



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Το μονοπάτι στόχευσης της υπομονάδας e (subunit e/Tim11) της  
μιτοχονδριακής ATP συνθάσης στην εσωτερική μεμβράνη των  
μιτοχονδρίων του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae**

**ΓΕΩΡΓΙΑ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ**

**Υπεύθυνος καθηγητής: Κ. ΤΟΚΑΤΛΙΔΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΗΣ 2014**



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.Γενική Ανασκόπηση.....	8
1.1. Τα μιτοχόνδρια.....	8
1.2. Τα μονοπάτια εισαγωγής στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα <i>S.cerevisiae</i> .....	9
2.Οξειδωτική αναδίπλωση στα μιτοχόνδρια.....	15
2.1. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και η σημασία τους στα μιτοχόνδρια.....	15
2.2. Το μονοπάτι δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών Mia40-Erv1.....	16
2.3. Τα υποστρώματα του μονοπατίου Mia40-Erv1.....	17
3.Το οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια.....	19
3.1. Οι ενεργές μορφές ROS στα μιτοχόνδρια.....	19
3.2. Οι μηχανισμοί αντιμετώπισης των ROS.....	19
4.Η εσωτερική αρχιτεκτονική των μιτοχονδρίων.....	21
4.1. Το σύμπλοκο MICOS.....	21
5.Η οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια.....	22
5.1. Εισαγωγή.....	22
5.2. Η ATP συνθάση.....	24
5.3. Οι ειδικές για τον διμερισμό υπομονάδες της ATP συνθάσης.....	26
5.4. Η υπομονάδα e (Tim11).....	27
ΣΚΟΠΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
1.Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.....	32
2.In organello τεχνικές (Πειράματα και χειρισμός μιτοχονδρίων).....	34
3.Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών.....	38
4.Μέθοδοι σακχαρομύκητα.....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
1.Είσοδος και στόχευση της πρωτεΐνης Tim11 στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα <i>S.cerevisiae</i> .....	45
1.1.Εισαγωγή.....	45
1.2.Είσοδος της ραδιοσήμασμένης πρωτεΐνης Tim11 σε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια παρουσία ή απουσία μεμβρανικού δυναμικού.....	46
1.3.Υπομιτοχονδριακός εντοπισμός της πρωτεΐνης Tim11 σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια και σε μιτοχόνδρια με απουσία μεμβρανικού δυναμικού.....	49
2.Έλεγχος της εισόδου μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Tim11 στα μιτοχόνδρια.....	53
2.1. Έλεγχος εισόδου μεταλλαγμάτων της Tim11 σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια.....	54
2.2. Έλεγχος εισόδου μεταλλαγμάτων της Tim11 σε μιτοχόνδρια στα οποία έχει διαρρηχθεί το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης.....	56
2.3. Υπομιτοχονδριακός εντοπισμός των μεταλλαγμάτων στα μιτοχόνδρια.....	57
2.3.1. Υπο φυσιολογικές συνθήκες σε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια.....	57
2.3.2. Σε μιτοχόνδρια στα οποία είχε διαταραχθεί το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης.....	58
3.Έλεγχος του μονοπατιού στόχευσης και εμπέδωσης στην εσωτερική μεμβράνη.....	61

3.1. Έλεγχος εισόδου της Tim11 στα μιτοχόνδρια από το σύμπλοκο TOM.....	61
3.2. Διερεύνηση εναλλακτικού ρόλου της Tim11 πρωτεΐνης στην περίπτωση απουσίας μεμβρανικού δυναμικού.....	62
3.3. Η πρωτεΐνη Tim11 είναι ανεξάρτητη των γνωστών μονοπατιών TIM22/TIM23 για την εμπέδωση της στην εσωτερική μεμβράνη.....	66
3.3.1. Παρουσίαση της Tim11 πρωτεΐνης σε μιτοπλάστες που επεξεργάστηκαν ή όχι με τρυψίνη παρουσία μεμβρανικού δυναμικού.....	67
3.3.2. Παρουσίαση της Tim11 πρωτεΐνης σε μιτοπλάστες που επεξεργάστηκαν ή όχι με τρυψίνη απουσία μεμβρανικού δυναμικού.....	
4. Έλεγχος σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ της πρωτεΐνης Tim11 και άλλων πρωτεϊνών.....	68
4.1. Είσοδος της Tim11 πρωτεΐνης σε μιτοχόνδρια παρουσία ή απουσία μεμβρανικού δυναμικού και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε διάλυμα απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης.....	69
4.2. Επίδραση του οξειδωτικού στρες (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) στην πρωτεΐνη Tim11.....	70
4.2.1. Έλεγχος διαλυτοποίησης της Tim11 με την χρήση απορρυπαντικών μετά από πείραμα εισόδου στα μιτοχόνδρια.....	70
4.2.2. Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της πρωτεΐνης Tim11 μετά από επεξεργασία με H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> και dimedone.....	72
ΣΥΖΥΤΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	75
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν οργανίδια εξαιρετικής σημασίας για τα κύτταρα καθώς επιτελούν λειτουργίες απαραίτητες για την ζωή. Μια από αυτές είναι η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπου συμμετέχουν τέσσερα σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων και η F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP συνθάση, το ένζυμο που καταλύει το τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, την παραγωγή του ενεργειακού μορίου ATP. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται υπο την μορφή διμερών/ολιγομερών στις ακρολοφίες της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Στον σακχαρομύκητα, η ATP συνθάση αποτελείται από 17 υπομονάδες οι οποίες έχουν όλες χαρακτηριστεί, κάποιες κωδικεύονται από το μιτοχονδριακό DNA στην μήτρα των μιτοχονδρίων και κάποιες κωδικεύονται από τον πυρήνα και εισέρχονται στο οργανίδιο μέσω ειδικών μονοπατιών στόχευσης. Η υπομονάδα e (Tim11) κωδικεύεται από το πυρηνικό DNA και αγκυροβολεί στην εσωτερική μεμβράνη με το αμινοτελικό της άκρο. Θεωρείται κρίσιμη υπομονάδα για τον σχηματισμό των διμερών του ενζύμου και την διαμόρφωση των ακρολοφιών στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η Tim11 όμως δεν φαίνεται να διαθέτει στην αλληλουχία της κάποιο από τα γνωστά σινιάλα στόχευσης για την εσωτερική μεμβράνη και επομένως η μελέτη του τρόπου εισαγωγής της στα μιτοχόνδρια πιστεύουμε ότι είναι ιδιαίτερης σημασίας.

# ABSTRACT

---

Mitochondria are very important organelles for the cells as they perform procedures that are necessary for life. One of them is oxidative phosphorylation (OXPHOS), in which four complexes of electron transport chain and F1-F0 ATP synthase take part. F1-F0 ATP synthase is the enzyme that catalyzes the final step of the procedure, the production of the energy molecule ATP. This enzyme is found in dimeric/oligomeric forms in mitochondria. Especially in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the enzyme consists of 17 well-characterized subunits, some encoded by mitochondrial DNA in the matrix of mitochondria and others encoded by the nucleus. Those encoded by the nucleus are imported in the organelles via specific sorting pathways leading the proteins to the mitochondrial subcompartments. Subunit e (Tim11) is encoded by the nucleus and is found anchored in the inner membrane of mitochondria. It is considered as an important subunit responsible for the dimerization of the ATPase and for the cristae formation inside mitochondria. Tim11's aminoacid sequence doesn't seem to have a known peptide signal which leads precursor proteins to the inner membrane of mitochondria and thus the study of Tim11's import and association with the inner membrane was considered to perhaps enrich the database of peptide signals or even lead to the identification of a new import pathway to the inner membrane.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

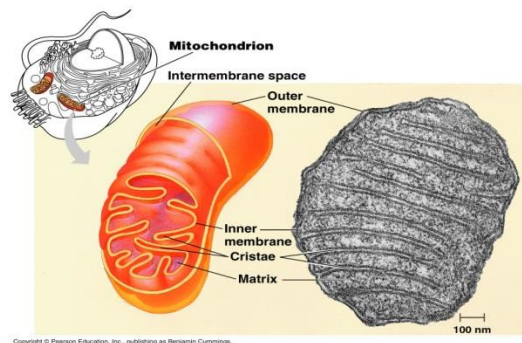
---

# Κεφάλαιο 1: Γενική Ανασκόπηση

## 1.1 Τα μιτοχόνδρια

Η ιστορική αναδρομή των μιτοχονδρίων ξεκινά γύρω στο 1857 όπου παρατηρήθηκαν και για πρώτη φορά. Το 1890 τους δόθηκε η ονομασία 'bioblasts' από τον Richard Altman ο οποίος τα χαρακτήρισε σαν πανταχού παρούσες δομές που συμμετέχουν σε ζωτικές λειτουργίες. Το 1898 κατέληξαν να πάρουν την ονομασία 'μιτοχόνδρια' από τις ελληνικές λέξεις 'μίτος' και 'χόνδρος' από τον Carl Benda (Ernst and Schatz, 1981). Η προέλευση τους αποτελεί πεδίο διαλόγου καθώς δυο θεωρίες προσπαθούν να εξηγήσουν το πως προέκυψαν τα οργανίδια εντός των κυττάρων. Η θεωρία της ενδοσυμβίωσης, που είναι και η πιο αποδεκτή, αναφέρθηκε από τον Altman στις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα και αναφέρει ότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν την εξελικτική συνέχεια ενός αερόβιου πρωτοβακτηρίου το οποίο φαγοκυτώθηκε από ένα αναερόβιο κύτταρο-ξενιστή (Reijnders, 1975). Το μιτοχονδριακό DNA ήταν η επόμενη μεγάλη ανακάλυψη γύρω από τα μιτοχόνδρια. Η χαρτογράφηση του για τον σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* ξεκίνησε από τους (Tzagoloff et al., 1979) και ο αντίστοιχος ανθρώπινος μιτοχονδριακός χάρτης δημιουργήθηκε από τους (Anderson et al., 1981).

Στον σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* τα μιτοχόνδρια υπολογίζεται ότι περιέχουν ~1000 πρωτεΐνες και ~1500 τα αντίστοιχα ανθρώπινα οργανίδια (Bolender et al., 2008). Η έρευνα που έχει γίνει γύρω από τα οργανίδια αυτά με την πάροδο των χρόνων έχει δείξει ότι συμμετέχουν σε πάρα πολλές κυτταρικές διαδικασίες, απαραίτητες για την σωστή λειτουργία του κυττάρου. Συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση), ο μεταβολισμός λιπιδίων και αμινοξέων και η βιοσύνθεση των συμπλόκων σιδήρου-θείου κ.α (Chacinska et al., 2009; Schatz, 2013).



Εικόνα 1: Τα μέρη του μιτοχονδρίου.

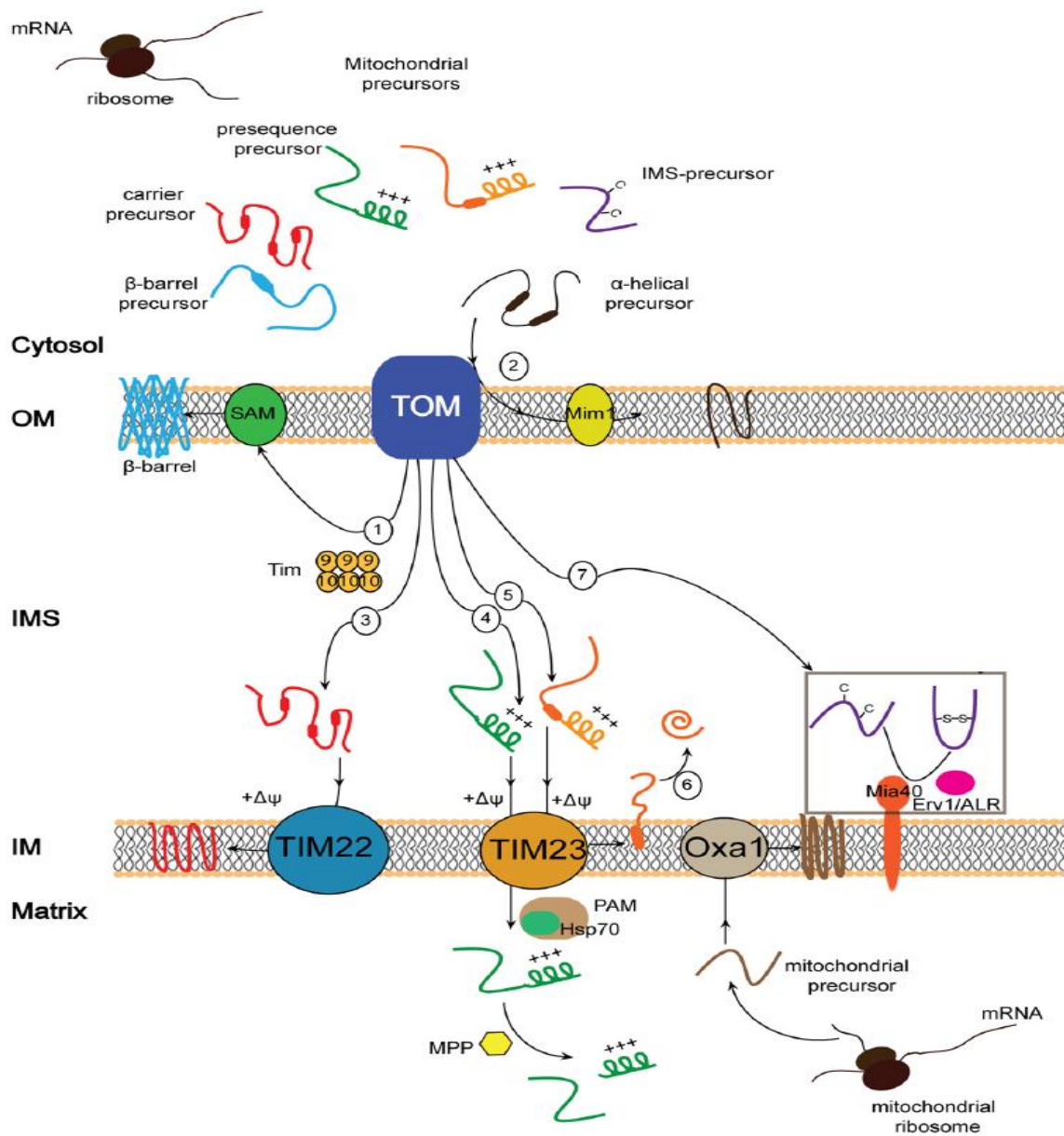


## 1.2 Μονοπάτια εισαγωγής και μεταφοράς πρωτεΐνων στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα *S.cerevisiae*.

Τα μιτοχόνδρια περικλύονται από δυο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική, και επομένως δημιουργούν δυο υδάτινα υποδιαμερίσματα, την μήτρα και τον διαμεμβρανικό χώρο ανάμεσα στις δύο μεμβράνες (Deponte and Hell, 2009; Hell, 2008; εικόνα 1). Το κάθε διαμέρισμα έχει τα δικά του χαρακτηριστικά και ιδιότητες και φιλοξενεί διαφορετικές πρωτεΐνες. Η εξωτερική μεμβράνη (outer membrane-OM) χαρακτηρίζεται ως ημιδιαπερατή, διαχωρίζει το μιτοχόνδριο από το κυτταρόπλασμα, διαθέτει υπομονάδες που σχηματίζουν τον βασικό πόρο εισόδου πρόδρομων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια (σύμπλοκο TOM) και φέρει πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις διαδικασίες σχάσης-σύντηξης (fission-fusion) (Mitra, 2013). Σε αντίθεση, η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από μικρά μόρια λόγω της παρουσίας της καρδιολιπίνης, ενός φωσφολιπιδίου το οποίο βρίσκεται σε 3 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι στην εξωτερική μεμβράνη (Houtkooper and Vaz, 2008). Σε αυτήν βρίσκονται οι υπομονάδες των καναλιών TIM22 και TIM23 καθώς και τα σύμπλοκα πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ο διαμεμβρανικός χώρος φέρει υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα συμμετοχή στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, μεταφορά πρωτεϊνών προς την εσωτερική μεμβράνη κ.α (Vergnolle et al., 2005). Στην μήτρα εντοπίζονται αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απόπτωση και στη βιογένεση των συμπλόκων σιδήρου-θείου (Lill and Mühlenhoff, 2008).

Το μιτοχονδριακό DNA κωδικεύει μόνο το 1% περίπου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, μόλις 8 πρωτεΐνες εκφράζονται από αυτό στην περίπτωση του σακχαρομύκητα και 13 στον άνθρωπο. Το υπόλοιπο 99% των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικεύεται από το πυρηνικό DNA, μεταφράζεται από ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται μέσω συγκεκριμένων μονοπατιών εισόδου στο οργανίδιο (Endo et al., 2011; Sickmann et al., 2003; Stojanovski et al., 2012). Η διερεύνηση επομένως της λειτουργίας των συγκεκριμένων μονοπατιών ήταν ερώτημα καίριας σημασίας.

Οι πρόδρομες πρωτεΐνες φέρουν ειδικά σινιάλα στόχευσης τα οποία τις οδηγούν κατευθείαν στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και από εκεί κατευθύνονται στο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα για το οποίο προορίζονται. Τα κλασσικά μιτοχονδριακά σήματα βρίσκονται αμινοτελικά της πρωτεΐνης και σχηματίζουν μια αμφιπαθή  $\alpha$ -έλικα η οποία είναι θετικά φορτισμένη από τη μια της πλευρά. Τα σινιάλα αυτά κυμαίνονται από 10-60 αμινοξέα και κόβονται πρωτεολυτικά όταν η πρωτεΐνη εισέλθει στο οργανίδιο. Υπάρχουν όμως και σινιάλα στόχευσης τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα εντός της πρωτεϊνικής αλληλουχίας και είναι ικανά να οδηγήσουν πρωτεΐνες στα διάφορα διαμερίσματα του οργανιδίου (Becker et al., 2012; Brix et al., 1999).



**Εικόνα 2:** Τα βασικά μονοπάτια στόχευσης πρόδρομων μορίων στα μιτοχόνδρια (Kallergi et al., 2014).

Πάρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα γνωστά μονοπάτια εισόδου πρόδρομων πρωτεϊνών ανάλογα σε πιο υπομιτοχονδριακό διαμέρισμα στοχεύονται.

### *Είσοδος από τον γενικό πόρο εισόδου πρωτεϊνών-Σύμπλοκο TOM*

Όταν συντεθεί η πρωτεϊνική αλληλουχία από τα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος κατευθύνεται προς την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων με την συνοδεία ‘σαπερονών’. Αυτές είναι ειδικές πρωτεΐνες που προστατεύουν τις υδρόφοβες αλληλουχίες του πρόδρομου μορίου ώστε να παραμείνει στην πρωτοταγή του δομή και να μπορέσει να περάσει από το σύμπλοκο TOM εντός των μιτοχονδρίων. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από 7 υπομονάδες και το βασικό συστατικό του είναι ο πόρος Tom40, μια πρωτεΐνη σε δομή β-βαρελιού που βρίσκεται ενσωματωμένη στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Ahting et al., 2001; Hill et al., 1998). Οι πρωτεΐνες που φέρουν τα κλασικά σινιάλα στόχευσης αναγνωρίζονται από τον Tom20 υποδοχέα (Saitoh et al., 2007), μεταφέρονται στο Tom22 και από εκεί εισέρχονται στο μιτοχόνδριο. Ένας άλλος υποδοχέας, ο Tom70, αναγνωρίζει τις αλληλουχίες που στοχεύονται στην εσωτερική μεμβράνη και τις μεταφέρει επίσης στον Tom22 υποδοχέα ώστε να εισαχθούν στο οργανίδιο (van Wilpe et al., 1999; Wagner et al., 2009). Το σύμπλοκο TOM συμπληρώνουν οι μικρές υπομονάδες Tom5, Tom6 και Tom7 οι οποίες παίζουν ρόλο στην είσοδο πρόδρομων μορίων και στην σταθεροποίηση και αποσταθεροποίηση του συμπλόκου αντίστοιχα (Dietmeier et al., 1997; Meisinger et al., 2001; Schmitt et al., 2005).

### *Ενσωμάτωση πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη*

#### *Το σύμπλοκο SAM*

Τα πρόδρομα μόρια που κατευθύνονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και εμπεδώνονται σε αυτήν μέσω του συμπλόκου SAM (Sorting and Assembly Machinery) φέρουν ειδικό β-σινιάλο (εικόνα 2-μονοπάτι 1). Αυτό το σινιάλο αποτελείται από μια λυσίνη ή αργινίνη, μια γλυκίνη και δυο υδρόφοβα αμινοξέα. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η Mdm1, ο πόρος Tom40, η πορίνη κλπ (Becker et al., 2008). Αφού περάσουν την εξωτερική μεμβράνη μέσω του TOM συμπλόκου, αυτά τα πρόδρομα μόρια αναγνωρίζονται από το εξαμερές σύμπλοκο σαπερονών Tim9/Tim10 που βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου, το οποίο με τη σειρά του τα μεταφέρει στο σύμπλοκο SAM (Kutik et al., 2008; Wiedemann et al., 2001).

#### *Η πρωτεΐνη Mim1*

Τα πρόδρομα μόρια που διαθέτουν α-έλικες αντί για β-πτυχώσεις χρησιμοποιούν το μονοπάτι μέσω της Mim1 (Mitochondrial Import 1) για την εμπέδωση στην εξωτερική μεμβράνη (εικόνα 2-μονοπάτι 2). Αυτές οι πρωτεΐνες δεν εισέρχονται από τον Tom40 πόρο αλλά φαίνεται να δημιουργούνται τοπικά κατάλληλες συνθήκες ώστε να μπορέσουν να διαπεράσουν την εξωτερική μεμβράνη και να ενσωματωθούν σε αυτή (Becker et al., 2012).

## Ενσωμάτωση πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη

### *Το σύμπλοκο TIM22*

Το σύμπλοκο TIM22 είναι το κύριο μονοπάτι εμπέδωσης πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη (εικόνα 2-μονοπάτι 3). Αποτελείται από τον πόρο Tim22 και τις υπομονάδες Tim54 και Tim18 και απαιτεί την παρουσία μεμβρανικού δυναμικού για την εισαγωγή πρωτεϊνών στην μεμβράνη (Neupert and Herrmann, 2007; Rehling et al., 2003). Πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν αυτό το κανάλι εισόδου έχει βρεθεί ότι ανήκουν σε μεγάλο βαθμό σε μεταβολικά μονοπάτια. Τα πρόδρομα μόρια που οδηγούνται σε αυτό το σύμπλοκο δεν φέρουν αμφιπαθή  $\alpha$ -έλικα αλλά έχουν πολλαπλά σινιάλα εντός της ώριμης αλληλουχίας τους. Περνούν από το σύμπλοκο TOM σχηματίζοντας υδρόφοβες λούπες (Wiedemann et al., 2001) και οδηγούνται προς το σύμπλοκο TIM22 με την βοήθεια των συμπλόκων σαπερονών Tim9/Tim10 και Tim8/Tim13 (Vial et al., 2002; Webb et al., 2006).

### *Το μονοπάτι Oxa1*

Το συγκεκριμένο μονοπάτι χρησιμοποιείται από πρωτεΐνες που κωδικοούνται από το μιτοχονδριακό DNA προκειμένου να ενσωματωθούν στην εσωτερική μεμβράνη (εικόνα 2). Τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα που μεταφράζουν τις πρωτεΐνες εντός της μήτρας του μιτοχονδρίου έρχονται σε επαφή με την Oxa1. Δυο λόγοι υπάρχουν γιατί μπορεί να συμβαίνει αυτό. Ο πρώτος, προκειμένου το προστατευθούν οι υδρόφοβες περιοχές των νεοσυντιθέμενων μορίων και να ενσωματωθούν στην μεμβράνη και ο δεύτερος, η αλληλεπίδραση αυτή κατά πάσα πιθανότητα προτιμάται ενεργειακά ώστε να περάσει το μόριο στην εσωτερική μεμβράνη (Hell et al., 1998; Stuart, 2002).

### *Το μονοπάτι TIM23- Μεταφορά πρωτεϊνών σε μήτρα, εσωτερική μεμβράνη και διαμεμβρανικό χώρο.*

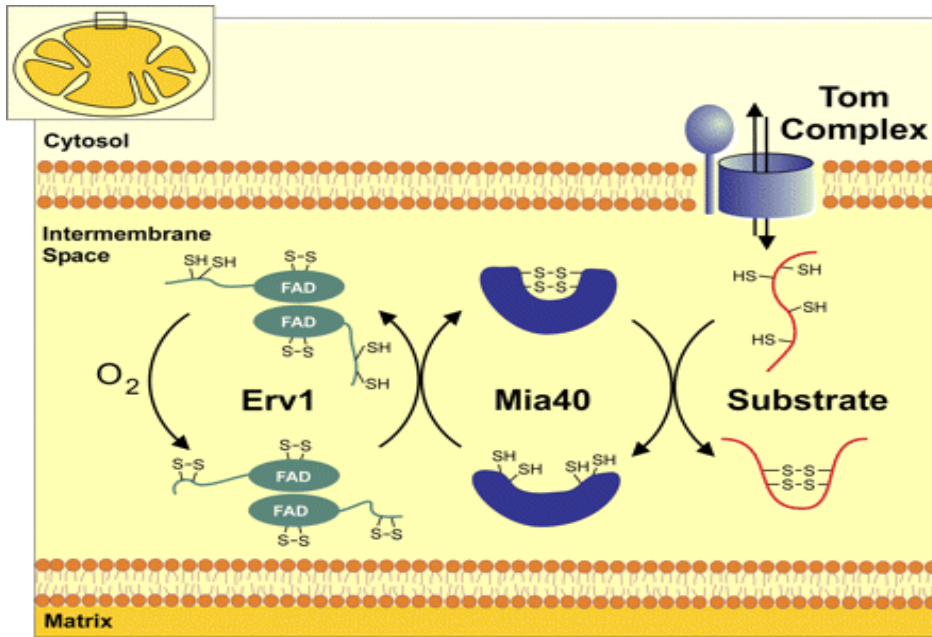
Η τρανσλοκάση TIM23 έχει την δυνατότητα μεταφοράς πρωτεϊνών προς τη μήτρα, προς τον διαμεμβρανικό χώρο αλλά και να ενσωματώνει πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη. Τα πρόδρομα μόρια που περνούν από το σύμπλοκο αυτό φέρουν στην αλληλουχία τους μια αμφιπαθή  $\alpha$ -έλικα που έχει υδρόφοβα αμινοξέα από την μια πλευρά και θετικά φορτισμένα αμινοξέα από την άλλη. Αυτή η αλληλουχία αναγνωρίζεται από τις υπομονάδες Tom20 και Tom22 αντίστοιχα (Chacinska et al., 2009; Moberg et al., 2004) και κατευθύνεται προς το σύμπλοκο TIM23 από το οποίο απαιτείται η παρουσία μεμβρανικού δυναμικού προκειμένου η θετικά φορτισμένη αλληλουχία να περάσει διαμέσου του πόρου του (Krayl et al., 2007; Shariff et al., 2004).

