμοιαζε με αυτή που προκύπτει μετά τον καθαρισμό του διμερούς απο βακτήρια *E. coli*. Το διμερές έφερε τα μονομερή ως ομοιοπολικά συνδεδεμένα, έφερε και τους τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς στα κυστεϊνικά ζεύγη C62/C65, C91/C108' και C91'/C108 (όπου ' η κυστεΐνη του άλλου μονομερές στο διμερές) και περιείχε και το μόριο FAD κατάλληλα τοποθετημένο στην ειδική περιοχή πρόσδεσής του στην πρωτεΐνη.

Στη συνέχεια, για να εξεταστεί αποκλειστικά ο ρόλος του FAD στην εισαγωγή δισουλφιδικών δεσμών στη sf-ALR, σε περίπτωση που κάποιοι απο τους τρεις δεσμούς δεν δημιουργούνται μόνο από τη Mia40, η πρωτεΐνη εξετάστηκε δομικά παρουσία FAD και απουσία Mia40. Βρέθηκε ότι η προσθήκη FAD καθορίζει μόνο το σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού των κυστεϊνών του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης. Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι για την ωρίμανση της sf-ALR, η οξειδωμένη Mia40 είναι υπεύθυνη ειδικά για το σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των δομικών κυστεϊνών (C171/C188 στη lf-ALR και C91/C108 στη sf-ALR) αλλά και των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κυστεϊνών που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του ομοιοπολικού διμερούς (C95/C204 στο ένα μονομερές με τις C95'/C204' του άλλου μονομερούς στη lf-ALR και C15/C124 και C15'/124' στη sf-ALR, αντίστοιχα), ενώ το FAD παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (C142/ C145 στη lf-ALR και C62/C65 στη sf-ALR) (Εικόνα 8).

Η αλληλουχία με την οποία οι παραπάνω δισουλφιδικοί δεσμοί προσδίδονται στη sf-ALR, βρέθηκε να είναι συγκεκριμένη καθώς επιπρόσθετη δομική μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση, έδειξε ότι πρώτα συμβαίνει ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μέσω της Mia40 και στη συνέχεια επέρχεται η πρόσδεση FAD στο μόριο και ο σχηματισμός του δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των κυστεϊνών του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης. Συγκριτικά με την αντίστροφη διαδοχή φάνηκε διαφορά στο προσανατολισμό των δύο υπομονάδων του διμερούς και/ή του FAD μορίου στην ALR, η οποία ήταν σημαντική αφού επηρέασε τη ροή των ηλεκτρονίων προς το κυτόχρωμα c καθοδικά του ΜΙΑ μονοπατιού. Στην περίπτωση όπου η είσοδος δισουλφιδικών δεσμών γίνονταν πρώτα απο τη Mia40 και στη συνέχεια απο το FAD η αντίδραση ήταν ταχύτερη και τα επίπεδα ανηγμένου κυτοχρώματος ήταν υψηλότερα συγκριτικά με την αντίστροφη πορεία εισόδου δισουλφιδικών δεσμών.

3. Σύνοψη κεφαλαίου

Συνοψίζοντας, σε αυτό το κεφάλαιο, μελετήθηκε η πρωτεΐνη Erv1/ALR ως υπόστρωμα του μονοπατιού MIA στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα με το συνδυασμό μοριακής και δομικής βιολογίας. Από τα παραπάνω πειράματα εισόδου της πρωτεΐνης σε απομονωμένα μιτοχόνδρια αλλά και από τη βιοχημική και δομική ανάλυση των συνεργατών μας, μπορέσαμε να καταλήξουμε στο παρακάτω συμπέρασμα: η πρωτεΐνη Erv1/ALR για την είσοδό της ως μιτοχονδριακό υπόστρωμα στο διαμεμβρανικό χώρο εξαρτάται από το καρβοξυτελικό άκρο της, από την αλληλεπίδρασή της με την Mia40 αρχικά και την πρόσδεση ενός FAD μορίου μετέπειτα ανά μονομερές στο διμερές που τελικά σχηματίζει για να δράσει ως σουλφυδριλοξειδάση πάνω στη Mia40 (Banci *et al*, 2009a; Gross *et al*, 2011; Kloppel *et al*, 2011; Sideris & Tokatlidis, 2007) (Εικόνα 17).

Επειδή η πρωτεΐνη ALR δε μπορούσε να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια όσες φορές δοκιμάστηκε σε πειράματα εισόδου, όπως αναφέρουν και οι Lange *et al.* με πειράματα *in vivo* συμπληρωματικότητας (Lange *et al*, 2001), μελετήσαμε το ομόλογό της, Erv1 ως υπόστρωμα προσδιορίσαμε την ελάχιστη περιοχή μέσω της οποίας πραγματοποιείται η συγκεκριμένη στόχευση και αναγνώριση από τη Mia40. Η περιοχή απο το αμινοξύ 134 εως το αμινοξύ 176 φάνηκε να είναι απαραίτητη για την πλήρη είσοδο της πρωτεΐνης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (διάσχιση ΟΜ), ενώ το αμινοτελικό μέρος της (N72) δε φάνηκε να παίζει κάποιο ρόλο στη στόχευση της πρωτεΐνης σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (Gabriel et al, 2007; Terziyska et al, 2007). Το αποτελέσμα αυτό συμφωνεί με τους Terziyska et al. οι οποίοι έδειξαν ότι τα κυστεϊνικά μεταλλάγματα σε σερίνες: C30S, C30/33S και C133S δεν επηρέαζαν την είσοδο της Erv1 στο μιτοχόνδριο (Terziyska et al, 2007). Απο τα παραπάνω, καταλήγουμε στο ότι η πρωτεΐνη Erv1 δε φαίνεται να φέρει αντίστοιχο σήμα στόχευσης ITS, όπως συμβαίνει με τα τυπικά υποστρώματα Tim10 και Cox17 (Sideris et al, 2009) αλλά ένα "μη κανονικό" σήμα στόχευσης το οποίο βρίσκεται στο καρβοξυτελικό μέρος του μορίου. Παρόμοια περίπτωση αποτελεί η είσοδος της Ccs1 (Copper chaperone superoxide dismutase 1) πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα που επίσης συμβαίνει μέσω του ΜΙΑ μονοπατιού. Η πρωτεΐνη αυτή εισάγεται μέσω της Mia40 η οποία δίνει στην Ccs1 ένα δισουλφιδικό δεσμό, αντίθετα απο τα τυπικά υποστρώματα με κυστεϊνικά μοτίβα CX3/9C, για τα οποία δύο δισουλφιδικοί δεσμοί είναι απαραίτητοι για την τελική τους αναδίπλωση κα ωρίμανση στο IMS. Η πρωτεΐνη Ccs1 φέρει επτά κυστεΐνες δύο απο τις οποίες βρίσκονται σε μοτίβο CX2C στο αμινοτελικό μέρος της πρωτεΐνης και δύο σε μοτίβο CXC στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης. Ένας και μόνο δισουλφιδικός δεσμός είναι αρκετός για την είσοδο της Ccs1 πρωτεΐνης στο IMS που δίνεται απο τη Mia40 η οποία φαίνεται να μπορεί να οξειδώνει και υποστρώματα που δεν φέρεουν τα τυπικά CX3/9C μοτίβα (Gross et al, 2011).

Ακόμα, η Mia40 βρέθηκε να οξειδώνει τις δομικές κυστεΐνες της Erv1 στο στάδιο Α της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης, και τις κυστεΐνες που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό των δύο δισουλφιδικών δεσμών που ενώνουν τα δύο μονομερή στην περίπτωση του ALR διμερούς, σταθεροποιώντας το με αυτόν τον τρόπο. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την περίπτωση των τυπικών υποστρωμάτων της Mia40 η οποία σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με συγκεκριμένες κυστεΐνες τους (δομικές κυστεΐνες) (Banci *et al*, 2009a; Gross *et al*, 2011; Kloppel *et al*, 2011; Sideris & Tokatlidis, 2007) που είναι απαραίτητες για την τελική αναδίπλωσή τους σε μία δομή που περιλαμβάνει δύο α-έλικες συνδεδεμένες με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς (Banci *et al*, 2010). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Mia40 αλληλεπιδρά μέσω του CPC μοτίβου της με την κυστεΐνη πρόσδεσης των τυπικών CX3/9C υποστρωμάτων, που περιέχεται στο ITS/MISS πεπτιδίου σήματος, επάγοντας ταυτόχρονα την αναδίπλωση των γειτονικών αμινοξέων της στην πρώτη α-έλικα των υποστρωμάτων. Στη συνέχεια, ο σχηματισμός της πρώτης αυτής έλικας λειτουργεί ως πυρήνας αναδίπλωσης για τη δεύτερη έλικα χωρίς να είναι απαραίτητος ο ρόλος της Mia40 σε αυτό το στάδιο. Απο την άλλη πλευρά το FAD βοηθά στο σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των κυστεϊνών του ενεργού κέντρου που βρίσκονται γειτονικά της περιοχής πρόσδεσής του. Σε αντίθεση με άλλα υποστρώματα, όπως το Cox17 (Banci *et al*, 2011b) η Mia40 δεν αρκεί για το σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών στην ALR αλλά το FAD παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό ξεχωρίζει την πρωτεΐνη ALR απο τα τυπικά υποστρώματα καθώς και το FAD είναι αναγκαίο για την ωρίμανση και την μετέπειτα λειτουργία της, ωστόσο σε ένα δεύτερο ξεχωριστό στάδιο μετά την οξείδωσή της απο τη Mia40. Κατ' επέκταση αυτό είναι πιθανό να ισχύει και για την Εrv1, πέρα απο την αλληλεπίδρασή της με την Mia40, δεδομένου της ομολογίας της περιοχής στην οποία προσδένεται το FAD, αλλά αυτό μένει να αποδειχθεί *in organello*.

Ο γενικός μηχανισμός δράσης της Mia40, επομένως, φαίνεται να συμφωνεί με την περίπτωση των οξείδωσης όλων των τυπικών υποστρωμάτων της αλλά επιπρόσθετα βήματα, μετά απο την αλληλεπίδραση αυτή, (πρόσδεση FAD εδώ) ίσως να απαιτείται για τα πιο πολύπλοκα σε δομή υποστρώματα έτσι ώστε αυτά να αναδιπλωθούν και να ωριμάσουν.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου του σακχαρομύκητα. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η σουλφυδριλοξειδάση Erv1^{sub} η οποία αρχικά ως υπόστρωμα του μονοπατιού ΜΙΑ εισάγεται σε ξεδίπλωτη μορφή μέσω του ΤΟΜ συμπλόκου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (μπλε χρώμα) και αλληλεπιδρά με τη Mia40 πρωτεΐνη (γαλάζιο χρώμα) μέσω ενός διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού (κίτρινο χρώμα, σφαίρες) (μικτό δισουλφιδικό
ενδιάμεσο). Κατα την απελευθέρωση του υποστρώματος απο τη Mia40, σχηματίζονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των δομικών κυστεϊνών στο διμερές της Erv1/ALR (γκρι χρώμα). Στην περίπτωση της ALR, σχηματίζονται και οι δύο διαμοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των μονομερών της διμερούς πρωτεΐνης (ροζ χρώμα). Η πρόσδεση του FAD μορίου (κόκκινο χρώμα) ανα μονομερές συμβαίνει σε ένα δεύτερο στάδιο όπου η Erv1/ALR αποκτά το δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των κυστεϊνών του ενεργού κέντρου της (μαύρο χρώμα) και τελικά την ενζυμικά ενεργή ώριμη δομή της (Kallergi *et al*, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Mia40 KAI Erv1/ALR OTAN Η Erv1 ΕΠΑΝΟΞΕΙΔΩΝΕΙ ΤΗ Mia40 (ΣΤΑΔΙΟ Β)

Μέρος των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου αφορούν τη δημοσίευση: Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, <u>Kallergi E</u>, Lionaki E, Pozidis C,Tokatlidis K (2011) Molecular recognition and substrate mimicry drive the electrontransfer process between MIA40 and ALR. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(12):4811-6 (Παράρτημα 4)

1. Εισαγωγή-Σκοπός

Απο δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας (Sideris et al, 2009) γνωρίζουμε ότι η ανθρώπινη ΜΙΑ40 δρα ως οξειδορεδουκτάση για να αναδιπλώσει οξειδωτικά τα τυπικά υποστρώματά της. Ως συνέπεια της παραπάνω αλληλεπίδρασης ο δισουλφιδικός δεσμός του CPC μοτίβου της (δεσμός μεταξύ των C53 και C55) ανάγεται και η πρωτεΐνη ΜΙΑ40 πρέπει να οξειδωθεί ξανά για να δράσει σε επόμενο υπόστρωμα με τον ίδιο τρόπο. Η επανοξείδωση της MIA40 συμβαίνει απο την ALR η οποία επανοξειδώνει το συγκεκριμένο μοτίβο της με αποτέλεσμα η ίδια να ανάγεται (Farrell & Thorpe, 2005). Η Erv1/ALR όμως διατηρείται ενζυμικά λειτουργική για τον επόμενο κύκλο επανοξείδωσης της Mia40/MIA40, καθώς τα ηλεκτρόνια της καταλήγουν μέσω του FAD, που είναι προσδεδεμένο στη δομή της, στο κυτόχρωμα c (Farrell & Thorpe, 2005) το οποίο επαναφέρει τις κυστεΐνες του ζεύγου κίνησης (CRSC/CRAC μοτίβο) που ανάγονται πίσω ξανά στην οξειδωμένη τους κατάσταση. Για το σύστημα ΜΙΑ επομένως, τα μέχρι τώρα γνωστά υποστρώματα της σουλφυδριλοξειδάσης ALR είναι: η MIA40 (Daithankar et al, 2009) και το κυτόχρωμα c (Farrell & Thorpe, 2005), το οποίο επίσης αποτελεί μόριο-κλειδί του παραπάνω μονοπατιού οξείδωσης πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου.

Η αλληλεπίδραση Mia40-Erv1 έχει μελετηθεί απο πολλές επιστημονικές ομάδες στο παρελθόν κυρίως στα στάδιο της ανακύκλωσης της Mia40 (στάδιο B). Πρόσφατα, από προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας πάνω στη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, γνωρίζουμε ότι το αμινοτελικό άκρο της Erv1 πρωτεΐνης είναι ικανό και αναγκαίο για την επανοξείδωση της Mia40 στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα (Lionaki *et al*, 2010). Απο την άλλη πλευρά, στον άνθρωπο, η ροή των ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο αντίστοιχων/ομόλογων πρωτεϊνών MIA40 και ALR κατα την αλληλεπίδρασή τους δεν είναι ακόμη πλήρως χαρακτηρισμένη. Στόχος σε αυτό το κεφάλαιο, ήταν να μελετήσουμε πιο ειδικά τον τρόπο με τον οποίο οι δύο πρωτεΐνες αναγνωρίζονται μεταξύ τους σε μοριακό επίπεδο (στάδιο B). Προς αυτήν την κατεύθυνση, συνεργαστήκαμε με το εργαστήριο του Ivano Bertini, όπου έγινε η κατάλληλη δομική μελέτη για το χαρακτηρισμό του μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων σε αυτήν την περίπτωση.

Τα δεδομένα στα οποία καταλήξαμε μαζί προσθέτουν σημαντική πληροφορία για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του μονοπατιού ΜΙΑ στον άνθρωπο, και κατ'επέκταση στο σακχαρομύκητα, καθώς χαρακτηρίζουν πιο συγκεκριμένα την περιοχή-καθοριστή πάνω στην Erv1/ALR που είναι απαραίτητη για την επανοξείδωση της Mia40/MIA40 και το μηχανισμό με τον οποίο δρα για να επιτελέσει τον παραπάνω ρόλο της (Chacinska *et al*, 2004; Lionaki *et al*, 2010).

2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

2.1 Συγκεκριμένα υδρόφοβα αμινοζέα της Erv1/ALR αλληλουχίας είναι αναγκαία για την επανοζείδωση της Mia40 in vitro

Για την μελέτη της Mia40-Erv1/ALR αλληλεπίδρασης στο στάδιο B (η Mia40 αποτελεί υπόστρωμα της Erv1), χρειάστηκε η δομική μελέτη τους με NMR. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι If-ALRC154/165A και sf-ALRC74/85A πρωτεΐνες, αντί των αντίστοιχων αγρίου τύπου που ο καθαρισμός τους για την ανάλυσή *in vitro* έδινε ολιγομερή (Daithankar *et al*, 2009; Farrell & Thorpe, 2005). Οι κυστεΐνες C154 και C165 για τη If-ALR και C74 και C85 για τη sf-ALR, δεν έχουν κάποιο λειτουργικό ρόλο στην πρωτεΐνη και δεν επηρέασαν το σχηματισμό του εκάστοτε ομοδιμερούς ούτε την πρόσδεση FAD ανά μονομερές, ενώ εμπόδισαν ταυτόχρονα το σχηματισμό ολιγομερών. Σημειώνεται εδώ ότι για την έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών, η προετοιμασία των γονιδιακών κασετών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας καθώς και ο αρχικός έλεγχος της έκφρασης τους.

Τα in vitro NMR αποτελέσματα για την αλληλεπίδραση μεταξύ των MIA40 (ανηγμένη στο CPC μοτίβο της, MIA40_{2SS}) και της lf-ALR_{4SS} ή sf-ALR_{3SS} (πλήρως οξειδωμένες), έδειξαν ότι: η lf-ALR_{4SS} οξειδώνει πλήρως το ανηγμένο CPC μοτίβο δημιουργώντας το δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των C53 και C55 (MIA40_{3SS}), όπως συμβαίνει και με τη sf-ALR_{3SS} που όμως η αποτελεσματικότητα της ήταν μερική. Αντίθετα, προηγούμενη αναφορά των Thorpe *et al.* έδειξε *in vitro* ότι η MIA40 μπορούσε να οξειδωθεί αποκλειστικά και μόνο από τη lf-ALR παρα το γεγονός ότι και η lf- αλλά και η sf-ALR φέρουν το ίδιο καρβοξυτελικό τμήμα, που είναι υπεύθυνο για την ενζυμική τους ενεργότητα (Daithankar *et al*, 2009).