Αν το πρόδρομο μόριο κατευθύνεται προς την μήτρα του οργανιδίου, πέρα από την παρουσία μεμβρανικού δυναμικού ( $\Delta\psi$ ), απαιτείται και η ύπαρξη μιας δεύτερης πηγής ενέργειας, του ATP (εικόνα

2-μονοπάτι 4). Το ενεργειακό αυτό μόριο, ενεργοποιεί το σύμπλοκο PAM (Presequence translocase-Associated Motor) στο οποίο βρίσκεται η μιτοχονδριακή σαπερόνη Hsp70 η οποία προσδένεται στην πρωτεΐνη και την οδηγεί στην μήτρα (van der Laan et al., 2010; Mossmann et al., 2011). Η αμφιπαθής  $\alpha$ -έλικα αφαιρείται πρωτεολυτικά μέσω της πεπτιδάσης MPP (Mitochondrial Processing Peptidase). Στην περίπτωση που υπάρχει υδρόφοβο τμήμα μετά την αμφιπαθή  $\alpha$ -έλικα, τότε το πρόδρομο μόριο οδηγείται στην εσωτερική μεμβράνη και αγκυροβολείται εκεί (stop-transfer pathway) (εικόνα 2-μονοπάτι 5). Μέρος των πρωτεϊνών που καταλήγει στον διαμεμβρανικό χώρο διέρχεται μέσω του TIM23 μονοπατιού (εικόνα 2-μονοπάτι 6). Αυτά τα πρόδρομα μόρια κόβονται πρωτεολυτικά σε δυο στάδια, από την MPP και από την Inner Membrane Peptidase (IMP) απελευθερώνοντας την πρωτεΐνη στον διαμεμβρανικό χώρο (Bolender et al., 2008; Glick et al., 1992).

#### *Στόχευση στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου-MIA pathway*

Η ανακάλυψη του κύριου μηχανισμού με τον οποίο πρωτεΐνες εγκλωβίζονται στον διαμεμβρανικό χώρο έγινε μόλις πριν 10 χρόνια. Για την μεταφορά πρωτεϊνών στον διαμεμβρανικό χώρο (IMS), πέραν αυτών που εισέρχονται από το TIM23 μονοπάτι, το όλο σύστημα λειτουργεί τελείως διαφορετικά από τα υπόλοιπα μονοπάτια (εικόνα 3). Στο IMS βρίσκονται πρωτεΐνες με μικρό μοριακό μέγεθος <20kDa οι οποίες φέρουν χαρακτηριστικά μοτίβα κυστεϊνών και έχουν την δυνατότητα σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. Αυτός είναι και ο τρόπος που παγιδεύονται στον διαμεμβρανικό χώρο αφού εισέλθουν εντός του οργανιδίου. Δεδομένου όμως ότι το περιβάλλον του IMS είναι αναγωγικό λόγω της ελεύθερης ανταλλαγής μορίων γλουταθειόνης με το κυτταρόπλασμα, ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα σε αυτά τα υποστρώματα αποτελούσε αίνιγμα (Hell, 2008; Naoé et al., 2004).



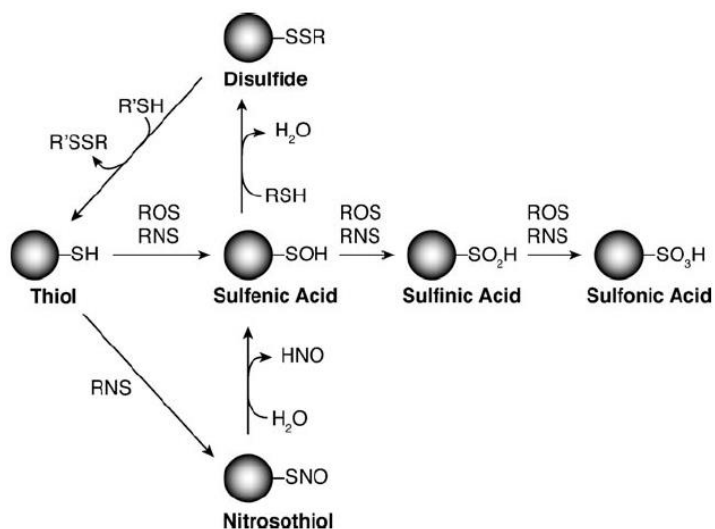
**Εικόνα 3:** Αναλυτική αναπαράσταση του μονοπατιού MIA στα μιτοχόνδρια (Herrmann and Köhl, 2007).

Ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών λαμβάνει χώρα μέσω αλληλεπιδράσεων των υποστρώματων με την βασική πρωτεΐνη του μηχανισμού MIA40 (Chacinska et al., 2004). Η αλληλεπίδραση της με τα εκάστοτε υποστρώματα οδηγεί στην αναγωγή του καταλυτικού της μοτίβου το οποίο επανοξειδώνεται από την Erv1 (Grumbt et al., 2007; Müller et al., 2008). Τα ηλεκτρόνια της αντίδρασης μεταφέρονται είτε απευθείας στο μοριακό οξυγόνο, είτε στο κυτόχρωμα c και την αναπνευστική αλυσίδα (Stojanovski et al., 2008). Τα υποστρώματα του μονοπατιού φέρουν χαρακτηριστικά κυστεϊνικά μοτίβα όπως τα CX<sub>2</sub>C και τα διπλά CX<sub>9</sub>C, CX<sub>3</sub>C μοτίβα (Sideris et al., 2009). Το μονοπάτι αναλύεται εκτενέστερα στο μέρος ‘Οξειδωτική αναδίπλωση στα μιτοχόνδρια’.

## Κεφάλαιο 2: Οξειδωτική αναδίπλωση στα μιτοχόνδρια

### 2.1 Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και η σημασία τους στα μιτοχόνδρια

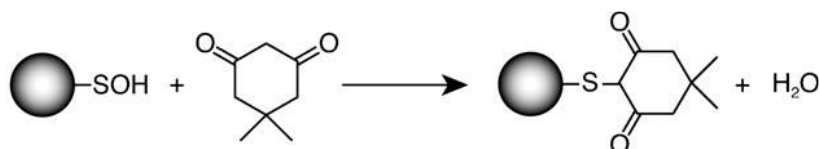
Οι δισουλφιδικοί δεσμοί αποτελούν τους πιο ισχυρούς δεσμούς. Σχηματίζονται ανάμεσα σε κατάλοιπα κυστεϊνών, έχουν την ικανότητα να διαμορφώνουν την δομή των πρωτεϊνών και να επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Οι κυστεΐνες ως αμινοξέα, θεωρούνται από τα πιο δραστικά κατάλοιπα και μπορούν να επηρεαστούν εύκολα από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Οι κυστεΐνες έχουν επίσης την δυνατότητα να συμμετέχουν σε καταλυτικά κέντρα ενζύμων ακόμα και να προσδένουν μέταλλα. Αυτός ο ιδιαίτερος ρόλος τους και η δραστική τους φύση είναι και ο λόγος που τα συγκεκριμένα κατάλοιπα εμφανίζονται συνήθως συντηρημένα ανάμεσα στις αλληλουχίες των πρωτεϊνών (Abkevich and Shakhnovich, 2000).



**Εικόνα 4:** Τα στάδιο οξειδωσης των κυστεϊνών από τα ενεργά μόρια οξυγόνου (ROS) (Seo and Carroll, 2011).

Όπως φαίνεται από το σχεδιάγραμμα (εικόνα 4), η κυστεΐνη διαθέτει ένα μόριο θειόλης το οποίο μπορεί να επηρεαστεί από οξειδωτικούς παράγοντες και να αλλάξει κατάσταση. Η ανηγμένη θειόλη όταν οξειδωθεί (από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συνήθως) οδηγείται στον σχηματισμό σουλφενικού οξέος (-SOH). Αυτή η κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού. Εναλλακτικά, η κατάσταση αυτή μπορεί να αναστραφεί και το σουλφενικό οξύ να οδηγηθεί πίσω στην κατάσταση της ανηγμένης θειόλης μέσω αλληλεπίδρασης με την γλουταθειόνη. Αν η παρουσία των οξειδωτικών είναι μεγάλη τότε η θειόλη μπορεί να οδηγηθεί σε μη αντιστρέψιμες καταστάσεις, το σουλφινικό και σουλφονικό οξύ. Η μετάβαση

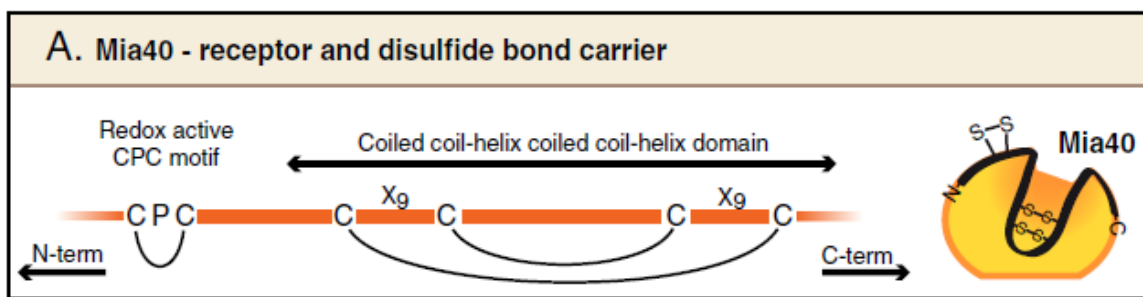
ανάμεσα στις οξειδωτικές καταστάσεις είναι πάρα πολύ γρήγορη και έτσι είναι δύσκολο να απομονωθούν και να παρατηρηθούν. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν φτιαχτεί διάφορα χημικά μόρια τα οποία μπορούν να αναγνωρίσουν το σουλφενικό οξύ (-SOH) όπως το 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (dimedone) (εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** Αντίδραση αναγνώρισης του σουλφενικού οξέος από το χημικό dimedone (Seo and Carroll, 2011)

## 2.2 Το μονοπάτι δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών Mia40-Erv1

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, οι δισουλφιδικοί δεσμοί δημιουργούνται μέσω του MIA μονοπατιού παγίδευσης πρωτεΐνων στον διαμεμβρανικό χώρο. Η Mia40 (Mitochondrial IMS import and assembly machinery) είναι απαραίτητη για την ζωή και είναι συντηρημένη μέχρι και τον άνθρωπο (Mesecke et al., 2005). Έχει μοριακό βάρος γύρω στα 44kDa αλλά λόγω των πολλών αρνητικών φορτίων που διαθέτει, όταν ηλεκτροφορείται αναλύεται στα 55-65kDa ανάλογα το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη στον σακχαρομύκητα, κωδικεύεται από το πυρηνικό DNA και εισάγεται στα μιτοχόνδρια μέσω του μονοπατιού TIM23 (stop-transfer) όπου αγκυροβολείται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω του αμινοτελικού της άκρου (Sideris and Tokatlidis, 2010).

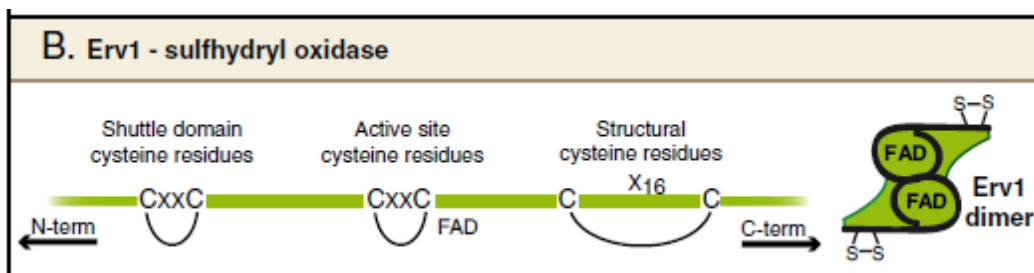


**Εικόνα 6:** Σχηματική αναπαράσταση των κυστεϊνικών μοτίβων και της τριτοταγής δομής της Mia40 (Stojanovski et al., 2012)



Το καρβοξυτελικό της μέρος είναι συντηρημένο ανάμεσα στους οργανισμούς ενώ το αμινοτελικό της διαφέρει σε αριθμό αμινοξέων. Στο καρβοξυτελικό της μέρος η Mia40 φέρει δυο CX<sub>2</sub>C δομικά μοτίβα και ένα CPC μοτίβο που είναι το καταλυτικό της κέντρο και το οποίο χρησιμεύει στην αλληλεπίδραση της με τα πρόδρομα μόρια (εικόνα 6). Η δομή της έχει χαρακτηριστεί τόσο στον σακχαρομύκητα όσο και στον άνθρωπο μέσω NMR και X-ray (Banci et al., 2009).

Η δεύτερη, επίσης απαραίτητη για την βιωσιμότητα, πρωτεΐνη του μονοπατιού είναι η Erv1 (Essential for respiration and viability 1). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη των 22kDa, είναι μια FAD-εξαρτώμενη σουλφυδριλοξειδάση που λειτουργεί ως διμερές προκειμένου να ανακυκλώσει την Mia40 και αυτή με την σειρά της να μπορεί να δεχτεί επιπλέον πρόδρομα μόρια για να τα οξειδώσει (Lee et al., 2000; Stojanovski et al., 2008). Η αντίδραση αυτή οδηγεί στην παραγωγή ηλεκτρονίων τα οποία μεταβιβάζονται είτε στο μοριακό οξυγόνο είτε μέσω του κυτοχρώματος c στην αναπνευστική αλυσίδα.



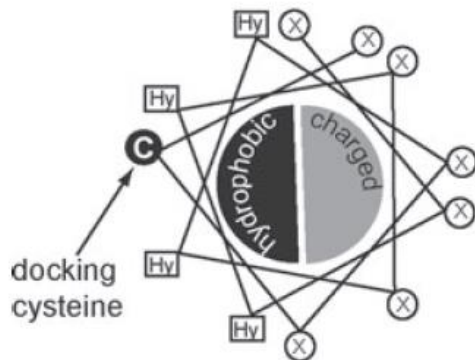
**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση των κυστεϊνικών μοτίβων και της τριτοταγής δομής της πρωτεΐνης Erv1 (Stojanovski et al., 2012)

Η Erv1 διαθέτει έξι συντηρημένες κυστεΐνες στην αλληλουχία της, εκ των οποίων οι τέσσερις βρίσκονται σε μοτίβο CX<sub>2</sub>C. Οι άλλες δύο κυστεΐνες σχηματίζουν ένα CX<sub>16</sub>C μοτίβο καρβοξυτελικά της αλληλουχίας της (εικόνα 7). Μετάλλαξη στις δυο αυτές κυστεΐνες, οδηγεί σε απώλεια της πρόσδεσης FAD από την Erv1 (Hofhaus et al., 2003). Τα άλλα δυο κυστεϊνικά μοτίβα χρησιμεύουν για την μετάφορα των ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στα μόρια FAD.

### 2.3 Τα υποστρώματα του μονοπατιού Mia40-Erv1.

Τα υποστρώματα του μονοπατιού αυτού φέρουν ειδικό σήμα στόχευσης (MISS/ITS) που αναγνωρίζεται από την Mia40 (εικόνα 8). Η αλληλουχία στόχευσης μοιάζει με την αμφιπαθή έλικα που έχουν οι

πρωτεΐνες που στοχεύονται στα μιτοχόνδρια αλλά σε αυτή την περίπτωση είναι πολύ μικρότερη σε αριθμό αμινοξέων, 10-12 κατάλοιπα και φέρει εντός της μια κυστεΐνη η οποία χρησιμοποιείται για την αλληλεπίδραση με το καταλυτικό κέντρο της Mia40 (Sideris and Tokatlidis, 2010).



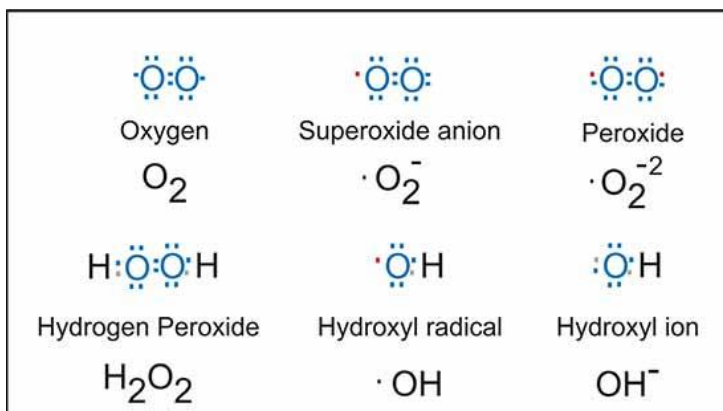
**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαράσταση του MISS/ITS σιγιάλου στόχευσης που οδηγεί τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στον διαμεμβρανικό χώρο μέσω του μονοπατιού MIA (Sideris and Tokatlidis, 2010).

Χαρακτηριστικά υποστρώματα του μονοπατιού MIA40 αποτελούν πρωτεΐνες που φέρουν διπλά  $CX_3C$  κυστεϊνικά μοτίβα όπως είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών Tims, των σαπερονών που βρίσκονται στον διαμεμβρανικό χώρο (Chacinska et al., 2009) καθώς και διπλά μοτίβα  $CX_9C$  που φέρουν οι πρωτεΐνες του συμπλόκου COX (Gabriel et al., 2007). Οι πρωτεΐνες αυτές όταν οξειδωθούν σχηματίζουν την χαρακτηριστική CHCH (coiled coil-helix-coiled coil-helix) δομή που σταθεροποιείται από δυο παράλληλους δισουλφιδικούς δεσμούς.

## Κεφάλαιο 3: Το οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια

### 3.1 Οι ενεργές μορφές ROS στα μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια, έχει βρεθεί πρόσφατα, ότι έχουν την ικανότητα να παράγουν ελεύθερες ρίζες και ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) τα οποία είναι πολύ τοξικά για το κύτταρο (Venditti et al., 2014). Στα μιτοχόνδρια, έχει βρεθεί ότι παράγεται περίπου το 85% των συνολικών ROS του κυττάρου (Aon et al., 2012). Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνουν μόρια όπως το  $H_2O_2$ , το ανιόν σουπεροξειδίου  $O_2^-$  και οι ρίζες υδροξυλίου  $\cdot OH$  (Paulsen and Carroll, 2009) και μπορούν να επηρεάσουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στις βιομεμβράνες, τις πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας μια σειρά από επιβλαβείς καταστάσεις για τον οργανισμό (Kehrer, 1993). Το ανιόν σουπεροξειδίου αποτελεί το αρχικό μόριο για την δημιουργία των άλλων ROS και συμμετέχει σε πολλές αντιδράσεις. Με την πάροδο του χρόνου οι αερόβιοι οργανισμοί ανέπτυξαν μηχανισμούς άμυνας για να προστατευτούν από τις ενεργές μορφές οξυγόνου. Η αποσύνθεση τους οδηγεί στην παραγωγή  $H_2O_2$ , το οποίο πέραν της οξειδωτικής του δράσης έχει επίσης και την δυνατότητα να συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων (Krems et al., 1995). Υπερπαραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο αν αποτύχουν οι μηχανισμοί αντιμετώπισης τους.



**Εικόνα 9:** Πίνακας ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). (by Paul Held, Laboratory Manager, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc.)

### 3.2 Μηχανισμοί αντιμετώπισης των ROS

### Δισμουτάσες του υπεροξειδίου (SOD)

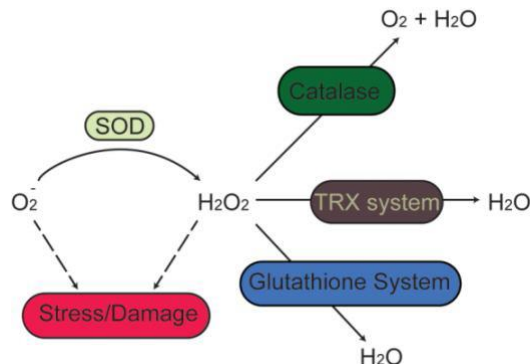
Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την κατανάλωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) το οποίο θα αποικοδομηθεί μέσω άλλων μονοπατιών στη συνέχεια. Στον σακχαρομύκητα κωδικοούνται δυο δισμουτάσες του υπεροξειδίου, η Sod1 και η Sod2 οι οποίες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και στο IMS, και στην μήτρα των μιτοχονδρίων αντίστοιχα. Η δράση αυτών των ενζύμων εξαρτάται από την πρόσδεση μετάλλων όπως ο χαλκός και ο ψευδάργυρος για την περίπτωση της Sod1 και το μαγγάνιο για την περίπτωση της Sod2 (Fridovich, 1995).

### Καταλάσες

Οι καταλάσες αποτελούν ένα από τα μονοπάτια διάσπασης του  $H_2O_2$  σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Δυο καταλάσες υπάρχουν στον σακχαρομύκητα, η μια βρίσκεται στα υπεροξυσώματα (Ctt1) και η δεύτερη στο κυτταρόπλασμα και στην μήτρα του μιτοχονδρίου (Ctt2) (Petrova et al., 2004). Ο ρόλος τους δεν είναι ξεκάθαρος καθώς πειράματα απαλοιφής αυτών των ενζύμων δεν έδωσαν κάποιο φαινότυπο, ίσως λόγω της παρουσίας εναλλακτικών μονοπατιών κατανάλωσης του  $H_2O_2$ .

### Συστήματα θειορεδοξίνης και γλουταθειόνης (TRX/GPX)

Ένας δεύτερος τρόπος αντιμετώπισης της υπερέκφρασης  $H_2O_2$  αποτελεί το σύστημα TRX/GPX το οποίο οδηγεί σε δημιουργία μορίων νερού μετά την αντίδραση αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το σύστημα αυτό επιδρά στις οξειδοαναγωγικές καταστάσεις των πρωτεϊνών προκειμένου να αποικοδομήσει το  $H_2O_2$  και χωρίζεται σε δυο κατηγορίες ανάλογα τον δότη ηλεκτρονίων. Η μια κατηγορία είναι οι υπεροξειδάσες της θειορεδοξίνης (Trx1, Trx2, Trx3) (Hansen et al., 2006; Watson et al., 2003) και η άλλη είναι οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Gpx1, Gpx2, Gpx3) (Toledano et al., 2013; Venditti et al., 2014). Από αυτές, στον σακχαρομύκητα, η Gpx3 θεωρείται πιο σημαντική ως προς την απόκριση της στο οξειδωτικό στρες λόγω  $H_2O_2$ , μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Yap1 (Delaunay et al., 2002; Paulsen and Carroll, 2009).



**Εικόνα 10:** Μηχανισμοί αντιμετώπισης των υψηλών επιπέδων  $H_2O_2$  στα κύτταρα (by Afroditi Chatzi)

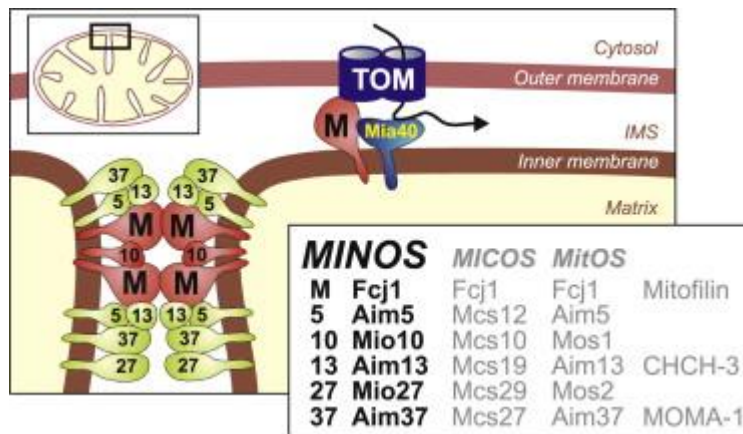
## Κεφάλαιο 4: Εσωτερική οργάνωση των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν οργανίδια με πολύπλοκη οργάνωση. Μελέτες με την χρήση ηλεκτρονικής τομογραφίας αποκάλυψαν ότι η εσωτερική τους μεμβράνη χωρίζεται σε δυο διακριτές τοπολογικά περιοχές, την εσωτερική συνοριακή μεμβράνη (inner boundary membrane-IBM) και τις ακρολοφίες (cristae) (Herrmann and Riemer, 2010). Η διαδικασία δημιουργίας των ακρολοφιών αυτών δεν είναι τυχαία αλλά οφείλεται σε εγκολπώσεις της εσωτερικής μεμβράνης που οφείλονται στην παρουσία των διασυνδέσεων (cristae junctions) στα όρια των ακρολοφιών και της εσωτερικής συνοριακής μεμβράνης (Mannella, 2006). Οι διασυνδέσεις αυτές διαχωρίζουν τις δυο μεμβράνες ως προς την πρωτεϊνική τους σύνθεσή αλλά και λειτουργικά παρεμποδίζοντας την διάχυση πρωτεϊνών από την εσωτερική μεμβράνη και τον διαμεμβρανικό χώρο (Herrmann, 2011). Πρόσφατες ανακαλύψεις έδωσαν φως στην πρωτεϊνική σύνθεση των διασυνδέσεων και αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου υπεύθυνου για την δημιουργία των ακρολοφιών.

### 4.1 Το σύμπλοκο MINOS

Το σύμπλοκο που έχει ρόλο στον καθορισμό και σχηματισμό των συγκεκριμένων ακρολοφιών ονομάζεται MINOS (Mitochondrial inner membrane organizing system) το οποίο αναφέρεται και ως MICOS (Mitochondrial contact site complex) ή και ως MitOS (Mitochondrial organizing structure) (Harner et al., 2011; Herrmann, 2011; Hoppins et al., 2011). Το πρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο αποτελείται από έξι υπομονάδες, την μιτοφιλίνη/Fcj1, την Mio10, Aim5, Aim13, Aim37 και Mio27 (εικόνα 11). Οι πρώτες δυο είναι απαραίτητες για την δημιουργία των ακρολοφιών καθώς απουσία τους έχει βρεθεί να χάνονται αυτές οι δομές και στην θέση τους δημιουργούνται παράλληλοι σχηματισμοί εντός του οργανιδίου (van der Laan et al., 2012).

Αυτό όμως που έχει ιδιαίτερη σημασία με αυτό το σύμπλοκο, είναι η ικανότητα του να αλληλεπιδρά και να συνδέει το σύμπλοκο TOM με την Mia40. Συγκεκριμένα, η μιτοφιλίνη/Fcj1 του MINOS φέρεται να επηρεάζει την εισαγωγή πρόδρομων μορίων καθώς όταν απουσιάζει, τα υποστρώματα της Mia40 εισέρχονται σε μειωμένο βαθμό στα μιτοχόνδρια ενώ σε υπερέκφραση της Fcj1 παρατηρείται αύξηση τους (von der Malsburg et al., 2011).



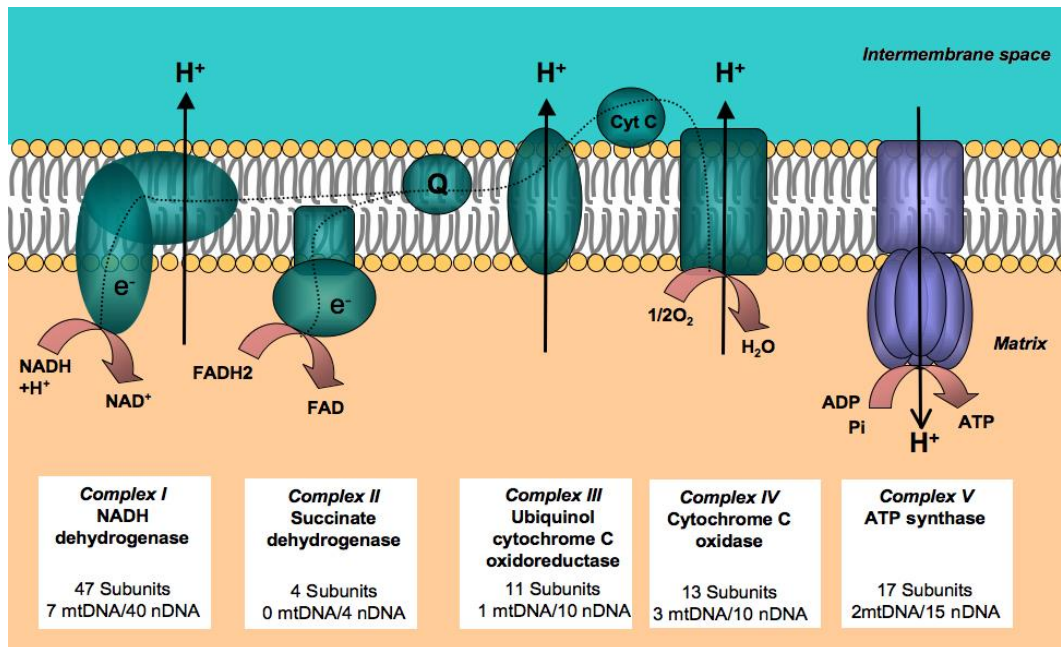
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος MINOS στα μιτοχόνδρια (Herrmann, 2011).