Επιπρόσθετα της ομοιοπολικής αληλεπίδρασης των παραπάνω πρωτεϊνών επιπλέον ελέγχθηκε η μη ομοιοπολική αναγνώριση που προτείναμε να βοηθά στην μεταφορά των ηλεκτρονίων από τη MIA40 προς την lf-ALR. Πειράματα θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (isothermal titration calorimetry, ITC), που ολοκληρώθηκαν από προηγούμενο μέλος του εργαστηρίου μας (Ειρήνη Λιονάκη), όπως και αντίστοιχα NMR πειράματα απο τους συνεργάτες μας, έδειξαν ότι το CRAC μοτίβο της lf-ALR μεσολαβεί την αλληλεπίδραση με τη Mia40 του σακχαρομύκητα, παρά το καταλυτικό κομμάτι της πρωτεΐνης καθώς η sf-ALR βρέθηκε να αλληλεπιδρά 14 φορές ασθενέστερα με την Mia40 (Banci et al, 2011a). Γνωρίζοντας ότι μόνο η lf-ALR ισομορφή εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό χώρο του σακγαρομύκητα και άρα αλληλεπιδρά με τη MIA40 in vivo, συμπεραίνουμε ότι τα πρώτα 80 αμινοξέα της (N80) τα οποία απουσιάζουν απο το αμινοτελικό μέρος της sf-ALR, πρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο στο στάδιο Β της Mia40/ALR αλληλεπίδρασης. Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας στο σακχαρομύκητα (Lionaki et al, 2010) υποστηρίζουν την παραπάνω θέση για το αμινοτελικό κομμάτι N72 στο οποίο περιλαμβάνεται το ακραίο ζεύγος κυστεϊνών CRSC μοτίβου στην περίπτωση της Erv1 της ζύμης. Ακόμη, βρέθηκε, με πειράματα NMR, ότι και το μοτίβο CXXC που βρίσκεται κοντά στο FAD μόριο (κυστεϊνικό ζευγάρι ενεργού κέντρου) και τα γειτονικά του κατάλοιπα επηρεάστηκαν από την αλληλεπίδραση της ανθρώπινης ALR με την MIA40 ενώ οι κυστεΐνες C91, C108, C15 και C124 της If-ALR (δομικές και κυστείνες που δίνουν το ομοιοπολικά συνδεδεμένο διμερές) παρέμειναν ελεύθερες και δε συμμετείχαν στην αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Τέλος, τα κατάλοιπα στη MIA40 τα οποία δομικά φάνηκαν να αλληλεπιδρούν με την ALR ήταν αυτά με τα οποία προσδένονταν και στην υδρόφοβη κοιλότητα της οξειδορεδουκτάσης, όπου λαμβάνει χώρα η πρόσδεση των τυπικών υποστρωμάτων της. Συμπερασματικά, επομένως, το αμινοτελικό κομμάτι της ALR που περιέχει το ακραίο CRAC μοτίβο αλληλεπιδρά ειδικά με το CPC μοτίβο της MIA40 με ένα τρόπο μιμούμενο την πρόσδεση Mia40-υποστρώματος για να την επανοξειδώσει και στη συνέχεια, ακολουθεί η κίνηση των ηλεκτρονίων ενδομοριακά μέσα στο διμερές της ALR πρωτεΐνης (Banci *et al*, 2012a).

Η κρυσταλλική δομή της sf-ALR στην οποία κατέληξαν οι συνεργάτες μας και οι Thorpe *et al* ανεξάρτητα, συνδυαστικά με την NMR μελέτη της lf-ALR, έδειξε ότι τελικά η lf- ισομορφή φέρει τον ίδιο πυρήνα των τεσσάρων α-ελίκων της sf-ALR αλλά και ένα επιπλέον μη δομημένο και αρκετά ευλύγιστο κομμάτι στο αμινοτελικό της άκρο. Η παροδική αλληλεπίδραση του αμινοτελικού μέρους με το ενεργό κέντρο που προσδένεται το FAD φάνηκε να αφορά την αμινοτελική αμινοξική αλληλουχία ASRRRPCRACVDFKTW (16aa) της lf-ALR. Πιο συγκεκριμένα, τα αμινοξέα του αμινοτελικού μέρους της ALR που βρέθηκαν να αλληλεπίδρούν σε κάθε περίπτωση,

62

ήταν τα FKTWM καθοδικά του CRAC που φάνηκε να σχηματίζουν δομή α-έλικας, και να είναι εκτεθειμένα προς την ίδια πλευρά της. Επομένως, βρέθηκε ότι το αμινοτελικό κομμάτι της ALR αλληλεπιδρά με το CEEC-FAD ενεργό κέντρο.

Για να χαρακτηριστούν τα συγκεκριμένα κατάλοιπα του αμινοτελικού μέρους της Erv1/ALR στην αλληλεπίδρασή τους με το ενεργό κέντρο της MIA40, οι συνεργάτες μας έλεγξαν διαφορετικά μήκη του αμινοτελικού μέρους της πρωτεΐνης If-ALR όταν αυτά φέρονταν ανοδικά του sf-ALR μορίου (αντιστοιχεί στον καταλυτικό πυρήνα της If-ALR) σε συγκεκριμένη κασέτα έκφρασης, παρατηρώντας αν η πρωτεΐνη έδινε το ίδιο αποτέλεσμα μετά απο NMR όπως η If-ALR προηγουμένως (Banci *et al*, 2011a). Από τη δομική αυτή ανάλυση φάνηκε ότι η αλληλουχία αμινοξέων ASRRRPCRACVDFKTW του αμινοτελικού άκρου της If-ALR, που περιέχει το CRAC μοτίβο, αναγνωρίζει το καταλυτικό μέρος της ALR (περιοχή πρόσδεσης FAD).

Απο την παραπάνω δομική μελέτη, προέκυψε ότι η αλληλεπίδραση της Erv1 πάνω στην Mia40 για την ανακύκλωση του ενεργού κέντρου της τελευταίας, στηρίζεται σε συγκεκριμένα υδρόφοβα αμινοξέα καθοδικά του CRAC μοτίβου της ALR (FKTWM) και κατ'επέκταση καθοδικά του αντίστοιχου CRSC μοτίβου της Erv1 (LLDFQ), τα οποία βρέθηκαν με NMR να εμφανίζουν υψηλή τάση σχηματισμού α-έλικας. Ο μιμητικός μηχανισμός, υποστηρίζεται και απο τους Bottinger *et al*, (2012) οι οποίοι αναφέρουν ότι η Mia40 προσδένει την Erv1 μέσω της δεύτερης κυστεΐνης του CPC μοτίβου της ωστόσο απουσία υποστρώματος.

2.2 Μελέτη της μοριακής αλληλεπίδρασης Mia40-Erv1 in organello

2.2.1. Τα υδρόφοβα μεταλλάγματα της Erv1, LLF/E, LLFQ/A και LLQ/A μπορούν να εισέλθουν στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα, όπως η αγρίου τύπου Erv1 πρωτεΐνη (στάδιο A)

Για την *in organello* μελέτη της περιοχής C₇₁RACVDFKTWM₈₁ της lf-ALR, όσον αφορά το ρόλο της στην επανοξείδωση της Mia40, προχωρήσαμε στην εύρεση της αντίστοιχης αλληλουχίας αμινοξέων στην Erv1 καθώς οι προσπάθειές μας για την είσοδο της lf-ALR σε μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, δεν έδωσαν θετικό αποτέλεσμα (Lange *et al*, 2001; Sztolsztener *et al*, 2013). Αφού εντοπίστηκαν τα υδρόφοβα αμινοξέα της lf-ALR (φαινυλαλανίνη F_{77} , τρυπτοφάνη W₈₀ και μεθειονίνη M81) καθοδικά του CRSC ομόλογου μοτίβου της Erv1 (λευκίνη L₃₆, λευκίνη L₃₇, φαινυλαλανίνη F39 και γλουταμίνη Q₄₀) πραγματοποιήθηκε μεταλλαξιγένεση τους σε αλανίνη (A), ή γλουταμικό οξύ (E). Τα μεταλλάγματα που προέκυψαν τελικά ήταν τα: LLF/E, LLQ/A και LLFQ/A (Εικόνα 18).

If-ALR: CRACVDFKTWM
Erv1: CRSCNTLLDFQ
$$\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$$

AA AA \rightarrow LLFQ//
or AA A \rightarrow LLQ/A
or EEE \rightarrow LLF/E

Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των υδρόφοβων μεταλλάξεων που πραγματοποιήθηκαν καθοδικά του CRSC μοτίβου των κυστεϊνών κίνησης της πρωτεΐνης
Q/A Erv1. Τα μεταλλάγματα που δημιουργήσαμε ήταν τα LLFQ/A, LLQ/A και LLF/E.

Η αγρίου τύπου Erv1 και τα μεταλλάγματα της παρήχθησαν ως ραδιενεργά σημασμένα *in vitro* για να μελετηθεί η ικανότητα είσοδου τους αρχικά σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Αυτό που φάνηκε μετά απο αυτοραδιογραφία της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων κάτω απο αποδιατακτικές και μη αναγωγικές συνθήκες, ήταν ότι και τα τρία μεταλλάγματα LLFQ/A, LLQ/A και LLF/E εισήχθησαν στα μιτοχόνδρια (ζώνη ~29kDa) και διατήρησαν την ικανότητά τους να σχηματίζουν το δισουλφιδικό ενδιάμεσο Mia40-Erv1 μετά την αλληλεπίδρασή τους με την ενδογενή Mia40 (ζώνη ~95kDa), όπως ακριβώς συμβαίνει με την αγρίου τύπου Erv1^{act} (Εικόνα 19, θέσεις 1-4). Αντίθετα, παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης το χρονο-εξαρτώμενο ενδιάμεσο δε εντοπίζονταν μετά απο αυτοραδιογραφία (Εικόνα 19, θέση 5).

Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι τα συγκεκριμένα υδρόφοβα αμινοξέα καθοδικά του CRSC μοτίβου στο αμινοτελικό κομμάτι της Erv1^{act} φαίνεται να μην επηρεάζουν την είσοδο της πρωτεΐνης διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και την οξείδωσή της απο τη Mia40 στο διαμεμβρανικό χώρο (στάδιο A), γεγονός που επιτρέπει την μελέτη της αλληλεπίδρασης των Mia40 και Erv1 μεταλλαγμάτων στο στάδιο B. Τα παραπάνω δεδομένα συμφωνούν με αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο II της διατριβής, σχετικά με το σημαντικό ρόλο του καρβοξυτελικού μέρους της Erv1^{act} στην είσοδο της πρωτεΐνης *in organello* και όχι του αμινοτελικού κομματιού της (N72) που δεν επηρεάζει την είσοδο της πρωτεΐνης *in organello*.



Εικόνα 19: Αυτοραδιογραφία μετά απο ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE που δείχνει την είσοδο και αλληλεπίδραση των ραδιενεργών εκδοχών της Erv1 (a) αγρίου τύπου (wt), (b) LLF/E, (c) LLQ/A και (d) LLFQ/A μεταλλάγματος με την ενδογενή Mia40. Η είσοδος του εκάστοτε ραδιενεργού πρόδρομου μορίου πραγματοποιήθηκε για 5, 10 και 20 λεπτά παρουσία NEM, για τη μελέτη του ενδιαμέσου 'Mia40-Erv1' (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2011a).

2.2.2 Τα υδρόφοβα μεταλλάγματα της Erv1, LLF/E, LLFQ/A και LLQ/A έχουν χάσει την ικανότητα επανοζείδωσης της Mia40 in organello (στάδιο B)

Τα υδρόφοβα αμινοξέα L36, L37, F39 και Q₄₀ ελέγχθηκαν στη συνέχεια *in organello*, όσον αφορά το ρόλο τους στην επανοξείδωση της Mia40. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου σε απομονωμένα galErv1 μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι') (Lionaki *et al*, 2010) δύο στάδια: 1) αρχικά την είσοδο των καθαρισμένων μεταλλαγμάτων LLF/E, LLQ/A και LLFQ/A στα οργανίδια που δε περιέχουν ενδογενή Erv1 στο εσωτερικό τους και 2) την είσοδο της ραδιενεργής Mia40SPC, που θα αποτελούσε το υπόστρωμα οξείδωσης των παραπάνω Erv1 πρωτεϊνικών μορίων για τον σχηματισμό μικτού δισουλφιδικού τους ενδιαμέσου (Sideris & Tokatlidis, 2007).

Για το παραπάνω πείραμα, η Erv1 αγρίου τύπου και τα μεταλλάγματα LLF/E, LLFQ/A και LLQ/A υπερεκφράστηκαν σε βακτήρια και καθαρίστηκαν για να εισαχθούν στα galErv1 μιτοχόνδρια (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι'). Μετά από το πρώτο αυτό πείραμα εισόδου που διήρκησε 30 λεπτά, τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν και επωάστηκαν με ραδιενεργό υπόστρωμα Mia40SPC.

Το αποτέλεσμα του πειράματος έδειξε ότι χωρίς την προ-είσοδο της Erv1, η ραδιενεργή Mia40 μπορούσε να εισαχθεί (ζώνη ~60-70kDa) (Chacinska *et al*, 2004; Naoe *et al*, 2004) σε κάθε περίπτωση μεν αλλά χωρίς να μπορεί να σχηματίζει μικτό δισουλφιδικό σύμπλοκο Mia40-Erv1 (Εικόνα 20a θέσεις 2-5), σε αντίθεση με την περίπτωση της προ-εισόδου της καθαρισμένης αγρίου τύπου Erv1 πρωτεΐνης, όπου το ενδιάμεσο μεταξύ των δύο ήταν εμφανές (ζώνη ~95kDa) (Εικόνα 20a θέσεις 6-9).



πριν την είσοδο της ραδιενεργής πρωτεΐνης Mia40SPC.

Απο άλλη την πλευρά, όταν χρησιμοποιήθηκαν τα υδρόφοβα μεταλλάγματα Erv1 LLFQ/A Kai LLF/E, ενώ η είσοδος της πρωτεΐνης Mia40 δεν επηρεάστηκε όπως αναμένονταν (ζώνη ~66kDa), το σύμπλοκο των Mia40-Erv1 δε φάνηκε να σχηματίζεται (Εικόνα 20b, θέσεις 2-9).

Εικόνα 20: Αυτοραδιογραφία μετά απο SDS-PAGE κάτω απο μη αναγωγικές συνθήκες του πειράματος εισόδου δύο σταδίων galErv1 απομονωμένα σε είσοδος μιτοχόνδρια. Η του ραδιενεργού πρόδρομου μορίου Mia40SPC αναλύθηκε μετά από είσοδο των (a) αγρίου τύπου Erv1wt και στη συνέχεια (b) των μεταλλαγμάτων LLFQ/A και LLF/E (τροποποιημένη εικόνα απο Banci et al, 2011a). (c) Ανοσοαποτύπωση με α-Erv1 αντίσωμα για τον έλεγχο της ποσότητας αγρίου τύπου ή μεταλλαγμάτων LLFQ/A και LLF/E στα galErv1 μιτοχόνδρια Απο τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι τα συγκεκριμένα υδρόφοβα αμινοξέα της περιοχής καθοδικά του μοτίβου CRSC είναι ζωτικής σημασίας για την ενζυμική δράση της Erv1 πάνω στη Mia40 (στάδιο B). Ανάλογο αποτέλεσμα θα περιμέναμε και για το αντίστοιχο μετάλλαγμα στα υδρόφοβα αμινοξέα καθοδικά του CRAC μοτίβου στο ανθρώπινο ομόλογο lf-ALR σχηματίζεται. Σημειώνεται ότι η ποσότητα των μεταλλαγμάτων που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή τους στο μιτοχόνδριο ήταν ίδια με με αυτήν που χρησιμοποιήσαμε στην περίπτωση της αγρίου τύπου Erv1, γεγονός που ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση του πειράματος εισόδου (Εικονα 20c).

Απο τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι τα συγκεκριμένα υδρόφοβα αμινοξέα της περιοχής καθοδικά του μοτίβου CRSC είναι ζωτικής σημασίας για την (FWM) μετά την αλληλεπίδρασή του με την ανθρώπινη MIA40.

2.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης των υδρόφοβων μεταλλαγμάτων της Erv1, LLF/E, LLFQ/A και LLQ/A με την Mia40 πρωτεΐνη in vitro

In vitro πειράματα ανασύστασης της αλληλεπίδρασης Mia40-Erv1 (Grumbt *et al*, 2007; Lionaki *et al*, 2010) επίσης πραγματοποιήθηκαν για να μελετηθεί ανεξάρτητα η αλληλεπίδραση μεταξύ της Mia40 και των υδρόφοβων μεταλλαγμάτων της Erv1.

Για την πρόσδεση των πρωτεϊνών ως θετικό πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η καθαρισμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ΔΝ290Mia40, ανηγμένη στο CPC μοτίβο της με την επίσης καθαρισμένη ανασυνδυασμένη αγρίου τύπου Erv1^{act} (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι'). Οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπίδρασαν μεταξύ τους και έδωσαν το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο που συμβολίζεται με αστερίσκο στην εικόνα 21Α το οποίο φάνηκε μετά απο ανοσοαποτύπωση της *in vitro* πρόσδεσης με α-Mia40 αντίσωμα. Η χρήση των υδρόφοβων LLF/E, LLF/A και LLFQ/A μεταλλαγμάτων, από την άλλη πλευρά δε φάνηκε να δίνει αντίστοιχο ενδιάμεσο (Εικόνα 21Α) ενώ το διμερές της ΔΝ290Mia40 (ζώνη ~50kDa) εμφανίζονταν σε κάθε περίπτωση. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαίωσε το σημαντικό ρόλο των υδρόφοβων αμινοξέων L36, L37, F39 και Q40 στην αλληλεπίδρασή τους με τη Mia40 που φάνηκε προηγουμένως *in organello*.

Ως αρνητικό πείραμα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν δύο μεταλλάγματα της Mia40: (1) η μεταλλαγμένη στο CPC μοτίβο του ενεργού της κέντρου πρωτεΐνη ΔN290Mia40SPS, η οποία δεν έχει λειτουργικό ενεργό κέντρο για να οξειδώσει τα υποστρώματά της (το CPC έχει αλλάξει σε SPS) και (2) το ΔN290Mia40 LMFFFM/A

67

μετάλλαγμα όπου έξι υδρόφοβα κατάλοιπα στην περιοχή πρόσδεσης των υποστρωμάτων της Mia40 έχουν μεταλλαχθεί σε αλανίνη (Εικόνα 21B). Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα έχει χρησιμοποιηθεί απο το εργαστήριό μας και σε προηγούμενες μελέτες π.χ για την μελέτη της αλληλεπίδρασης Mia40-COX17 (Banci *et al*, 2009a). Και στις δύο περιπτώσεις των μεταλλαγμένων μορφών της Mia40 το Mia40-Erv1 ενδιάμεσο χάνονταν, όπως αναμένονταν. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και το ΔΝ290Mia40SPC για την παγίδευση και καλύτερη παρατήρηση του μικτού δισουλφιδικού ενδιαμέσου, όπου όπως φαίνεται και στην εικόνα 21B παρατηρείται σε μεγαλύτερη ένταση και στα 10 λεπτά αντίδρασης αλλά και στα 20 λεπτά συγκριτικά με τις υπόλοιπες περιπτώσεις Mia40-Erv1^{act} αλληλεπίδρασης και ειδικότερα σε σχέση με την περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η ΔΝ290Mia40 αγρίου τύπου.



Εικόνα 21: (A) In vitro πρόσδεση της αγρίου τύπου ΔΝ290Mia40 με την αγρίου τύπου Erv1 καθώς και με τα LLF/E, LLQ/A και LLFQ/A μεταλλάγματα. Το μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με την Erv1 συμβολίζεται με αστερίσκο (*). Το μονομερές (~15kDa) και το διμερές της Mia40 (~50kDa) επίσης φαίνονται. Τα δείγματα αναλύθηκαν κάτω από μη αναγωγικές συνθήκες και το ενδιάμεσο Mia40–Erv1^{act} φάνηκε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-Mia40. (B) Όπως η περίπτωση (A), αλλά διαφορετικές μορφές της Mia40 (μεταλλάγμα SPC, SPS και το εξαπλό υδρόφοβο LMFFFM/A) χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλεπίδραση με την αγρίου τύπου Erv1^{act} σε κάθε

περίπτωση. Το ενδιάμεσο μεταξύ των Mia40 και Erv1 συμβολίζεται με αστερίσκο όπως στην περίπτωση (A) (Banci *et al*, 2011a).

2.4 Μελέτη των υδρόφοβων μεταλλαγμάτων της Erv1, LLF/E, LLFQ/A και LLQ/A in vivo

Από τα παραπάνω πειράματα in organello και in vitro, καταλήξαμε στο ότι τα L36, L37, F39 και Q40 αμινοξέα της Erv1 πρέπει να έχουν πολύ σημαντικό ρόλο in vivo, καθώς η επανοξείδωση της Mia40 είναι αναγκαία για την σωστή λειτουργία του MIA μονοπατιού. Με πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας ελέγξαμε τη ζωτικότητα του galErv1 στελέχους μετασχηματισμένου κάθε φορά με την κατάλληλη Erv1 εκδοχή (LLF/E, LLFQ/A και LLQ/A), ή την Erv1 αγρίου τύπου που αποτέλεσε το θετικό πείραμα ελέγχου. Όταν το στέλεχος αναπτύχθηκε παρουσία γλυκόζης ή γαλακτικού οξέος (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι), όλες οι μεταλλάξεις φάνηκαν να είναι θνησιγόνες για τα κύτταρα, εκτός από το μετάλλαγμα LLQ/A, το οποίο φανερώνει το σημαντικό ρόλο της φαινυλαλανίνης (F39) στην προκειμένη περίπτωση (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Σύγκριση της κυτταρικής ανάπτυξης του galErv1 στελέχους *S. cerevisiae* που φέρει τα πλασμίδια έκφρασης των Erv1 αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων (LLQ/A, LLFQ/A και LLF/E) σε στερεό θρεπτικό μέσο με γαλακτόζη (SG), γλυκόζη (SC) και γαλακτικό οξύ (SL) όπου επιστρώθηκαν σε διαφορετικές αραιώσεις (10⁵ 10⁴, 10³, 10² και 10) μετά απο 24 και 48 ώρες ανάπτυξής τους σε υγρή καλλιέργεια (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2011a).

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε ειδικά για τη μελέτη της φαινυλαλανίνης F39. Δύο ήταν τα μεταλλάγματα που ελέγχθησαν συγκριτικά με την αγρίου τύπου Erv1 *in vivo*: το μετάλλαγμα της φαινυλαλανίνης σε αλανίνη, F/A και σε γλουταμικό οξύ, F/E. Ta galErv1 κύτταρα έδειξαν έντονο θνησιγόνο φαινότυπο στην περίπτωση του μεταλλάγματος F/E, και στις 24 ώρες αλλά και στις 48 ώρες ανάπτυξής τους παρουσία γλυκόζης ή γαλακτικού οξέος, αλλά όχι στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα F/A. Η μετάλλαξη σε αλανίνη είναι ουδέτερη για τη λειτουργία του αμινοτελικού μέρους της Erv1 πάνω στη Mia40 σε αντίθεση με την μετάλλαξη της F39 σε γλουταμικό οξύ που κανει τη δομή της περιοχής πιο εύκαμπτη και επομένως επηρεάζει την υδροφοβικότητα του αμινοτελικού κομματιού σε βαθμό που η επανοξείδωση της Mia40 δεν μπορεί να συμβεί και τα κύτταρα σακχαρομύκητα δεν επιβιώνουν (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Δοκιμασία γενετικής συμπλήρωσης *in vivo* για τα μονά υδρόφοβα μεταλλάγματα F/A και F/E σε galErv1 κύτταρα σακχαρομύκητα. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε γαλακτόζη (SG), γλυκόζη (SC) ή γαλακτικό οξύ (SL) εμπλουτισμένο με 0,2% γλυκόζη. Τα κύτταρα της αρχικής καλλιέργειας για την κάθε περίπτωση πλασμιδίου, αναπτύχθηκαν 24 και 48 ώρες σε γλυκόζη ή λακτικό οξύ για τη σίγηση του ενδογενούς *Erv1* γονιδίου. Για την καλλιέργεια των κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10⁵ 10⁴, 10³, 10² και 10 της υγρής αρχικής καλλιέργειας.

2.5 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών Mia40, Erv1 και κυτοχρώματος c στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα (in organello)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, μελετώντας την Mia40-Erv1 αλληλεπίδραση στο στάδιο επανοξείδωσης της οξειδορεδουκτάσης από την Erv1, η πρωτεΐνη αυτή φάνηκε να αλληλεπιδρά με τη Mia40 στην ίδια περιοχή (υδρόφοβη κοιλότητα) στην οποία προσδένονται τα τυπικά υποστρώματά της (Banci *et al*, 2011a; Sideris *et al*, 2009). Από την άλλη πλευρά, η θεωρία του τριαδικού συμπλόκου (Stojanovski *et al*, 2008) φαίνεται να υποστηρίζει την ύπαρξη ενός συμπλόκου μεταξύ των Mia40, Erv1 και υποστρώματος κατα την οξειδωση του υποστρωματος. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με το μοριακό μηχανισμό αλληλεπίδρασης των Mia40-Erv1 στον οποίο καταλήξαμε, καθώς η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος πάνω στη Mia40 δε θα μπορούσε ταυτόχρονα να καταλαμβάνεται απο την Erv1 πρωτεΐνη. Σε μία προσπάθεια να προσεγγίσουμε το παραπάνω ζήτημα, εξετάσαμε τη στοιχειομετρία των Mia40 και Erv1 πρωτεϊνών, καθώς και του κυτοχρωματος c, *in organello*.

Πιο συγκεκριμένα, μετρήσαμε τα επίπεδα των Mia40 και Erv1 σε απομονωμένα καθαρά μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα αγρίου τύπου πραγματοποιώντας ημι-ποσοτική ανοσοαποτύπωση (semiquantitative western blot analysis), με ειδικά αντισώματα α-Erv1, α-Mia40 και α-cytc (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι'). Χρησιμοποιώντας διαφορετικά ποσά καθαρών μιτοχονδρίων και μια ποικιλία συγκεκριμένων ποσών καθαρισμένης ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης Erv1 και Mia40 σε κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλμίδης κάτω από αποδιατακτικές και αναγωγικές συνθήκες (Εικόνα 24).

Η ποσοτικοποίηση έδειξε τη Mia40 να υπάρχει σε ποσό 10μg ανά mg καθαρών μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα (ή περίπου 220 pmoles/mg μιτοχονδρίων) και την Erv1 σε 0,4μg ανά mg (ή περίπου 18 pmoles/mg μιτοχονδρίων). Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα για το κυτόχρωμα c όπου βρήκαμε ότι απαντάται σε ποσό 15μg/mg (ή περίπου 1250 pmoles/mg μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα) (Παράρτηματα 1-3). Για τον έλεγχο του πειράματος όσον αφορά το ποσό μιτοχονδρίων που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά, ακολούθησε ανοσοαποτύπωση για την πορίνη (διαμεμβρανική πρωτεΐνη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεβράνης). Επιπρόσθετα της παραπάνω ποσοτικοποίησης, οι Mesecke *et al* με παρόμοιο τρόπο υπολόγισαν την ποσότητα του Tim10 υποστρώματος της Mia40 να βρίσκεται σε

moles της Erv1, ενώ η ποσοτικοποίηση για την Mia40 και το κυτόχρωμα c που υπάρχει στη γενωμική βάση δεδομένων του σακχαρομύκητα (Saccharomyces cerevisiae Genome Database, SGD) συμφωνεί με την δική μας όσον αφορά τα σχετικά ποσά των πρωτεϊνών χωρίς να έχει γίνει ανάλογη μέτρηση για την Erv1. Πιο συγκεκριμένα, για πρώτη φορά οι Ghaemmaghami et al, το 2003, κατασκεύασαν δύο συλλογές των πρωτεϊνών του σακχρομύκητα, όπου το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος του εκάστοτε γονιδίου σημάνθηκε με ένα TAP ή GFP επίτοπο (Howson et al, 2005) και στη συνέχεια ακολούθησε η έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη Mia40 ανα κύτταρο βρέθηκε να εντοπίζεται σε αριθμό 5040 μορίων στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα ενώ το κυτάχρωμα c (που κωδικοποιείται απο το γονίδιο CYC1) αριθμούσε τα 7330 μόρια επίσης ανα κύτταρο σακχαρομύκητα, στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα (Ghaemmaghami et al, 2003; Huh et al, 2003).



Εικόνα 24: Ανοσοαποτύπωση μετά από Tricine SDS-PAGE ανάλυση των πρωτεϊνών Mia40, Erv1 και κυτοχρώματος c *in organello*. Διαφορετικά ποσά καθαρών αγρίου τύπου μιτοχονδρίων και πρωτεϊνών αναλύθηκαν με ημιποσοτική ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας τα ειδικά αντισώματα (A) α-Mia40, (B) α-Erv1 και (C) α-cytc. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση για την πρωτεΐνη ελέγχου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, πορίνη (Porin), για τον έλεγχο της διαδικασίας (D) πίνακας της ποσοτικοποίησης των Mia40, Erv1 και κυτοχρώματος c1 (cytc1) (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2011a).

Προκύπτει, επομένως, ότι η Erv1 βρίσκεται σε υποστοιχειομετρικά ποσά συγκριτικά με αυτά της Mia40 *in vivo*, γεγονός που συμφωνεί με την ενζυμική λειτουργία της σουλφυδριλοξειδάσης στην ανακύλωση της Mia40. Αυτό το αποτέλεσμα υποστηρίζει το ότι η οξείδωση του υποστρώματος της Mia40 έπεται της αλληλεπίδρασής της με την Erv1, η οποία δρα για την μετέπειτα επανοξείδωση του CPC μοτίβου της. Με αυτό τον τρόπο, το CPC μοτίβο της Mia40 θα μπορούσε να οξειδώνεται αρχικά απο την Erv1 για να δράσει πάνω στο εκάστοτε υπόστρωμα στη συνέχεια, αντικρούοντας την περίπτωση σχηματισμού τριαδικού συμπλόκου (Stojanovski *et al*, 2008) για την οποία θα ήταν πιθανώς απαραίτητα ισομοριακά επίπεδα των Erv1 και Mia40 *in vivo*. Πάντως, η στοιχειομετρία των Erv1 και Mia40 σε ένα πιθανό τριμοριακό σύμπλοκο μαζί με το υπόστρωμα δεν έχει καθοριστεί.

3. Σύνοψη κεφαλαίου

Απο τα αποτελέσματα του παρόντος αλλά και του προηγούμενου κεφαλαίου, συμπεραίνουμε ότι οι πρωτεΐνες Erv1 και Mia40 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε δύο στάδια με την αλληλεπίδρασή τους αυτή να οδηγείται από διαφορετικές περιοχές της Erv1. Η είσοδος της Erv1^{sub} στα μιτοχόνδρια απαιτεί την οξείδωση των δομικών κυστεϊνών του καρβοξυτελικού της μέρους (Kallergi *et al*, 2012), ενώ η επανοξείδωση της Mia40 (στάδιο B) απαιτεί την Erv1^{act} αναδιπλωμένη με το αμινοτελικό της άκρο να παίζει σημαντικό ρόλο καθώς φέρει το ακραίο ζεύγος κυστεϊνών (CRSC) που είναι αναγκαίο και ικανό για την οξείδωση του CPC μοτίβου της Mia40 (Banci *et al*, 2011a).

Απο την μελέτη της ALR με NMR και πειράματα ITC φάνηκε οτι, η μεγάλου μήκους lf-ALR προσδένεται πιο αποτελεσματικά στη MIA40 παρα η μικρού μήκους sf-ALR, γεγονός που φανερώνει το σημαντικό ρόλο του αμινοτελικού κομματιού N80 σε αυτό το στάδιο, για την επανοξείδωση της MIA40 και τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτό εξηγείται απο το γεγονός ότι το CRAC μοτίβο βρίσκεται στο αμινοτελικό αυτό ευλύγιστο-δομικά και αποδιπλωμένο κομμάτι, σε αντίθεση με το ανάλογο CEEC μοτίβο στη sf-ALR που δεν είναι τόσο εκτεθειμένο. Ακόμα, η μη δομημένη κατάσταση στην οποία βρίσκεται το N80 μπορεί να εξηγήσει απο την μία πλευρά την πρόσδεση με τη MIA40 αλλά και απο την άλλη την επακόλουθη αλληλεπίδρασή του ενδομοριακά με το FAD μόριο, φανερώνοντας τον ρόλο του κομματιού αυτού στη ροή των ηλεκτρονίων απο την MIA40 προς την ALR. Στη συνέχεια, ενδομοριακά της ALR (If-ALR), τα ηλεκτρόνια φάνηκε να περνούν απο το μοτίβο CRAC στο FAD μόριο που βρίσκεται προσδεδεμένο γειτονικά του CEEC μοτίβου κυστεϊνών του ενεργού κέντρου της, όπως συμβαίνει και στην Εrv1 πρωτεΐνη (Bien *et al*, 2010).

Στην παραπάνω αλληλεπίδραση, η αναγνώριση του ενεργού κέντρου της MIA40/Mia40 εξαρτάται από μία συγκεκριμένη αλληλουχία 12 αμινοξέων της ALR/Erv1 η οποία φάνηκε να προσδένεται στην υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης υποστρωμάτων της Mia40 μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό, φαίνεται μιμείται το μηχανισμό πρόσδεσης των τυπικών υποστρωμάτων με μοτίβα CX3C και CX9C στην ίδια περιοχή (Εικόνα 25). Τα αμινοξέα που περιέχονται στο κομμάτι της Erv1/ALR για την αλληλεπίδρασή της με τη Mia40/MIA40 είναι υδρόφοβα αμινοξέα που βρίσκονται δομικά εκτεθειμένα, χωρίς να παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην είσοδο της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο.

Καθώς στην υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης της Mia40, φαίνεται να προσδένονται τα τυπικά υποστρώματά της (Banci et al, 2010; Sideris et al, 2009) αλλά και το αμινοτελικό κομμάτι της Erv1/ALR που φέρει το κυστεϊνικό ζεύγος κίνησης (CRSC ή CRAC, αντίστοιχα) (μηχανισμός μίμησης υποστρώματος) αναιρείται η πιθανή δημιουργία τριαδικού συμπλόκου Mia40-Erv1-υπόστρωμα (τουλάχιστον στη συγκεκριμένη θέση) για την πλήρη οξείδωση του υποστρώματος, όπως υποστηρίζεται στη βιβλιογραφία για τον σακγαρομύκητα (Stojanovski et al, 2008). Η αλληλεπίδραση Mia40-Erv1 φαίνεται να συμβαίνει ακολούθως της αλληλεπίδρασης Mia40-υποστρώματος, γεγονός που υποστηρίζεται απο την και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών Mia40 Erv1 στο μιτογόνδριο του σακγαρομύκητα που σημειώνεται στο κεφάλαιο αυτό. Η ύπαρξη της Erv1 σε υποστοιχειομετρική ποσότητα συγκριτικά με την Mia40 συμφωνεί με την ενζυμική του δράση καθώς η ύπαρξη του τριαδικού συμπλόκου δε θα ήταν εφικτή στην περίπτωση που συγκεκριμένη ποσότητα Mia40 απαιτούσε αντίστοιχη σε ποσό Erv1. Απο την άλλη πλευρά, οι Bien et al, το 2010, πραγματοποίησαν πειράματα in vitro

74

για την οξείδωση του Cox19 υποστρώματος παρουσία Mia40 και Erv1 τα οποία δεν κατέληξαν στο σχηματισμό τριαδικού συμπλόκου (Bien *et al*, 2010), υποστηρίζοντας ότι το Cox19 μπορεί να οξειδωθεί πλήρως απο τη Mia40, χωρίς να απαιτείται η δράση της Erv1. Περισσότερες μελέτες *in vivo* και πιθανώς πειράματα κινητικής τόσο για την αλληλεπίδραση μεταξύ των Mia40-υποστρώματος όσο και Mia40-Erv1 απαιτούνται για να αποφανθούμε με σιγουριά στο παραπάνω ερώτημα γνωρίζοντας την ποσότητα των πρωτεϊνών *in organello*. Πρόσφατα, οι Bottinger *et al*, υποστήριξαν και πάλι τη θεωρία του τριαδικού συμπλόκου, αυτή τη φορά in vivo για την οξείδωση ποικίλων υποστρωμάτων του MIA μονοπατιού, μέσω μιας δεύτερης περιοχής πρόσδεσης της Erv1 πάνω στη Mia40, η οποία αποκαλύπτεται ως διαθέσιμη μετά την αλληλεπίδραση Mia40-υποστρώματος (Bottinger *et al*, 2012).