## Κεφάλαιο 5: Η οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια

### 5.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, τα μιτοχόνδρια αποτελούν τη μεγαλύτερη πηγή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και έχειδειχθεί ότι διαθέτουν ένα ισχυρό σύστημα άμυνας απέναντι σε αυτά. Εντός των οργανιδίων αυτών, τα σύμπλοκα που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο στην παραγωγή ROS και στην ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος στα διαμερίσματα των μιτοχονδρίων (Brand et al., 2004; Dröse et al., 2014).

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, γνωστής και ως μηχανισμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εντοπίζονται στα κρίστα, τις χαρακτηριστικές δομές που σχηματίζονται από την εσωτερική μεμβράνη στα μιτοχόνδρια και στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων και το ένζυμο σύνθεσης ATP, την F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP συνθάση (Stuart, 2008; εικόνα 12) Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται ανάμεσα στα τέσσερα σύμπλοκα και καταλήγουν στον τελικό δέκτη που είναι το μοριακό οξυγόνο ώστε να παραχθεί νερό.



**Εικόνα 12:** Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Bellance et al., 2009).

Προκειμένου να λειτουργήσει η αναπνευστική αλυσίδα χρησιμοποιεί ως καύσιμα NADH και ηλεκτρικό οξύ που παράγονται κατά τις διαδικασίες της γλυκόλυσης και του κύκλου κιτρικού οξέος. Κατά τη διάρκεια της κατάλυσης τους, ανάμεσα στα μεγάλα σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων εντοπίζονται και δυο μικρότερα μόρια, η ουβικινόνη και το κυτόχρωμα c, που μεταβιβάζουν τα ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο I στο III και από το II στο III αντίστοιχα. Η λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων δημιουργεί μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης το οποίο χρησιμοποιείται από την ATP συνθάση για την παραγωγή ATP. Αναλυτικά η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από (Chaban et al., 2014; Dudkina et al., 2010):

#### NADH-οξειδοαναγωγή της ουβικινόνης (σύμπλοκο I)

Το μεγαλύτερο σύμπλοκο της αλυσίδας, βρίσκεται αγκυροβολημένο στην εσωτερική μεμβράνη με ένα μικρό μέρος του εκτεθειμένο προς την μήτρα του μιτοχονδρίου. Έχει την δυνατότητα πρόσδεσης NADH και μεταφέρει δυο ηλεκτρόνια στην λιποφιλική ουβικινόνη η οποία όταν αναχθεί οδηγεί στην μεταφορά τεσσάρων πρωτονίων από την μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (Baradaran et al., 2013; Efremov et al., 2010). Αποτελεί ένα από τα κυριότερα σύμπλοκα παραγωγής σουπεροξειδίου, της αρχικής μορφής ROS, το οποίο απελευθερώνεται στην μήτρα του μιτοχονδρίου (Brand, 2010; Kowaltowski et al., 2009; Muller et al., 2004).

### Αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (σύμπλοκο II)

Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί δεύτερο ανεξάρτητο σημείο εισόδου ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα οξειδώνοντας το ηλεκτρικό οξύ και μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια στην ουβικινόνη συνδέοντας έτσι απευθείας την αναπνευστική αλυσίδα με τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Επίσης σε αντίθεση με τα υπόλοιπα τρία σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, το σύμπλοκο II δεν αποτελεί κανάλι πρωτονίων και δεν συμμετέχει ενεργά στην δημιουργία βαθμίδωσης. Όπως και το σύμπλοκο I, έχει και αυτό την δυνατότητα παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια χωρίς να γνωρίζουμε την ακριβή τοπολογία απελευθέρωσης τους (Dröse et al., 2014; Guo and Lemire, 2003).

### Οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III)

Το σύμπλοκο αυτό λειτουργεί ως διμερές στην εσωτερική μεμβράνη και οξειδώνει την ουβικινόνη σε ουβικινόλη μεταφέροντας δυο πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο. Τα ηλεκτρόνια από το οξειδωμένο μόριο της ουβικινόλης μεταφέρονται στο κυτόχρωμα c μέσω του κυτοχρώματος  $b_1$  και  $c_1$  του συμπλόκου III. Το σύμπλοκο αυτό παράγει επίσης σουπεροξειδίο το οποίο το απελευθερώνει τόσο στον διαμεμβρανικό χώρο όσο και στην μήτρα των μιτοχονδρίων (Muller et al., 2004).

### Οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV)

Το σύμπλοκο αυτό δέχεται τα ηλεκτρόνια που μεταφέρει το κυτόχρωμα c, είτε από το σύμπλοκο III είτε από το μονοπάτι οξειδωτικής αναδίπλωσης Mia40-Erv1 (Hell, 2008), και τα μεταφέρει στο μοριακό οξυγόνο ώστε να το μετατρέψει σε δυο μόρια νερού. Από αυτή την διαδικασία τέσσερα πρωτόνια οδηγούνται προς τον διαμεμβρανικό χώρο από την μήτρα των μιτοχονδρίων.

## *5.2 Η ATP συνθάση*

Το πέμπτο σύμπλοκο της αναπνευστικής αλυσίδας είναι η F1-F0 ATP συνθάση. Αυτό το ένζυμο εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών και στην περιπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων. Η F1-F0 ATP συνθάση είναι απαραίτητη για την παροχή της ενέργειας που χρειάζονται οι αερόβιοι οργανισμοί, του ATP, το οποίο συντίθεται από το ADP και τον ελεύθερο φώσφορο. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροχημικής διαμεμβρανικής διαβάθμισης πρωτονίων μέσω της δράσης της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Boyer, 1997; Senior et al., 2002).

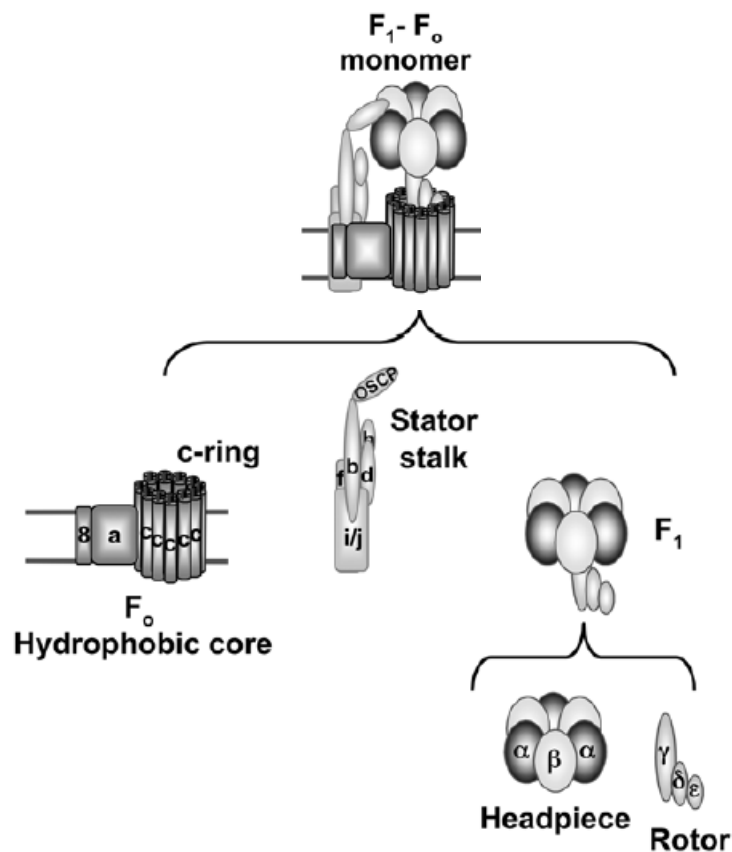
Όπως αναγράφεται και στην ονομασία του, το ένζυμο αυτό αποτελείται από δυο ξεχωριστά λειτουργικά μέρη, το υδρόφιλο F1 μέρος που είναι εκτεθειμένο προς την μήτρα του μιτοχονδρίου, και το υδρόφοβο F0 μέρος το οποίο βρίσκεται εμπεδωμένο στην εσωτερική μεμβράνη. Το F1 μέρος είναι υπεύθυνο για την



σύνθεση και την υδρόλυση του ATP και το F0 μέρος είναι υπεύθυνο για την μεταφορά των πρωτονίων από τον διαμεμβρανικό χώρο στην μήτρα των μιτοχονδρίων (Ackerman and Tzagoloff, 2005; Arnold et al., 1998). Τα δύο τμήματα του ενζύμου ενώνονται μέσω του κεντρικού και περιφερειακού στελέχους του ενζύμου.

Η απλούστερη μορφή του ενζύμου εντοπίζεται στο περίπλασμα των βακτηρίων και αποτελείται από οκτώ υπομονάδες (Senior et al., 2002). Στον σακχαρομύκητα, το ένζυμο έχει μοριακό βάρος περίπου 600kDa και οι υπομονάδες που το αποτελούν κωδικοποιούνται τόσο από το πυρηνικό όσο και από το μιτοχονδριακό DNA. Ενώ έχει διατηρήσει την βασική δομή του προγονικού προκαρυωτικού ενζύμου, έχει εξελιχθεί και παρουσιάζει επιπλέον υπομονάδες που σχετίζονται με το F0 τμήμα (Velours and Arselin, 2000; Walker et al., 1995). Διαθέτει 14 υπομονάδες που είναι απαραίτητες για την λειτουργικότητα του και έχει επιπλέον επτά που ρυθμίζουν την λειτουργία του και έχουν άλλους ρόλους στο ένζυμο (Giraud et al., 2002; Velours et al., 2009; Wittig and Schägger).

Συγκεκριμένα το F1 τμήμα αποτελείται από πέντε υπομονάδες, τις  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  και  $\epsilon$  οι οποίες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Το F0 τμήμα αποτελείται από τις υπομονάδες  $\delta$ ,  $c_9$  και  $8$  οι οποίες κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA και από τις  $4$ ,  $d$ ,  $h$ ,  $f$ ,  $i/j$  και OSCP οι οποίες κωδικοποιούνται στον πυρήνα και σχηματίζουν το περιφερειακό στέλεχος που ενώνει τα δυο τμήματα (εικόνα 13). Δυο αναστολείς της λειτουργίας του ενζύμου οι Inh και Stf1p εντοπίζονται στο ένζυμο η δράση των οποίων ρυθμίζεται από τις Stf2p και Stf3p που επίσης αποτελούν υπομονάδες του ενζύμου (Ackerman and Tzagoloff, 2005, 2007; Davies et al., 2012; Giraud et al., 2002).

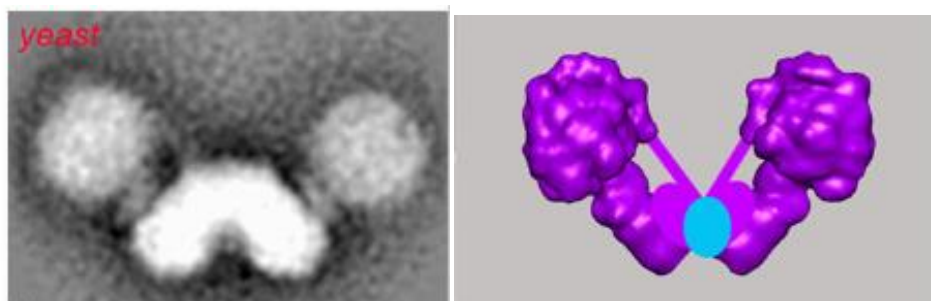


**Εικόνα 13:** Σχηματική αναπαράσταση των υπομονάδων που συνθέτουν το μονομερές της F1-F0 ATP συνθάσης (Ackerman and Tzagoloff, 2007).

Το ένζυμο είναι λειτουργικό με τις παραπάνω υπομονάδες που αναφέρθηκαν, παρόλα αυτά η μονομερής υπόσταση του δεν θεωρείται ότι είναι η φυσιολογική κατάσταση στην οποία λειτουργεί στην περίπτωση των μιτοχονδρίων (Wittig and Schägger, 2008). Πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από την ομάδα του (Allen et al., 1989) σε μιτοχόνδρια του *Paramecium multimicronucleatum* έδειξαν την ύπαρξη των F1 τμημάτων της ATPάσης σε διάταξη σειρών από διμερή στα cristae της εσωτερικής μεμβράνης. Τα διμερή μετά από πειράματα *in situ* έχειδειχθεί ότι βρίσκονται σε ευρείες γωνίες  $\sim 86^\circ$  (Davies et al., 2012; εικόνα 14). Αποσταθεροποίηση των διμερών της ATPάσης προκαλεί μείωση στο μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για την βιογένεση τους και την είσοδο πρωτεϊνών διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης (Bornhönd et al., 2006). Επίσης, απουσία των διμερών/ολιγομερών του ενζύμου παρουσιάζονται αλλαγές στην μορφολογία των μιτοχονδρίων όπου αντί για τις εσωτερικές χαρακτηριστικές ακρολοφίες τους, παρουσιάζοντας πολλαπλές κυκλικές δομές (onion-like structures) (Davies et al., 2012; Wittig and Schägger, 2008). Η παρουσίαση των διμερών της ATP συνθάσης στις ακρολοφίες των μιτοχονδρίων και η απουσία της μορφολογίας τους όταν τα διμερή παύουν να υπάρχουν δείχνει ξεκάθαρα ότι υπάρχει διασύνδεση της ATPάσης με την μορφολογία των μιτοχονδρίων (Dudkina et al., 2006; Zick et al., 2009).

### 5.3 Οι ειδικές για τον διμερισμό υπομονάδες της ATP συνθάσης

Η ανακάλυψη του διμερισμού-ολιγομερισμού της ATPάσης κίνησε το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητικών ομάδων προκειμένου να λύσουν την δομική αλλά και λειτουργική φύση αυτής της κατάστασης του ενζύμου. Περαιτέρω λοιπόν ανάλυση της σύνθεσης του διμερούς της ATPάσης οδήγησε στην ταυτοποίηση των τριών υπομονάδων e, g και k (Arnold et al., 1998). Επιπρόσθετες μελέτες οδήγησαν στην αναγνώριση των υπομονάδων i/j, 4, 6 και h εμπλουτίζοντας την λίστα των υπομονάδων που συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία (Fronzes et al., 2003; Soubannier et al., 2002; Spannagel et al., 1998; Vaillier et al., 1999). Όλες οι υπομονάδες έχουν αντίστοιχα ομόλογα τους στα θηλαστικά με την εξαίρεση των υπομονάδων i/j και k που βρίσκονται αποκλειστικά στον σακχαρομύκητα (Dudkina et al., 2010).



**Εικόνα 14:** Ηλεκτρονική μικροσκοπία και σχηματική αναπαράσταση του διμερούς της ATP συνθάσης στο σακχαρομύκητα (Chaban et al., 2014).

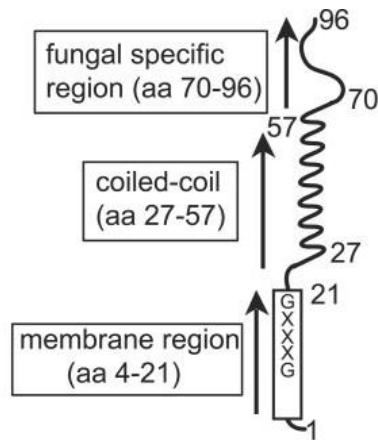
Όλες οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν την ικανότητα δημιουργίας ομοδιμερών μέσω χημικού ανασυνδιασμού, πέραν της k για την οποία δεν έχουμε τέτοιες ενδείξεις (Brunner et al., 2002; Bustos and Velours, 2005; Fronzes et al., 2006; Soubannier et al., 2002; Spannagel et al., 1998). Οι υπομονάδες 4 και 6 οι οποίες βρίσκονται στο περιφερειακό στέλεχος της ATPάσης αλληλεπιδρούν μαζί με τις υπομονάδες e και g και φαίνεται να παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στον διμερισμό (Soubannier et al., 2002; Velours et al., 2011). Απουσία της υπομονάδας h αποτρέπει την ενσωμάτωση της υπομονάδας 6 στην ATPάση οδηγώντας σε απώλεια της λειτουργίας του ενζύμου (Goyon et al., 2008). Η υπομονάδα g απαιτεί την παρουσία της e για να προσδεθεί στο σύμπλοκο της ATPάσης όπως και η υπομονάδα k απαιτεί την ύπαρξη της i (Wagner et al., 2010). Η εσωτερική αρχιτεκτονική των μιτοχονδρίων φαίνεται να επηρεάζεται μόνο στην απουσία των υπομονάδων e, g και του πρώτου διαμεμβρανικού τμήματος της υπομονάδας 4. Η απουσία της υπομονάδας k δεν επηρεάζει την δομή των ακρολοφιών (Chaban et al., 2014; Davies et al., 2012; Giraud et al., 2002).

Ενώ αρχικά υπήρχε η εντύπωση ότι οι υπομονάδες *e* και *g* ήταν απαραίτητες για τον σχηματισμό των διμερών της ATP συνθάσης, πλέον αυτό έχει αρχίσει να αμφισβητείται (Wittig and Schägger, 2008). Μελέτες υποστηρίζουν ότι διμερή του ενζύμου μπορούν να σχηματιστούν απουσία των δύο υπομονάδων μέσω πειραμάτων χημικού ανασυνδιασμού των υπομονάδων *h* και *i* (Fronzes et al., 2006) ή πειραμάτων φθορισμού σε κύτταρα που δεν έχουν την υπομονάδα *e* (Gavin et al., 2005). Επίσης έχει δειχθεί ότι οι υπομονάδες *e* και *g* δημιουργούν ξεχωριστά διακριτά σύμπλοκα τα οποία έχουν την δυνατότητα να οδηγηθούν προς διμερισμό, παρόλα αυτά ο σχηματισμός του διμερούς γίνεται από τις υπομονάδες *i/j* και *k* (Wagner et al., 2009, 2010).

#### 5.4 Η υπομονάδα *e*/Tim11

Η υπομονάδα *e* (Su *e*) παρατηρήθηκε και παρουσιάστηκε αρχικά ως Tim11 το 1996 ως πιθανό συστατικό του συστήματος μεταφοράς πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και συγκεκριμένα στην μεταφορά του κυτοχρώματος  $b_2$  στον διαμεμβρανικό χώρο (Tokatlidis et al., 1996). Αργότερα, μελέτες ταυτοποίησαν το Tim11 ως την υπομονάδα *e* της ATPάσης διαψεύδοντας την αναγκαιότητα της στην μεταφορά του κυτοχρώματος  $b_2$  αλλά διατηρώντας το ερώτημα για το κατά πόσο έχει διττό ρόλο στα μιτοχόνδρια (Arnold et al., 1997).

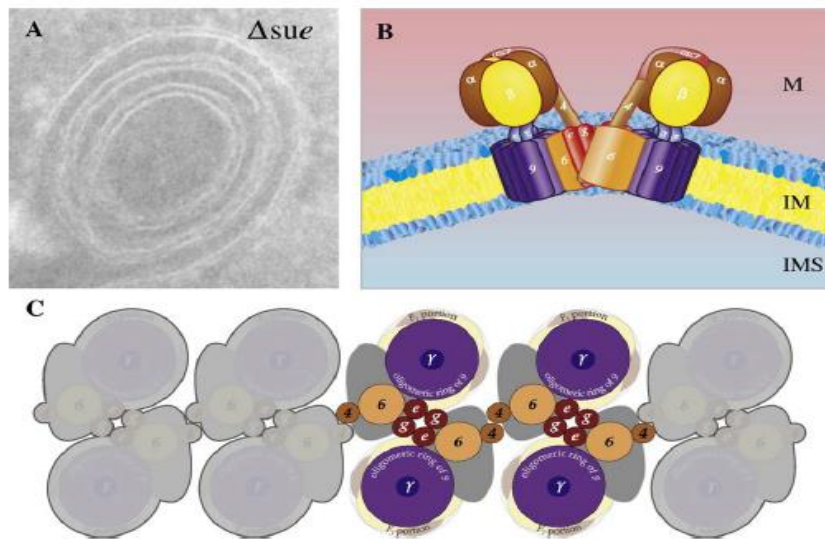
Η Su *e*/Tim11 έχει βρεθεί σε ομολογία με όλες τις γνωστές αντίστοιχες πρωτεΐνες στα θηλαστικά με εξαίρεση το καρβοξυτελικό της άκρο το οποίο επεκτείνεται περισσότερο στην περίπτωση του σακχαρομύκητα. Επίσης πειράματα ανοσοαποτύπωσης δείχνουν την Tim11 ως μια άφθονη πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια (Arnold et al., 1997). Η Tim11 είναι μια σχετικά μικρή πρωτεΐνη 96 αμινοξέων και μοριακού βάρους περίπου 11kDa. Εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων με το αμινοτελικό της άκρο εμπεδωμένο στην εσωτερική μεμβράνη και το καρβοξυτελικό της μέρος εκτεθειμένο στον διαμεμβρανικό χώρο (τοπολογία  $N_{in}-C_{out}$ ) (Arnold et al., 1997, 1998; Arselin et al., 2004). Το αμινοτελικό της άκρο χαρακτηρίζεται ως υδρόφοβο με τον αριθμό των αμινοξέων που είναι αγκυροβολημένα στην μεμβράνη να κυμαίνεται από τα κατάλοιπα 1-25 ή 4-21 ή 26 (Arselin et al., 2003; Brunner et al., 2002; Everard-Gigot et al., 2005).



**Εικόνα 15:** Μοντέλο της δομής της υπομονάδας Tim11 στον σακχαρομύκητα (Everard-Gigot et al., 2005).

Συγκεκριμένα στο σακχαρομύκητα, η Tim11 εμφανίζει εντός του αμινοτελικού της άκρου το κλασσικό μοτίβο διμερισμού GXXXG, του οποίου η μετάλλαξη οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των υπερμοριακών δομών της ATPάσης (Arselin et al., 2004; Yao et al., 2008). Τα κατάλοιπα 27-57 φαίνεται να σχηματίζουν την χαρακτηριστική δομή coiled-coil η οποία είναι συντηρημένη σε όλα τα ομόλογα της πρωτεΐνης ενώ τα τελευταία 40 αμινοξέα εμφανίζονται ως ειδικά για τον συγκεκριμένο οργανισμό και δεν παρουσιάζουν κάποια ομολογία με άλλες Su e πρωτεΐνες (Everard-Gigot et al., 2005; εικόνα 15). Η Tim11 διαθέτει επίσης μια μοναδική κυστεΐνη στο κατάλοιπο 28 και πειράματα χημικής διασύνδεσης (crosslinking) δείχνουν την ικανότητα της να δημιουργεί ομοδιμερή μέσω της συγκεκριμένης κυστεΐνης (Brunner et al., 2002).

Μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από ΔTim11 κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα μετατροπής σε rho<sup>-</sup>, σε μιτοχόνδρια δηλαδή χωρίς μιτοχονδριακό DNA (Arselin et al., 2003, 2004). Επίσης σε τέτοια μιτοχόνδρια παρατηρείται απώλεια της χαρακτηριστικής δομής που σχηματίζει η εσωτερική μεμβράνη, των ακρολοφιών συνδέοντας έτσι τον διμερισμό/ολιγομερισμό της ATP συνθάσης με την μορφολογία των μιτοχονδρίων (Paumard et al., 2002; Soubannier et al., 2002; εικόνα 16). Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που διαψεύδουν την σύνδεση και διαχωρίζουν τα δυο γεγονότα. Υποστηρίζουν ότι το Tim11 στο μιτοχόνδριο, μέσω του N-άκρου του αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που χρειάζονται για την σωστή εσωτερική μορφολογία των μιτοχονδρίων και την σταθερότητα του μιτοχονδριακού DNA και με το C-άκρο του συμμετέχει στον διμερισμό/ ολιγομερισμό της ATPάσης (Everard-Gigot et al., 2005; Stuart, 2008). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Mgm1p η οποία είναι υπεύθυνη για την σύντηξη (fusion) των μιτοχονδρίων έχει δειχθεί να συνδέεται λειτουργικά με την Tim11 (Amutha et al., 2004) όπως και η μιτοφιλίνη/Fcj1 φαίνεται να αλληλεπιδρά μαζί της διαμορφώνοντας τις ακρολοφίες (Rabl et al., 2009).



**Εικόνα 16:** A) Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μιτοχονδρίου από σακχαρομύκητα στο οποίο δεν εκφράζεται η Tim11 υπομονάδα της F1-F0 ATP συνθάσης. B) Μοντέλο αναπαράστασης της κάμψης που προκαλεί το διμερές της ATPάσης. C) Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης των ολιγομερών της ATPάσης (Zick et al., 2009).

# ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

---

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του μονοπατιού εισαγωγής και στόχευσης της υπομονάδας Tim11 της ATPάσης στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα *S.cerevisiae* καθώς και η μελέτη τυχόν αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει με άλλες πρωτεΐνες κατά τη διαδικασία στόχευσης της. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για να προσεγγίσουμε το ερώτημα ήταν κυρίως *in vitro* πειράματα εισόδου ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης σε απομονωμένα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα παρουσία ή απουσία μεμβρανικού δυναμικού. Συγκεκριμένα, η αγρίου-τύπου πρωτεΐνη καθώς και μεταλλάγματα της στο αμινοτελικό άκρο χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα εισόδου ραδιενεργών μορίων ώστε να διευκρινιστούν τα κατάλοιπα που είναι απαραίτητα για την είσοδο της πρωτεΐνης στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων και ο τρόπος με τον οποίο η υπομονάδα αυτή της ATPάσης εμπεδώνεται στην εσωτερική μεμβράνη και είναι λειτουργική.

Επίσης σε αυτή την μελέτη θελήσαμε να ελέγξουμε τις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει η πρωτεΐνη κατά την στόχευση της στα μιτοχόνδρια. Έτσι δημιουργήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς (βλ. Πίνακας 1) προκειμένου να γίνουν εν συνεχεία πειράματα χημικού ανασυνδιασμού (crosslinking) τα οποία δεν προλάβουμε χρονικά να τα πραγματοποιήσουμε. Επίσης προς αυτή την κατεύθυνση εξετάστηκε η πιθανή επίδραση του οξειδωτικού στρες στην πρωτεΐνη Tim11 και η δυνατότητα σουλφενυλίωσης της μέσω πειράματος ανοσοκατακρήμνισης. Είναι πιθανό η Tim11 όντας υπομονάδα της ATPάσης και της αναπνευστικής αλυσίδας να αποτελεί στόχο των ROS που παράγονται κατά την διάρκεια μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό το ερώτημα δεν έχει απαντηθεί και χρειάζεται να εξεταστεί περαιτέρω.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---



## 1. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

### 1.1 Μεταλλαξιγένεση (*Mutagenesis*)

Όλες οι σημειακές μεταλλάξεις έγιναν στο γονίδιο Tim11 με βάση το πρωτόκολλο “QuickChange site-directed mutagenesis” και τις οδηγίες του κατασκευαστή (Stratagene). Σαν μήτρα, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pRS316 Tim11 και pQE16 Tim11 DHFR His. Οι σημειακές μεταλλάξεις στο πλασμίδιο pSP64 Tim11 5Met υπήρχαν ήδη από προηγούμενη μελέτη που έγινε στο εργαστήριο.