Τέλος, το 2012, ένα χρόνο μετά την δική μας δημοσίευση, οι Guo et al μελετώντας τη κρυσταλλική δομή της Erv1 πρωτεΐνης και αυτής του καρβοξυτελικού πυρήνα της, κατέληξαν ότι το αμινοτελικό κομμάτι της Erv1 σχηματίζει επίσης μια αμφιπαθή α-έλικα η οποία είναι κρίσιμη για την μεταφορά ηλεκτρονίων απο τη Mia40 προς το ενεργό κέντρο της Erv1 (Guo et al, 2012). Αυτό το αποτέλεσμα ήταν σημαντικό καθώς για πρώτη φορά φάνηκε και δομικά η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των Mia40-Erv1 στο σακχαρομύκητα (Bien et al, 2010). Πιο συγκεκριμένα, τα αμινοξέα L36, L37, F39 και Q40 που μελετήσαμε in vitro, in organello και in vivo, αποδείχτηκε ότι δομικά ανήκουν σε μια α-έλικα η οποία εντοπίζεται στο πρώτο μονομερές να αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο του δεύτερου μονομερούς της διμερούς πρωτεΐνης (Guo et al, 2012). Ακόμα, με in silico μελέτη, φάνηκε ότι η αλληλεπίδραση του αμινοτελικού μέρους της Erv1 (Meth1 – Asp83) και της Mia40 στην υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης υποστρωμάτων της Mia40 (Banci et al, 2010) που επιβεβαίωσε το συμπέρασμα στο οποίο καταλήξαμε εμείς. Πιο συγκεκριμένα, η θέση πρόσδεσης τόσο για την αλληλεπίδραση Mia40-υπόστρωμα όσο και για την Mia40-Erv1 είναι η ίδια με αυτήν που καταλήξαμε και εμείς (η Erv1 προσδέθηκε στα αμινοξέα L294, M302, F311, F315, F334, M337 της υδρόφοβης κοιλότητας της Mia40). Τα υδρόφοβα αμινοξέα L36, L37 και F39 στην Erv1 φάνηκαν να αλληλεπιδρούν με τη Mia40 τα οποία ανήκουν στο αμινοτελικό κομμάτι της, CRSCNTL36L37DF39Q, που είναι ομόλογο με αυτό που βρέθηκε απο μας να είναι στην περίπτωση της ALR πρωτεΐνης (CRACVDFKTWM). Τα αμινοξέα αυτά είχαν ζωτικό ρόλο για το σχηματισμό του Mia40-Erv1 στο σακγαρομύκητα, με το F39 να



αποτελεί το σημαντικότερο ίσως αμινοξύ στην προκειμένη περίπτωση σύμφωνα με το *in vivo* πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας στο σακχαρομύκητα.

Εικόνα 25: Ο μηχανισμός "μίμησης του υποστρώματος" της αλληλεπίδρασης Mia40-Erv1. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση οδηγείται από υδρόφοβες αλληλεπίδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ του αμινοτελικού άκρου της (πράσινο χρώμα) lf-ALR (ροζ χρώμα) και της υδρόφοβης κοιλότητας πρόσδεσης υποστρώματος (πράσινο χρώμα) της MIA40 (κόκκινο χρώμα). Η περιοχή της MIA40 στην οποία προσδένεται το ITS σήμα (πράσινο χρώμα) (Banci *et al*, 2010; Sideris *et al*, 2009) της πρωτεΐνης Cox17 (μπλε χρώμα) είναι ίδια για την επανοξείδωσή της απο τη lf-ALR. Στο πλαίσιο στο μέσο της εικόνας φαίνονται τα μικτά δισουλφιδικά ενδιάμεσα μεταξύ των MIA40-Coχ17 και MIA40- lf-ALR. Οι κυστεΐνες συμβολίζονται με κίτρινο χρώμα (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2011a).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΔΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚΟΥ ΑΚΡΟΥ ΤΗΣ Erv1/ALR ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου αφορούν τη δημοσίευση: Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Felli IC, Gallo A, Pavelkova A, <u>Kallergi E</u>, Andreadaki M, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K (2013) An intrinsically disordered domain has a dual function coupled to compartment-dependent redox control, , 425(3):594-608 (Παράρτημα 4)

1 Εισαγωγή-Σκοπός

Μέχρι τώρα, τα πειραματικά μας αποτελέσματα μας οδήγησαν σε πολύ σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την αλληλεπίδραση Mia40-Erv1 τόσο στο στάδιο A όσο και στο στάδιο B. Τα δεδομένα μας, έδειξαν ότι το αμινοτελικό άκρο της Erv1/ALR, N72 και N80 αντίστοιχα, δεν ήταν σημαντικό για την είσοδο της Ev1/ALR πρωτεΐνης σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα, αλλά ήταν σημαντικό για την επανοξείδωση της Mia40 μέσω συγκεκριμένων υδρόφοβων αμινοξέων που φέρει. Απαλείφοντας το αμινοτελικό κομμάτι N72 της Erv1, η ΔN72 Erv1 μπορούσε ακόμα να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια και να δώσει μικτό δισουλφιδικό ενδιάμεσο με τη Mia40 *in organello* (Kallergi *et al*, 2012), αλλά το ίδιο το κομμάτι N72 φάνηκε να χρειάζεται στη συνέχεια για την ανακύκλωση της Mia40 (Lionaki *et al*, 2010; Banci *et al*, 2011a).

Ωστόσο τα παραπάνω αναφέρονται σε καθαρά απομονωμένα μιτοχόνδρια και όχι *in vivo*. Στον οργανισμό *S. cerevisiae*, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, υπάρχει μόνο μία μορφή του Erv1 μορίου (Lisowsky, 1992), αυτή με πλήρες μήκος 189 αμινοξέων, που εντοπίζεται αποκλειστικά στο IMS του μιτοχονδρίου. Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη ALR, απαντάται σε δύο ισομορφές, όπου μόνο η μεγάλου μήκους (If-ALR) εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων ενώ όταν απουσιάζουν τα πρώτα 80 αμινοξέα της αλληλουχίας της, η αντίστοιχη ισομορφή που προκύπτει (sf-ALR) εντοπίζεται σε διαφορετικό υποκυτταρικό διαμέρισμα (Lange *et al*, 2001) (πυρήνας, κυτταρόπλασμα και εξωκυττάριος χώρος) (Gandhi *et al*, 1999; Li *et al*, 2000; Lu *et al*, 2002).

Επομένως, εύλογα κανείς διερρωτάται ποιος μπορεί να είναι ο ρόλος του αμινοτελικού μέρους N72 (ή N80) στη στόχευση της Erv1 (lf-ALR) πρωτεΐνης στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κύτταρο. Σχετικά πειράματα των Lange *et al.* έδειξαν ότι η sf-ALR πρωτεΐνη μπορεί να εισαχθεί στο διαμεμβρανικό χώρο μιτοχονδρίων του θερμοευαίσθητου Erv1^{ts} στελέχους του σακχαρομύκητα, μόνο στην περίπτωση που έφερε αμινοτελικά του τα πρώτα 93 αμινοξέα της Erv1 πρωτεΐνης (N93). Αντίθετα, η lf-ALR δε μπορούσε να στοχευθεί στα μιτοχόνδρια αλλά παρέμενε στο κυτταρόπλασμα γεγονός που φανερώνει τη σημασία του αμινοτελικού μέρους της Erv1 στο αρχικό στάδιο εισόδου της στο οργανίδιο (Lange *et al*, 2001).

Σκοπός του κεφαλαίου αυτού, είναι η δομική και λειτουργική μελέτη του αμινοτελικού N72 κομματιού της Erv1 τόσο στην στόχευση και είσοδο της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο όσο και στο σημαντικό ρόλο της στην επανοξείδωση της Mia40.

2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

2.1 Δομική και in silico μελέτη του αμινοτελικού άκρου της σουλφυδριλοζειδάσης Erv1/ALR

Για τη μελέτη του ρόλου του αμινοτελικού άκρου της Erv1/ALR, συνεργαστήκαμε ξανά με το εργαστήριο του Ivano Bertini, όπου διεξήχθη η δομική ανάλυση του κομματιού N80 στην οξειδωμένη και ανηγμένη του κατάσταση (N80_{SS}/N80_{SH}), όπως και η μελέτη του κατα την αλληλεπίδρασή του με την οξειδωμένη ή ανηγμένη στο CPC μοτίβο της, MIA40 (MIA40_{3SS}/MIA40_{2SS}, αντίστοιχα).

Η NMR μελέτη του N80 κομματιού στην οξειδωμένη του κατάσταση (N80_{SS}), έδειξε ότι η διαμόρφωσή του στο χώρο, ήταν όμοια με αυτήν που αποκτά στο πλήρους μήκους οξειδωμένο πρωτεϊνικό lf-ALR. Αυτό σήμαινε ότι το N80 απο μόνο του ήταν κατάλληλο για τη μελέτη του ρόλου του ως μέρος της lf-ALR στην αλληλεπίδρασή του με τη MIA40 στη συνέχεια.

Πιο συγκεκριμένα, το κομμάτι N80_{SS} φάνηκε να έχει δύο υποπεριοχές με υποτυπώδη δευτεροταγή δομή, μία στο αμινοτελικό (αμινοτελική μονάδα, αμινοξέα 6-45) και μία στο καρβοξυτελικό μέρος του (καρβοξυτελική μονάδα, αμινοξέα 1-79). Οι περιοχές που βρέθηκαν να είναι περισσότερο δομημένες στην αμινοτελική μονάδα, ήταν η υποπεριοχή υδρόφοβων αμινοξέων (αμινοξέα 15-19) και η υποπεριοχή μεταξύ των αμινοξέων με αριθμό 30-35, που ήταν προστατευμένη απο το διαλύτη και είχε τάση να σχηματίζει α-έλικα. Η δε καρβοζυτελική μονάδα έφερε την περισσότερο δομημένη περιοχή της μεταξύ των αμινοξέων 61-79, η οποία αποτελεί μια μικρή αμινοξική αλληλουχία ανοδικά του μοτίβου CRAC της lf-ALR (αμινοξέα 65-68) με τάση σχηματισμού δευτεροταγούς δομής α-έλικας καθώς και ένα αμινοξικό τμήμα (αμινοξέα 74-79) που περιλάμβανε τη δεύτερη κυστεΐνη του CRAC μοτίβου και αμινοξέα καθοδικά της. Και οι δύο μονάδες φάνηκαν να συνδέονται με ένα πιο ευλίγιστο κομμάτι (αμινοξέα 46-60) κεντρικά του N80 (Εικόνα 26).

Επιπρόσθετα, το N80 βρέθηκε να είναι μη δομημένο και στις δύο οξειδοαναγωγικές καταστάσεις του CRAC μοτίβου του. Ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κυστεϊνών του δεν επηρέαζε τη δομή της αμινοτελικής μονάδας αλλά επηρέαζε μερικώς και κυρίως τη καρβοξυτελική μονάδα στις κυστεΐνες του CRAC μοτίβου, το οποίο παρουσιάζονταν περισσότερο δομημένο, αφήνοντας όμως και πάλι το N80 στο σύνολό του σε ξεδίπλωτη κατάσταση.



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση των δομικών χαρακτηριστικών του αμινοτελικού άκρου N80 της lf-ALR. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι περιοχές υδρόφοβων αμινοξέων (Hydr) ενώ με κόκκινο οι αμινοξικές περιοχές που έχουν τάση σχηματισμού α-έλικας (α-helical). Οι κυστεΐνες συμβολίζονται με πράσινο χρώμα και το ευλύγιστο κομμάτι των δύο μονάδων στη πρωτεΐνη συμβολίζεται με καφέ (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2013b).

Ακόμα, μέσω NMR μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ των MIA40_{3SS}/MIA40_{2SS} με το N80_{SS} όπου: στην περίπτωση της οξειδωμένης Mia40_{3SS} (οπου οι κυστεΐνες και του διπλού CX9C και του CPC μοτίβου της είναι οξειδωμένες) οι περιοχές που επηρεάστηκαν δομικά ήταν η περιοχή των υδρόφοβων αμινοξέων (αμινοξέα 15-18) και η περιοχή των αμινοξέων 67-79 που περιλάμβανε το CRAC μοτίβο. Απο την άλλη πλευρά, όταν χρησιμοποιήθηκε η ανηγμένη Mia40288 άλλαξε η οξειδωτική κατάσταση των κυστεϊνών του CRAC (ανηγμένες) και επηρεάστηκε η περιοχή των αμινοξέων 15-18, όπως στην περίπτωση της Mia40_{3SS}-N80_{SS} αλληλεπίδρασης. Η αλληλεπίδραση αυτής της περιοχής του N80 με την Mia40, και στις δύο οξειδοαναγωγικές καταστάσεις της Mia40, φάνηκε να είναι ασθενής και μη ομοιοπολική η οποία ενδεγομένως μεσολαβεί και την πρόσδεση της ALR στη Mia40 ή είναι μη ειδική εξαιτίας της υψηλής τάσης του υδρόφοβου αυτού μέρους να αλληλεπιδρά με την υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης υποστρώματος της Mia40. Απο την άλλη πλευρά τα δεδομένα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας (Lionaki et al, 2010) που συνολικά δείγνουν ότι το N72/80 όταν είναι οξειδωμένο μπορεί να αλληλεπιδρά με την ανηγμένη Mia40₂₈₈, όπως συμβαίνει με την περίπτωση των πλήρου μήκους πρωτεϊνών.

Παράλληλα με την δομική μελέτη του κομματιού N80, έγινε προσπάθεια ανάλυσης του N72 κομματιού της Erv1 πρωτεΐνης με τον ίδιο τρόπο. Αντίθετα από την περίπτωση της ανθρώπινης πρωτεΐνης, το κομμάτι N72 της Erv1 κατακρημνίζονταν όταν χρησιμοποιούνταν στις απαραίτητες ποσότητες που απαιτούνταν για την NMR ανάλυσή του, μετά απο απομόνωση και καθαρισμό του από βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με την αντίστοιχη κασέτα έκφρασης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό PRALINE για να βρούμε με μια *in silico* προσέγγιση τα δομικά χαρακτηριστικά του N72 (Εικόνα 27b).

Από αυτήν την *in silico* μελέτη το κομμάτι N72, φάνηκε να απαρτίζεται απο συγκεκριμένες περιοχές στην αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή του οι οποίες έχουν την τάση να σχηματίζουν μια α-έλικα, και απο περιοχές που είναι πλούσιες σε υδρόφοβα αμινοξέα (Εικόνα 27a και b). Οι περιοχές αυτές αντιστοιχούν στις ανάλογες περιοχές που βρέθηκαν στο ομόλογο κομμάτι N80 της If-ALR με NMR αλλά ωστόσο λόγω της μικρής ομοιότητας του αμινοτελικού μέρους των δύο πρωτεϊνών δεν ταυτίζονται.



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση των δομικών χαρακτηριστικών του αμινοτελικού άκρουυ του N72 της Erv1. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι περιοχές υδρόφοβων αμινοξέων (Hydr) ενώ με κόκκινο οι αμινοξικές περιοχές που έχουν τάση σχηματισμού α-έλικας (α-helical). Οι κυστεΐνες συμβολίζονται με πράσινο χρώμα (c) σύγκριση με στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών N72 και N80 χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PRALINE (<u>http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww</u>). Τα χρώματα, κόκκινο για τις περιοχές με τάση α-έλικας και μπλε για τις υδρόφοβες περιοχές, αφορούν προβλέψεις και όχι πειραματικά δεδομένα (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2013b).

2.2 Μελέτη του αμινοτελικού μέρους της σουλφυδριλοξειδάσης Erv1/ALR in organello

Στο κεφάλαιο Ι, φάνηκε ξεκάθαρα ότι ο καταλυτικός πυρήνας της Erv1 (ΔN72) αλλά και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη Erv1 μπορούσαν να εισαχθούν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα σε πειράματα εισόδου *in organello*. Συνεπώς, το

κομμάτι N72 μπορούσε να παραληφθεί χωρίς να είναι σημαντικό για την είσοδο της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο (Kallergi *et al*, 2012).

Για να μελετήσουμε συγκεκριμένα τον ρόλο του N72 κομματιού της Erv1 στην είσοδο της Erv1 στο οργανίδιο, προχωρήσαμε σε πείραμα εισόδου ραδιενεργού N72 σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Μετά απο ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση Tris-Tricine SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία, δε φάνηκε ραδιενεργό σήμα στα μιτοχόνδρια που να αντιστοιχεί στο κομμάτι N72 (~7kDa) (ακόμα και όταν χρησιμοποιήσαμε πέντε φορές περισσότερο υλικό για είσοδο), σε αντίθεση με την πλήρου μήκους Erv1 πρωτεΐνη, η οποία εισήχθη (ζώνη ~29kDa) όπως αναμένονταν (Εικόνα 28a).

Το παραπάνω αποτέλεσμα θα μπορούσε να σημαίνει ότι: (1) είτε δεν εισήχθη το ραδιενεργό N72 στα μιτοχόνδρια είτε (2) μπήκε στα μιτοχόνδρια αλλά παράλληλα



Εικόνα 28: Πείραμα εισότου του πεπτιδίου N72 της Erv1. Αυτοραδιογραφία μετά απο είσοδο του ραδιενεργού πεπτιδίου (a) N72 (συμβολίζεται με μπάρα) της Erv1 και (b) N72 με τρεις επιπλέον μεθειονίνες καρβοξυτελικά του. συγκριτικά με την είσοδο της ραδιενεργής αγρίου τύπου (wt) πρωτεΐνης σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα. Η επώαση των μιτοχονδρίων

με το ραδιενεργό υπόστρωμα σε κάθε περίπτωση διήρκησε 10 λεπτά και ακολουθήθηκε επεξεργασία των οργανιδίων με πρωτεάση (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι') (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2013b).

ακολούθησε άμεση αποικοδόμησή του, δεδομένου της μη δομημένης και επομένως ασταθής φύσης του. Και τα δύο σενάρια είναι πιθανά καθώς προσπάθειες για τον εντοπισμό του N72 σε κυτταρικό εκχύλισμα σακχαρομύκητα όπου εκφράζονταν σημασμένο με έξι ιστιδίνες καρβοξυτελικά της αλληλουχίας του (N72-His₆) δεν έδωσαν σαφές αποτέλεσμα.

Για να αποκλείσουμε την περίπτωση όπου το N72 ίσως δεν εντοπίζονταν επειδή δεν έφερε αρκετές ραδιοσημασμένες κυστεΐνες που θα επέτρεπαν την καλύτερη ανίχνευσή του, προσθέσαμε πέντε μεθειονίνες στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου για να ενισχύσουμε περισσότερο την ένταση του ραδιενεργού σήματος μετά απο αυτοραδιογραφία. Ούτε σε αυτήν την περίπτωση δε φάνηκε σήμα που να

αντιστοιχεί στο κομμάτι N72 ακόμα και όταν χρησιμοποιήσαμε πέντε φορές περισσότερη ποσότητα ραδιενεργού υποστρώματος συγκριτικά με την περίπτωση της αγρίου τύπου Erv1 (Εικόνα 28b).

2.3 Το αμινοτελικό μέρος της σουλφυδριλοζειδάσης Erv1/ALR φέρει πληροφορία στόχευσης για την μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη DHFR in organello

Για να απαντήσουμε στο αν το κομμάτι N72 φέρει πληροφορία στόχευσης της πρωτεΐνης Erv1 χρησιμοποιήσαμε τη μη μιτοχονδριακή αναγωγάση DHFR (dihydrofolate reductase) του ποντικού, η οποία απο μόνη της δεν φέρει πληροφορία εισόδου της στα μιτοχόνδρια (Eilers & Schatz, 1986). Εκφράζοντας το πεπτίδιο είτε αμινοτελικά είτε καρβοξυτελικά της πρωτεΐνης DHFR (παραγωγή χιμερικών πρωτεϊνών) με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA δημιουργήσαμε τα ραδιενεργά μόρια N72-DHFR και DHFR-N72 και εξετάσαμε την είσοδο τους σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα αγρίου τύπου μετά απο αυτοραδιογραφία.

Το παραπάνω πείραμα έδειξε ότι και το N72-DHFR αλλά και το DHFR-N72, εισάγονταν στα μιτοχόνδρια σε ποσοστό μικρότερο συγκριτικά με την περίπτωση εισόδου της αγρίου τύπου Erv1 (σύγκριση με Εικονα 28a) (Εικόνα 29, θέσεις 1-5 και θέσεις 11-13). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το N72 βοηθάει στη στόχευση του DHFR στο μιτοχόνδριο και στις δύο περιπτώσεις (είτε αμινοτελικά είτε καρβοξυτελικά του DHFR μορίου) και κατ'επέκταση στη στόχευση της Erv1 όσον αφορά την πλήρου μήκους πρωτεΐνη.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε το ρόλο του μονοπατιού MIA στην είσοδο του N72-DHFR στα μιτοχόνδρια. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν galMia40 μιτοχόνδρια στα οποία η έκφραση της ενδογενούς Mia40 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή γαλακτόζης και συνεπώς παρουσία γλυκόζης τα συγκεκριμένα μιτοχόνδρια του στελέχους δε φέρουν καθόλου Mia40 (αντίστοιχο του galErv1 στελέχους, βλέπε 'υλικά και μέθοδοι'). Μετά απο πείραμα εισόδου του ραδιενεργού N72-DFR στα galMia40 μιτοχόνδρια, η χιμερική πρωτεΐνη φάνηκε να εισάγεται όπως και στα αγρίου τύπου προηγουμένως (Εικόνα 29, θέσεις 6-10). Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι η Mia40 δεν απαιτείται για την είσοδο του N72-DHFR *in organello*, γεγονός που αναδεικνύει και υποστηρίζει ανεξάρτητα τον πολύ σημαντικό ρόλο της FAD-καταλυτικής περιοχής στο καρβοξυτελικό τμήμα της Erv1 για την αλληλεπίδρασή της με την οξειδορεδουκτάση, όπως συζητήθηκε στο κεφάλαιο Ι.

83

Επιπρόσθετα, ελέγχθηκε ο ρόλος του μεμβρανικού δυναμικού της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Δψ) στην είσοδο του ραδιενεργού N72-DHFR με αυτοραδιογραφία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η χημική ουσία valinomycin, η οποία αφαιρεί το μεμβρανικό δυναμικό σχηματίζοντας κανάλια διέλευσης ιόντων καλίου στην εσωτερική μεμβράνη που οδηγούν στην εκπόλωσή της. Αυτό που φάνηκε ήταν ότι το N72-DHFR μπορούσε να εισέλθει στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα χωρίς να εξαρτάται από το μεμβρανικό δυναμικό ζεικόνα 29, θέσεις 2-3 και 7-8).



Εικόνα 29: Αυτοραδιογραφία μετά απο SDS-PAGE ανάλυση του πειράματος εισόδου του χιμερικού πρωτεϊνικού μορίου N72-DHFR σε αγρίου τύπου και galMia40 μιτοχόνδρια και του DHFR-N72 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια για 10 λεπτά. Με αστερίσκο (*) συμβολίζεται η ζώνη ραδιενεργού σήματος που αφορά την εκάστοτε χιμερική πρωτεΐνη N72-DHFR / DHFR-N72. Το απορρυπαντικό Triton X-100 χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα εισόδου για να ελεγχθεί η δράση της πρωτεάσης, όπου σε κάθε περίπτωση φαίνεται ότι το μόριο μπορεί να αποικοδομηθεί και επομένως τα σήματα που φαίνονται αφορούν ειδικά την είσοδο των ραδιενεργών μορίων στα μιτοχόνδρια (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι') (τροποποιημένη εικόνα απο Banci *et al*, 2013b).

Επομένως, το παραπάνω αποτέλεσμα δείχνει ότι η είσοδος του N72 δεν σχετίζεται με τα κύρια μονοπάτια εισόδου πρωτεϊνών TIM23 (είσοδος στη μήτρα) και TIM22 (είσοδος στην εσωτερική μεμβράνη) τα οποία απαιτούν την ύπαρξη μεμβρανικού δυναμικού για τη σωστή τους λειτουργία αλλά ούτε και με το MIA μονοπάτι μέσω του οποίου εισέρχεται η πλήρους μήκους Erv1.

2.4 Υπομιτοχονδριακός εντοπισμός του πρωτεϊνικού μορίου N72-DHFR

Για να μελετήσουμε τον υπομιτοχονδριακό εντοπισμό του N72-DHFR, προχωρήσαμε σε μια σειρά πειραμάτων που θα μας επέτρεπαν να εξακριβώσουμε αν το ραδιενεργό αυτό πρόδρομο μόριο μετά την είσοδό του στα μιτοχόνδρια εντοπίζεται: (1) ως

υδατοδιαλυτό στη μήτρα ή το IMS των μιτοχονδρίων ή (2) βρίσκεται αγκυροβολημένο στην εξωτερική ή εσωτερική μεμβράνη των οργανιδίων. Προς αυτή την κατεύθυνση δημιουργήθηκαν και απομονώθηκαν μιτοπλάστες (μιτοχόνδρια χωρίς την εξωτερική μεμβράνη τους) μετά το πείραμα εισόδου του N72-DHFR σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα αγρίου τύπου, και πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο του μιτοχονδριακού υλικού για διαλυτοποίηση των δύο μεμβρανών (IM και OM) και απομόνωση της πρωτεΐνης απο εκεί σε περίπτωση που φέρονταν ως μεμβρανική (Εικόνα 30a).

Πιο συγκεκριμένα, το ραδιενεργό N72-DHFR εισήχθη στα μιτοχόνδρια που στη συνέχεια απομονώθηκαν για να επεξεργαστούν, με ήπιο ωσμωτικό σοκ, προς τη δημιουργία των μιτοπλαστών (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι') (Εικόνα 30a). Το ραδιενεργό σήμα φάνηκε να εντοπίζεται στο κλάσμα της πελέτας που προέκυψε (μιτοπλάστες) το οποίο εξαφανίζονταν μετά από επεξεργασία των μιτοπλαστών με πρωτεάση (τρυψίνη) (ζώνη ~29kDa) (Εικόνα 30b, θέσεις 4,5 έναντι 6,7). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το N72-DHFR δεν προστατεύονταν μέσα στη μήτρα αλλά εντοπίζονταν στο διαμεμβρανικό χώρο, οπότε κατα το πείραμα εισόδου του παραμένε υδατοδιαλυτό στο IMS. Ακόμα, η δεύτερη ραδιενεργή ζώνη που εμφανίστηκε κάτω απο τα 29kDa αφορούσε το DHFR κομμάτι στο υπερκείμενο (S) κατα την παραγωγή μιτοπλαστών και στην πελέτα (P) όντας ανθεκτικό σε πρωτεόλυση, σε αντίθεση με το κομμάτι N72-DHFR (Εικόνα 30b, θέσεις 4, 6 και 6,7).

Απο την άλλη πλευρά τα πειράματα εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο και επακόλουθη φυγοκέντρηση του υλικού έδειξαν ότι το ραδιενεργό σήμα του N72-DHFR εντοπίζονταν στο υπερκείμενο και όχι στο κλάσμα της πελέτας, γεγονός που σημαίνει ότι το χιμερικό αυτό μόριο δεν είναι προσδεδεμένο στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Εικόνα 30b, θέσεις 11,12).

Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι ενδογενών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, με τα οποία μπορούμε να ελέγξουμε την ακεραιότητα των υπομιτοχονδριακών χώρων και τη διαδικασία κλασμάτωσης, επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα των παραπάνω πειραματικών διαδικασιών (δημιουργία μιτοπλαστών και εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο). Ακόμα, η πρωτεΐνη Su9-DHFR, η οποία στοχεύεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου εξαρτώμενη απο το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης, χρησιμοποιήθηκε ως θετικό πείραμα ελέγχου και των δύο παραπάνω διαδικασιών.

85



Εικόνα 30: Υπομιτογονδριακός εντοπισμός του πρωτεϊνικού μορίου N72-DHFR (a) Πειραματική διαδικασία παραγωγής μιτοπλαστών και διαλυτοποίησης μιτοχονδριακών μεμβρανών μετά απο εκχύλιση με αναθρακικό νάτριο (b) Αυτοραδιογραφία μετά απο SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση σε μεμράνη νιτροκυτταρίνης των δειγμάτων του υπομιτοχονδριακού εντοπισμού του N72-DHFR μετά από είσοδό του σε απομονωμένα μιτοχόνδρια με επακόλουθο ωσμωτικό σοκ για τη δημιουργία μιτοπλαστών (αριστερά) και εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο (δεξιά). Σε όλα τα δείγματα, προστέθηκε πρωτεϊνάση Κ στο τέλος της αντίδρασης σε συγκέντρωση 20 μg/ml τα οποία στη συνέχεια απομονώθηκαν ξανά με φυγοκέντρηση πριν τη δημιοργία μιτοπλαστών ή την εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο. Οι συμβολισμοί της εικόνας ερμηνέύονται ως εξής: Μ, για μιτοχόνδρια, S, για το υπερκείμενο της διαδικασίας εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο και Ρ, για τη πελέτα που προκύπτει απο την ίδια διαδικασία, Δψ, για το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μιτογονδριακής μεμβράνης, Trypsin, για την επεξεργασία του μιτοχονδριακού δείγματος μετά την είσοδο του ραδιενεργού N72-DHFR μορίο, με τρυψίνη εξωτερικά ή επεξεργασία με την πρωτεάση κατα τη διάρκεια της δημιουργίας των μιτοπλαστών και Triton, για το απορρυπαντικό Triton X-100 που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της δράσης της πρωτεάσης (πρωτεϊνικό μόριο που έχει χρησιμοποιηθεί σεένα πλήθος πειραμάτων εισόδου κυρίως πρωτεϊνών που στοχεύονται στη μήτρα των μιτοχονδρίων) (τροποποιημένη εικόνα απο (Banci et al, 2013b).

2.5 Μελέτη των δομικών υποπεριοχών N72 και ΔN72 της Erv1 όσον αφορά τη στόχευση του μορίου στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα

Απο τα αποτελέσματα αυτού και του πρώτου κεφαλαίου, η πρωτεΐνη Erv1 φαίνεται να φέρει δύο διαφορετικά σήματα στόχευσης στην αμινοξική της αλληλουχία. Το ένα εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα της, ΔΝ72 (αμινοξέα 73-189), το οποίο αναγνωρίζεται από το οξειδωμένο CPC μοτίβο της Mia40 και το άλλο στο αμινοτελικό τμήμα, N72 (αμινοξέα 1-72), το οποίο μπορεί να εισάγει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα χωρίς να εμφανίζεται εξάρτηση απο το μονοπάτι MIA. Επειδή και τα δύο αυτά σήματα εντοπίζονται στην πλήρου μήκους Erv1 προσπαθήσαμε να καταλάβουμε το ρόλο τους στη στόχευση του DHFR μορίου όταν αυτά δρουν ταυτόχρονα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την Erv1 σε σύντηξη με το DHFR ανοδικά ή καθοδικά του. Μετά την είσοδο των ραδιενεργά εκφρασμένων *in vitro* χιμερικών πρωτεϊνων Erv1-DHFR και DHFR-Erv1 σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια το αποτέλεσμα της αυτοραδιογραφίας



Εικόνα 31: Αυτοραδιογραφία μετά απο πείραμα εισόδου των Erv1-DHFR (θέσεις 1-4) και DHFR-Erv1 (θέσεις 5-8) σε απομονωμένα αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Το DHFR μέρος της εκάστοτε χιμερικής πρωτεΐνης συμβολίζεται με μπάρα. Οı παρακάτω συμβολισμοί έχουν ως εξής: Μ: μιτογόνδρια απομονωμένα μετά απο το πείραμα εισόδου, Sup: υπερκείμενο μετά απο την είσοδο των πρωτεϊνών και πελετάρισμα των μιτοχονδρίων, ΤΧ: μιτοχονδριακή πελέτα που διαλυτοποιήθηκε με χρήση του απορρυπαντικού Triton X-100 μετά απο είσοδο των πρωτεϊνών

και επεξεργασίας του μιτοχονδριακού δείγματος με πρωτεάση, PK: μιτοχόνδρια επεξεργασμένα πρωτεάση K. Οι χιμερικές πρωτεΐνες Erv1-DHFR ή DHFR-Erv1 συμβολίζονται με αστερίσκο (*) (Banci *et al*, 2013b).

έδειξε ότι η είσοδος του Evr1-DHFR (Εικόνα 31, θέσεις 1-4) ή του DHFR-Erv1 (Εικόνα 31, θέσεις 5-8) επηρεάστηκε συγκριτικά με την είσοδο του αγρίου τύπου Erv1 εμφανίζοντας είσοδο περίπου 20 φορές χαμηλότερη (Εικόνα 31, θέσεις 2, 6 συγκριτικά με την εικόνα 28a). Αυτό δείχνει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν και τα δύο μέρη της πρωτεΐνης Erv1 στη στόχευσή της στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα, καθώς κάθε φορά το DHFR κομμάτι εμπόδιζε την προσβασιμότητα του N72 ή ΔN72 μέρους πρρος το οργανίδιο (Εικόνα 31, θέσεις 3 και 7).

Αντίστοιχα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για τα χιμερικά μόρια ΔΝ72-DHFR και DHFR-ΔΝ72 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια αλλά και πειράματα επώασης των Erv1-DHFR και DHFR-Erv1 μορίων με τη χημική ουσία methotrexate η οποία προκαλεί αναδίπλωση του DHFR μέρους κρατώντας το εκάστοτε μόριο στο εξωτερικό των μιτοχονδρίων αγκυροβολώντας το κατα την είσοδό του στο μιτοχόνδριο διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης (Eilers & Schatz, 1986). Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων επιβεβαίωσαν τη σημασία και των δύο κομματιών N72 και ΔN72 στο μόριο Erv1 και έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή *in vivo* συνδυάζει το βοηθητικό ρόλο του αμινοτελικού της άκρου και τον κρίσιμο ρόλο του καρβοξυτελικού που αναγνωρίζεται ειδικά απο τη Mia40. Τέλος, δεδομένου της ομοιότητας των N72 και N80 που εμφανίζουν όσον αφορά τη δομή τους και τη λειτουργία τους αλλά και των Erv1 και ALR πρωτεϊνών υποθέτουμε ότι τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να ισχύουν και για την ανθρώπινη πρωτεΐνη.

Τέλος, για να μελετήσουμε, το ρόλο του N72 in vivo, κλωνοποιήσαμε τις παρακάτω μορφές χιμερικών πρωτεϊνών: N72-DHFR, DHFR-N72, N72, DHFR, N80 και Su9-DHFR στον πλασμιδιακό φορέα pRS316up40. Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω κασέτες μετασχηματίσαμε με αυτές κύτταρα σακχαρομύκητα αγρίου τύπου και στη συνέχεια προετοιμάσαμε τα αντίστοιχα κυτταρικά εκχυλίσματα και πραγματοποιήσαμε απομονώσεις μιτοχονδρίων για να ταυτοποιήσουμε την κυτταρική τοπολογία του κάθε μορίου με αντίσωμα α-DHFR ή α-Erv1. Ενώ η παρασκευή του κατάλληλου υλικού προς ανάλυση πραγματοποιήθηκε χωρίς πρόβλημα, το αποτέλεσμα που προέκυψε δεν ήταν ξεκάθαρο για να διελευκάνουμε το παραπάνω ζήτημα και *in vivo*.

2.6 Μελέτη της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης των Erv1-Mia40 χρησιμοποιώντας συστοιχία ακινητοποιημένων πεπτιδίων

Στην προσπάθειά μας να ταυτοποιήσουμε τα τμήματα της Erv1 που αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη Mia40 και κατα το στάδιο που η Erv1 φέρεται ως υπόστρωμα αλλά και κατά το στάδιο που η αναδιπλωμένη Erv1 επανοξειδώνει τη Mia40, ακολουθήσαμε μία εντελώς ανεξάρτητη προσέγγιση του ερωτήματος, αυτή της χρήσης συστοιχίας ακινητοποιημένων πεπτιδίων.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ειδική μεμβράνη που έφερε ακινητοποιημένη την Erv1 πρωτεΐνη σε εξήντα 13-μερή πεπτίδια (τα οποία αλληλεπικαλύπτονταν μεταξύ τους ανά 10 αμινοξέα) (βλέπε 'υλικά και μέθοδοι'). Η μεμβράνη ακινητοποιημένων πεπτιδίων της Erv1 επωάστηκε με καθαρισμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ΔN290Mia40 (Banci *et al*, 2009a) και στη συνέχεια ακολούθησε μεταφορά της σε μεμβράνη PVDF και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-Mia40 για την ανίχνευση των πεπτιδίων στα οποία προσδέθηκε (Εικόνα 32).

Το αποτέλεσμα της διαδικασίας έδειξε ότι η πρωτεΐνη Mia40 προσδένεται επιλεκτικά σε περιοχή γύρω από τα τρία κυστεϊνικά ζευγάρια C30/33, C130/133 και C159/176 της Erv1 (Εικόνα 33a και Πίνακας 2). Η πρώτη περιοχή της Erv1, που φάνηκε να αλληλεπιδρά με τη Mia40, ήταν η αμινοτελική περιοχή της. Αυτή περιλάμβανε το CRSC μοτίβο μέσω του οποίου γίνεται η επανοξείδωση της Mia40 (κεφάλαιο II) (Banci *et al*, 2011a) και αντιστοιχεί στην περιοχή του N80 που φάνηκε να είναι περισσότερο δομημένη (αμινοξέα 61-79) εικόνας 26 με τάση σχηματισμού αέλικας και προστασίας απο το διαλύτη. Η δεύτερη ήταν η περιοχή του ενεργού κέντρου



Εικόνα 32: Διαγραμματική απεικόνιση της δοκιμασίας πρόσδεσης της πρωτεΐνης Mia40 πάνω στη μεμβράνη ακινητοποιημένων πεπτιδίων της πρωτεΐνης Erv1 (α) Η μεμβράνη των πεπτιδίων της Erv1 επωάζεται με την καθαρισμένη εκφρασμένη σε βακτήρια ΔΝ290Mia40 και στη συνέχεια (β) μεταφέρεται σε μεμβράνη PVDF για ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-Mia40 και δευτερογενές α-rabbit.

όπου προσδένεται το FAD η οποία βρέθηκε στην περίπτωση της ALR να αλληλεπιδρά με τη Mia40 μέσω NMR (κεφάλαιο II) και η τρίτη ήταν καθοδικά της δομικής κυστεΐνης C159, στο καρβοξυτελικό μέρος της Erv1, η οποία με πειράματα εισόδου και πειράματα πρόσδεσης των Erv1-Mia40 *in vitro* φάνηκε να προσδένεται ομοιοπολικά πάνω στη Mia40 κατα την είσοδο της Erv1 στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα.