### 1.2 Κλωνοποιήσεις (*Clonings*)

Σε όλες τις κλωνοποιήσεις αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο Tim11 ως ένθεμα. Αρχικά, έγινε ενίσχυση της έκφρασης του είτε από το γένωμα του σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae*) είτε από πλασμίδιο με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στην συνέχεια, ανάλογα τον φορέα έκφρασης (pET24, pRS316, pQE16-DHFR-His), χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Πιο ειδικά οι κλωνοποιήσεις του Tim11-DHFR-His και των σημειακών μεταλλαγμάτων του στο φορέα pSP65 έγιναν με PCR από τον φορέα pQE16-Tim11-DHFR-His που έφερε τα αντίστοιχα μεταλλάγματα. Το N23 κομμάτι του Tim11 κλωνοποιήθηκε στον pQE16 με διαφορετικό τρόπο. Λόγω του μικρού του μεγέθους, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές (primers) για το πλασμίδιο pQE16-Tim11-DHFR-His, οι οποίοι αναγνώριζαν μια ευρύτερη περιοχή του πλασμιδίου μαζί με το N23 κομμάτι του Tim11. Τόσο το pQE16-Tim11-DHFR-His όσο και το pSP65-Tim11-DHFR-His και όλα τα μεταλλάγματα τους, κλωνοποιήθηκαν αλλά δεν χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Θα χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα. Το πλασμίδιο pSP65-Tim11-5Met που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα έκφρασης της ραδιενεργής πρωτεΐνης Tim11, υπήρχε ήδη από προηγούμενη δουλειά που είχε γίνει στο εργαστήριο.

Όλες οι κλωνοποιήσεις και μεταλλάξεις συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Πλασμίδια</b>	<b>Αναφορά</b>
pSP65 Tim11 5Met	προηγούμενη μελέτη
pSP64 Tim11 (R8G) 5Met	προηγούμενη μελέτη
pSP64 Tim11 (R21G) 5Met	προηγούμενη μελέτη
pSP64 Tim11 (R21G/D23G) 5Met	προηγούμενη μελέτη
pSP64 Tim11 (R8K) 5Met	προηγούμενη μελέτη
pSP64 Tim11 (ΔN23) 5Met	προηγούμενη μελέτη
pSP65 C28S 5Met	mutagenesis
<b>pET24 Tim11 His</b>	<b>EcoRI/Xho1</b>
<b>pRS316 Tim11</b>	<b>EcoRI/Xho1 (future experiments)</b>
pRS316 Tim11 (R8G)	mutagenesis (future experiments)
pRS316 Tim11 (R21G)	mutagenesis (future experiments)
pRS316 Tim11 (R21G/D23G)	mutagenesis (future experiments)
pRS316 Tim11 (R8K)	mutagenesis (future experiments)
<b>pQE16 Tim11 DHFR His</b>	<b>EcoRI/BamHI (future experiments)</b>
pQE16 Tim11 (R8G) DHFR His	mutagenesis (future experiments)
pQE16 Tim11 (R21G) DHFR His	mutagenesis (future experiments)
pQE16 Tim11 (R21G/D23G)DHFR His	mutagenesis (future experiments)
pQE16 Tim11 (R8K)DHFR His	mutagenesis (future experiments)
pQE16 Tim11 (N23)DHFR His	<b>Xho1/BamHI (future experiments)</b>
<b>pSP65 Tim11 DHFR His</b>	<b>EcoRI/BamHI (future experiments)</b>
<b>pSP65 Tim11 (R8G)DHFR His</b>	<b>EcoRI/PstI (future experiments)</b>
<b>pSP65 Tim11 (R21G)DHFR His</b>	<b>EcoRI/PstI (future experiments)</b>
<b>pSP65 Tim11 (R21G/D23G)DHFR His</b>	<b>EcoRI/PstI (future experiments)</b>
<b>pSP65 Tim11 (R8K) DHFR His</b>	<b>EcoRI/PstI (future experiments)</b>

**Πίνακας 1:** Καταγραφή των κλωνοποιήσεων και των μεταλλαγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είτε θα χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικά πειράματα. Στην πρώτη στήλη αναγράφεται το όνομα του πλασμιδιακού φορέα με το κλωνοποιημένο ή μεταλλαγμένο γονίδιο και στην δεύτερη στήλη αναφέρονται ο τρόπος που δημιουργήθηκαν.

Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα DH5a μετασχηματίστηκαν με τα παραπάνω πλασμίδια μέσω της τεχνικής ανασυνδυασμένου DNA. Προκειμένου να ελεγχθεί η ορθότητα των εκάστοτε ενθεμάτων, αρχικά εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινήτες, και στη συνέχεια έγινε αλληλούχιση DNA για το κάθε ένθεμα.

## 2. *In organello* τεχνικές (Πειράματα και χειρισμός μιτοχονδρίων)

### 2.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μιτοχόνδρια τα οποία απομονώθηκαν από το αγρίου τύπου στέλεχος D273-10B του *Saccharomyces cerevisiae*. Το στέλεχος αναπτύσσεται στους 30°C σε θρεπτικό που περιέχει γαλακτικό οξύ (YPLac) ως πηγή άνθρακα. Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται η παραγωγή ενέργειας στο κυτταρόπλασμα καθώς το γαλακτικό οξύ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην βιοχημική διαδικασία της γλυκόλυσης και επομένως επιβιώνουν μόνο τα κύτταρα που έχουν λειτουργικά μιτοχόνδρια. Επίσης, με την χρήση του συγκεκριμένου θρεπτικού επιτυγχάνεται και αύξηση των μιτοχονδρίων προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες του κάθε κυττάρου σε ενέργεια. Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Daum *et al* του 1982, όπου με την χρήση του πολυσακχαρίτη Nycodenz απομονώνονται καθαρά μιτοχόνδρια τα οποία αποθηκεύονται στους -80 °C.

### 2.2 *In vitro* έκφραση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών

Η έκφραση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών έγινε με βάση το πρωτόκολο και τις οδηγίες του κατασκευαστή ‘TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega). Η μετάφραση γίνεται με την χρήση της SP6 πολυμεράσης και άρα τα γονίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος μας πρέπει να βρίσκονται κλωνοποιημένα σε πλασμίδια που φέρουν τον αντίστοιχο εκκινητή. Για την συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα pSP65 και pSP64. Η σήμανση των πρωτεϊνών έγινε με την χρήση ραδιενεργής μεθειονίνης ( $S^{35}$ ) και με το σύστημα σύζευξης μεταγραφής/μετάφρασης σε πρόδρομα ερυθρά αιμοσφαίρια κουνελιού. Η αντίδραση γίνεται στους 30°C για 90 λεπτά και στη συνέχεια τα ριβοσώματα απομακρύνονται από την πρωτεΐνη με φυγοκέντρηση στα 55 000rcf για 15 λεπτά στους 4°C.

### 2.3 Είσοδος ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων στα μιτοχόνδρια

Προκειμένου η ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη να εισέλθει στα μιτοχόνδρια πρέπει να βρίσκεται σε περιβάλλον το οποίο να είναι κατάλληλο για την είσοδο της στο οργανίδιο. Τα μιτοχόνδρια επομένως, επαναδιαλύονται σε import buffer 0,5mg/ml παρουσία 2mM ATP και 2,5mM NADH. Στην συνέχεια προστίθεται το ραδιενεργό υπόστρωμα (5% κ.ο) και επωάζεται στους 30°C για τον απαιτούμενο χρόνο του πειράματος. Η συγκέντρωση των μιτοχονδρίων κυμαίνεται από 50-

150μg ανα αντίδραση ανάλογως το πείραμα. Η αντίδραση σταματά με την τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο και στη συνέχεια με φυγοκέντρηση τους στα 16000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το μη εισαγμένο ραδιενεργό πρόδρομο μόριο, που βρίσκεται πλέον στο υπερκείμενο, απομακρύνεται και η μιτοχονδριακή πελέτα επαναδιαλύεται σε ισοτονικό διάλυμα (breaking buffer) παρουσία πρωτεΐνάσης K ή τρυψίνης σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml. Γίνεται επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται PMSF (2mM τελική συγκέντρωση) ή SBTI (2mg/ml τελική συγκέντρωση) αντίστοιχα, για να γίνει αναστολή της πρωτεόλυσης. Γίνεται επώαση για άλλα 10 λεπτά με τον αναστολέα και τα μιτοχόνδρια απομονώνονται ξανά με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 16000rcf στους 4°C. Η μιτοχονδριακή πελέτα επαναδιαλύεται πια σε 2x Laemmli buffer με ή χωρίς β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα δείγματα βράζονται για 5 λεπτά στους 95°C και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε 12% Tris-Tricine SDS-PAGE. Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μεταφέρονται στη συσκευή Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell Biorad. Εκεί, τα πρωτεϊνικά δείγματα μεταφέρονται μέσω ηλεκτροαποτύπωσης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προκειμένου να ελεγχθούν, μέσω ανοσοαποτύπωσης (βλ. παρακάτω), τα επίπεδα διάφορων πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο. Εναλλακτικά, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης βάφεται με την χρωστική Coomassie brilliant blue (R-250) και στεγνώνει σε χαρτί Whatman στην συσκευή Biorad Gel Dryer για 1 ώρα. Και στις δυο περιπτώσεις, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή το πήκτωμα ακρυλαμίδης, τοποθετούνται σε κασέτα και εκτίθενται σε φίλμ για 2 μέρες. Η εμφάνιση του αποτελέσματος έγινε με αυτοραδιογραφία με την χρήση phospho-imager.

### **Διαλύματα:**

#### **Import buffer 2x:**

100mM Hepes, pH 7.1, 1.2M sorbitol, 4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM L-Methionine, 2mg/ml Fatty Acid free Bovine Serum Albumin (BSA), 2mM ATP, 2,5mM NADH.

#### **Ισοτονικό διάλυμα επαναδιάλυσης μιτοχονδρίων (breaking buffer):**

0.6 M sorbitol, 20 mM Hepes pH 7.4

#### **10x Laemmli sample buffer (SB):**

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

Coomassie stain:

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

Destaining buffer:

15% methanol, 10% acetic acid

1x Transfer buffer:

3gr Tris, 14,4gr glycine, 20% methanol, 0,1% SDS

*2.4 Διάρρηξη δυναμικού της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων*

Η παραπάνω διαδικασία εισόδου ραδιοσημασμένων πρόδρομων μορίων στα μιτοχόνδρια εφαρμόστηκε για τα πειράματα όπου το μεμβρανικό δυναμικό παραμένει αδιάρρηκτο. Για τα πειράματα διάρρηξης του δυναμικού χρησιμοποιήθηκαν κατά βάση δυο ιονοφόρα εκτός αν δηλώνεται διαφορετικά στο πείραμα. Αυτά είναι το Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) και η Βαλινομυκίνη (valinomycin). Το CCCP δρά στην διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, επηρεάζοντας την λειτουργία της ATP συνθάσης. Συγκεκριμένα, παρεμποδίζει την δημιουργία βαθμίδωσης πρωτονίων που δημιουργείται από την μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη. Η βαλινομυκίνη είναι επίσης ένα ιονοφόρο χημικό το οποίο έχει επιλεκτικότητα στα ιόντα καλίου έναντι των ιόντων νατρίου επηρεάζοντας το μεμβρανικό δυναμικό.

Για τα πειράματα αυτής της διατριβής, τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε import buffer 0,5mg/ml παρουσία 2mM ATP, 25μM CCCP και 1mM βαλινομυκίνη τελική συγκέντρωση εκτός και αν δηλώνετε διαφορετικά στα πειράματα. Η υπόλοιπη διαδικασία εισόδου ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών παραμένει όπως περιγράφεται πιο πάνω.

*2.5 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών μετά από πείραμα εισόδου στα μιτοχόνδρια.*

Η συγκεκριμένη διαδικασία ακολουθεί την διαδικασία εισόδου στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια αφού απομονωθούν μετά το στάδιο της πρωτεόλυσης, επαναδιαλύονται σε διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (IP buffer) και λύνονται με την προσθήκη ήπιου απορρυπαντικού DDM σε τελική συγκέντρωση 1%. Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκεντρώνονται στους 4°C για άλλα 30 λεπτά στα 14000gcf. Στην συνέχεια, επωάζονται με το εκάστοτε αντίσωμα ή με ορό πριν την ανοσοποίηση (pre-immune serum) για 2 ώρες στους 4°C εκτός και αν αναφέρεται αλλιώς στο πείραμα. Έπειτα, προστίθενται Protein A ή Protein G σφαιρίδια

(Amersham) για 2 ώρες στους 4°C, τα οποία προηγουμένως έχουν εξισσοροπηθεί για 1 ώρα με IP buffer και 1mg/ml No Fatty Acid Free Bovine Serum Albumine (BSA). Τα σφαιρίδια συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 30 δευτερόλεπτα και ξεπλένονται με IP buffer. Η προσδεδεμένη πρωτεΐνη εκλούεται με την προσθήκη 6x Laemmli sample buffer απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ελέγχθηκαν με αυτοραδιογραφία.

#### Διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (IP buffer):

10mM Tris pH 7.4, 50mM NaCl και 1mM PMSF

#### *2.6 Δημιουργία μιτοπλαστών*

Για την δημιουργία μιτοπλαστών (μιτοχόνδρια απαλλαγμένα από την εξωτερική τους μεμβράνη), τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε υποτονικό διάλυμα. Μετά το πείραμα εισόδου των ραδιοσημασμένων πρόδρομων μορίων, τα μιτοχόνδρια αφού απομονώθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε 1x import buffer και αραιώθηκαν με 9 όγκους φρέσκο mitoplast buffer (20mM Hepes-KOH pH 7,4) έτσι ώστε η συγκέντρωση των μιτοχονδρίων να είναι 0,5mg/ml. Η επαναδιάλυση έγινε παρουσία ή απουσία πρωτεΐνης K ή τρυψίνης (0,1mg/ml τελική συγκέντρωση) για 30 λεπτά στον πάγο και στην συνέχεια προστέθηκε 2mM PMSF ή 2mg/ml SBTI αντίστοιχα. Η επώαση με τον αναστολέα έγινε για άλλα 10 λεπτά στο πάγο και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 14000rcf για 5 λεπτά στους 4°C. Έτσι το υπερκείμενο (διαμεμβρανικός χώρος) διαχωρίζεται από την πελέτα (μιτοπλάστες και θραύσματα εξωτερικής μεμβράνης). Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 2x Laemmli sample buffer. Στο υπερκείμενο, αν μας ενδιαφέρει να το εξετάσουμε, προστίθεται 10% κ.ο Trichloroacetic acid (TCA) και επωάζεται στον πάγο για 20 λεπτά για να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αυτό. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνται και η πελέτα με τις πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου επαναδιαλύεται σε 2x Laemmli sample buffer. Λόγω της οξύτητας του TCA, προστίθενται 1-2μl 1M Tris pH 8.0 για να ρυθμιστεί το pH του δείγματος. Ακολουθεί ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE, ηλεκτροαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και έλεγχος με αυτοραδιογραφία. Η μεμβράνη χρησιμοποιείται στη συνέχεια για έλεγχο με αντισώματα για πρωτεΐνες των υποδιαμερισμάτων του μιτοχονδρίου.

### 2.7 Εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο (*carbonate extraction*)

Η συγκεκριμένη διαδικασία γίνεται για να καθοριστεί ο υπομιτοχονδριακός εντοπισμός πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο. Αφού πραγματοποιηθεί το πείραμα εισόδου και απομονωθούν τα μιτοχόνδρια μετά την επεξεργασία με πρωτεάση, επαναδιαλύονται σε 0,1M φρέσκο και παγωμένο ανθρακικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Γίνεται επώαση για 30 λεπτά στο πάγο και τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 55000rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο κατακρημνίζεται με την προσθήκη 10% TCA και το κατακρημνισμένο υλικό όπως και η πελέτα επαναδιαλύονται σε 2x Laemmli buffer. Τα δείγματα βράζονται στους 95°C και αναλύονται με SDS-PAGE.

## 3. Βιοχημική ανάλυση πρωτεϊνών

### 3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Μέσω αυτής της τεχνικής επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το Laemmli buffer που χρησιμοποιείται για την τελική επαναδιάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων περιέχει, όπως αναγράφεται πιο πάνω, SDS. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει και προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες. Τα δείγματα που είναι να ηλεκτροφορηθούν, αναλόγως αν διαθέτουν ή όχι ομοιοπολικούς δεσμούς, επαναδιαλύονται σε Laemmli buffer χωρίς ή με β-μερκαπτοαιθανόλη και DTT. Όλα τα δείγματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας αναλύθηκαν σε 12% Tris-Tricine SDS-PAGE. Η συνταγή έχει ως εξής για δυο πήκτωμα:

#### 12% Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating):

2,5ml 48,5% acrylamide/1,5% bis-acrylamide

3,3ml Gel Tricine buffer

1,3ml 87% Glycerol

2,79ml  $\text{H}_2\text{O}$

0,1% APS

0,01% TEMED

#### 4% Πήκτωμα επιστοιβάξης (Stacking):

0,25ml 48,5% acrylamide/1,5% bis-acrylamide

0,75ml Gel Tricine buffer

1,945ml H<sub>2</sub>O

0,1% APS

0,01% TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση του πήκτωματος χρησιμοποιούνται επίσης αραιώσεις 1x των:

#### 10x Tricine Lower buffer:

242,2gr Tris, 171gr Tricine, 10gr SDS pH 8.9

#### 10x Tricine Upper buffer:

121,1gr Tris, pH 8.9 (with HCl)

### *3.2 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ανοσοαποτόπωση (Western)*

Η διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης περιγράφηκε πιο πάνω. Προκειμένου να ανιχνευτούν οι πρωτεΐνες, η μεμβράνη επωάζεται αρχικά με 5% γάλα/TBST για 1 ώρα. Στη συνέχεια, τα εκάστοτε πρωταρχικά αντισώματα προστίθενται σε διάλυμα που περιέχει 1% γάλα/TBST και επωάζονται από 1-12 ώρες ανάλογα την αποτελεσματικότητά τους. Τα περισσότερα αντισώματα είναι πολυκλωνικά και παράγονται με ανοσοποίηση σε κουνέλια. Πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα με TBST και έπειτα προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα (a-rabbit/a-mouse) το οποίο είναι συζευγμένο με HRP (horseradish peroxidase) επίσης σε διάλυμα με 1% γάλα/TBST. Γίνεται επώαση της μεμβράνης για άλλη μια ώρα και οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται με την χρήση ECL σε φίλμ. Το ένζυμο HRP παρουσία υπεροξειδίου και λουμινόλης εκλύει φώς και μαυρίζει το φίλμ.

#### 1x TBST:

9gr NaCl, 10ml Tris-Cl pH 7.4, 1gr Tween 20

### *3.3 Έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια*

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Tim11 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pET24 καθώς και στον pQE16 και μετασχηματίστηκαν στο στέλεχος *E.coli* BL21 (DE3). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε μόνο από



τον πλασμιδιακό φορέα pET24 για αυτή την μελέτη. Καλιέργιες LB παρουσία καναμυκίνης εμβολιάστηκαν με μοναδιαίες αποικίες και επωάστηκαν για 12 ώρες στους 37°C. Η καναμυκίνη είναι το αντιβιοτικό στο οποίο φέρει αντίσταση το πλασμίδιο pET24 και τα άρα τα κύτταρα που θα μεγαλώσουν παρουσία αντιβιοτικού θα φέρουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο εντός τους. Στη συνέχεια, αραιώνονται σε φρέσκο θρεπτικό υγρό (LB) παρουσία καναμυκίνης και επωάστηκαν στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) να φτάσει 0,6-0,8. Στη συνέχεια, προστίθεται 0,4mM IPTG και επωάζονται για 4 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3500rpm για 10 λεπτά και οι πελέτες φυλάσσονται στους -20°C.

### 3.3 Καθαρισμός της *Tim11-His* πρωτεΐνης από *DE3* στέλεχος κυττάρων

Ο καθαρισμός της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης Tim11 μας πήρε αρκετό καιρό για να πραγματοποιηθεί. Έπειτα από αρκετές προσπάθειες καταλήξαμε στον καλύτερο δυνατό καθαρισμό της που περιγράφεται παρακάτω. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο έκφρασης, όπως περιγράφεται αναλυτικά πιο πάνω, της σε 1L LB παρουσία καναμυκίνης. Αφού τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση, επαναδιαλύθηκαν σε 20ml Buffer A και προστέθηκαν 0,1mg/ml λυσοζύμη και 2mM PMSF. Η λυσοζύμη υδρολύει την πεπτιδογλυκάνη στο βακτηριακό τοίχωμα και προκαλεί λύση των κυττάρων. Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών και χρησιμοποιείται για να προστατεύσει την πρωτεΐνη μας από πρωτεόλυση. Τα κύτταρα στην συνέχεια σπάνε με την βοήθεια του συστήματος French press χρησιμοποιώντας 900psi και περνώντας το διάλυμα των κυττάρων 6 φορές από το σύστημα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 21000rcf για 30' στους 4°C. Από το υπερκείμενο κρατείται δείγμα και απομακρύνεται, ενώ η πελέτα οδηγείται σε διαδικασία αποδιάταξης με 8M ουρία ώστε να ανακτήσουμε την πρωτεΐνη η οποία υπάρχει στα σωμάτια εγκλεισμού του βακτηρίου (inclusion bodies). Επαναδιαλύσαμε λοιπόν την πελέτα σε 9ml Buffer B που περιέχει ουρία και με την χρήση μικρού σε διάμετρο σιλικονένιου σωλήνα ομογενοποιήσαμε το διάλυμα. Έπειτα, αφήσαμε το διάλυμα να κουνιέται για 2 ώρες στους 4°C αφού πρώτα προσθέσαμε 2mM PMSF. Αφού αυξήσαμε τον όγκο στα 20ml ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 21000rcf για 30' στους 4°C. Εντωμεταξύ, 5ml σφαιρίδια νικελίου (Ni-NTA agarose) εξισσοροπήθηκαν σε Buffer B παρουσία 5mM ιμιδαζόλιο. Αυτή τη φορά κρατάμε το υπερκείμενο στο οποίο προστέθηκε ιμιδαζόλιο σε τελική συγκέντρωση 5mM και προστέθηκε στα σφαιρίδια. Η πρωτεΐνη με τα σφαιρίδια κουνιόταν για 3 ώρες στους 4°C. Το υλικό που δεν προσδέθηκε συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 1000rpm για 5'. Τέσσερα διαδοχικά πλυσίματα εφαρμόστηκαν στα σφαιρίδια αραιώνοντας την ουρία και αυξάνοντας το ιμιδαζόλιο στα 15mM ώστε να απομακρυνθούν τα μη-ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες. Η

πρωτεΐνη εκλούστηκε σε Buffer A παρουσία 500mM ιμιδαζόλιο. Η Tim11-His αποθηκεύτηκε στους -20°C αφού προστέθηκε 50% γλυκερόλη.

### Διαλύματα:

#### Buffer A:

50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl

#### Buffer B:

50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 8M Urea

#### Wash1:

50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 6M Urea, 5mM imidazole

#### Wash 2:

50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 4M Urea, 15mM imidazole

#### Wash 3:

50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 2M Urea, 15mM imidazole

#### Wash 4:

50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 15mM imidazole

### *3.5 Υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης μετά τον καθαρισμό (Bradford assay)*

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε διάλυμα. Ο υπολογισμός έγινε με την χρήση του Protein assay dye reagent και τις οδηγίες του κατασκευαστή Bio-Rad. Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι η Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία προσδένεται πρωτίστως σε βασικά και αρωματικά αμινοξέα, ειδικά σε κατάλοιπα αργινίνης. Η πρόσδεση της όξινης χρωστικής στην πρωτεΐνη προκαλεί μετατόπιση του φάσματος από τα 465nm στα 595nm και στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων με μια πρότυπη καμπύλη ώστε να πάρουμε μια σχετική ένδειξη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη BSA (1mg/ml stock) του κατασκευαστή NEB. Μια τυπική πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης BSA αποτελείται από 0, 1, 2, 4, 8, 10 (μg).

Συγκεκριμένα για την πρότυπη καμπύλη:

800μl H<sub>2</sub>O + x μl BSA + 1μl elution buffer + 200μl BioRad Protein dye

Για τα πρωτεϊνικά δείγματα:

800μl H<sub>2</sub>O + x μl protein + 200μl BioRad Protein dye

Όλα τα δείγματα μετρούνται στη συνέχεια σε φασματοφωτόμετρο στα 595nm.

## 4. Μέθοδοι Σακχαρομύκητα

### 4.1 Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης.

Πέρα από το αγρίου τύπου στέλεχος D273-10B που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιτοχονδρίων, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε και το στέλεχος JK9-3 στο οποίο το γονίδιο για την πρωτεΐνη Tim11 έχει διαρρηχθεί. Τα κύτταρα μεγάλωσαν στους 30°C σε θρεπτικά που αναφέρονται παρακάτω.

#### Πλούσια θρεπτικά (YPD/YPL)

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

#### Φτωχό θρεπτικό (SC)

2% (w/v) πηγή άνθρακα (γλυκόζη), 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.6% (w/v) casamino amino acids.

### 4.2 Πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας.

Για τα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος JK9-3 το οποίο μετασχηματίστηκε με το πλασμίδιο pRS316urp40 (προσδίδει αυξοτροφία στην ουρακίλη) το οποίο έφερε το γονίδιο του Tim11 ή τα μεταλλάγματα του. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεγάλωσαν σε φτωχό θρεπτικό μέσο απουσία ουρακίλης (SD-ura) και μεγάλωσαν στους 30°C για 2 μέρες.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

# 1. Είσοδος και στόχευση της πρωτεΐνης Tim11 στο μιτοχόνδριο του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*.

## 1.1 Εισαγωγή

Η πρωτεΐνη Tim11, όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, είναι μια από τις πολλές υπομονάδες της ATP συνθάσης. Το ένζυμο αυτό καταλύει την τελική αντίδραση στην διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, την παραγωγή δηλαδή του ενεργειακού μορίου ATP που είναι απαραίτητο για την επιβίωση και την σωστή λειτουργία του κυττάρου. Επομένως, η ανάλυση και η κατανόηση του τρόπου λειτουργίας της ATP συνθάσης είναι πολύ σημαντική μιας και ο ρόλος που επιτελεί είναι ζωτικής σημασίας. Η μιτοχονδριακή ATP συνθάση στον σακχαρομύκητα αποτελείται δομικά από 17, μέχρι σήμερα, γνωστές υπομονάδες οι οποίες αναλύονται στον παρακάτω πίνακα.

Mitochondrial yeast ATPase subunits	Encoded	Monomeric/Dimeric ATPase	Import pathway
Alpha ( $\alpha$ )	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-matrix
Beta ( $\beta$ )	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-matrix
Gamma ( $\gamma$ )	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-matrix
OSCP	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-matrix
Delta ( $\delta$ )	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-matrix
Epsilon ( $\epsilon$ )	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-inner membrane
<i>a</i> , subunit 6	<i>mtDNA</i>	Monomeric	Oxa1 pathway
<i>b</i> , subunit 4	nuclear	Monomeric	multiple targeting signal/TIM22 pathway
<i>c</i> , subunit 9	<i>mtDNA</i>	Monomeric	Oxa1 pathway
<i>d</i>	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-inner membrane
<i>e</i> ( <i>Tim11</i> )	nuclear	Dimeric	N-terminal signal peptide/transmembrane segment
<i>f</i>	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-inner membrane
<i>g</i>	nuclear	Dimeric	No signal peptide-1 transmembrane segment
<i>h</i>	nuclear	Monomeric	TIM23 pathway-inner membrane
<i>k</i>	nuclear	Dimeric	No signal peptide
<i>i/j</i>	nuclear	Monomeric/Dimeric?	No signal peptide
subunit 8	<i>mtDNA</i>	Monomeric	Oxa1 pathway

**Πίνακας 2:** Καταγραφή των υπομονάδων της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. (Ackerman and Tzagoloff, 2007). Στην πρώτη στήλη αναφέρονται τα ονόματα των υπομονάδων, στην δεύτερη στήλη αναγράφεται το που κωδικοποιούνται, στην τρίτη στήλη σε ποια μορφή του ενζύμου ανιχνεύονται και στην τέταρτη μέσω ποιού μονοπατιού

εισέρχονται στο οργανίδιο. Για την δημιουργία της τέταρτης στήλης χρησιμοποιήσαμε τα προγράμματα βιοπληροφορικής, MitoProt, iPSORT και Praline.