Εικόνα 33: Ανοσοαποτύπωση με α-Mia40 της συστοιχίας ακινητοποιημένων πεπτιδίων της Erv1 για την εύρεση των περιοχών του Erv1 πρωτεϊνικού μορίου που αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με τη Mia40. (a) Πρόσδεση της αγρίου τύπου ΔΝ290Mia40 και (b) πρόσδεση του εξαπλού υδρόφοβου μεταλλάγματος LMFFFM/A της Mia40 πάνω στη συστοιχία πεπτιδίων. Σε κάθε περίπτωση (a ή b) στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται η μεμβράνη των Erv1 πεπτιδίων, με εμφανές το σήμα αυτών που αλληλεπιδρούν με τη Mia40 και στο κάτω μέρος το ιστόγραμμα που προέκυψε μετά απο τη σχετική ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος/αλληλεπίδρασης (Image Quant 5.2). Επίσης, παρουσιάζονται και τα κυστεϊνικά ζεύγη της Erv1 (ακραίο ζεύγος CX₂C, ζεύγος κυστεϊνών ενεργού κέντρου CX₂C και δομικό ζεύγος CX16C) πάνω απο το εκάστοτε ιστόγραμμα (Banci *et al*, 2013b).

Peptide number in	Peptide sequence	Number of amino acid	Cysteines present
pepscan array			
11	RSSNTLLDFQYVT	31-43	C33
39	GEMKQFLNIFSHI	115-127	
40	KQFLNIFSHIYPS	118-130	C130
44	SNWSAKDFEKYIR	130-142	C130 & C133
57	LRKPKFDSNFWEK	169-181	C176

58	PKFDSNFWEKRWK	172-184	C176

Πίνακας 2: Παρουσίαση των 13-μερών πεπτιδίων της πρωτεΐνης Erv1 που εμφάνισαν την ισχυρότερη πρόσδεση με τη πρωτεΐνη ΔΝ290Mia40 αγρίου τύπου (περιλαμβάνονται μόνο αυτά που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ένταση, >1000 arbitary units). Για κάθε πεπτίδιο εμφανίζεται ο αριθμός της θέσης του πάνω στη συστοιχία πεπτιδίων, η αμινοξική του αλληλουχία, ο αριθμός του πρώτου και τελευταίου αμινοξέος (αρχή και τέλος πεπτιδίου), καθώς και οι κυστεΐνες της Erv1 που τυχόν περιλαμβάνονται.

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε το υδρόφοβο εξαπλό μετάλλαγμα της Mia40, ΔΝ290Mia40LMFFFM/A όπου η κοιλότητα πρόσδεσης υποστρωμάτων σε αυτήν την περίπτωση φέρει υδρόφοβες μεταλλάξεις σε αλανίνη που δεν επιτρέπουν την πρόσδεσή τους στην περιοχή (Banci *et al*, 2009a). Στην περίπτωση αυτή η πρόσδεση της μεταλλαγμένης Mia40 πάνω στα πεπτίδια της Erv1 δε φάνηκε να συμβαίνει (Εικόνα 33b), γεγονός που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των δύο προηγούμενων κεφαλαίων, όπου η αλληλεπίδραση της Erv1/ALR φάνηκε να συμβαίνει στην υδρόφοβη κοιλότητα της Mia40 τόσο κατά την είσοδο της Erv1/ALR στο μιτοχόνδριο όσο και κατα την επανοξείδωση της Mia40 απο την Erv1/ALR μέσω του μηχανισμού μίμησης υποστρώματος.

3.Σύνοψη κεφαλαίου

Στο τρίτο αυτό κεφάλαιο, μελετήθηκε το εγγενώς αποδιαταγμένο αμινοτελικό άκρο της σουλφυδριλοξειδάσης Erv1/ALR, N72 και N80, αντίστοιχα, όσον αφορά τη διαμόρφωσή του στο χώρο *in vitro* και των δομικών αλλαγών που αποκτά στις δύο οξειδοαναγωγικές καταστάσεις των κυστεϊνών του (N80_{SS}/N80_{SHSH}). Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο ρόλος του στην πλήρους μήκους Erv1 όπου φάνηκε να είναι υπεύθυνο για την στόχευση της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα *in vivo*.

Τα αποτελέσματα στα οποία καταλήξαμε έδειξαν ότι: (α) το αμινοτελικό N80/N72 είναι εγγενώς αποδιαταγμένο με δύο υπο-περιοχές περισσότερο δομημένες με τάση σχηματισμού α-ελικοειδούς δομής, (β) η οξείδοαναγωγή του CRAC μοτίβου αλλά και η αλληλεπίδρασή του με τη Mia40 δεν φαίνεται να επηρεάζει τη γενικότερη ξεδίπλωτη κατάσταση του N80 στην οποία παραμένει, παρα μόνο τις κυστεΐνες του CRAC μοτίβου οι οποίες οξειδώνονται και (γ) το ίδιο κομμάτι στην Erv1 είναι ικανό να στοχεύσει μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στο διαμεμβρανικό χώρο *in organello*. Οπότε για την στόχευση και είσοδο της πλήρους μήκους Erv1 (Εικόνα 34) στο μιτοχόνδριο φαίνεται να απαιτείται τόσο το αμινοτελικό τμήμα (ρόλος στη στόχευση



Εικόνα **34**: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου του αμινοτελικού άκρου της Erv1/ALR στόχευση-βιογένεση στην της Erv1/ALR πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια και στην επανοξείδωση Mia40. Με μπλέ της χρώμα συμβολίζεται η ALR πρωτεΐνη με τις δύο κυστεΐνες του CRAC μοτίβου της να είναι σε ανηγμένη κατάσταση στο αμινοτελικό κομμάτι της. Με μωβ γρώμα συμβολίζεται το σύμπλοκο ΤΟΜ της ΟΜ του μιτογονδρίου και με κίτρινο η ΜΙΑ40 όπου φέρει το CPC μοτίβο της σε ανηγμένη κατάσταση. Δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται απο το ανηγμένο CPC προς το οξειδωμένο CRAC μοτίβο της ενζυμικά λειτουργικής ALR, για την ανακύκλωση της ΜΙΑ40 τελικά στο διαμεμβρανικό χώρο (IMS) (Banci et al, 2013b).

της πρωτεΐνης στην εξωτερική επιφάνεια του μιτοχονδρίου) όσο και το καρβοξυτελικό μέρος της πρωτεΐνης (για την οξείδωσή του απο τη Mia40) (βλέπε επίσης κεφάλαιο Ι). Συνεπώς, η οξειδοαναγωγική κατάσταση του CRAC μοτίβου θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σημαντικό παράγοντα για τη διάκριση των δύο λειτουργικών ρόλων της Erv1/ALR: τη στόχευση της πρωτεΐνης απο το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο (όταν το CRSC/CRAC μοτίβο του αμινοτελικού άκρου βρίσκεται σε ανηγμένη κατάσταση) και την αλληλεπίδρασή της με την Mia40 για την οξείδωση του CPC μοτίβου της στο διαμεμβρανικό χώρο (CRSC/CRAC σε οξειδωμένη κατάσταση).

Το αμινοτελικό κομμάτι της Erv1/ALR βρέθηκε να είναι αρκετά μη δομημένο ακόμα και μετά την οξείδωσή του. Αυτό το γεγονός ισχύει στα πλαίσια της πλήρους μήκους πρωτεΐνης και όχι μόνο όταν το αμινοτελικό πεπτίδιο βρίσκεται μόνο του σε διάλυμα. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα τυπικά υποστρώματα της Mia40 τα οποία οξειδώνονται και αναδιπλώνονται πλήρως απο την οξειδορεδουκτάση. Το αμινοτελικό N80 απο την άλλη παραμένει σε ξεδίπλωτη κατάσταση πιθανώς για να είναι ικανό να αλληλεπιδρά τόσο με τη Mia40 όσο και ενδομοριακά του ALR διμερούς με το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης για μεταφορά των ηλεκτρονίων στο FAD (βλέπε κεφάλαιο II) γεγονός που υποστηρίζει την αναγκαιότητά του να παραμένει αποδιαταγμένο. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί η συμμετοχή ενός τέτοιου εγγενώς ξεδίπλωτου κομματιού (intrinsically disordered domain, IDD) στην στόχευση πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο αν και πολλές πρωτεΐνες έχουν βρεθεί (και με NMR και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X) να περιέχουν περιοχές εγγενώς αποδιαταγμένες (Bertini *et al*, 2011; de Marcos-Lousa *et al*, 2006; Kjaergaard & Poulsen, 2011; Schwarzinger *et al*, 2001). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν η υπομονάδα Tom70 του TOM συμπλόκου που περιέχει συγκεκριμένα μοτίβα υπεύθυνα για την πρόσδεση μιας πληθώρας υποστρωμάτων που χρησιμοποιούν το TIM22 μονοπάτι (Beddoe *et al*, 2004) για την εισαγωγή τους στα μιτοχόνδρια καθώς και το καρβοξυτελικό κομμάτι της υπομονάδας Tom22, του ίδιου συμπλόκου, το οποίο προβάλλεται στο IMS (Perry & Lithgow, 2005). Και στις δύο περιπτώσεις οι πρωτεΐνες φαίνονται να είναι ξεδίπλωτες τοπικά και με περιορισμένη δομή σε συγκεκριμένες περιοχές αμινοξέων, ενώ οι περιοχές αυτές εμφανίζονται περισσότερο δομημένες όταν προσδένονται σε αυτές πρωτεΐνες οι οποίες με αυτόν τον τρόπο απελευθερώνονται για την είσοδό τους στο μιτοχόνριο (Tompa, 2002).
ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ:

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Ο διαμεμβρανικός χώρος του μιτοχονδρίου (IMS), φέρει μία ποικιλία διαφορετικών πρωτεϊνών που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς στη δομή τους. Πρόσφατα, ένα σύστημα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών στο υπομιτογονδριακό αυτό διαμέρισμα έχει ταυτοποιηθεί (μονοπάτι MIA) στο οποίο οι Mia40 και Erv1 πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο για τη βιογένεση του μιτοχονδρίου. Αυτό το σύστημα οξειδοαναγωγικών αλληλεπιδράσεων οδηγεί την είσοδο πρόδρομων υποστρωμάτων που περιέχουν συντηρημένα μοτίβα κυστεϊνών (τύπου CX3C και CX9C), στο IMS, παγιδεύοντάς τα εκεί μέσω της οξειδωτικής τους αναδίπλωσης. Εκτενής μελέτη έχει γίνει πάνω στο μηχανισμό αναγνώρισης των τυπικών υποστρωμάτων CX3/9C απο τη Mia40. Κατα γενική ομολογία, το μοντέλο που προτείνεται κάθε φορά, είναι ότι τα υποστρώματα αρχικά αναγνωρίζονται απο το CPC ενεργό κέντρο της Mia40 η οποία τα αναδιπλώνει οξειδωτικά, ενώ ο ρόλος της Erv1 (Erv1^{act}) είναι να αναγνωρίσει και να οξειδώσει με τη σειρά της το ενεργό κέντρο της οξειδορεδουκτάσης, το οποίο ανάγεται μετά την αλληλεπίδραση Mia40-υποστρώματος (Lionaki et al, 2010; Sideris & Tokatlidis, 2010). Επιπρόσθετα, η σουλφυδριλοξειδάση Erv1 αποτελεί υπόστρωμα της Mia40 (Erv1^{sub}) αλληλεπιδρώντας μαζί της για την είσοδό της και την σωστή αναδίπλωσή της στο IMS (Gabriel et al, 2007; Kallergi et al, 2012; Terziyska et al, 2007).

Στην παρούσα διατριβή, επικεντρωθήκαμε στη Mia40-Erv1 αλληλεπίδραση όταν η Erv1^{sub} αναγνωρίζεται απο τη Mia40 ως υπόστρωμα του μονοπατιού MIA (στάδιο A) και όταν η Erv1^{act} όντας αναδιπλωμένη στο διαμεμβρανικό χώρο, δρα πάνω στη Mia40 για να την ανακυκλώσει πίσω στην ενεργή της μορφή (στάδιο B). Τα αποτελέσματά μας, έδειξαν ότι καθένα από τα δύο στάδια οδηγείται από διαφορετικές υποπεριοχές της Erv1 πρωτεΐνης. Η επανοξείδωση της Mia40 μεσολαβείται άμεσα και αποκλειστικά από το αμινοτελικό άκρο της Erv1^{act} και συγκεκριμένα απο το (ακραίο) 'ζεύγος κίνησης' κυστεϊνών της (Bien et al, 2010; Grumbt et al, 2007; Lionaki et al, 2010). Πιο αναλυτικά, μία ειδική αλληλουχία 12 αμινοξέων που φέρει το αμινοτελικό άκρο της Erv1^{act}, προσδένεται στη Mia40 μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ακολουθώντας το μηχανισμό πρόσδεσης των τυπικών υποστρωμάτων της (Banci et al, 2011a). Απο την άλλη πλευρά, η επικράτεια στην οποία προσδένεται το FAD και πιο συγκεκριμένα οι δομικές κυστεΐνες του καρβοξυτελικού μέρους της Erv1^{sub} απαιτούνται για την είσοδο της πρωτεΐνης μέσω της Mia40 στο μιτογόνδριο (Kallergi et al, 2012). Ακόμα το αμινοτελικό μέρος της Erv1 (N72) φάνηκε να είναι ξεδίπλωτο και στις δύο οξειδωτικές καταστάσεις του και να παίζει βοηθητικό ρόλο στη στόχευση της πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο καθώς μπορεί να εισάγει στο IMS μη μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που βρίσκονται συνδεδεμένες αμινοτελικά ή καρβοξυτελικά του, σε αυτό (Banci *et al*, 2013b).

Τα αποτελέσματα στα οποία καταλήξαμε φαίνεται να οδηγούν στην παρακάτω πορεία λειτουργίας του Erv1/ALR πρωτεϊνικού μορίου απο τη στιγμή της σύνθεσής του έως την κατάληξή του στο διαμεμβρανικό χώρο: (1) Η Erv1^{sub} κωδικοποιείται απο το πυρηνικό DNA και συντίθεται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος, (2) η πληροφορία στόχευσής της στο μιτοχόνδριο φαίνεται να είναι διπλή και να βρίσκεται στο αμινοτελικό της μέρος (N72/N80 για την Erv1/ALR, αντίστοιχα) αλλά και σε ένα κομμάτι 43 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό της τμήμα τα οποία αναγνωρίζονται ειδικά απο τη Mia40 κατα την είσοδο του Erv1/ALR^{sub} υποστρώματος διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (σύμπλοκο TOM), (3) η είσοδος και αλληλεπίδραση της Erv1/ALR^{sub} με τη Mia40 προσδίδει τους κατάλληλους δισουλφιδικούς δεσμούς για την αναδίπλωσή της, με το FAD να προσδένεται σε ένα δεύτερο στάδιο, για τη δημιουργία επιπρόσθετων δεσμών στην τελική δομή της πρωτεΐνης και τέλος (4) η δράση της Erv1/ALR^{act} μέσω του αμινοτελικού της μέρους πάνω στην Mia40 είναι απαραίτητη για την ανακύκλωση του ενεργού κέντρου της οξειδορεδουκτάσης, το οποίο ανάγεται σε κάθε κύκλο αλληλεπίδρασής της με το εκάστοτε νεο-εισαχθέν υπόστρωμα.

Ωστόσο, υπάρχουν αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την στόχευση της πρωτεΐνης Erv1/ALR στο μιτόχονδριο σε κυτταρικό επίπεδο, όπως για παράδειγμα η πιθανή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με σαπερόνες του κυτταροπλάσματος και η αλληλεπίδρασή της με τους υποδοχείς του ΤΟΜ συμπλόκου για την είσοδο του μορίου στο IMS. Τα τυπικά μιτοχονδριακά υποστρώματα που στοχεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο, χρειάζεται να είναι σε μία ανηγμένη και ξεδίπλωτη κατάσταση (Lu et al, 2004b; Lutz et al, 2003; Morgan & Lu, 2008). Πιο συγκεκριμένα, για τα μικρά Tim έχει βρεθεί ότι ιόντα ψευδαργύρου τα διατηρούν στην κατάλληλή τους διαμόρφωση, χωρίς όμως να είναι γνωστό αν τα ιόντα αυτά απομακρύνονται πριν την είσοδό τους στο IMS ή εισέρχονται μαζί με το υπόστρωμα στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου (Mesecke et al, 2008). Πρόσφατα βρέθηκε ότι και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν την είσοδο μιτοχονδριακών υποστρωμάτων απο το κυτοσόλιο προς το οργανίδιο όπως το σύστημα της θειορεδοξίνης (Durigon et al, 2012). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η είσοδος των υποστρωμάτων του IMS ρυθμίζεται και απο το σύστημα του πρωτεασώματος-ουβικουιτίνης του κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα, κατα το στάδιο πριν την είσοδό τους τα συγκεκριμένα υποστρώματα σε ένα μεγάλο ποσοστό τους πέπτονται και απομακρύνονται, κάτω απο φυσιολογικές συνθήκες, με αποτέλεσμα αυτό να επηρεάζει αρνητικά την είσοδό τους στο οργανίδιο καθορίζοντας τα επίπεδα τους στο διαμεμβρανικό χώρο (Bragoszewski *et al*, 2013). Κατα πόσον η Erv1/ALR μπορεί να επηρεάζεται επίσης απο τους παραπάνω παράγοντες για τη στόχευσή της και την είσοδό της στο μιτοχόνδριο, παραμένει άγνωστο καθώς δεν υπάρχουν ακόμα σχετικά δημοσιευμένα αποτελέσματα.

Μέχρι σήμερα, δεν είναι γνωστό αν η είσοδό της Erv1/ALR γίνεται συν- ή μετα-μεταφραστικά. Στην πλειοψηφία τους, όμως, οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται απο το πυρηνικό γονιδίωμα στοχεύονται μετα-μεταφραστικά και η δράση σαπερονών του κυτταροπλάσματος έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρησή τους σε μια αποδιαταγμένη δομή που επιτρέπει την είσοδό τους στο οργανίδιο. Παρ'όλα αυτά, ο ρόλος των κυττοσολικών σαπερονών στην είσοδο των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών του IMS παραμένει άγνωστος. Καθώς το αμινοτελικό μέρος της Erv1/ALR (N72/N80) βρέθηκε να είναι αποδιαταγμένο και γνωρίζοντας ότι στον άνθρωπο μόνο η If-ALR εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και όχι η sf-ALR που το κομμάτι αυτό απουσιάζει, είναι πιθανή η αλληλεπίδρασή του μέρους αυτού της πρωτεΐνης με σαπερόνες, όπως η Hsp70 (Heat <u>s</u>hock <u>protein 70</u>kDa) (ή <u>S</u>tress-<u>s</u>eventy <u>s</u>ubfamily <u>A</u>, Ssa1) (Young *et al*, 2003a). Στο σακχαρομύκητα η Hsp70 έχει βρεθεί να διευκολύνει την είσοδο και των πρωτεϊνών που προορίζονται για τη μήτρα ή την IM προστατεύοντας τες απο λανθασμένη αναδίπλωση και δημιουργία συσσωματωμάτων (Becker *et al*, 1996; Deshaies *et al*, 1988; Murakami *et al*, 1988; Young *et al*, 2003b).

Προσεγγίζοντας το παραπάνω ερώτημα για την πιθανή αλληλεπίδραση της Erv1 πρωτεΐνης του σακχαρομύκητα με σαπερόνες κατα την στόχευσή της στο μιτοχόνδριο, χρησιμοποιήσαμε την καθαρισμένη ανασυνδυασμένη σαπερόνη Hsp70/Ssa1 για την πρόσδεσή της σε συστοιχία πεπτιδίων της Erv1 (ομοίως με την περίπτωση της Mia40 πρόσδεσης, κεφάλαιο III) (Εικόνα 35). Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν τις δύο πρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν στις αντίστοιχες περιοχές της Mia40-Erv1 πρόσδεσης οι οποίες περιλαμβάνουν τα τρία κυστεϊνικά μοτίβα της Erv1 (C30/33, C130/133 και C159/176). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη δράση σαπερόνης που έχουν και η Ssa1 αλλά και η Mia40 σε κάθε περίπτωση. Ωστόσο, επιπρόσθετα πειράματα *in vitro* και *in vivo* θα προσθέσουν πληροφορία για τη βιογένεση της Erv1/ALR πρωτεΐνης και επομένως για τη λειτουργία του μονοπατιού MIA. Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, το σύμπλοκο TOM δρα ως γενική πύλη εισόδου των υποστρωμάτων που τελικά καταλήγουν στο IMS. Αυτό έχει φανεί για την περίπτωση της Erv1 (Terziyska *et al*, 2007) αλλά και για άλλα μιτοχονδριακά υποστρώματα με πειράματα όπου εμποδίζονταν κάθε φορά η είσοδος της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα *in organello*, από μεγάλα ποσά πρωτεΐνικών



Εικόνα 35: Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Erv1 και Ssa1. Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-Ssa1 της PVDF μεμβράνης στην οποία μεταφέρθηκε η Ssa1 (Hsp70) πρωτεΐνη η οποία προσδένεται σε συγκεκριμένα πεπτίδια της Erv1 πρωτεΐνης στη συστοιχία πεπτιδίων.

υποστρωμάτων που στοχεύονταν στη μήτρα του μιτοχονδρίου τα οποία εμπόδιζαν μεσω ανταγωνισμού την πρόσδεσή και διέλευσή τους μέσω του TOM (Lutz et al, 2003). Για την περίπτωση της Erv1, οι Terziyska et al, ακολούθησαν την παραπάνω πειραματική προσέγγιση για το χαρακτηρισμό της Erv1 ως υπόστρωμα της Mia40, χρησιμοποιώντας τη χιμερική πρωτεΐνη Su9-DHFR όπου και οι δύο εισέρχονται στο μιτοχόνδριο μέσω του TOM συμπλόκου (Terziyska et al, 2007). Το σύμπλοκο TOM αποτελείται απο τις υπομονάδες Tom20, 22, 70, 5, 6, και 7. Η υπομονάδα Tom70 παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση και είσοδο μιτοχονδριακών υποστρωμάτων που ακολουθούν το TIM22 μονοπάτι μεταφοράς, τα οποία φέρουν εσωτερικά της αλληλουχίας τους κατάλληλα σήματα στόχευσης (Hines et al, 1990; Sollner et al, 1990). Απο την άλλη πλευρά, η υπομονάδα Tom20, επίσης έχει βρεθεί να συμμετέχει στην στόχευση πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο οι οποίες ακολουθούν το μονοπάτι TIM23 και φέρουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα στο αμινοτελικό τους άκρο ως σήματα στόχευσης (Brix et al, 1997; Kurz et al, 1999; Ramage et al, 1993; Sollner et al, 1989).

Καθώς για την περίπτωση της Erv1^{sub} δεν έχει μελετηθεί ειδικά η αλληλεπίδρασή της με το TOM σύμπλοκο, πραγματοποιήσαμε πειράματα εισόδου σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σακχαρομύκητα τα οποία είχαν επεξεργαστεί προηγουμένως με πρωτεάση (τρυψίνη) η οποία πέπτει ειδικά τους υποδοχείς Tom20, 22 και 70 αλλά αφήνει ανέπαφη την Tom5 υπομονάδα (Kurz *et al*, 1999). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας του συμπλόκου TOM έχει βρεθεί να είναι εκείνος μέσω του οποίου τα μικρά Tims αναγνωρίζουν το σύμπλοκο TOM για την είσοδό τους στο

98

IMS (Kurz et al, 1999). Ελέγχοντας τη διαδικασία με ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τις συγκεκριμένες υπομονάδες (για επιβεβαίωση της πέψης τους) και με πειράματα εισόδου στη συνέχεια ειδικών ραδιενεργών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούν τους παραπάνω υποδοχείς (AAC2 που αναγνωρίζεται μέσω του Tom70 και Su9-DHFR που αναγνωρίζεται μέσω του Tom20) προχωρήσαμε στην εξέταση της αλληλεπίδρασης Erv1-TOM (Εικόνα 36). Τα μέχρι τώρα δεδομένα, δείχνουν ξεκάθαρα ότι η Erv1 δεν εξαρτάται απο τον υποδοχέα Tom5, όπως συμβαίνει με τα μικρά Tims, αλλά σίγουρα απο κάποιο άλλο υποδοχέα ο οποίος είναι ευαίσθητος σε τρυψίνη και πέπτεται (Tom20, 22, 70). Επιπρόσθετα πειράματα προς αυτήν την κατεύθυνση, όπως για παράδειγμα, η χρησιμοποίηση ειδικών στελεχών του σακχαρομύκητα (Tom20Δ και Tom70Δ) (Kurz et al, 1999), απο τα οποία απουσιάζουν οι υποδοχείς Tom20 και Tom70, θα βοηθούσαν στη μελέτη της βιογένεσης της Erv1, και στην ολοκλήρωση του μοντέλου της αλληλεπίδρασης Mia40/Erv1 γενικότερα.



Εικόνα 36: Η είσοδος της Erv1 πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο εξαρτάται απο το σύμπλοκο TOM. Αυτοραδιογραφία μετά απο πείραμα εισόδου των ραδιενεργών πρωτεϊνικών μορίων Su9-DHFR, AAC2 και Erv1 σε μιτοχόνδρια που απο πριν έχουν επεξεργαστεί με πρωτεάση (τρυψίνη) (SH) ή όχι (IM). Ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντισωμα για την πρωτεΐνη πορίνη (α-porin) που σχηματίζει πόρο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και για τις Tom40 και Tom20 που αποτελούν υποδοχείς του συμπλόκου TOM, πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της διαδικασίας κοπής των υποδοχέων της OM. Στην περίπτωση της Erv1, τα μιτοχόνδρια επεξεργάστηκαν και με πρωτεάση παρουσία αναστολέα της (SBTI) για να επιβεβαιωθεί ο τρόπος δράσης της στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκε. Το δείγμα "TX" αναφέρεται στην επεξεργασία του δείγματος, μετά απο την προετοιμασία των μιτοχονδρίων και το πείραμα εισόδου, με απορρυπαντικό Triton X-100 για τον έλεγχο δράσης της πρωτεάσης πρωτεϊάσης K (PK).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abe Y, Shodai T, Muto T, Mihara K, Torii H, Nishikawa S, Endo T, Kohda D (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* **100**: 551-560

Ades IZ, Butow RA (1980) The products of mitochondria-bound cytoplasmic polysomes in yeast. *The Journal of biological chemistry* **255**: 9918-9924

Alder NN, Jensen RE, Johnson AE (2008) Fluorescence mapping of mitochondrial TIM23 complex reveals a water-facing, substrate-interacting helix surface. *Cell* **134**: 439-450

Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, Tokatlidis K (2005) Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *Journal of molecular biology* **353**: 937-944

Allen S, Lu H, Thornton D, Tokatlidis K (2003) Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *The Journal of biological chemistry* **278**: 38505-38513

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465

Ang SK, Lu H (2009) Deciphering structural and functional roles of individual disulfide bonds of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p. *The Journal of biological chemistry* **284**: 28754-28761

Arnesano F, Balatri E, Banci L, Bertini I, Winge DR (2005) Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure* **13**: 713-722

Attardi G, Schatz G (1988) Biogenesis of mitochondria. Annu Rev Cell Biol 4: 289-333

Banci L, Barbieri L, Luchinat E, Secci E (2013a) Visualization of redox-controlled protein fold in living cells. *Chemistry & biology* **20:** 747-752

Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Kallergi E, Lionaki E, Pozidis C, Tokatlidis K (2011a) Molecular recognition and substrate mimicry drive the electron-transfer process between MIA40 and ALR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4811-4816

Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Tokatlidis K (2012a) An electron-transfer path through an extended disulfide relay system: the case of the redox protein ALR. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 1442-1445

Banci L, Bertini I, Cefaro C, Cenacchi L, Ciofi-Baffoni S, Felli IC, Gallo A, Gonnelli L, Luchinat E, Sideris D, Tokatlidis K (2010) Molecular chaperone function of Mia40 triggers consecutive induced folding steps of the substrate in mitochondrial protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 20190-20195

Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Felli IC, Gallo A, Pavelkova A, Kallergi E, Andreadaki M, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K (2013b) An intrinsically disordered domain has a dual function coupled to compartment-dependent redox control. *Journal of molecular biology* **425**: 594-608

Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A (2011b) Functional role of two interhelical disulfide bonds in human Cox17 protein from a structural perspective. *The Journal of biological chemistry* **286**: 34382-34390

Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Martinelli M, Sideris DP, Katrakili N, Tokatlidis K (2009a) MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nature structural & molecular biology* **16**: 198-206

Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Jaiswal D, Neri S, Peruzzini R, Winkelmann J (2012b) Structural characterization of CHCHD5 and CHCHD7: two atypical human twin CX9C proteins. *Journal of structural biology* **180**: 190-200

Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Tokatlidis K (2009b) The coiled coil-helix-coiled coil-helix proteins may be redox proteins. *FEBS letters* **583**: 1699-1702

Basu S, Leonard JC, Desai N, Mavridou DA, Tang KH, Goddard AD, Ginger ML, Lukes J, Allen JW (2013) Divergence of Erv1-associated mitochondrial import and export pathways in trypanosomes and anaerobic protists. *Eukaryotic cell* **12**: 343-355

Becker J, Walter W, Yan W, Craig EA (1996) Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Molecular and cellular biology* **16**: 4378-4386

Becker T, Bottinger L, Pfanner N (2012) Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem Sci* **37**: 85-91

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

Becker T, Vogtle FN, Stojanovski D, Meisinger C (2008b) Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 557-563

Becker T, Wenz LS, Kruger V, Lehmann W, Muller JM, Goroncy L, Zufall N, Lithgow T, Guiard B, Chacinska A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N (2011) The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispanning outer membrane proteins. *J Cell Biol* **194:** 387-395

Beddoe T, Bushell SR, Perugini MA, Lithgow T, Mulhern TD, Bottomley SP, Rossjohn J (2004) A biophysical analysis of the tetratricopeptide repeat-rich mitochondrial import receptor, Tom70, reveals an elongated monomer that is inherently flexible, unstable, and unfolds via a multistate pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**: 46448-46454

Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A (1997) Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *The Journal of biological chemistry* **272**: 33191-33196

Benz R (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochimica et biophysica acta* **1197**: 167-196

Bertini I, Felli IC, Gonnelli L, Vasantha Kumar MV, Pierattelli R (2011) High-resolution characterization of intrinsic disorder in proteins: expanding the suite of (13)C-detected NMR spectroscopy experiments to determine key observables. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **12**: 2347-2352

Bien M, Longen S, Wagener N, Chwalla I, Herrmann JM, Riemer J (2010) Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Molecular cell* **37**: 516-528

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

Bottinger L, Gornicka A, Czerwik T, Bragoszewski P, Loniewska-Lwowska A, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Milenkovic D, Chacinska A (2012) In vivo evidence for cooperation of Mia40 and Erv1 in the oxidation of mitochondrial proteins. *Molecular biology of the cell* **23**: 3957-3969

Bragoszewski P, Gornicka A, Sztolsztener ME, Chacinska A (2013) The ubiquitinproteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Molecular and cellular biology* **33**: 2136-2148

Brix J, Dietmeier K, Pfanner N (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *The Journal of biological chemistry* **272**: 20730-20735

Brix J, Rudiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J, Pfanner N (1999) Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem* **274**: 16522-16530

Ceh-Pavia E, Spiller MP, Lu H (2013) Folding and biogenesis of mitochondrial small tim proteins. *International journal of molecular sciences* **14:** 16685-16705

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

Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuan Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO journal* **23**: 3735-3746

Chatzi A, Sideris DP, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K (2013) Biogenesis of yeast Mia40 - uncoupling folding from import and atypical recognition features. *The FEBS journal*

Chatzi A, Tokatlidis K (2013) The mitochondrial intermembrane space: a hub for oxidative folding linked to protein biogenesis. *Antioxidants & redox signaling* **19**: 54-62

Chen X, Zhang DY, Liu X, Wei GH (2007) [Expression of augmenter of liver regeneration in cryptorchidism spermatogenic cells and its implication]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* **13**: 700-705

Curran SP, Leuenberger D, Leverich EP, Hwang DK, Beverly KN, Koehler CM (2004) The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**: 43744-43751

Curran SP, Leuenberger D, Oppliger W, Koehler CM (2002a) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *The EMBO journal* **21**: 942-953

Curran SP, Leuenberger D, Schmidt E, Koehler CM (2002b) The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *The Journal of cell biology* **158**: 1017-1027 Dabir DV, Leverich EP, Kim SK, Tsai FD, Hirasawa M, Knaff DB, Koehler CM (2007) A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *The EMBO journal* **26**: 4801-4811

Daithankar VN, Farrell SR, Thorpe C (2009) Augmenter of liver regeneration: substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space. *Biochemistry* **48**: 4828-4837

Daithankar VN, Schaefer SA, Dong M, Bahnson BJ, Thorpe C (2010) Structure of the human sulfhydryl oxidase augmenter of liver regeneration and characterization of a human mutation causing an autosomal recessive myopathy. *Biochemistry* **49**: 6737-6745

Darshi M, Trinh KN, Murphy AN, Taylor SS (2012) Targeting and import mechanism of coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 (ChChd3) into the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of biological chemistry* **287**: 39480-39491

Daum G, Bohni PC, Schatz G (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **257**: 13028-13033

de Marcos-Lousa C, Sideris DP, Tokatlidis K (2006) Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends in biochemical sciences* **31**: 259-267

Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**: 800-805

Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**: 314-318

Dudek J, Rehling P, van der Laan M (2013) Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 274-285

Durigon R, Wang Q, Ceh Pavia E, Grant CM, Lu H (2012) Cytosolic thioredoxin system facilitates the import of mitochondrial small Tim proteins. *EMBO reports* **13**: 916-922

Eilers M, Schatz G (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* **322**: 228-232

Endo T, Yamano K, Kawano S (2010) Structural basis for the disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxidants & redox signaling* **13**: 1359-1373

Farrell SR, Thorpe C (2005) Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry* **44**: 1532-1541

Fass D (2008) The Erv family of sulfhydryl oxidases. *Biochimica et biophysica acta* **1783**: 557-566

Fischer M, Horn S, Belkacemi A, Kojer K, Petrungaro C, Habich M, Ali M, Kuttner V, Bien M, Kauff F, Dengjel J, Herrmann JM, Riemer J (2013) Protein import and oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space of intact mammalian cells. *Molecular biology of the cell* **24**: 2160-2170

Gabriel K, Milenkovic D, Chacinska A, Muller J, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C (2007) Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *Journal of molecular biology* **365**: 612-620

Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 63-77

Gandhi CR (2012) Augmenter of liver regeneration. *Fibrogenesis & tissue repair* **5**: 10

Gandhi CR, Kuddus R, Subbotin VM, Prelich J, Murase N, Rao AS, Nalesnik MA, Watkins SC, DeLeo A, Trucco M, Starzl TE (1999) A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats. *Hepatology* **29**: 1435-1445

Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S (2006) Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function. *World journal of gastroenterology : WJG* **12:** 4951-4958

Gebert N, Chacinska A, Wagner K, Guiard B, Koehler CM, Rehling P, Pfanner N, Wiedemann N (2008) Assembly of the three small Tim proteins precedes docking to the mitochondrial carrier translocase. *EMBO reports* **9**: 548-554

Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *The Journal of cell biology* **164**: 19-24

Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741

Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *The Journal of biological chemistry* **271**: 14504-14509

Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S, Hallberg RL, Schatz G (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**: 809-822

Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476-1481

Gross DP, Burgard CA, Reddehase S, Leitch JM, Culotta VC, Hell K (2011) Mitochondrial Ccs1 contains a structural disulfide bond crucial for the import of this unconventional substrate by the disulfide relay system. *Molecular biology of the cell* **22**: 3758-3767

Grumbt B, Stroobant V, Terziyska N, Israel L, Hell K (2007) Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of biological chemistry* **282:** 37461-37470

Guo PC, Ma JD, Jiang YL, Wang SJ, Bao ZZ, Yu XJ, Chen Y, Zhou CZ (2012) Structure of yeast sulfhydryl oxidase erv1 reveals electron transfer of the disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of biological chemistry* **287**: 34961-34969

Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, Shimonishi M, Porter KA, Starzl TE (1994) Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 8142-8146

Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W (1989) Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* **988:** 1-45

Hawlitschek G, Schneider H, Schmidt B, Tropschug M, Hartl FU, Neupert W (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* **53**: 795-806

Hell K (2008) The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1783:** 601-609

Herrmann JM, Hell K (2005) Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **30**: 205-211

Herrmann JM, Neupert W (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**: 219-225

Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, Pfanner N (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* **395**: 516-521

Hines V, Brandt A, Griffiths G, Horstmann H, Brutsch H, Schatz G (1990) Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *The EMBO journal* **9**: 3191-3200

Hofhaus G, Lee JE, Tews I, Rosenberg B, Lisowsky T (2003) The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**: 1528-1535

Hofmann S, Rothbauer U, Muhlenbein N, Baiker K, Hell K, Bauer MF (2005) Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *Journal of molecular biology* **353**: 517-528

Hogg PJ (2003) Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in biochemical sciences* **28**: 210-214

Hoogenraad NJ, Ryan MT (2001) Translocation of proteins into mitochondria. *IUBMB Life* **51:** 345-350

Hoppins SC, Nargang FE (2004) The Tim8-Tim13 complex of Neurospora crassa functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12396-12405