Βασιζόμενοι στα όσα γνωρίζουμε σχετικά με τα σινιάλα στόχευσης στα μιτοχόνδρια, βάση της βιβλιογραφίας (εικόνα 2) και με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής δημιουργήσαμε τον πιο πάνω πίνακα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα MitoProt, iPSORT και Praline, για την εύρεση των αλληλουχιών στόχευσης που οδηγούν τις υπομονάδες της ATP συνθάσης στα μιτοχόνδρια. Όλες οι πρωτεΐνες, πέραν αυτών που είναι έντονα σηματοδοτημένες, φέρουν στην αλληλουχία τους σινιάλα στόχευσης για την είσοδο τους στα μιτοχόνδρια και ακολουθούν τα κανάλια TIM22/TIM23 για την εμπέδωση τους στην εσωτερική μεμβράνη (Πίνακας 2). Αντίθετα, οι τέσσερις πρωτεΐνες e, g, k, i, που συμμετέχουν αποκλειστικά στον διμερισμό της ATP συνθάσης δεν ακολουθούν αυτό τον κώδικα των σινιάλων στόχευσης. Οι υπομονάδες g, k, i, βάση των βιοπληροφορικών προγραμμάτων, δεν φέρουν σινιάλο στόχευσης για τα μιτοχόνδρια, ενώ για την υπομονάδα e (Tim11) προβλέπεται ότι υπάρχει αλληλουχία στόχευσης στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Επιλέξαμε επομένως να ασχοληθούμε με την υπομονάδα e (Tim11), γιατί ενώ φέρει σινιάλο στόχευσης για τα μιτοχόνδρια, δεν έχει τα χαρακτηριστικά εκείνα που οδηγούν πρωτεΐνες να εμπεδωθούν στην εσωτερική μεμβράνη και παρόλα αυτά μπορεί να αγκυροβολεί σε αυτήν. Θεωρούμε ότι η μελέτη της στόχευσης της μπορεί να οδηγήσει στην επέκταση των γνώσεων μας όσο αφορά τις αλληλουχίες στόχευσης και τα μονοπάτια εισόδου στο συγκεκριμένο οργανίδιο.

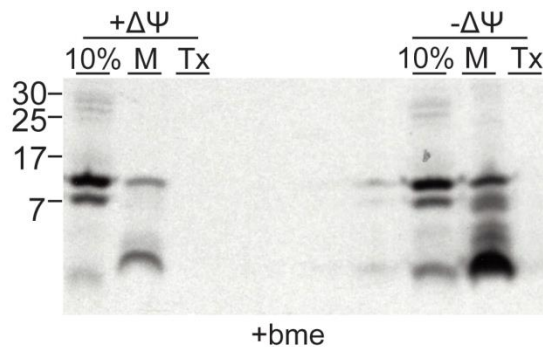
### *1.2 Είσοδος της ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης Tim11 σε αγρίου τύπου μιτοχόνδρια παρουσία ή απουσία μεμβρανικού δυναμικού*

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, η Tim11 θεωρείται υπομονάδα του F<sub>0</sub> τμήματος της ATP συνθάσης και βρίσκεται αγκυροβολημένη με το αμινοτελικό της άκρο στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, έχοντας το υδατοδιαλυτό καρβοξυτελικό της μέρος προς τον διαμεμβρανικό χώρο του οργανιδίου. Είναι επίσης γνωστό ότι, πρωτεΐνες που φέρουν αλληλουχία στόχευσης για την εσωτερική μεμβράνη εξαρτώνται από την παρουσία μεμβρανικού δυναμικού προκειμένου να εμπεδωθούν σ' αυτήν.

Αρχικά λοιπόν, θελήσαμε να δούμε αν η είσοδος και η αγκυροβόληση της Tim11 στην εσωτερική μεμβράνη εξαρτάται από την παρουσία του μεμβρανικού δυναμικού. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε ένα απλό πείραμα εισόδου με ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη σε φυσιολογικά

μιτοχόνδρια και σε μιτοχόνδρια στα οποία το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης είχε διαρρηχθεί. Η διάρρηξη του μεμβρανικού δυναμικού έγινε με την χρήση των ιονοφόρων CCCP και βαλινομυκίνης όπως περιγράφεται με βάση το πρωτόκολλο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

Για την παραγωγή της ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης, χρησιμοποιήσαμε το πλασμίδιο pSP65 το οποίο έφερε το γονίδιο για την Tim11 ακολουθούμενο από πέντε μεθειονίνες (κατασκευασμένο από προηγούμενο μέλος του εργαστηρίου). Η μέθοδος ραδιοσήμανσης που χρησιμοποιούμε γίνεται σε μεθειονίνες. Η Tim11 όμως φέρει μόνο δύο μεθειονίνες έναντι της αμινοξικής της αλληλουχίας. Αυτό θα δυσκόλευε την ενίσχυση και ανίχνευση του σήματος της πρωτεΐνης μετέπειτα και αυτός ήταν και ο λόγος που προστέθηκαν οι πέντε μεθειονίνες καρβοξυτελικά του γονιδίου. Ακολουθώντας επομένως τα πρωτόκολλα ραδιοσήμανσης και εισόδου ραδιενεργών υποστρωμάτων όπως περιγράφονται πιο πάνω (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), η πρωτεΐνη Tim11 εισήχθη στα μιτοχόνδρια (εικόνα 16).



**Εικόνα 17: Η Tim11 έχει την δυνατότητα εισόδου σε μιτοχόνδρια στα οποία έχει διαρρηχθεί το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης.** Αυτοραδιογραφία του πειράματος εισόδου της Tim11 σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια (+ΔΨ) και σε μιτοχόνδρια που έχουν υποστεί διάρρηξη του μεμβρανικού δυναμικού τους (-ΔΨ). Η διάρρηξη του μεμβρανικού δυναμικού έγινε με 25μM CCCP και 1mM βαλινομυκίνη σε τελική συγκέντρωση. Τα μιτοχόνδρια (50μg ανά περίπτωση) επώαστηκαν για 20' με το ραδιενεργό υλικό. Τα δείγματα στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με πρωτεΐνάση K (0,1mg/ml τελική συγκέντρωση), η δράση της οποίας αναστάλθηκε με 10' επώαση στον πάγο με SBTI (1mg/ml τελική συγκέντρωση), επαναδιαλύθηκαν σε 2x sample buffer παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% Tricine-SDS gel. Το 10% δείγμα εκφράζει το 10% της συνολικής ποσότητας ραδιενεργής πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για είσοδο σε 50μg μιτοχονδρίων. Το Tx είναι δείγμα μιτοχονδρίων το οποίο επαναδιαλύθηκε σε απορρυπαντικό Triton-X 100 (1% τελική συγκέντρωση) παρουσία πρωτεΐνάσης K μετά το πείραμα εισόδου. Το imp υποδηλώνει το δείγμα εισαγμένης πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια.

Το δείγμα ελέγχου της έκφρασης του ραδιενεργού υποστρώματος (10%) δείχνει ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται σε αρκετά καλό βαθμό. Παρόλα αυτά παρατηρούμε την έκφραση δύο διακριτών μπαντών, η μια μετατοπίζεται στα ~11kDa που ανταποκρίνεται στην αγρίου-τύπου πρωτεΐνη και μια που

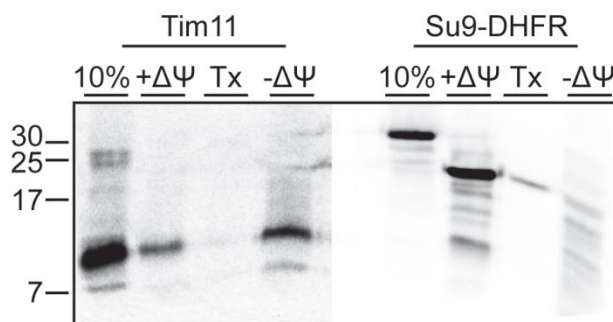


μετατοπίζεται πιο χαμηλά στα 7kDa. Η χαμηλότερη αυτή μπάντα κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην 2<sup>η</sup> μεθειονίνη που έχει η πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στο 24<sup>ο</sup> αμινοξύ στην αλληλουχία της. Το μοριακό βάρος της συγκεκριμένης μπάντας μάλλον αντιστοιχεί στο ΔN23 τμήμα της Tim11 και παράγεται κατά την διαδικασία της σύνθεσης και ραδιοσήμανσης της πρωτεΐνης παράλληλα με την αγρίου-τύπου πρωτεΐνη, πιθανόν λόγω μη ειδικής έναρξης της μεταγραφής από την SP6 πολυμεράση.

Είναι αξιοσημείωτο ότι, παρουσία δυναμικού μόνο η μπάντα που ανταποκρίνεται στην αγρίου-τύπου πρωτεΐνη εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, ενώ στην περίπτωση απουσίας του μεμβρανικού δυναμικού φαίνεται να εισέρχονται και οι δύο εκφραζόμενοι πληθυσμοί της πρωτεΐνης όπως επίσης και να σχηματίζεται ένα πλήθος από μπάντες χαμηλότερου μοριακού βάρους, πιθανόν από αποδομημένα τμήματα της πρωτεΐνης. Το Triton-X (Tx) δείγμα δούλεψε δείχνοντας ότι το ραδιενεργό υλικό στα δείγματα μιτοχονδρίων (imp) είναι όντως υλικό που έχει εισαχθεί στα μιτοχόνδρια και ότι η ποσότητα πρωτεΐνης K που χρησιμοποιήθηκε είναι αρκετή για την πρωτεόλυση της.

Η Tim11 επομένως, από το αποτέλεσμα του πειράματος, παρουσιάζεται ως εξαίρεση στον κανόνα που θέλει τις πρωτεΐνες που εισέρχονται στα μιτοχόνδρια και εμπεδώνονται στην εσωτερική μεμβράνη, να απαιτούν την παρουσία μεμβρανικού δυναμικού. Η εικόνα δείχνει ξεκάθαρα ότι η Tim11 όχι απλά είναι ανεξάρτητη από το μεμβρανικό δυναμικό, αλλά φαίνεται να εισάγεται και σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα επίπεδα πρωτεΐνης που εισάγονται σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια.

Προκειμένου λοιπόν να ελέγξουμε την αξιοπιστία του αποτελέσματος, πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα εισόδου χρησιμοποιώντας τη ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη Su9-DHFR (εικόνα 17). Η πρωτεΐνη αυτή είναι επίσης υπομονάδα της ATP συνθάσης που φέρει καρβοξυτελικά της μια μη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη (DHFR), έχει σινιάλο στόχευσης για τη μήτρα των μιτοχονδρίων και είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι απαιτεί την παρουσία μεμβρανικού δυναμικού για να εισέλθει στα μιτοχόνδρια. Το πείραμα αυτό είναι ένα πείραμα ελέγχου που θα πιστοποιούσε ότι τα μιτοχόνδρια, στα οποία διαρρηγνύεται το μεμβρανικό δυναμικό, δεν αντιμετωπίζουν κάποιο πρόβλημα ως προς την ακεραιότητα τους και ότι είναι ικανά να εισάγουν πρωτεΐνες με ειδικό τρόπο στο εσωτερικό τους.



**Εικόνα 18: Η Tim11 εισέρχεται ειδικά στα μιτοχόνδρια απουσία μεμβρανικού δυναμικού.** Αυτοραδιογραφία πειράματος εισόδου της Tim11 και της Su9-DHFR σε κανονικά μιτοχόνδρια (+ΔΨ) και σε μιτοχόνδρια απουσία μεμβρανικού δυναμικού (-ΔΨ). Τα μιτοχόνδρια επωάστηκαν για 20' με τα ραδιενεργά υποστρώματα. Επεξεργάστηκαν στη συνέχεια με πρωτεΐνάση K, η δράση της αναστάλθηκε με την χρήση του αναστολέα της SBTI και επαναδιαλύθηκαν σε 2x sample buffer παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης (2x+bme). Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 12% Tricine-SDS gel.

Τα δύο υποστρώματα εκφράζονται ικανοποιητικά όπως φαίνεται από το 10% δείγμα. Στην περίπτωση της Tim11, βλέπουμε ότι αυτή τη φορά δεν υπάρχει τόσο έντονα το σήμα της χαμηλότερης μπάντας, της περικομμένης εκδοχής της πρωτεΐνης, κάτι που ενισχύει την υπόθεση μας ότι όντως αυτή η μπάντα οφείλεται σε μη-ειδική έναρξη της μεταγραφής κατά την διαδικασία της σύνθεσης της πρωτεΐνης. Όσο αφορά την είσοδο των δύο πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της Tim11 υπάρχει και πάλι αυξημένη είσοδος της στα μιτοχόνδρια με διαταραγμένο το μεμβρανικό δυναμικό σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια. Στην περίπτωση της Su9-DHFR, βλέπουμε ότι η πρωτεΐνη εισέρχεται στα μιτοχόνδρια παρουσία δυναμικού και βρίσκεται πλέον στην ώριμη μορφή της που αναλύεται σε χαμηλότερο μοριακό βάρος. Η πρωτεΐνη αντίθετα, όπως ήταν αναμενόμενο, δεν μπορεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια απουσία μεμβρανικού δυναμικού.

Με βάση λοιπόν το αποτέλεσμα της εικόνας μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι το μεμβρανικό δυναμικό διαρρηγνύεται επιτυχώς στα μιτοχόνδρια και ότι όντως η είσοδος της Tim11 σε αυτά απουσία δυναμικού είναι ειδική από την στιγμή που η είσοδος της Su9-DHFR παρεμποδίζεται.

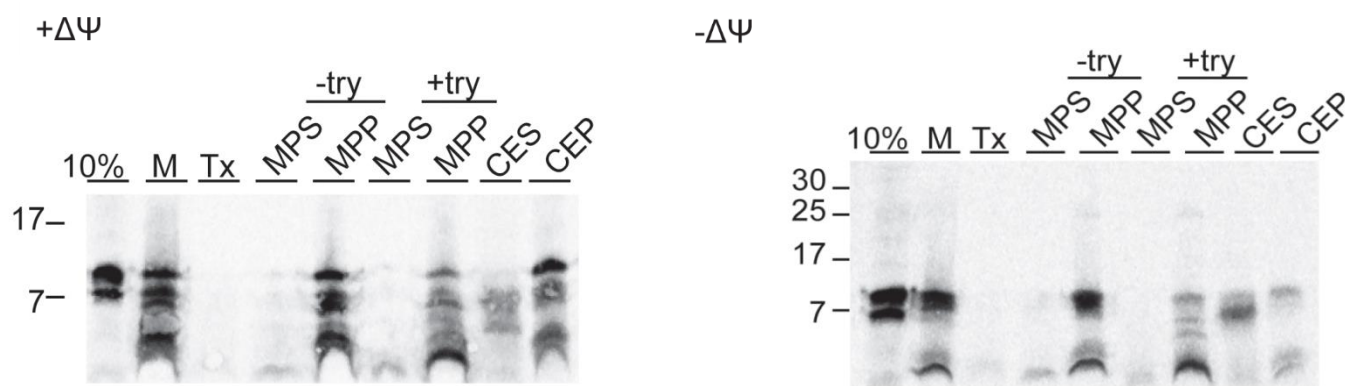
### *1.3 Υπομιτοχονδριακός εντοπισμός της πρωτεΐνης Tim11 σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια και σε μιτοχόνδρια με απουσία μεμβρανικού δυναμικού*

Για να διερευνήσουμε εκτενέστερα την ικανότητα της Tim11 να εισέρχεται στα οργανίδια ανεξάρτητα από το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης, πραγματοποιήσαμε πείραμα υπομιτοχονδριακού εντοπισμού. Με αυτό τον τρόπο, θα βλέπαμε αν η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο ίδιο μιτοχονδριακό διαμέρισμα (εσωτερική μεμβράνη) ή αν αλλάζει η στόχευση της όταν εισέρχεται σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού.

Για να προσεγγίσουμε αυτό το ερώτημα η πρωτεΐνη παράχθηκε και εισήχθηκε σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια ως δείγμα ελέγχου και σε μιτοχόνδρια στα οποία διαταράχθηκε το δυναμικό, με τη χρήση 25μM CCCP και 1mM βαλινομυκίνης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Έπειτα ακολουθήσαμε τα πρωτόκολλα

δημιουργίας μιτοπλαστών και εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο (εικόνα 18). Η μια διαδικασία λειτουργεί ως συμπληρωματική της άλλης για τον ακριβή εντοπισμό πρωτεϊνών στα υπομιτοχονδριακά διαμερίσματα.

Οι μιτοπλάστες, είναι μιτοχόνδρια στα οποία η εξωτερική μεμβράνη έχει διαρρηχθεί. Μέσω λοιπόν αυτής της μεθόδου μπορούμε να δούμε αν η Tim11 βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο ή στους μιτοπλάστες (εσωτερική μεμβράνη και μήτρα). Η εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο διαρρηγνύει και τις δύο μεμβράνες των μιτοχονδρίων, έτσι ο διαμεμβρανικός χώρος (IMS) και η μήτρα οδηγούνται στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση ενώ τα θραύσματα των δύο μεμβρανών βρίσκονται στο κλάσμα της πελέτας. Το υπερκείμενο που προέκυψε από την φυγοκέντρηση μετά τις δύο διαδικασίες, επώαστηκε για 20' με 10% τριχλωροξικό οξύ (TCA) σε τελική συγκέντρωση ώστε να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες που υπάρχουν σε αυτό το κλάσμα. Και οι δυο διαδικασίες αναλύονται εκτενέστερα στο μέρος “Υλικά και Μέθοδοι”.

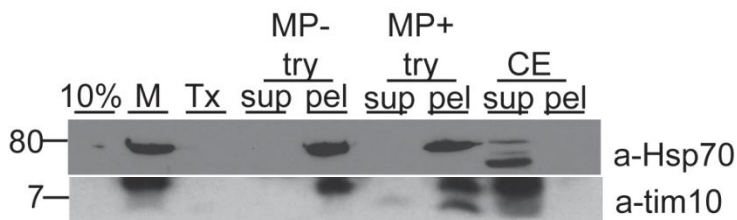


**Εικόνα 19: Ο υπομιτοχονδριακός εντοπισμός της Tim11 είναι διαφορετικός ανάμεσα σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια και σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού.** Αυτοραδιογραφία από πείραμα υπομιτοχονδριακού εντοπισμού της Tim11 σε κανονικά μιτοχόνδρια και σε μιτοχόνδρια με διαταραγμένο μεμβρανικό δυναμικό. Τα μιτοχόνδρια επώαστηκαν για 20' με το ραδιενεργό υπόστρωμα και στη συνέχεια είτε υπέστησαν ωσμωτικό σοκ προκειμένου να χάσουν την εξωτερική τους μεμβράνη (μιτοπλάστες), είτε διαλυτοποιήθηκαν με ανθρακικό νάτριο. 50μg μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση εκτός από τα δείγματα εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο όπου χρησιμοποιήθηκαν 100μg μιτοχονδρίων λόγω απώλειας υλικού που συμβαίνει κατά τη διαδικασία διαλυτοποίησης των μεμβρανών. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 2x sb+bme και αναλύθηκαν σε Tricine-SDS gel.

Αναλύοντας το αποτέλεσμα βλέπουμε ότι και στις δύο περιπτώσεις, η πρωτεΐνη εκφράζεται και εισέρχεται στα μιτοχόνδρια όπως έχουμε δει και στα προηγούμενα πειράματα. Μετά την δημιουργία μιτοπλαστών, η πρωτεΐνη εμφανίζεται στο κλάσμα της πελέτας και είναι επηρρεπής στην τρυψινόλυση. Τα δείγματα από την διαδικασία εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα ανάμεσα σε μιτοχόνδρια παρουσία και απουσία μεμβρανικού δυναμικού. Για την περίπτωση παρουσίας δυναμικού μπορούμε να δούμε ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται εμπεδωμένη την εσωτερική μεμβράνη όπως είναι αναμενόμενο ενώ για την περίπτωση απουσίας δυναμικού φαίνεται ότι η πρωτεΐνη υπάρχει τόσο εμπεδωμένη στην εσωτερική μεμβράνη αλλά υπάρχει και ποσοστό της που φαίνεται να είναι σε επαφή με την μεμβράνη και όχι αγκυροβολημένο σε αυτήν.

Συγκεκριμένα, στα φυσιολογικά μιτοχόνδρια η Tim11 βρίσκεται σε ποσοστό >90% στην πελέτα (CEP), δηλαδή στην εσωτερική μεμβράνη ενώ το υπόλοιπο ~10% φαίνεται να αποδομείται στον διαμεμβρανικό χώρο (CES). Αντίθετα, στην περίπτωση των μιτοχονδρίων που έχουν διαρρηγμένο το μεμβρανικό δυναμικό τους, η πρωτεΐνη εμφανίζεται σε ένα ποσοστό ~30% στο κλάσμα της πελέτας (CEP), ενώ το υπόλοιπο ~70% βρίσκεται στο υπερκείμενο (CES) σε δύο διακριτούς πληθυσμούς. Από το 70% της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο CES, ένα 20% αναλύεται στο ύψος της πλήρους μήκους πρωτεΐνης ενώ το υπόλοιπο 50% σχηματίζει μια ξεκάθαρη μπάντα στο ύψος του ΔN23 κομματιού.

Το πείραμα ελέγχθηκε μέσω της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης για γνωστές πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων (εικόνα 19). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τις πρωτεΐνες Hsp70, η οποία είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται στην μήτρα των μιτοχονδρίων και Tim10, η οποία εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο. Η ανοσοαποτύπωση έγινε και στις δυο μεμβράνες, εδώ απεικονίζεται συνδιασμένη εικόνα και των δυο μεμβρανών που απεικονίζονται καλύτερα τα αποτελέσματα.



**Εικόνα 20:** Ανοσοαποτύπωση των μεμβρανών μετά από αυτοραδιογραφία του πειράματος εντοπισμού της Tim11 πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια.

Από την εικόνα του πειράματος βλέπουμε ότι η Tim10 παρόλο που είναι πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου και θα περιμέναμε να την δούμε στο υπερκείμενο, ανιχνεύεται στη πελέτα. Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλα πειράματα και εκτιμάται ότι έχει την ικανότητα να είναι σε επαφή με την εσωτερική μεμβράνη και συγκεκριμένα έχει βρεθεί να είναι σε αλληλεπίδραση με την Tim12 πρωτεΐνη του TIM22 καναλιού. Όσο για την πρωτεΐνη Hsp70, αυτή κατευθύνεται στο κλάσμα της πελέτας, κατά τη δημιουργία μιτοπλαστών και δεν επηρεάζεται από την παρουσία τρυψίνης, ενώ οδηγείται στο υπερκείμενο κατά την εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο. Παρόλα αυτά, η τρυψινόλυση των μιτοπλαστών δεν ήταν επιτυχής καθώς η πρωτεΐνη Tim10, που βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο, εξακολουθεί να ανιχνεύεται με το αντίσωμα στο δείγμα των μιτοπλαστών παρουσία τρυψίνης. Αυτό εξηγεί και τον μερικό κατακερματισμό της Tim11 στο ίδιο δείγμα στο πείραμα αυτοραδιογραφίας. Σε γενικές γραμμές όμως μπορούμε να πούμε ότι το πείραμα ανοσοαποτύπωσης έχει δουλέψει και ότι ο εντοπισμός της Tim11 στα μιτοχόνδρια είναι ορθός.

## 2. Έλεγχος της εισόδου μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Tim11 στα μιτοχόνδρια

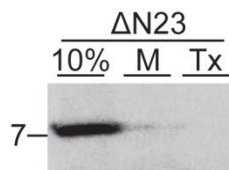
Προσπαθώντας να κατανοήσουμε περισσότερο την είσοδο και την διαφορετική τοπολογία της Tim11 στα μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού, εστίασαμε στην αλληλουχία στόχευσης της η οποία βρίσκεται στο αμινοτελικό της άκρο (εικόνα 20). Όπως προαναφέρθηκε, η Tim11 δεν φέρει το κλασσικό σινιάλο στόχευσης για την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων καθώς δεν διαθέτει ούτε την θετικά φορτισμένη αλληλουχία ώστε να αναγνωριστεί από το TIM23 κανάλι, αλλά ούτε και διαθέτει πολλά διαμεμβρανικά τμήματα ώστε να περάσει από το κανάλι TIM22. Με βάση την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι τα πρώτα 26 περίπου αμινοξέα της πρωτεΐνης που βρίσκονται στο αμινοτελικό της άκρο είναι και τα αμινοξέα που βρίσκονται αγκυροβολημένα στην εσωτερική μεμβράνη (Arselin et al., 2003). Αναλύοντας τις ιδιότητες αυτών των αμινοξέων με την χρήση του προγράμματος Praline, βλέπουμε ότι σχεδόν όλα είναι υδρόφοβα πέραν τριών που είναι φορτισμένα. Τα φορτισμένα αμινοξέα είναι δύο αργινίνες, R8 και R21, οι οποίες έχουν θετικό φορτίο και ένα ασπαρτικό, το D23, το οποίο φέρει αρνητικό φορτίο.

1-MSTVNVL**RYSALGLGLFFGF****RNDMIL**KCNAKKEEQAYEEKCLKLVEE  
AKKEYAKLHPVVT**PKDVPANASFNLEDPNIDFERVILNAVESLKEAST**-96

### Εικόνα 21: Αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης Tim11 στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα.

Μαρκαρισμένη με κίτρινο παρουσιάζεται η διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης, με κόκκινο τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα και με πράσινο το μοναδικό αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο της διαμεμβρανικής περιοχής.

Θέλοντας λοιπόν να εντοπίσουμε την πληροφορία εκείνη που είναι απαραίτητη για την στόχευση της Tim11 στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιήσαμε ένα μετάλλαγμα της πρωτεΐνης, το ΔN23, από το οποίο απουσιάζουν τα πρώτα 23 αμινοξέα. Σε αυτό το τμήμα βρίσκεται σχεδόν ολόκληρο το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης καθώς και το μεγαλύτερο τμήμα της αλληλουχίας στόχευσης με βάση το πρόγραμμα iPSORT. Για να προσεγγίσουμε το ερώτημα χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο που κωδικεύει την μεταλλαγμένη έκδοχή της Tim11 (ΔN23), το οποίο είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα pSP64 και φέρει καρβοξυτελικά του 5 μεθειονίνες (κλωνοποιήθηκε από προηγούμενο μέλος του εργαστηρίου). Χρησιμοποιώντας αυτό το πλασμίδιο, καταφέραμε να συνθέσουμε και να ραδιοσημάνουμε την ΔN23-Tim11. Το πείραμα εισόδου της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έγινε αρχικά σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια ώστε να ελέγξουμε την δυνατότητα εισόδου της στα οργανίδια (εικόνα 21).

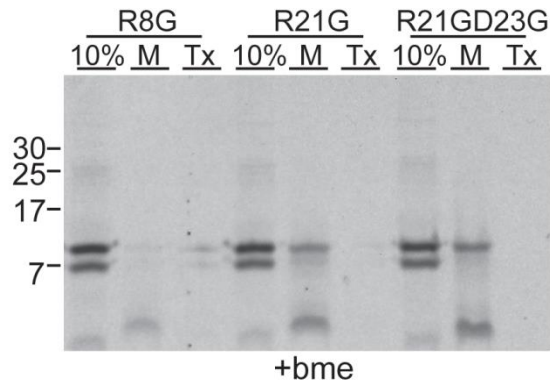


**Εικόνα 22:** Το αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας της Tim11 φέρει την πληροφορία στόχευσης στα μιτοχόνδρια. Εικόνα αυτοραδιογραφίας μετά από πείραμα εισόδου του μεταλλάγματος ΔN23-Tim11 σε κανονικά μιτοχόνδρια όπου φαίνεται ότι η είσοδος του συγκεκριμένου μεταλλάγματος είναι αδύνατος.

Η ΔN23-Tim11 εκφράζεται αρκετά καλά κατά τη διαδικασία της σύνθεσης και ραδιοσήμανσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, στο 10% δείγμα δεν υπάρχουν δύο μπάντες όπως στο αγρίου τύπου μετάλλαγμα αλλά μόνο μία η οποία αναλύεται στα ~7kDa. Επομένως μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι η 2<sup>η</sup> μπάντα που εμφανίζεται και αναλύεται χαμηλότερα στην περίπτωση της αγρίου τύπου Tim11 είναι το ΔN23-Tim11 το οποίο εκφράζεται μη-ειδικά κατά την διαδικασία σύνθεσης της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, το αποτέλεσμα του πειράματος δείχνει ότι η είσοδος του συγκεκριμένου μεταλλάγματος στα μιτοχόνδρια δεν είναι εφικτή και άρα το σήμα εισόδου της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια βρίσκεται ανάμεσα σε αυτά τα 23 αμινοξέα.

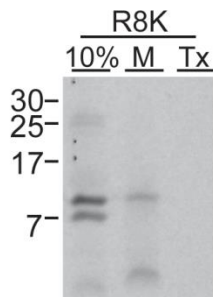
### 2.1 Έλεγχος εισόδου μεταλλαγμάτων της Tim11 σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια

Για να διερευνήσουμε εκτενέστερα τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την είσοδο της Tim11 στα μιτοχόνδρια, δημιουργήσαμε μεταλλάγματα της πρωτεΐνης στα φορτισμένα αμινοξέα. Τα φορτισμένα αμινοξέα, όπως είναι γνωστό, είναι κρίσιμα για την αναγνώριση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών από τους υποδοχείς της τρανσλοκάσης της εξωτερικής μεμβράνης (σύμπλοκο TOM). Έτσι λοιπόν δημιουργήθηκαν τρία μεταλλάγματα, το R8G όπου η αργινίνη 8 έχει μεταλλαχθεί σε γλυκίνη, το R21G, όπου η αργινίνη 21 έχει μεταλλαχθεί σε γλυκίνη και το διπλό μετάλλαγμα R21G/D23G, όπου η αργινίνη 21 και το ασπαρτικό στη θέση 23 έχουν μεταλλαχθεί σε γλυκίνες. Τα γονίδια που κωδικοποιούν της πρωτεΐνες αυτές δημιουργήθηκαν μέσω μεταλλαξιγένεσης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) από προηγούμενο μέλος του εργαστηρίου. Πραγματοποιήσαμε επομένως ένα πείραμα εισόδου των τριών αυτών μεταλλαγμάτων σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια προκειμένου να δούμε αν κάποιο/α από αυτά επηρεάζει την εισαγωγή της πρωτεΐνης (εικόνα 22).



**Εικόνα 23:** Το θετικό φορτίο στο R8G μετάλλαγμα είναι απαραίτητο για την είσοδο της Tim11 στα μιτοχόνδρια. Αυτοραδιογραφία μετά από πείραμα εισόδου των μεταλλαγμάτων R8G, R21G και R21G/D23G υπο φυσιολογικές συνθήκες σε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια.

Οι τρεις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες συντίθενται κανονικά και σχηματίζουν και αυτές όπως και η αγρίου-τύπου πρωτεΐνη δύο διακριτές μπάντες. Τα R21G και R21G/D23G, φαίνεται να εισέρχονται χωρίς ιδιαίτερο πρόβλημα στα μιτοχόνδρια κάτι που δεν συμβαίνει για την περίπτωση του R8G μεταλλάγματος. Είναι εμφανές ότι η αργινίνη στην θέση 8 παίζει καθοριστικό ρόλο για την είσοδο της πρωτεΐνης από το TOM σύμπλοκο μέσα στο οργανίδιο. Θέλοντας να το επιβεβαιώσουμε αυτό, εισάγαμε στα μιτοχόνδρια το μετάλλαγμα R8K, όπου η αργινίνη στη θέση 8 έχει μεταλλαχθεί σε λυσίνη (εικόνα 23). Σε αυτή την περίπτωση, το θετικό φορτίο παραμένει καθώς η θετικά φορτισμένη αργινίνη αντικαθίσταται από την θετικά φορτισμένη λυσίνη. Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα δημιουργήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και τα παραπάνω από προηγούμενο μέλος του εργαστηρίου.



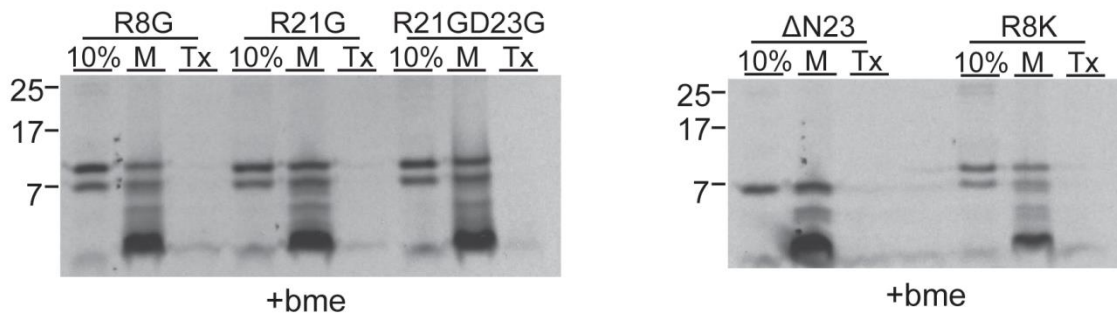
**Εικόνα 24:** Η διατήρηση του θετικού φορτίου στην θέση 8 της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της Tim11 οδηγεί την πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια. Αυτοραδιογραφία μετά από πείραμα εισόδου του μεταλλάγματος R8K στα μιτοχόνδρια.

Όπως φαίνεται, το μετάλλαγμα R8K επαναφέρει την δυνατότητα εισόδου της Tim11 στα μιτοχόνδρια. Επομένως, το θετικό φορτίο στο συγκεκριμένο αμινοξύ είναι απαραίτητο προκειμένου η πρωτεΐνη να ξεπεράσει το φράγμα της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου.



## 2.2 Έλεγχος εισόδου μεταλλαγμάτων της Tim11 σε μιτοχόνδρια στα οποία έχει διαρρηχθεί το μεμβρανικό δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης.

Γνωρίζοντας πλέον πια είναι η επίδραση των μεταλλαγμάτων στην είσοδο της Tim11 υπο φυσιολογικές συνθήκες, προχωρήσαμε σε πειράματα εισόδου τους σε μιτοχόνδρια στα οποία έχει διαταραχθεί το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης ώστε να διαπιστώσουμε αν υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των δυο καταστάσεων (εικόνα 24).



**Εικόνα 25: Όλα τα Tim11 μεταλλάγματα έχουν την δυνατότητα εισόδου σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού.**

Αυτοραδιογραφία μετά από πείραμα εισόδου όλων των Tim11 μεταλλαγμάτων στα μιτοχόνδρια απουσία μεμβρανικού δυναμικού με την χρήση των ιονοφόρων CCCP και βαλινομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μM και 1mM αντίστοιχα. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 2x sb+bme και ηλεκτροφορήθηκαν σε Tricine gel 12%.

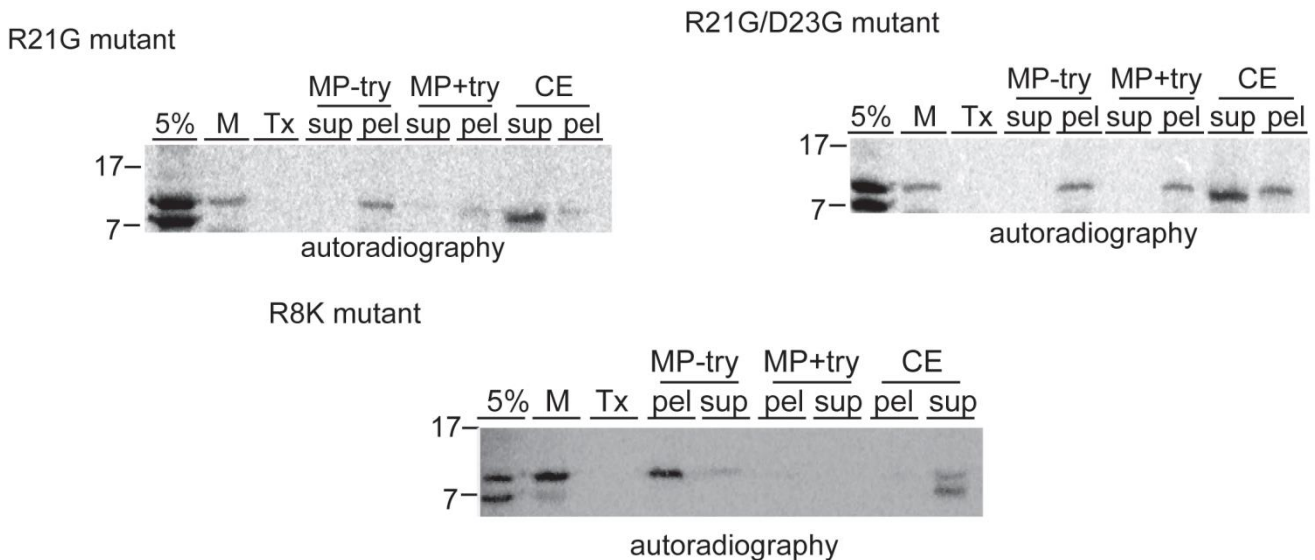
Σε γενικές γραμμές, η εικόνα που παίρνουμε είναι πολύ διαφορετική από αυτήν στο αντίστοιχο πείραμα σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια. Σε όλα τα μεταλλάγματα, πέραν του ΔN23 που εκφράζει μια μπάντα στο 10%, εισέρχονται και οι δύο πληθυσμοί της πρωτεΐνης σε αντίθεση με το πείραμα εισόδου σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια, όπου εισέρχεται μόνο η αγρίου-τύπου πρωτεΐνη (μπάντα που αναλύεται ψηλότερα). Επίσης, απουσία μεμβρανικού δυναμικού, η πρωτεΐνη εισάγεται στα μιτοχόνδρια ανεξάρτητα από οποιαδήποτε μετάλλαξη. Βλέπουμε ότι, τα R21G, R21G/D23G και R8K εισάγονται όπως συμβαίνει και υπο φυσιολογικές συνθήκες. Συμπεραίνουμε ότι, απουσία δυναμικού το αμινοτελικό άκρο της Tim11 φαίνεται να μην είναι απαραίτητο για την είσοδο της πρωτεΐνης στο οργανίδιο και κατά συνέπεια ούτε το θετικό φορτίο του καταλοίπου 8 έχει κάποια επίδραση στην είσοδο της πρωτεΐνης.

### 2.3 Υπομιτοχονδριακός εντοπισμός των μεταλλαγμάτων στα μιτοχόνδρια

Το ερώτημα που τέθηκε στη συνέχεια ήταν αν υπάρχει διαφορετικός εντοπισμός των μεταλλαγμάτων τόσο ανάμεσα τους όσο και ανάμεσα σε φυσιολογικά και σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού.

#### 2.3.1 Υπο φυσιολογικές συνθήκες σε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια

Πραγματοποιήσαμε λοιπόν, πείραμα υπομιτοχονδριακού εντοπισμού των τριών μεταλλαγμάτων, R21G, R21G/D23G και R8K που είναι τα μόνα που εισάγονται υπο φυσιολογικές συνθήκες στα μιτοχόνδρια (εικόνα 25). Οι αντίστοιχες ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες συντέθηκαν με την χρήση του *in vitro* συστήματος σύζευξης μεταγραφής-μετάφρασης και εισήχθησαν στα μιτοχόνδρια. Το ραδιενεργό υλικό που δεν εισήλθε στα οργανίδια απομακρύνθηκε με πρωτεόλυση από την πρωτεΐνάση K. Στη συνέχεια, δείγματα μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία δημιουργίας μιτοπλαστών, που επεξεργάστηκαν ή όχι με τρυψίνη, και για εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο όπως ακριβώς έγινε και στο πείραμα υπομιτοχονδριακού εντοπισμού της αγρίου-τύπου πρωτεΐνης που αναλύεται πιο πάνω.



**Εικόνα 26: Ο υπομιτοχονδριακός εντοπισμός των R21G, R21G/D23G και R8K διαφέρει από την αγρίου-τύπου Tim11.** Αυτοραδιογραφία πειράματος εντοπισμού των μεταλλαγμάτων R21G, R21G/D23G και R8K σε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια. Οι τρεις πρωτεΐνες συντέθηκαν και εισήχθησαν στα μιτοχόνδρια μετά από 20' επώαση στους 30°C. Το ραδιενεργό υλικό που δεν εισήλθε στα οργανίδια κατακερματίστηκε με την χρήση πρωτεΐνάσης K (0,1mg/ml).

Οι πρωτεΐνες και στις τρεις περιπτώσεις εκφράζονται και εισάγονται στα μιτοχόνδρια επιβεβαιώνοντας το αποτέλεσμα εισόδου αυτών των μεταλλάξεων στα μιτοχόνδρια. Στα δείγματα μιτοπλαστών, και τα τρία μεταλλάγματα εμφανίζονται στο κλάσμα της πελέτας απουσία τρυψίνης, ενώ παρουσία της πρωτεάσης πέραν του R21G/D23G μεταλλάγματος κατακερματίζονται. Πιθανόν, ο χειρισμός του συγκεκριμένου δείγματος δεν ήταν το ίδιο καλός και η τρυψίνη δεν έδρασε με τον τρόπο που θα θέλαμε. Τέλος, στα δείγματα εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο τα μεταλλάγματα R21G και R8K οδηγούνται στο υπερκείμενο. Το R8K αποδομείται με κάποιο τρόπο και δημιουργεί την δεύτερη μπάνα στο ύψος της ΔN23 μπάνας που εκφράζεται στο δείγμα 10% κάτι που δεν συμβαίνει σε κάποιο από τα άλλα δυο μεταλλάγματα. Σε αντίθεση, το διπλό μετάλλαγμα μοιράζεται στα δύο κλάσματα, σαφώς περισσότερο όμως βρίσκεται στο κλάσμα του υπερκειμένου.

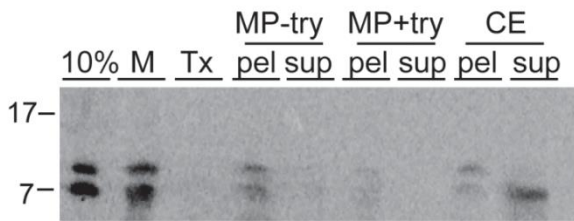
Ειδικά για το R8K, θα περιμέναμε να οδηγηθεί και αυτό όπως και η αγρίου-τύπου Tim11 στην πελέτα μιας και η μετάλλαξη που φέρει, διατηρεί το θετικό φορτίο του καταλοίπου και γενικότερα έχει τις φυσικοχημικές ιδιότητες όπως και η αγρίου-τύπου πρωτεΐνη.

Έλεγχος της διαδικασίας έγινε με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης και για τα τρία πειράματα. Οι πρωτεΐνες ελέγχου Hsp70 και Tim10 δεν δώσανε ξεκάθαρες εικόνες ώστε να πούμε με σιγουριά ότι τα μεταλλάγματα αυτά εντοπίζονται ορθά στα μιτοχόνδρια. Επομένως, το πείραμα χρειάζεται να επαναληφθεί ώστε να σιγουρευτούμε για τον εντοπισμό των τριών μεταλλαγμάτων.

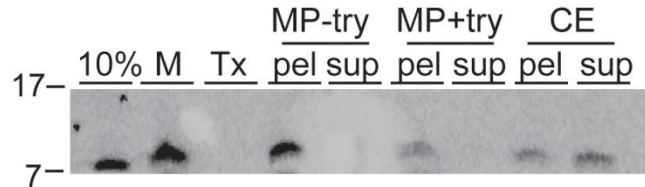
### *2.3.2 Σε μιτοχόνδρια στα οποία έχει διαταραχθεί το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης*

Παρατηρώντας λοιπόν ότι, απουσία δυναμικού όλα τα μεταλλάγματα έχουν την δυνατότητα εισόδου στα μιτοχόνδρια και ότι το αμινοτελικό άκρο της Tim11 χάνει της ιδιότητες που έχει υπο φυσιολογικές συνθήκες, πραγματοποιήσαμε πείραμα υπομιτοχονδριακού εντοπισμού όλων των μεταλλαγμάτων. Αρχικά όμως, το πείραμα έγινε για τα δύο μεταλλάγματα, R8G και ΔN23, που παρουσία μεμβρανικού δυναμικού αδυνατούν να εισέλθουν στα μιτοχόνδρια (εικόνα 26). Οι συνθήκες του πειράματος είναι οι ίδιες που περιγράφονται και πιο πάνω σε αντίστοιχα πειράματα.

R8G



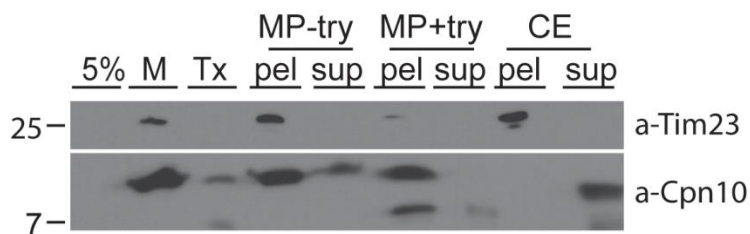
ΔN23



**Εικόνα 27:** Τα μεταλλάγματα R8G και ΔN23 εισέρχονται και εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού. Αυτοραδιογραφία πειράματος εντοπισμού των δυο μεταλλαγμάτων μετά από είσοδο τους στα μιτοχόνδρια. Η πρωτεΐνη φαίνεται να εντοπίζεται τόσο στο κλάσμα της πελέτας όσο και στο κλάσμα του υπερκευμένου μετά από εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο.

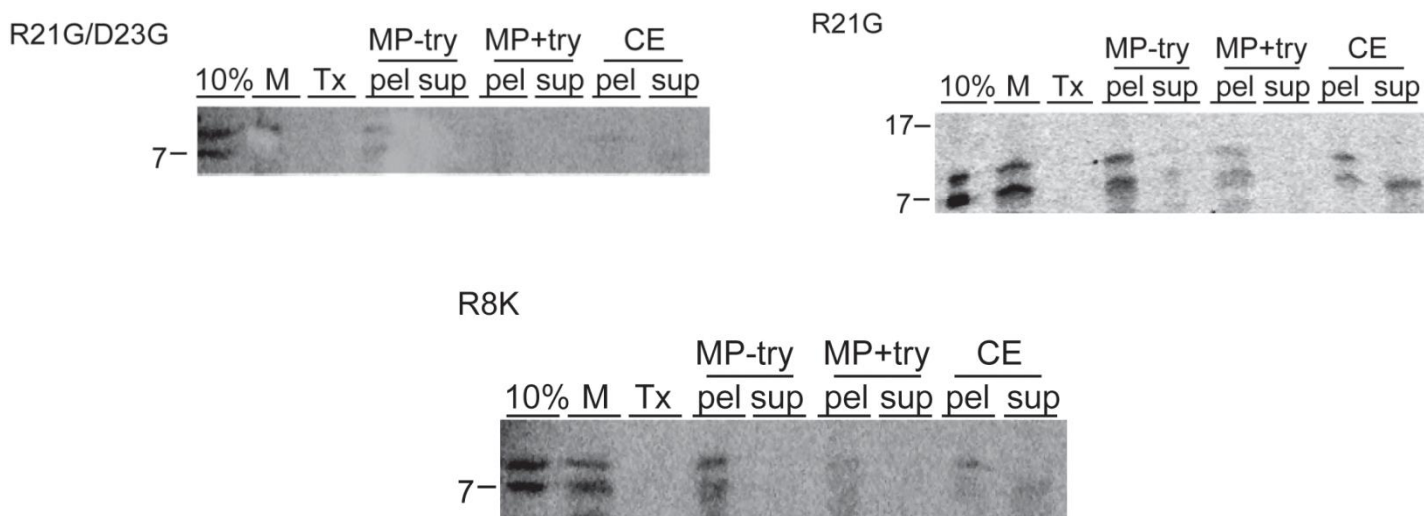
Η είσοδος των R8G και ΔN23 επιβεβαιώνεται μετά και από το πείραμα εντοπισμού τους στα μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού. Για την περίπτωση του R8G παρατηρούμε την έκφραση των ξεχωριστών πληθυσμών της πρωτεΐνης στο 10% δείγμα. Και οι δυο πληθυσμοί έχουν την δυνατότητα εισόδου στα μιτοχόνδρια (δείγμα M) όπως φαίνεται και στην εικόνα 26. Η R8G-Tim11 κατευθύνεται στο κλάσμα της πελέτας μετά από την διαδικασία δημιουργίας μιτοπλαστών (MP-try) και είναι ευαίσθητη στην τρυψινόλυση (MP+try). Στην διαδικασία εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο η πλήρους μήκους πρωτεΐνη κατευθύνεται στην πελέτα ενώ η μάλιστα που αναλύεται χαμηλότερα κατευθύνεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο υπερκεύμενο. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και για το ΔN23 μετάλλαγμα όσο αφορά την είσοδο και την δημιουργία μιτοπλαστών. Για τα CE δείγματα παρατηρούμε να υπάρχει κάπως πιο ισομοιρασμένο το σήμα της πρωτεΐνης ανάμεσα σε υπερκεύμενο και πελέτα.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η διαδικασία έγινε σωστά πραγματοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με αντισώματα για γνωστές πρωτεΐνες μιτοχονδριακών διαμερισμάτων (εικόνα 27). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την Tim23 και Crn10. Η Tim23 είναι πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης ενώ η Crn10 εντοπίζεται στην μήτρα.



**Εικόνα 28:** Ανοσοαποτύπωση του πειράματος εντοπισμού των μεταλλαγμάτων R8G και ΔN23 σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού. Και τα δυο αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 1:2000 και επώαστηκαν για 2 ώρες με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το υπόλοιπο πρωτόκολλο αναλύεται εκτενώς στο μέρος ‘Υλικά και Μέθοδοι’.

Αφου είδαμε τον υπομιτοχονδριακό εντοπισμό των R8G και ΔN23 σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού, των μεταλλαγμάτων που δεν μπορούν να εισέλθουν υπο φυσιολογικές συνθήκες στα μιτοχόνδρια, προχωρήσαμε σε πειράματα εντοπισμού των R21G, R21G/D23G και R8K προκειμένου να τα συγκρίνουμε με τα αντίστοιχα πειράματα που έγιναν σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια (εικόνα 28).



**Εικόνα 29:** Τα μεταλλάγματα R21G, R21G/D23G και R8K εντοπίζονται διαφορετικά στα μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού συγκριτικά με τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια αλλά παρόμοια με τα άλλα δυο μεταλλάγματα, R8G και ΔN23. Αυτοραδιογραφία του πειράματος εντοπισμού των τριών μεταλλαγμάτων που έχουν την δυνατότητα εισόδου και σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια. Η διαδικασία του πειράματος αναλύεται σε αντίστοιχα πειράματα και περιγράφεται επίσης αναλυτικά σε στάδια στο μέρος ‘Υλικά και Μέθοδοι’.

Ενώ σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια εισέρχονται μόνο οι πάνω μπάντες από τις δυο που εκφράζονται στα 10% δείγματα, απουσία δυναμικού εισέρχονται και οι δυο σε όλες τις περιπτώσεις. Τα τρία μεταλλάγματα R21G, R21G/D23G και R8K εντοπίζονται παρόμοια με τα προηγούμενα δύο, R8G και ΔN23. Τα R21G/D23G και R8K χρειάζεται να επαναληφθούν καθώς η εικόνα τους δεν είναι πολύ καθαρή και δεν δείχνει ξεκάθαρα το σήμα της πρωτεΐνης στην περίπτωση εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο. Για το R21G, μπορούμε να δούμε ότι κατευθύνεται στην πελέτα μετά την δημιουργία

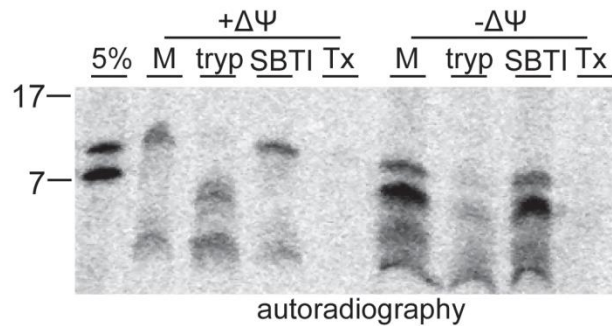
μιτοπλαστών και είναι εκτεθειμένο σε πρωτεόλυση από την τρυψίνη (δείγματα MP). Παρόλα αυτά, συγκριτικά με το αντίστοιχο πείραμα σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια, εμφανίζεται να έχει διαφορετικό εντοπισμό στα CE δείγματα. Στα φυσιολογικά μιτοχόνδρια το συγκεκριμένο μετάλλαγμα οδηγείται στο υπερκείμενο, απουσία δυναμικού η πάνω εισερχόμενη μπάντα βρίσκεται στην πελέτα μαζί με ένα ποσοστό της χαμηλότερης μπάντας. Το υπόλοιπο ποσοστό της κάτω μπάντας αναλύεται στο κλάσμα του υπερκειμένου.

### **3. Έλεγχος του μονοπατιού στόχευσης και εμπέδωσης στην εσωτερική μεμβράνη**

Η Tim11 πρωτεΐνη φαίνεται να παρουσιάζει γενικά μια ιδιαίτερη εικόνα. Υπο φυσιολογικές συνθήκες, εισέρχεται στο οργανίδιο μέσω αλληλεπίδρασης του θετικά φορτισμένου καταλοίπου στη θέση 8 με το σύμπλοκο TOM και εμπεδώνεται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού. Αυτό αλλάζει σε συνθήκες απουσίας δυναμικού και η Tim11 φέρεται να διαμορφώνει μια αρκετά διαφορετική συμπεριφορά. Η δυνατότητα εισόδου της αγρίου τύπου όσο και όλων των μεταλλαγμάτων, ειδικά του ΔN23 από το οποίο απουσιάζει σχεδόν ολόκληρη η αλληλουχία στόχευσης και αγκυροβόλησης της πρωτεΐνης, μας οδήγησαν να αναρωτηθούμε αν σε συνθήκες απουσίας δυναμικού η πρωτεΐνη εισέρχεται ανεξάρτητα από το TOM σύμπλοκο ή ακόμα αν σε αυτές τις συνθήκες η πρωτεΐνη υιοθετεί έναν άλλο ρόλο πέραν αυτού που έχει στα φυσιολογικά μιτοχόνδρια.