Horn D, Al-Ali H, Barrientos A (2008) Cmc1p is a conserved mitochondrial twin CX9C protein involved in cytochrome c oxidase biogenesis. *Molecular and cellular biology* **28**: 4354-4364

Howson R, Huh WK, Ghaemmaghami S, Falvo JV, Bower K, Belle A, Dephoure N, Wykoff DD, Weissman JS, O'Shea EK (2005) Construction, verification and experimental use of two epitope-tagged collections of budding yeast strains. *Comparative and functional genomics* **6**: 2-16

Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691

Hulett JM, Lueder F, Chan NC, Perry AJ, Wolynec P, Likic VA, Gooley PR, Lithgow T (2008) The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex. *J Mol Biol* **376**: 694-704

Jensen RE, Dunn CD, Youngman MJ, Sesaki H (2004) Mitochondrial building blocks. *Trends in cell biology* **14**: 215-218

Kallergi E, Andreadaki M, Kritsiligkou P, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K, Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Peruzzini R (2012) Targeting and maturation of Erv1/ALR in the mitochondrial intermembrane space. *ACS chemical biology* **7**: 707-714

Kallergi E, Kalef-Ezra E, Karagouni-Dalakoura K, Tokatlidis K (2013) Common Players in Mitochondria Biogenesis and Neuronal Protection Against Stress-Induced Apoptosis. *Neurochemical research*

Kawamata H, Manfredi G (2008) Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria. *Human molecular genetics* **17:** 3303-3317

Kawano S, Yamano K, Naoe M, Momose T, Terao K, Nishikawa S, Watanabe N, Endo T (2009) Structural basis of yeast Tim40/Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 14403-14407

Kellems RE, Allison VF, Butow RA (1975) Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *The Journal of cell biology* **65:** 1-14

Kellems RE, Butow RA (1972) Cytoplasmic-type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. I. Evidence for ribosome binding sites on yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **247**: 8043-8050

Kjaergaard M, Poulsen FM (2011) Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *Journal of biomolecular NMR* **50**: 157-165

Kloppel C, Suzuki Y, Kojer K, Petrungaro C, Longen S, Fiedler S, Keller S, Riemer J (2011) Mia40-dependent oxidation of cysteines in domain I of Ccs1 controls its distribution between mitochondria and the cytosol. *Molecular biology of the cell* **22**: 3749-3757

Koehler CM (2004) The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends in biochemical sciences* **29**: 1-4

Koehler CM, Jarosch E, Tokatlidis K, Schmid K, Schweyen RJ, Schatz G (1998) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* **279**: 369-373

Koehler CM, Tienson HL (2009) Redox regulation of protein folding in the mitochondrial intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* **1793:** 139-145

Kojer K, Bien M, Gangel H, Morgan B, Dick TP, Riemer J (2012) Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *The EMBO journal* **31**: 3169-3182

Kurz M, Martin H, Rassow J, Pfanner N, Ryan MT (1999) Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Molecular biology of the cell* **10**: 2461-2474

Kutik S, Stojanovski D, Becker L, Becker T, Meinecke M, Kruger V, Prinz C, Meisinger C, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Wiedemann N (2008) Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* **132:** 1011-1024

LaBrecque DR, Pesch LA (1975) Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. *The Journal of physiology* **248**: 273-284

Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO reports* **2**: 715-720

Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T (2000) Erv1p from Saccharomyces cerevisiae is a FADlinked sulfhydryl oxidase. *FEBS letters* **477**: 62-66 Leonard JV, Schapira AH (2000) Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* **355**: 389-394

Levitan A, Danon A, Lisowsky T (2004) Unique features of plant mitochondrial sulfhydryl oxidase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 20002-20008

Li Y, Li M, Xing G, Hu Z, Wang Q, Dong C, Wei H, Fan G, Chen J, Yang X, Zhao S, Chen H, Guan K, Wu C, Zhang C, He F (2000) Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. *The Journal of biological chemistry* **275**: 37443-37447

Li Y, Wei K, Lu C, Li Y, Li M, Xing G, Wei H, Wang Q, Chen J, Wu C, Chen H, Yang S, He F (2002) Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**: 3888-3893

Lill R, Muhlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* **77**: 669-700

Lionaki E, Aivaliotis M, Pozidis C, Tokatlidis K (2010) The N-terminal shuttle domain of Erv1 determines the affinity for Mia40 and mediates electron transfer to the catalytic Erv1 core in yeast mitochondria. *Antioxidants & redox signaling* **13**: 1327-1339

Lionaki E, Tavernarakis N (2013) Oxidative stress and mitochondrial protein quality control in aging. *Journal of proteomics*

Lisowsky T (1992) Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Molecular & general genetics : MGG* **232:** 58-64

Liu Q, D'Silva P, Walter W, Marszalek J, Craig EA (2003) Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science* **300**: 139-141

Longen S, Bien M, Bihlmaier K, Kloeppel C, Kauff F, Hammermeister M, Westermann B, Herrmann JM, Riemer J (2009) Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *Journal of molecular biology* **393:** 356-368

Lu C, Li Y, Zhao Y, Xing G, Tang F, Wang Q, Sun Y, Wei H, Yang X, Wu C, Chen J, Guan KL, Zhang C, Chen H, He F (2002) Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**: 90-92

Lu H, Allen S, Wardleworth L, Savory P, Tokatlidis K (2004a) Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *The Journal of biological chemistry* **279**: 18952-18958

Lu H, Golovanov AP, Alcock F, Grossmann JG, Allen S, Lian LY, Tokatlidis K (2004b) The structural basis of the TIM10 chaperone assembly. *The Journal of biological chemistry* **279**: 18959-18966

Lutz T, Neupert W, Herrmann JM (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *The EMBO journal* **22**: 4400-4408

Mamathambika BS, Bardwell JC (2008) Disulfide-linked protein folding pathways. *Annual review of cell and developmental biology* **24:** 211-235

Mapa K, Sikor M, Kudryavtsev V, Waegemann K, Kalinin S, Seidel CA, Neupert W, Lamb DC, Mokranjac D (2010) The conformational dynamics of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *Molecular cell* **38**: 89-100

Marc P, Margeot A, Devaux F, Blugeon C, Corral-Debrinski M, Jacq C (2002) Genomewide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO reports* **3**: 159-164

Margulis L (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*: 21-38

Margulis L, Bermudes D (1985) Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* **1**: 101-124

Martin W, Dagan T, Koonin EV, Dipippo JL, Gogarten JP, Lake JA (2007) The evolution of eukaryotes. *Science* **316**: 542-543; author reply 542-543

Mesecke N, Bihlmaier K, Grumbt B, Longen S, Terziyska N, Hell K, Herrmann JM (2008) The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40. *EMBO reports* **9**: 1107-1113

Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**: 1059-1069

Milenkovic D, Gabriel K, Guiard B, Schulze-Specking A, Pfanner N, Chacinska A (2007) Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: sitespecific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *The Journal of biological chemistry* **282**: 22472-22480

Milenkovic D, Ramming T, Muller JM, Wenz LS, Gebert N, Schulze-Specking A, Stojanovski D, Rospert S, Chacinska A (2009) Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Molecular biology of the cell* **20**: 2530-2539

Morgan B, Ang SK, Yan G, Lu H (2009) Zinc can play chaperone-like and inhibitor roles during import of mitochondrial small Tim proteins. *The Journal of biological chemistry* **284:** 6818-6825

Morgan B, Lu H (2008) Oxidative folding competes with mitochondrial import of the small Tim proteins. *The Biochemical journal* **411**: 115-122

Muller JM, Milenkovic D, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A (2008) Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Molecular biology of the cell* **19**: 226-236

Murakami H, Pain D, Blobel G (1988) 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *The Journal of cell biology* **107**: 2051-2057

Naoe M, Ohwa Y, Ishikawa D, Ohshima C, Nishikawa S, Yamamoto H, Endo T (2004) Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of biological chemistry* **279:** 47815-47821

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

Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. Annu Rev Biochem 66: 863-917

Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry* **76:** 723-749

Neupert W, Schatz G (1981) How proteins are transported into mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* **6:** 1-4

Papic D, Krumpe K, Dukanovic J, Dimmer KS, Rapaport D (2011) Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugo1 follows a unique Mim1-dependent import pathway. *J Cell Biol* **194:** 397-405

Paschen SA, Neupert W (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* **52:** 101-112

Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**: 862-866

Pawlowski R, Jura J (2006) ALR and liver regeneration. *Molecular and cellular biochemistry* **288**: 159-169

Perry AJ, Lithgow T (2005) Protein targeting: entropy, energetics and modular machines. *Current biology : CB* **15:** R423-425

Pfanner N, Geissler A (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2:** 339-349

Popov-Celeketic J, Waizenegger T, Rapaport D (2008) Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* **376:** 671-680

Ramage L, Junne T, Hahne K, Lithgow T, Schatz G (1993) Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *The EMBO journal* **12**: 4115-4123

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

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

Riemer J, Fischer M, Herrmann JM (2011) Oxidation-driven protein import into mitochondria: Insights and blind spots. *Biochimica et biophysica acta* **1808**: 981-989

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

Schatz G, Mason TL (1974) The Biosynthesis of Mitochondrial Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **43:** 51-87

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

Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, Eyrich B, Zahedi RP, Stojanovski D, Schonfisch B, Guiard B, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* **144**: 227-239

Schwarzinger S, Kroon GJ, Foss TR, Chung J, Wright PE, Dyson HJ (2001) Sequencedependent correction of random coil NMR chemical shifts. *Journal of the American Chemical Society* **123**: 2970-2978

Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13207-13212

Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, Mikropoulou D, Gallo A, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Tokatlidis K (2009) A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *The Journal of cell biology* **187**: 1007-1022

Sideris DP, Tokatlidis K (2007) Oxidative folding of small Tims is mediated by sitespecific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. *Molecular microbiology* **65**: 1360-1373

Sideris DP, Tokatlidis K (2010) Oxidative protein folding in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxidants & redox signaling* **13**: 1189-1204

Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W, 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, Neupert W (1989) MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* **59:** 1061-1070

Sollner T, Pfaller R, Griffiths G, Pfanner N, Neupert W (1990) A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* **62**: 107-115

Spiller MP, Ang SK, Ceh-Pavia E, Fisher K, Wang Q, Rigby SE, Lu H (2013) Identification and characterisation of mitochondrial Mia40 as an iron-sulphur protein. *The Biochemical journal*

Stein G, Lisowsky T (1998) Functional comparison of the yeast scERV1 and scERV2 genes. *Yeast* **14**: 171-180

Stojanovski D, Bragoszewski P, Chacinska A (2012) The MIA pathway: a tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 1142-1150

Stojanovski D, Milenkovic D, Muller JM, Gabriel K, Schulze-Specking A, Baker MJ, Ryan MT, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A (2008) Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase. *The Journal of cell biology* **183**: 195-202

Sztolsztener ME, Brewinska A, Guiard B, Chacinska A (2013) Disulfide bond formation: sulfhydryl oxidase ALR controls mitochondrial biogenesis of human MIA40. *Traffic* **14**: 309-320

Terziyska N, Grumbt B, Bien M, Neupert W, Herrmann JM, Hell K (2007) The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS letters* **581**: 1098-1102

Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Mokranjac D, Mesecke N, Neupert W, Herrmann JM, Hell K (2005) Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS letters* **579**: 179-184

Thornton JM (1981) Disulphide bridges in globular proteins. *Journal of molecular biology* **151:** 261-287

Tienson HL, Dabir DV, Neal SE, Loo R, Hasson SA, Boontheung P, Kim SK, Loo JA, Koehler CM (2009) Reconstitution of the mia40-erv1 oxidative folding pathway for the small tim proteins. *Molecular biology of the cell* **20**: 3481-3490

Todd LR, Damin MN, Gomathinayagam R, Horn SR, Means AR, Sankar U (2010) Growth factor erv1-like modulates Drp1 to preserve mitochondrial dynamics and function in mouse embryonic stem cells. *Molecular biology of the cell* **21**: 1225-1236

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

Tokatlidis K, Vial S, Luciano P, Vergnolle M, Clemence S (2000) Membrane protein import in yeast mitochondria. *Biochem Soc Trans* **28:** 495-499

Tompa P (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends in biochemical sciences* **27**: 527-533

Tzamarias D, Struhl K (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369**: 758-761

van der Laan M, Bohnert M, Wiedemann N, Pfanner N (2012) Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends in cell biology* **22**: 185-192

Vitu E, Bentzur M, Lisowsky T, Kaiser CA, Fass D (2006) Gain of function in an ERV/ALR sulfhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide. *Journal of molecular biology* **362**: 89-101

Voisine C, Craig EA, Zufall N, von Ahsen O, Pfanner N, Voos W (1999) The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* **97:** 565-574

von der Malsburg K, Muller JM, Bohnert M, Oeljeklaus S, Kwiatkowska P, Becker T, Loniewska-Lwowska A, Wiese S, Rao S, Milenkovic D, Hutu DP, Zerbes RM, Schulze-Specking A, Meyer HE, Martinou JC, Rospert S, Rehling P, Meisinger C, Veenhuis M, Warscheid B, van der Klei IJ, Pfanner N, Chacinska A, van der Laan M (2011) Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Developmental cell* **21**: 694-707

Voronova A, Meyer-Klaucke W, Meyer T, Rompel A, Krebs B, Kazantseva J, Sillard R, Palumaa P (2007) Oxidative switches in functioning of mammalian copper chaperone Cox17. *The Biochemical journal* **408**: 139-148

Webb CT, Gorman MA, Lazarou M, Ryan MT, Gulbis JM (2006) Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Molecular cell* **21**: 123-133

Weckbecker D, Longen S, Riemer J, Herrmann JM (2012) Atp23 biogenesis reveals a chaperone-like folding activity of Mia40 in the IMS of mitochondria. *The EMBO journal* **31:** 4348-4358

Weis BL, Schleiff E, Zerges W (2013) Protein targeting to subcellular organelles via MRNA localization. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 260-273

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

Wiedemann N, Truscott KN, Pfannschmidt S, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N (2004) Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**: 18188-18194

Wrobel L, Trojanowska A, Sztolsztener ME, Chacinska A (2013) Mitochondrial protein import: Mia40 facilitates Tim22 translocation into the inner membrane of mitochondria. *Molecular biology of the cell* **24**: 543-554

Wu CK, Dailey TA, Dailey HA, Wang BC, Rose JP (2003) The crystal structure of augmenter of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase. *Protein science : a publication of the Protein Society* **12**: 1109-1118

Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F (2003a) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends in biochemical sciences* **28**: 541-547

Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003b) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**: 41-50

Yu HY, Xiang DR, Huang HJ, Li J, Sheng JF (2010) Expression level of augmenter of liver regeneration in patients with hepatic failure and hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* **9**: 492-498

Zhang Y, Lyver ER, Nakamaru-Ogiso E, Yoon H, Amutha B, Lee DW, Bi E, Ohnishi T, Daldal F, Pain D, Dancis A (2008) Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Molecular and cellular biology* **28**: 5569-5582

Διαδίκτυο

http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_ATP.htm

http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww

ПАРАРТНМАТА



Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Erv1. Οι εντάσεις των ζωνών των διαφορετικών ποσοτήτων της Erv1 μετρήθηκαν με το πρόγραμμα Image Quant 5.2 και φαίνονται στον Πίνακα 2.

Ποσότητα αγρίου τύπου μιτοχονδρίων (μg)	Τιμές έντασης ζωνών	Ποσότητα Erv1 (ng)	Συγκέντρωση Erv1 στα μιτοχόνδρια (ng/μg)
0	0	0	0
40	9225	16	0,4
60	13844	24	0,4
80	18594	32	0,4
Μέσος όρος			0,4

Πίνακας 3: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη Erv1. Στον πίνακα αυτόν φαίνονται οι τιμές ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Erv1 που φορτώθηκε και οι τιμές των εντάσεων των ζωνών αυτών μετρημένες με το πρόγραμμα Image Quant 5.2.

Ποσότητα πρωτεΐνης Erv1 (ng)	Τιμές έντασης ζωνών
0	0
5	3815
10	5084
15	9061

Πίνακας 4: Ποσοτικοποίηση της Erv1 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Η Erv1 υπάρχει σε ποσότητα 0.4μg ανά mg αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα *in vivo*.



Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη της ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης Mia40. Οι εντάσεις των ζωνών των διαφορετικών ποσοτήτων της ΔΝ67SPCMia40 μετρήθηκαν με το πρόγραμμα Image Quant 5.2 και φαίνονται στον Πίνακα 4.

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

Πίνακας 5: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη Mia40. Στον πίνακα αυτόν φαίνονται οι τιμές ανασυνδυασμένης καθαρής πρωτεΐνης ΔN67SPCMia40 που φορτώθηκε και οι τιμές των εντάσεων των ζωνών αυτών μετρημένες με το πρόγραμμα. Image Quant 5.2.

Ποσότητα πρωτεΐνης ΔΝ67SPCMia40 (ng)	Τιμές έντασης ζωνών
0	0
200	17105
300	19761
500	33041

Πίνακας 6: Ποσοτικοποίηση της Mia40 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Η Mia40 υπάρχει σε ποσότητα 10μg ανά mg αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα *in vivo*.



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

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

Πίνακας 7: Πίνακας τιμών των εντάσεων για την πρωτεΐνη κυτόχρωμα c. Στον πίνακα αυτόν φαίνονται οι τιμές πρωτεΐνης κυτόχρωμα c (από το στέλεχος *S. cerevisiae*, Sigma) που φορτώθηκε και οι τιμές των εντάσεων των ζωνών αυτών μετρημένες με το πρόγραμμα Image Quant 5.2.

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

Πίνακας 8: Ποσοτικοποίηση του κυτοχρώματος c σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα c υπάρχει σε ποσότητα 15μg ανά mg αγρίου τύπου μιτοχονδρίων σακχαρομύκητα *in vivo*.

Λίστα δημοσιεύσεων

- 1. <u>Kallergi E</u>, Kalef-Ezra E, Karagouni-Dalakoura K, Tokatlidis K. Common Players in Mitochondria Biogenesis and Neuronal Protection Against Stress-Induced Apoptosis. *Neurochem Res.* 2013.
- Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Felli IC, Gallo A, Pavelkova A, <u>Kallergi E</u>, Andreadaki M, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K.. An intrinsically disordered domain has a dual function coupled to compartment-dependent redox control. *J Mol Biol*. 2013. 425(3):594-608.
- 3. <u>Kallergi E</u>, Andreadaki M, Kritsiligkou P, Katrakili N, Pozidis C, Tokatlidis K, Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gajda K, Peruzzini R. Targeting and maturation of Erv1/ALR in the mitochondrial intermembrane space. *ACS Chem Biol*. 2012. 7(4):707-14
- 4. Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, <u>Kallergi E</u>, Lionaki E, Pozidis C, Tokatlidis K. Molecular recognition and substrate mimicry drive the electron-transfer process between MIA40 and ALR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. 108(12):4811-6.