#### *3.1 Έλεγχος εισόδου της Tim11 στα μιτοχόνδρια από το σύμπλοκο TOM*

Προκειμένου να προσεγγίσουμε αυτό το ερώτημα, πήραμε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια τα οποία τα επεξεργαστήκαμε ή όχι με τρυψίνη σε SEM buffer (εικόνα 29). Στη συνέχεια, αφού απομονώθηκαν τα πρωτεολυμένα ή μη μιτοχόνδρια τα επαναδιαλύσαμε σε import buffer παρουσία ή απουσία μεμβρανικού δυναμικού. Ακολούθως, εκφράσαμε ραδιενεργή την Tim11 και πραγματοποιήσαμε πείραμα εισόδου, έχοντας ως δείγμα ελέγχου, μιτοχόνδρια στα οποία προσθέσαμε μόνο τον αναστολέα της τρυψίνης (SBTI).



**Εικόνα 30:** Η Tim11 εισέρχεται από το σύμπλοκο TOM είτε παρουσία είτε απουσία μεμβρανικού δυναμικού. Αυτοραδιογραφία πειράματος εισαγωγής της αγρίου-τύπου πρωτεΐνης Tim11 σε μιτοχόνδρια στα οποία έχει προηγηθεί κατακερματισμός των εκτεθειμένων υπομονάδων του TOM καναλιού. Το πείραμα έγινε τόσο σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια όσο και σε μιτοχόνδρια με διαταραγμένο το μεμβρανικό δυναμικό τους. Η πρωτεΐνη εισήχθη επίσης σε μιτοχόνδρια τα οποία δεν επεξεργάστηκαν με τρυψίνη καθώς και σε μιτοχόνδρια στα οποία προστέθηκε μόνο ο αναστολέας της τρυψίνης (SBTI) πριν από το πείραμα εισόδου. Τα μιτοχόνδρια επαναδιαλύθηκαν σε SEM buffer, η τρυψίνη χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0,02mg/ml και ο αναστολέας σε συγκέντρωση 0,6mg/ml.

Είναι ξεκάθαρο ότι, η πρωτεΐνη δεν ακολουθεί κάποιο άλλο μονοπάτι εισόδου στο μιτοχόνδριο αλλά εισάγεται από το TOM κανάλι είτε παρουσία είτε απουσία δυναμικού. Αυτό το συμπεραίνουμε καθώς δεν βλέπουμε να υπάρχει είσοδος της πρωτεΐνης στα δείγματα μιτοχονδρίων που επεξεργάστηκαν με τρυψίνη πριν την είσοδο της Tim11 (δείγμα tryp). Παρόλα αυτά και σε αυτό το πείραμα βλέπουμε ότι η είσοδος της Tim11 στα μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού είναι εφικτή και φανερά πιο έντονη.

### 3.2 Διερεύνηση εναλλακτικού ρόλου της Tim11 πρωτεΐνης στην περίπτωση απουσίας μεμβρανικού δυναμικού

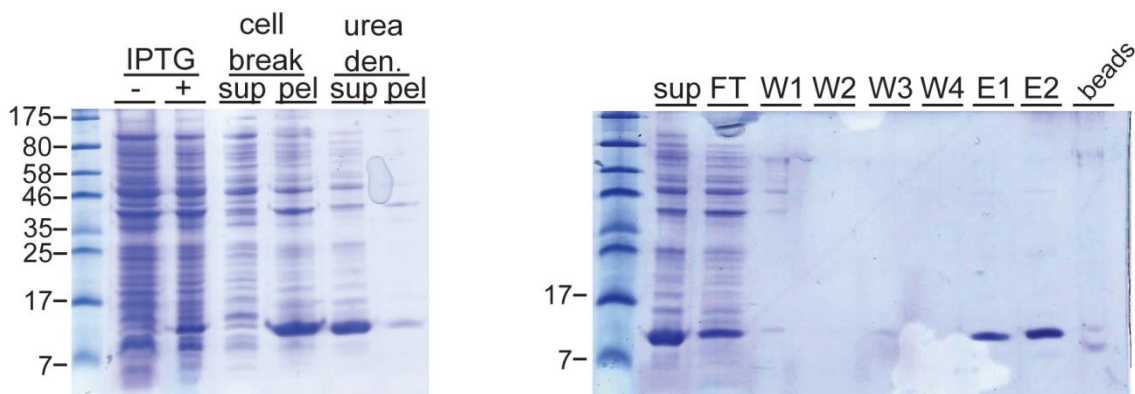
Γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι η πρωτεΐνη Tim11 δεν παίζει κάποιο ρόλο ως προς την ενζυμική λειτουργία της ATP συνθάσης αλλά είναι απαραίτητη προκειμένου το ένζυμο να διμεριστεί/ολιγομεριστεί και να κάμψει την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων δημιουργώντας τις χαρακτηριστικές δομές στο εσωτερικό τους (ακρολοφίες). Μια πιθανή εξήγηση για την αυξημένη είσοδο τόσο της αγρίου-τύπου πρωτεΐνης όσο και των μεταλλαγμάτων της, θα μπορούσε να είναι ότι αποκτά κάποιο επιπλέον ρόλο στα μιτοχόνδρια απουσία μεμβρανικού δυναμικού.

Γνωρίζουμε ότι όταν υπάρχει αποσταθεροποίηση των διμερών της ATPάσης προκαλείται μείωση στο μεμβρανικό δυναμικό (Bornhönd et al., 2006). Επομένως, όταν εμείς διαταράσσουμε το δυναμικό ίσως να προκαλούμε κάποιου είδους σηματοδότηση στα μιτοχόνδρια, ότι τα διμερή/ολιγομερή της ATP συνθάσης έχουν διασπαστεί και αυτό να προκαλεί την είσοδο περισσότερης Tim11 στα μιτοχόνδρια



προκειμένου να διατηρηθούν τα ολιγομερή του ενζύμου. Ίσως η σηματοδότηση αυτή να προσπαθεί να αναστρέψει την κατάσταση ώστε να επανέλθει το δυναμικό στην εσωτερική μεμβράνη. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει και την είσοδο του ΔN23 μεταλλάγματος το οποίο μπορεί να μην διαθέτει την αλληλουχία στόχευσης και αγκυροβόλησης της πρωτεΐνης, παρόλα αυτά διαθέτει στο καρβοξυτελικό του μέρος μια περιοχή (coiled-coil domain) η οποία γνωρίζουμε ότι συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις για την σταθεροποίηση των διμερών/ολιγομερών της ATP συνθάσης.

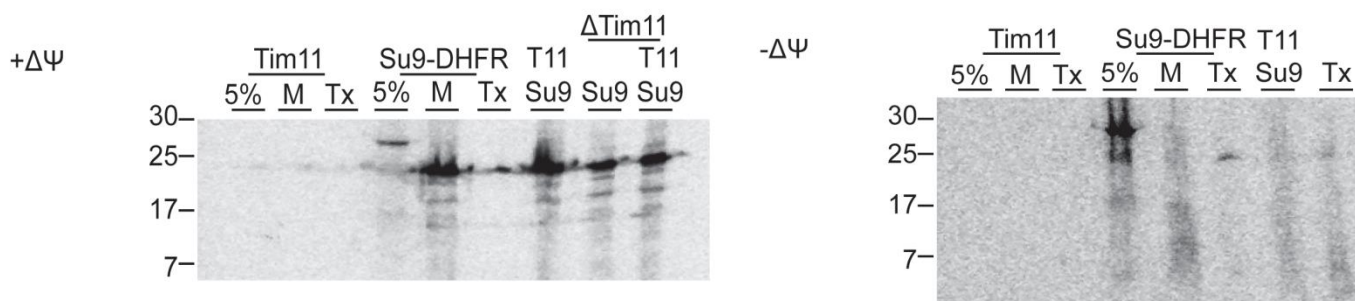
Για να προσεγγίσουμε αυτή την υπόθεση πραγματοποιήσαμε ένα ραδιενεργό πείραμα εισόδου δυο σταδίων σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια και σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού. Σε αυτά τα πειράματα εισάγονται δύο πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια, η μια εισάγεται ως μη ραδιενεργή, που έχει προκύψει από καθαρισμό, και η δεύτερη συντίθεται και ραδιοσημαίνεται με το *in vitro* σύστημα σύνθεσης ραδιενεργών πρωτεϊνών. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε καθαρή Tim11-His tagged πρωτεΐνη, η οποία καθαρίστηκε κατά την διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας και ο καθαρισμός της περιγράφεται αναλυτικά στο μέρος 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ως ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε η Su9-DHFR.



**Εικόνα 31: Καθαρισμός της Tim11-His από στέλεχος DE3 του βακτηρίου *E.coli*.** Η Tim11 κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pRS316 ο οποίος, φέρει καρβοξυτελικά του πολυκλωνικού μέρους έξι ιστιδίνες. Έπειτα ακολούθησε μετασηματισμός του pRS316 Tim11 στο DE3 στέλεχος προκειμένου να εκφραστεί η πρωτεΐνη. Η υπερέκφραση έγινε παρουσία 0,4mM IPTG για 4 ώρες στους 30°C. Η πρωτεΐνη μετά από το σπάσιμο των κυττάρων καταλήγει στην πελέτα και διαλυτοποιείται με την χρήση 8M ουρίας και επώαση για 2 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε σφαιρίδια νικελίου (Ni-NTA) τα οποία είχαν εξισοροποιηθεί προηγουμένως με το buffer στο οποίο βρισκόταν η πρωτεΐνη. Η ουρία αραιώθηκε κατά την διάρκεια των διαδοχικών πλυσιμάτων και η πρωτεΐνη εκλούστηκε στο τέλος με 500mM ιμιδαζόλιο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι)



Αν όντως η Tim11 έχει κάποιο ρόλο στην επαναφορά του μεμβρανικού δυναμικού, τότε η Su9-DHFR που δεν εισέρχεται απουσία δυναμικού, θα μπορεί να το κάνει στα μιτοχόνδρια στα οποία προηγουμένως εισήλθε η Tim11. Για να είμαστε σίγουροι ότι το αποτέλεσμα που θα πάρουμε θα οφείλεται στην επίδραση της Tim11, η Su9-DHFR επώαστηκε με τα μιτοχόνδρια σε διάλυμα που περιείχε μόνο IB2x και ATP 0,1M. Δεν υπήρχαν δηλαδή χημικά όπως το NADH, CCCP και βαλινομυκίνη που επηρεάζουν το αποτέλεσμα προς συγκεκριμένη κατεύθυνση. Επίσης, για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τόσο αγρίου-τύπου όσο και ΔTim11 μιτοχόνδρια για να μπορούμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μεταξύ των δύο. Τα ΔTim11 μιτοχόνδρια απομονώθηκαν από προηγούμενο μέλος του εργαστηρίου (εικόνα 31).

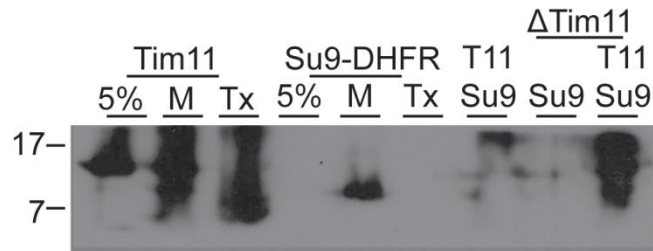


**Εικόνα 32: Η Su9—DHFR δεν μπορεί να εισαχθεί σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού στα οποία έχει εισέλθει καθαρή Tim11 πρωτεΐνη.** Αυτοραδιογραφία πειράματος εισόδου σε δυο στάδια, καθαρής Tim11 και ραδιενεργής Su9-DHFR σε μιτοχόνδρια παρουσία και απουσία μεμβρανικού δυναμικού. Αρχικά έγινε είσοδος της καθαρής Tim11 στα μιτοχόνδρια για 30', τα οποία στη συνέχεια απομονώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε import buffer παρουσία μόνο ATP 0,1M. Έπειτα προστέθηκε η Su9-DHFR και επώαστηκε για 10'. Τα μιτοχόνδρια, απομονώθηκαν και επεξεργάστηκαν με πρωτεΐναση K για να απομακρυνθεί το μή-εισαγμένο υλικό. Η δράση της πρωτεάσης αναστάλθηκε με 1mM PMSF και τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 2x sb+bme. Τα δείγματα 5% αντιπροσωπεύουν το 5% του συνολικού ραδιενεργού υλικού που παρουσιάστηκε ανα περίπτωση μιτοχονδρίων (50μg). Imp: δείγμα μιτοχονδρίων, Tx: δείγμα μιτοχονδρίων που επαναδιαλύθηκε σε 1%Triton-X απορρυπαντικό παρουσία πρωτεϊνάσης K. Tim11-Su9: δείγμα μιτοχονδρίων στο οποίο εισήλθαν και οι δύο πρωτεΐνες.

Το αποτέλεσμα της εικόνας δεν μπορεί να υποστηρίξει την υπόθεση μας. Η συγκεκριμένη εικόνα αυτοραδιογραφίας παρουσιάζει μόνο την ραδιενεργή Su9-DHFR και όχι την καθαρή Tim11 που εισήλθε στα μιτοχόνδρια. Για να ανιχνεύσουμε την καθαρή πρωτεΐνη πραγματοποιήσαμε πείραμα ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα για την Tim11 πρωτεΐνη το οποίο περιγράφεται παρακάτω.

Η Su9-DHFR παράγεται, εισάγεται και βρίσκεται πλέον στην ώριμη μορφή της στα φυσιολογικά μιτοχόνδρια ενώ απουσία δυναμικού είναι αδύνατη η είσοδος της στο οργανίδιο (δείγματα imp). Τα δείγματα μιτοχονδρίων τα οποία επώαστηκαν πρώτα με την Tim11, παρουσία ή απουσία δυναμικού,

εμφανίζουν την ίδια εικόνα με την απλή είσοδο της Su9-DHFR για τις αντίστοιχες καταστάσεις. Επομένως, η Tim11 που εισέρχεται απουσία δυναμικού δεν είναι σε θέση να επαναφέρει το δυναμικό στην εσωτερική μεμβράνη και άρα να εισάγει την Su9-DHFR στα μιτοχόνδρια. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την απλή είσοδο της Su9-DHFR στα  $\Delta$ Tim11 μιτοχόνδρια η οποία φαίνεται να αυξάνεται ελάχιστα όταν στα συγκεκριμένα μιτοχόνδρια εισέλθει προηγουμένως, παρουσία δυναμικού, η Tim11.



**Εικόνα 33:** Ανοσοαποτύπωση της μεμβράνης μετά από το πείραμα αυτοραδιογραφίας δύο-σταδίων σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια. Η διαδικασία έγινε με την χρήση αντισώματος για το  $\Delta$ N23 τμήμα της πρωτεΐνης Tim11 σε αναλογία 1:2000. Πριν την επώαση με το αντίσωμα η μεμβράνη παρουσιάστηκε σε διάλυμα 1x TBST με 5% γάλα για να παρεμποδιστεί η μη-ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Αφού ξεπλύθηκε 3 φορές επί 5' με 1x TBST, επώαστηκε με το πρωτογενές αντίσωμα  $\alpha$ -Tim11, για μια ώρα και στη συνέχεια για άλλη μια ώρα με το δευτερογενές,  $\alpha$ -rabbit. Ανάμεσα στα αντισώματα επαναλύθηκαν 3 πλυσίματα με 1x TBST και η μεμβράνη εκτέθηκε σε εμφάνιση με φίλμ μετά από χρήση ECL.

Η ανοσοαποτύπωση των μεμβρανών έγινε με την χρήση αντισώματος για την Tim11 που αναγνωρίζει το  $\Delta$ N23 μέρος της πρωτεΐνης (εικόνα 33). Η εικόνα δεν είναι πολύ καθαρή, παρόλα αυτά, παρατηρούμε ότι στο 5% δείγμα, που είναι το 5% της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης που επώαστηκε ανα 50μg μιτοχονδρίων, η Tim11 αναλύεται σε ψηλότερο μοριακό βάρος, γύρω στα 15kDa, σε σχέση με τα πειράματα αυτοραδιογραφίας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι μετά τον καθαρισμό της η πρωτεΐνη παρέμεινε στο διάλυμα έκλουσης με το ιμιδαζόλιο και κατευθείαν προσθέσαμε 50% γλυκερόλη και την τοποθετήσαμε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ίσως η παρουσία του ιμιδαζολίου να επηρεάζει την ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης και να την οδηγεί σε ψηλότερο μοριακό βάρος. Η ερμηνεία αυτή ενισχύεται και από την παρουσία της ενδογενούς Tim11 στα δείγματα μιτοχονδρίων (imp) που βλέπουμε, πιο καθαρά στο δείγμα της Su9-DHFR, την εμφάνιση της πρωτεΐνης στο αναμενόμενο ύψος.

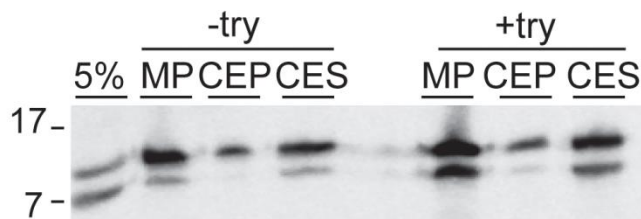
### 3.3 Η πρωτεΐνη Tim11 είναι ανεξάρτητη των γνωστών μονοπατιών TIM22/TIM23 για την εμπέδωση της στην εσωτερική μεμβράνη

Η αγκυροβόληση της Tim11 στην εσωτερική μεμβράνη αποτελεί ένα ακόμα αίνιγμα και δεν υπάρχει κάποια αναφορά σχετικά με αυτό. Υπάρχει πιθανότητα να αναγνωρίζεται από τα TIM22/TIM23 μέσω μιας διαφορετικής αλληλουχίας στόχευσης που δεν περιλαμβάνεται στις ήδη γνωστές ή ίσως ακόμα να ακολουθεί κάποιο άγνωστο μονοπάτι εισαγωγής πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη. Αυτό που είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία είναι ότι, τα δύο αυτά μονοπάτια έχουν την ικανότητα να εισάγουν πρωτεΐνες στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων υπο την προϋπόθεση ότι το δυναμικό της είναι αδιατάραχο.

Προκειμένου να προσεγγίσουμε αυτό το ερώτημα και να δούμε αν η εμπέδωση της Tim11 ακολουθεί κάποιο από αυτά τα δύο μονοπάτια, δημιουργήσαμε μιτοπλάστες οι οποίοι επεξεργάστηκαν ή όχι με 0,1mg/ml τελική συγκέντρωση τρυψίνης (εικόνα 33). Μέσω αυτής της διαδικασίας, στην περίπτωση που δεν έχουμε τρυψίνη στο διάλυμα, δημιουργούμε μιτοπλάστες οι οποίοι έχουν ανέπαφες και λειτουργικές της δύο τρανσλοκάσες TIM22 και TIM23. Αντίθετα, στους μιτοπλάστες που έχουν υποστεί τρυψινόλυση, οι εκτεθειμένες υπομονάδες των δύο συμπλόκων έχουν κατακερματιστεί και αποικοδομηθεί. Το πείραμα αυτό έγινε τόσο σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια όσο και σε μιτοχόνδρια απουσία μεμβρανικού δυναμικού.

#### 3.3.1 Παρουσίαση της Tim11 πρωτεΐνης σε μιτοπλάστες που επεξεργάστηκαν ή όχι με τρυψίνη παρουσία μεμβρανικού δυναμικού

Αρχικά το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μιτοπλάστες που διατηρούν το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης άθικτο οι οποίοι επώαστηκαν με την ραδιενεργή πρωτεΐνη για 20' ακολουθώντας το πρωτόκολλο όπως και στην περίπτωση της εισαγωγής πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Έπειτα, οι μιτοπλάστες υπέστησαν διαλυτοποίηση της μοναδικής τους μεμβράνης μέσω εκχύλισης με ανθρακικό νάτριο ώστε να εξετάσουμε την δυνατότητα ανάκτησης της πρωτεΐνης και άρα το πόσο ισχυρά προσδεδεμένη είναι στην εσωτερική μεμβράνη.



**Εικόνα 34: Η Tim11 είναι ανεξάρτητη των καναλιών εισαγωγής πρωτεΐνων στην εσωτερική μεμβράνη TIM22/TIM23 σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια.** Αυτοραδιογραφία πειράματος παρουσίασης της ραδιενεργής Tim11 σε μιτοπλάστες παρουσία δυναμικού (+ΔΨ) που έχουν επεξεργαστεί ή όχι με τρυψίνη. Έπειτα ακολουθήσε εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός σύνδεσης με την εσωτερική μεμβράνη. MP: δείγμα μιτοπλαστών, CEP: δείγμα πελέτας μετά από επεξεργασία με ανθρακικό νάτριο, CES: δείγμα υπερκειμένου μετά από εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο.

Η Tim11 μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι είναι ανεξάρτητη από την παρουσία των καναλιών TIM22 και TIM23 και από οποιαδήποτε πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης προκειμένου να ενσωματωθεί στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Είναι αξιοσημείωτο ότι, η αποικοδόμηση των εκτεθειμένων τμημάτων των καναλιών TIM22/TIM23 όχι μόνο δεν παρεμπόδισε την εμπέδωση της πρωτεΐνης στην εσωτερική μεμβράνη αλλά, μπορούμε να πούμε ότι την ενίσχυσε σε ένα μικρό βαθμό καθώς οι μπάντες και στα τρία δείγματα είναι πιο έντονες παρουσία τρυψίνης συγκριτικά με αυτές απουσία τρυψίνης. Επίσης παρατηρούμε ότι, μετά την εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο, στο δείγμα της πελέτας (CEP) υπάρχει μόνο η αγρίου τύπου πρωτεΐνη ενώ στο δείγμα του υπερκειμένου (CES) εντοπίζεται και το ΔN23 που αναλύεται χαμηλότερα όπως είναι και το αναμενόμενο μιας και αυτό δεν φέρει το τμήμα αγκυροβόλησης στην μεμβράνη. Το σήμα της πρωτεΐνης αγρίου τύπου που υπάρχει στους μιτοπλάστες (μπάντα που αναλύεται ψηλότερα), υπάρχει σε ένα ποσοστό περίπου 30% στην πελέτα και 70% στο υπερκείμενο, ενώ η ΔN23 βρίσκεται όλη στο δείγμα του υπερκειμένου. Αυτό συμβαίνει και στους μιτοπλάστες που επεξεργάστηκαν με τρυψίνη αλλά και σε αυτούς που δεν έχουν επεξεργαστεί.

### *3.3.2 Παρουσίαση της Tim11 πρωτεΐνης σε μιτοπλάστες που επεξεργάστηκαν ή όχι με τρυψίνη απουσία μεμβρανικού δυναμικού*

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε αυτή τη φορά σε μιτοπλάστες απουσία δυναμικού για να δούμε και να συγκρίνουμε πως συμπεριφέρεται η Tim11 σε αυτή τη περίπτωση (εικόνα 34). Οι μιτοπλάστες δημιουργήθηκαν όπως παραπάνω και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα στο οποίο είχαμε προσθέσει τα ιονοφόρα CCCP και βαλινομυκίνη προκειμένου να διαταράξουμε το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης. Το ραδιενεργό υπόστρωμα προστέθηκε στη συνέχεια και επώαστηκε για 20' στους 30°C και έπειτα ακολουθήσε η εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο.



**Εικόνα 35:** Η Tim11 είναι ανεξάρτητη των καναλιών εισαγωγής πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη TIM22/TIM23 σε μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού. Αυτοραδιογραφία πειράματος εισαγωγής ραδιοσημασμένης Tim11 πρωτεΐνης σε μιτοπλάστες απουσία δυναμικού που έχουν επεξεργαστεί ή όχι με τρυψίνη πριν την εισαγωγή της πρωτεΐνης σε αυτούς. MP: δείγμα μιτοπλαστών, CEP: δείγμα πελέτας μετά από επεξεργασία με ανθρακικό νάτριο, CES: δείγμα υπερκειμένου μετά από εκχύλιση με ανθρακικό νάτριο.

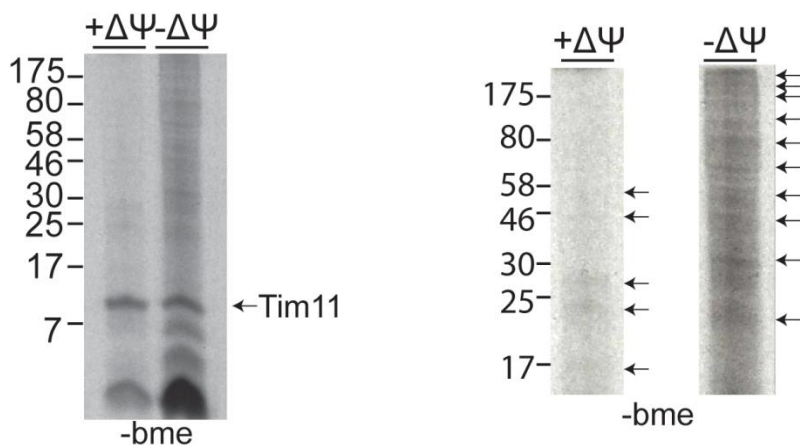
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων, βλέπουμε ότι η εμπέδωση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη δεν επηρεάζεται ούτε από δυναμικό αλλά ούτε από την επεξεργασία των μιτοπλαστών με τρυψίνη. Άρα η πρωτεΐνη είναι τόσο ανεξάρτητη της διαφοράς δυναμικού που σχηματίζεται στην εσωτερική μεμβράνη όσο και ανεξάρτητη των δύο γνωστών καναλιών για την μεταφορά και εμπέδωση πρωτεϊνών, των TIM22 και TIM23. Σε αντίθεση με την περίπτωση παρουσίας της Tim11 σε κανονικούς μιτοπλάστες, όταν έχουμε απουσία μεμβρανικού δυναμικού δεν υπάρχει κάποια διαφορά στην ένταση του σήματος παρουσία ή απουσία τρυψίνης. Παρόλα αυτά υπάρχει διαφορετικός εντοπισμός της πρωτεΐνης στα δείγματα μετά από διαλυτοποίηση της εσωτερικής μεμβράνης ανάμεσα στις δύο καταστάσεις των μιτοπλαστών. Σε αντίθεση με τους κανονικούς μιτοπλάστες, στην περίπτωση απουσίας δυναμικού το 90% της αγρίου τύπου πρωτεΐνης βρίσκεται στο δείγμα της πελέτας ενώ το ΔN23 Tim11 ισομοιράζεται θα λέγαμε ανάμεσα σε πελέτα και υπερκείμενο. Αυτό συμβαίνει είτε οι μιτοπλάστες επεξεργάστηκαν, είτε όχι με τρυψίνη πριν χρησιμοποιηθούν για το πείραμα.

#### **4. Έλεγχος σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ της πρωτεΐνης Tim11 και άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών**

Προκειμένου να διερευνήσουμε εκτενέστερα το ερώτημα της στόχευσης της Tim11 στο μιτοχόνδριο, πραγματοποιήσαμε πειράματα με τα οποία ελέγξαμε την δυνατότητα της Tim11 να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες κατά την διαδικασία μεταφοράς και εμπέδωσης της στην εσωτερική μεμβράνη τόσο παρουσία όσο και απουσία δυναμικού.

#### 4.1 Είσοδος της Tim11 πρωτεΐνης σε μιτοχόνδρια παρουσία ή απουσία μεμβρανικού δυναμικού και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε διάλυμα απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης

Η δημιουργία συμπλόκων ανάμεσα στην Tim11 και σε άλλα υποστρώματα, μικρού μοριακού βάρους, είναι διακριτή αν απλά τα δείγματα μετά το πείραμα εισόδου επαναδιαλυθούν σε διάλυμα απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης (2x sample buffer -b-me). Η β-μερκαπτοαιθανόλη έχει την δυνατότητα διάσπασης τυχόν δισουλφιδικών δεσμών που δημιουργούνται ανάμεσα στις πρωτεΐνες. Επομένως απουσία της από το διάλυμα, θα οδηγήσει στην εμφάνιση μπαντών ψηλότερου μοριακού βάρους. Προκειμένου να δούμε αν υπάρχει διαφορά στην δυνατότητα δημιουργίας συμπλόκων της Tim11 πραγματοποιήσαμε το πείραμα αυτό τόσο σε φυσιολογικά μιτοχόνδρια όσο και σε μιτοχόνδρια απουσία μεμβρανικού δυναμικού (εικόνα 36).



**Εικόνα 36: Η Tim11 πρωτεΐνη μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες.**

Αυτοραδιογραφία μετά από πείραμα εισόδου της πρωτεΐνης Tim11 σε μιτοχόνδρια παρουσία ή απουσία μεμβρανικού δυναμικού. Οι μιτοχονδριακές πελέτες επαναδιαλύθηκαν σε 2x sample buffer απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (Tricine gel 12%). Δεξιά απεικονίζεται μεγένθυση της εικόνας επικεντρώνοντας στις μπάντες που αναλύονται ψηλότερα από το μονομερές της πρωτεΐνης και υποδεικνύονται με βέλη.

Η Tim11 έχει την δυνατότητα σχηματισμού πρωτεϊνικών συμπλόκων και στις δύο περιπτώσεις, είτε παρουσία είτε απουσία μεμβρανικού δυναμικού αλλά φαίνεται ξεκάθαρα ότι στην περίπτωση απουσίας δυναμικού, ο σχηματισμός συμπλόκων είναι πολύ περισσότερος και εντονότερος. Αυτό ενισχύει την θεωρία ότι το Tim11 πιθανόν να αποκτά κάποιο άλλο ρόλο όταν το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης διαρρηγνύεται.

#### 4.2 Επίδραση του οξειδωτικού στρες ( $H_2O_2$ ) στην πρωτεΐνη Tim11.

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, πρωτεΐνες που φέρουν κυστεΐνες στην αμινοξική τους αλληλουχία και βρίσκονται εκτεθειμένες στον εσωτερικό χώρο των μιτοχονδρίων μπορούν να οξειδωθούν από μόρια  $H_2O_2$  που παράγονται στο μιτοχόνδριο. Αυτό συμβαίνει σε πρωτεΐνες οι οποίες έχουν την ανάγκη να οξειδωθούν προκειμένου να αναδιπλωθούν και να αποκτήσουν την τελική τους στερεοδιάταξη στο χώρο καθώς επίσης και σε πρωτεΐνες οι οποίες χρειάζεται να οξειδωθούν για να αλληλεπιδράσουν με άλλα υποστρώματα. Παρόλα αυτά, το ποσοστό εκτεθειμένων κυστεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας που αντιδρά με ελεύθερα μόρια  $H_2O_2$  είναι πολύ μικρό (Dröse et al., 2014).

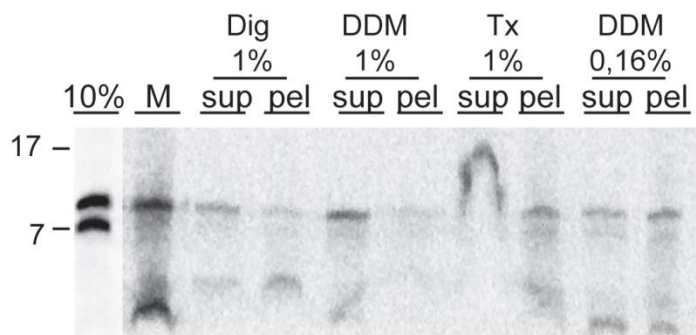
Ειδικά, για την περίπτωση της Tim11, αν αυτή επηρεάζεται από το  $H_2O_2$  θα είναι για να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες καθώς φέρει μια και μοναδική κυστεΐνη στην αμινοξική της αλληλουχία (C28) και άρα δεν μπορεί να δημιουργήσει ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς ώστε να αναδιπλωθεί. Το κατάλοιπο αυτό βρίσκεται αμέσως μετά το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης και σχεδόν εφάπτεται της εσωτερικής μεμβράνης.

Το  $H_2O_2$  όπως βλέπουμε και από την εικόνα 4 οξειδώνει σε πολλές μορφές την κυστεΐνη εκ των οποίων η πιο σταθερή είναι η σουλφενυλιωμένη (-SOH). Προκειμένου να δούμε αν αυτή η κυστεΐνη 28 έχει την δυνατότητα σουλφενυλίωσης, πραγματοποιήσαμε αρχικά ένα πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της Tim11 με *a*-dimedone μετά από πείραμα εισόδου της σε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια. Το dimedone είναι ένα χημικό μόριο το οποίο έχει την δυνατότητα να αναγνωρίζει σουλφενυλιωμένες κυστεΐνες (εικόνα 5).

##### 4.2.1 Έλεγχος διαλυτοποίησης της Tim11 με την χρήση απορρυπαντικών μετά από πείραμα εισόδου στα μιτοχόνδρια

Πριν το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρειάζεται να διερευνήσουμε πως η Tim11 θα μπορέσει να ανακτηθεί από την εσωτερική μεμβράνη καθώς, τα αντισώματα που θα χρησιμοποιηθούν για την ανοσοκατακρήμνιση θα πρέπει να επωαστούν με το υπερκείμενο που θα προκύψει μετά από την διαλυτοποίηση των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Για να λύσουμε αυτό το ερώτημα χρησιμοποιήσαμε τέσσερα διαφορετικά απορρυπαντικά, το DDM σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 0,16% και 1%, το digitonin και το Triton-X σε τελικές συγκεντρώσεις 1% (εικόνα 36). Το απορρυπαντικό εκείνο που μπορεί να διαλυτοποιήσει καλύτερα την πρωτεΐνη και να την οδηγήσει μετά από φυγοκέντρηση στο υπερκείμενο αυτό θα χρησιμοποιηθεί και στο κυρίως πείραμα. Πραγματοποιήσαμε λοιπόν, ένα πείραμα εισόδου της Tim11 σε φυσιολογικά

μιτοχόνδρια και στη συνέχεια επαναδιαλύσαμε τις μιτοχονδριακές πελέτες σε 10mM Tris pH 7.4, 50mM NaCl και 1mM PMSF (IP buffer). Έπειτα προσθέσαμε τα αντίστοιχα απορρυπαντικά, τα επώασαμε για μισή ώρα στο πάγο, τα φυγοκεντρήσαμε για άλλη μισή ώρα στις 14000rcf και διαχωρήσαμε το υπερκείμενο από την πελέτα. Η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 2x sample buffer παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και στο υπερκείμενο έγινε κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ για 20'. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για άλλα 20' και η πελέτα επανδιαλύθηκε σε 2x sb +bme.



autoradiography

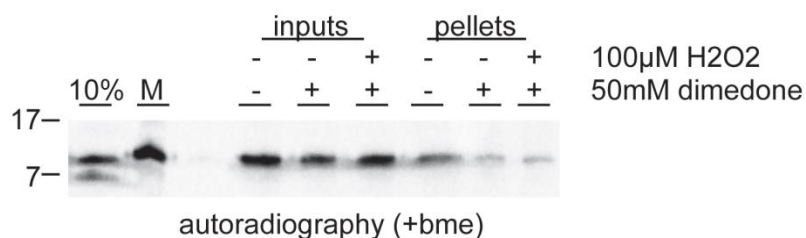
**Εικόνα 37: Η χρήση 1% DDM διαλυτοποιεί καλύτερα την Tim11.** Αυτοραδιογραφία μετά από πείραμα εισόδου της Tim11 πρωτεΐνης σε αγρίου-τύπου μιτοχόνδρια τα οποία υπέστησαν στην συνέχεια διαλυτοποίηση με την χρήση των απορρυπαντικών DDM 0,16%, DDM 1%, Digitonin 1% και Triton-X 1%. Μετά την μισάωρη επώαση με τα απορρυπαντικά, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από την πελέτα ώστε να κατακρημνιστεί το υλικό που βρίσκεται σε αυτό με την χρήση 10% τριχλωροξικού οξέος (TCA). Η επώαση με το TCA έγινε για 20' και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για άλλα 20'. Οι πελέτες που προέκυψαν όσο και οι πελέτες από την προηγούμενη φυγοκέντρηση επαναδιαλύθηκαν σε 2x sb+bme και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε Tricine gel 12%.

Από το αποτέλεσμα του πειράματος, βλέπουμε ότι καλύτερη διαλυτοποίηση γίνεται στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε DDM 1% καθώς βλέπουμε ότι όλη σχεδόν η πρωτεΐνη οδηγείται στο υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση.



#### 4.2.2 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της πρωτεΐνης Tim11 μετά από επεξεργασία με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και dimedone

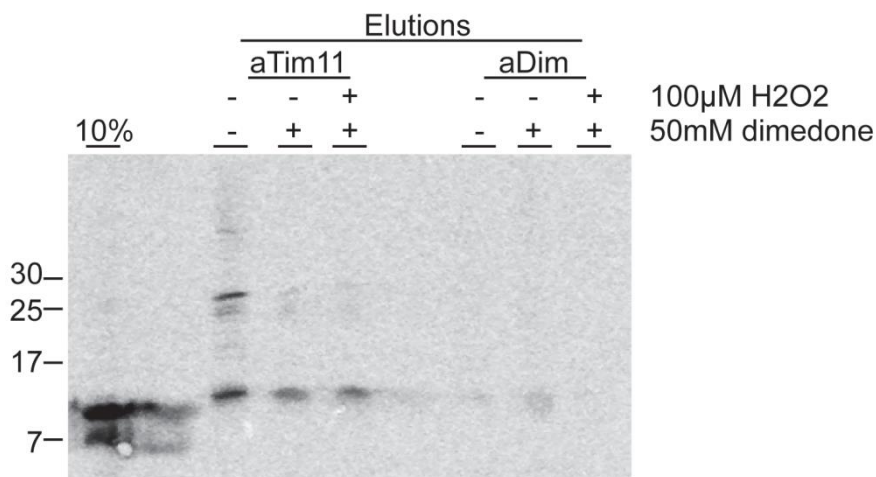
Γνωρίζοντας επομένως το κατάλληλο απορρυπαντικό που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε προχωρήσαμε με το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης. Η πρωτεΐνη εισήλθε στα μιτοχόνδρια μετά από επώαση 20', έπειτα οι μιτοχονδριακές πελέτες απομονώθηκαν, διαλυτοποιήθηκαν με την χρήση DDM 1% και επώαστηκαν στο πάγο για μισή ώρα. Κατά την διάρκεια της διαλυτοποιήσης προστέθηκαν ή όχι 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 50mM dimedone όπως δηλώνεται στις εικόνες των αποτελεσμάτων παρακάτω. Δείγματα ελέγχου της διαδικασίας κρατήθηκαν από όλες τις περιπτώσεις, φυγοκεντρήθηκαν και φορτώθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Τόσο το υπερκείμενο όσο και οι πελέτες από όλες τις περιπτώσεις φορτώθηκαν στο πήκτωμα ώστε να ξέρουμε πόσο καλά διαλυτοποιήθηκαν τα μιτοχόνδρια (εικόνα 38).



**Εικόνα 38: Αυτοραδιογραφία των δειγμάτων ελέγχου του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης.** Μιτοχόνδρια (50μg ανα περίπτωση), φυγοκεντρήθηκαν μετά από διαλυτοποίηση με 1% DDM παρουσία ή απουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και dimedone και διαχωρίστηκαν σε δείγματα υπερκείμενου και πελέτας. Οι πελέτες επαναδιαλύθηκαν σε 2x sb+bme ενώ τα υπερκείμενα κατακρημνίστηκαν με την χρήση 10% τριχλωροξικού οξέος (TCA) προτού φορτωθούν στο πήκτωμα. Στην εικόνα επίσης παρουσιάζονται τα δείγματα 10% και μιτοχονδρίων που δεν υπέστησαν διαλυτοποίηση με απορρυπαντικό (imp).

Τα υπόλοιπα δείγματα, φυγοκεντρήθηκαν για μισή ώρα και το υπερκείμενο από την κάθε περίπτωση, ισομοιράστηκε και αραιώθηκε σε 4ml IP buffer ώστε να αραιωθεί το απορρυπαντικό. Στα δύο δείγματα που δημιουργήθηκαν από την κάθε περίπτωση, προστέθηκαν στο ένα a-Tim11 και στο άλλο a-dimedone. Η επώαση με το αντίσωμα έγινε για δύο ώρες στους 4°C και στη συνέχεια προστέθηκαν protein-A σφαιρίδια τα οποία αφού εξισσοροπήθηκαν με IP buffer και BSA 1% επώαστηκαν για άλλες δύο ώρες με το διάλυμα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000rpm για 30'' και το υπερκείμενο κρατήθηκε. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια πλύθηκαν με 1ml IP buffer, φυγοκεντρήθηκαν και συλλέχθηκαν. Τέλος, η πρωτεΐνη απομακρύνθηκε από τα σφαιρίδια με την προσθήκη 6x sample buffer -β-μερκαπτοαιθανόλη

μετά από vortex, βράσιμο στους 95°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση για άλλα 5 λεπτά στις 16000rcf (εικόνα 39).

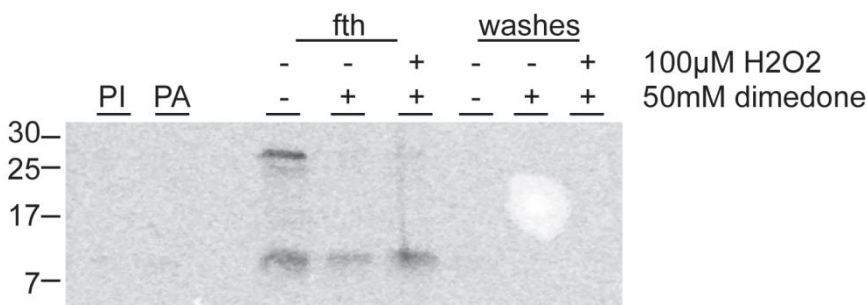


**Εικόνα 39:** Ανοσοκατακρήμνιση της Tim11 με a-Tim11 και a-dimedone μετά από πείραμα σουλφενυλίωσης της. Αυτοραδιογραφία των δειγμάτων του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης που εκλούστηκαν από τα protein A σφαιρίδια. Το ραδιενεργό υλικό που εισήχθη στα μιτοχόνδρια (150μg ανα περίπτωση), διαλυτοποιήθηκε με 1% DDM για μισή ώρα παρουσία ή απουσία 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 50mM dimedone και φυγοκεντρήθηκε για άλλη μισή ώρα στις 14000rcf. Το υπερκείμενα από την φυγοκέντρηση αραιώθηκαν σε 4ml IP buffer (10mM Tris pH 7.4, 50mM NaCl και 1mM PMSF) και στην συνέχεια προστέθηκαν τα αντισώματα. Από το κάθε αντίσωμα πήραμε 5μl και το αραιώσαμε με 10μl IP buffer, το ισομοιράσαμε στις τρεις περιπτώσεις και το επώασαμε για 2 ώρες με το διάλυμα της πρωτεΐνης. Έπειτα προσθέσαμε τα protein A σφαιρίδια, τα οποία είχαν εξισοροποιηθεί προηγουμένως με IP buffer και 1% BSA (no fatty acid free). Η επώαση με τα σφαιρίδια έγινε για άλλες δύο ώρες και μετά από φυγοκέντρηση και πλύσιμο με IP buffer τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν. Η εκλούση της πρωτεΐνης έγινε με επαναδιάλυση σε 6x sb-bme, vortex, βράσιμο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για άλλα 5 λεπτά.

Από την εικόνα αυτοραδιογραφίας των εκλουόμενων δειγμάτων, βλέπουμε όπως είναι αναμενόμενο η Tim11 να ανοσοκατακρημνίζεται σε όλες τις περιπτώσεις, όταν έχουμε το αντίσωμα για την ίδια. Παρόλα αυτά παρατηρούμε ότι μόνο στην περίπτωση που απουσιάζουν τα δυο χημικά, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και dimedone, αναλύεται μια επιπλέον μπάνα στα ~26kDa η οποία εξαφανίζεται με την προσθήκη 50mM dimedone και δεν εμφανίζεται ούτε όταν προστίθεται H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το χημικό DMSO, στο οποίο βρίσκεται επαναδιαλυμένο το dimedone, είναι γνωστό ότι επιδρά στις πρωτεΐνες και πιθανόν να επηρεάζει την σταθερότητα του συμπλόκου αυτού όταν βρίσκεται στο διάλυμα. Όσο για τα δείγματα που ανοσοκατακρημνίστηκαν με a-dimedone, παρατηρούμε την ύπαρξη μιας αχνής μπάνας στο δείγμα που έχει προστεθεί μόνο το dimedone. Σε αυτό το δείγμα φαίνεται η επίδραση που έχει το ενδογενές H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην πρωτεΐνη, και εδώ φαίνεται ότι η Tim11 έχει την δυνατότητα να σουλφενυλιωθεί προτού δημιουργήσει κάποιου είδους αλληλεπίδραση μέσω της κυστεΐνης της. Στο δείγμα που προστίθεται τόσο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> όσο και το dimedone,

δεν θα περιμέναμε να δούμε την πρωτεΐνη να ανοσοκατακρημνίζεται καθώς η συγκέντρωση του οξειδωτικού είναι επίτηδες πολύ μεγαλύτερη από το κανονικό ώστε να οδηγήσει ταχύτερα την κυστεΐνη στις άλλες οξειδωμένες καταστάσεις, τις οποίες δεν μπορεί να αναγνωρίσει το dimedone και κατά συνέπεια το αντίστοιχο αντίσωμα.

Δείγματα από το υλικό που δεν προσδέθηκε και από τα πλυσίματα των σφαιριδίων, χρησιμοποιήθηκαν για να ελέγξουμε αν τα αντισώματα έχουν προσδέσει την πρωτεΐνη και πόσο ειδικά το έχουν κάνει (εικόνα 40). Γνωρίζοντας ότι, το a-Tim11 θα προσδέσει ειδικά μάλλον την πρωτεΐνη, ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης μόνο τα δείγματα που συλλέχθηκαν από ότι δεν προσδέθηκε και από τα πλυσίματα των σφαιριδίων που επώαστηκαν με το a-dimedone. Το υλικό από τα δείγματα αυτά, κατακρημνίστηκε με χρήση TCA σε τελική συγκέντρωση 10% , επώαστηκε στο πάγο για 20 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε για άλλα 20 λεπτά στις 14000rcf.



**Εικόνα 40:** Αυτοραδιογραφία των δειγμάτων από μη-προσδεμένο υλικό αλλά και πλυσιμάτων των protein A σφαιριδίων που επώαστηκαν με το a-dimedone. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν μετά την φυγοκέντρηση των σφαιριδίων μετά την επώαση με το αντίσωμα (fth) και τα υπόλοιπα μετά από πλύσιμο με 1ml IP buffer (washes). Οι ποσότητες που είχαμε μετά τις φυγοκεντρήσεις αντιστοιχούσαν σε 150µg μιτοχονδρίων. Για το φόρτωμα στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες που αντιστοιχούσαν σε 50µg μιτοχονδρίων οι οποίες κατακρημνίστηκαν με τη χρήση 10% TCA μετά από επώαση για 20' και φυγοκέντρηση στις 1400rcf για άλλα 20'.

Η πρωτεΐνη που δεν δεσμεύεται στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται το a-dimedone, βλέπουμε να βρίσκεται στα μη-προσδεμένα δείγματα. Μάλιστα, μπορούμε να δούμε να σχηματίζεται και η ίδια, δεύτερη μπάνα όπως και στην περίπτωση του a-Tim11 που δεν είχε προστεθεί κανένα από τα δυο χημικά. Επίσης μπορούμε να διακρίνουμε την μείωση στην ένταση της μπάνας στο δείγμα που προστέθηκε μόνο το χημικό dimedone επιβεβαιώνοντας την εικόνα των εκλούμενων δειγμάτων όπου φαίνεται να υπάρχει μια αχνή μπάνα στο ύψος της Tim11. Για τα δείγματα των πλυσιμάτων, μπορούμε να δούμε ότι δεν υπάρχει κάποια απομάκρυνση υλικού σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

---

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να μελετήσουμε το μονοπάτι εισαγωγής και στόχευσης της πρωτεΐνης Tim11 καθώς και τις τυχόν αλληλεπιδράσεις που μπορεί να έχει με άλλες πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια του σακχαρομύκητα *S.cerevisiae*. Ο ρόλος της συγκεκριμένης υπομονάδας της ATP συνθάσης είναι αρκετά μελετημένος όπως παρουσιάζεται στο κεφάλαιο της εισαγωγής. Παρόλα αυτά δεν γνωρίζουμε σχεδόν τίποτα για το πώς αυτή καταλήγει να βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και να είναι λειτουργική. Οι μέχρι τώρα μελέτες απλώς εντοπίζουν την πρωτεΐνη αγκυροβολημένη στην εσωτερική μεμβράνη μέσω ενός αμινοτελικού διαμεμβρανικού τμήματος με το καρβοξυτελικό υδρόφιλο μέρος της να βρίσκεται εκτεθειμένο στον διαμεμβρανικό χώρο.

Στην πορεία προσέγγισης του ερωτήματος προέκυψαν αποτελέσματα τα οποία ξεκαθαρίζουν ότι η Tim11 έχει την δυνατότητα εισόδου στα μιτοχόνδρια ανεξαρτήτως της παρουσίας μεμβρανικού δυναμικού ( $\Delta\Psi$ ). Η παρατήρηση αυτή έρχεται να προσθέσει μια εξαίρεση στον κανόνα που θέλει τις πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης να εξαρτώνται από το μεμβρανικό δυναμικό για να εισέλθουν στα μιτοχόνδρια. Η αρχική αυτή παρατήρηση μας οδήγησε να αναρωτηθούμε αν η πρωτεΐνη χρησιμοποιεί κάποιο από τα δυο γνωστά μονοπάτια για την εισαγωγή πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη, τα TIM22 και TIM23 (stop-transfer). Γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι η λειτουργία των συγκεκριμένων μονοπατιών απαιτεί την παρουσία δυναμικού στην εσωτερική μεμβράνη. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η Tim11 είναι ανεξάρτητη των δύο μονοπατιών, κάτι που εν μέρει εξηγεί την είσοδο της στα μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού. Το αποτέλεσμα αυτό μας έδειξε επίσης ότι υπάρχει ενισχυμένη αγκυροβολήση της στην εσωτερική μεμβράνη όταν η τελευταία έχει επεξεργαστεί με τρυψίνη, προϋδειάζοντας ότι ίσως η Tim11 να αγκυροβολείται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασής της με τις κεφαλές των λιπιδίων της εσωτερικής μεμβράνης. Επιπλέον πειράματα εισόδου της πρωτεΐνης σε *Δtim22* και *Δtim23* μιτοχόνδρια θα μπορούσαν να μας επιβεβαιώσουν το παραπάνω αποτέλεσμα. Επίσης, θα μπορούσαμε να πραγματοποιήσουμε πειράματα παρουσία λιπιδίων προκειμένου να ελέγξουμε την απευθείας πρόσδεση της πρωτεΐνης σε αυτά ή ακόμα και σε μιτοχόνδρια στα οποία απουσιάζει η καρδιολιπίνη, το λιπίδιο με το οποίο είναι εμπλουτισμένη η εσωτερική μεμβράνη, και να δούμε κατά πόσο έχει κάποιο ρόλο στην πρόσδεση της πρωτεΐνης.

Πειράματα εισόδου ραδιενεργών μεταλλαγμάτων στο αμινοτελικό άκρο της Tim11 δείχνουν ότι τα πρώτα 23 αμινοξέα της πρωτεΐνης είναι απαραίτητα για την είσοδο της στα φυσιολογικά μιτοχόνδρια. Πιο συγκεκριμένα, η θετικά φορτισμένη αργινίνη στην θέση 8 αποδεικνύεται ότι είναι αυτή που πιθανώς αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο TOM προκειμένου να εισαχθεί η πρωτεΐνη στα οργανίδια. Ιδιαίτερη εντύπωση μας έκανε το γεγονός ότι, σε μιτοχόνδρια που έχει διαταραχθεί το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης, τα 23 αυτά αμινοξέα δεν φαίνεται να χρειάζονται προκειμένου να βρεθεί η πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια. Η παρατήρηση αυτή θέτει ερωτηματικά για την αλληλουχία στόχευσης της πρωτεΐνης και

μας οδήγησε να αναρωτηθούμε αν η Tim11 εισέρχεται στα μιτοχόνδρια ανεξάρτητα από το σύμπλοκο TOM. Το ερώτημα αυτό απαντήθηκε πραγματοποιώντας πειράματα τρυψινολύσης των μιτοχονδρίων, όπου επιβεβαιώθηκαν ότι η είσοδος της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια συμβαίνει όντως μέσω του συμπλόκου TOM και στις δυο συνθήκες των μιτοχονδρίων, παρουσία και απουσία δυναμικού.

Η ικανότητα όμως της Tim11 να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια όταν απουσιάζει η αλληλουχία στόχευσης της μας οδήγησε να αναρωτηθούμε για το ρόλο και τη λειτουργία της σε συνθήκες απουσίας του μεμβρανικού δυναμικού. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία και σταθεροποίηση των διμερών της ATP συνθάσης και τυχόν αποσταθεροποίησή τους προκαλεί μείωση του μεμβρανικού δυναμικού (Bornhövd et al., 2006). Υποθέσαμε λοιπόν, ότι ο λόγος που η Tim11 μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια απουσία δυναμικού ακόμα και χωρίς το αμινοτελικό της άκρο, είναι γιατί η διατάραξη του δυναμικού πιθανώς σηματοδοτεί στα μιτοχόνδρια ότι έχουν αποσταθεροποιηθεί τα διμερή της ATPάσης και άρα να εισάγει περισσότερα μόρια Tim11 προκειμένου να τα σταθεροποιήσει.

Είναι πιθανό η διατάραξη δυναμικού να δημιουργεί πράγματι αποσταθεροποίηση των διμερών και να μην είναι απλώς μια σηματοδότηση χωρίς λόγο. Μιας και είναι γνωστό ότι όταν το μεμβρανικό δυναμικό διαταράσσεται η εσωτερική μεμβράνη γίνεται πολύ πιο ασταθής, αναρωτηθήκαμε αν η Tim11 έχει κάποιο ρόλο στην επαναφορά του μεμβρανικού δυναμικού με το να προσδέεται και να σταθεροποιεί τα διμερή της ATPάσης. Πείραμα διπλής εισόδου της καθαρής Tim11 και της εξαρτώμενης από το δυναμικό ραδιενεργής Su9-DHFR σε μιτοχόνδρια δεν επιβεβαίωσε κάτι τέτοιο.

Προσπαθώντας να προσεγγίσουμε περισσότερο το ερώτημα, πραγματοποιήσαμε πειράματα μελέτης αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες και παρατηρήσαμε ότι η Tim11 έχει τη δυνατότητα σχηματισμού περισσότερων συμπλόκων με άλλες πρωτεΐνες στην περίπτωση απουσίας δυναμικού. Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα χημικής διασύνδεσης (crosslinking) και μετέπειτα σε αναλύσεις με φασματομετρία μάζας προκειμένου να διευκρινίσουμε τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η Tim11.

Επίσης, γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι η αναπνευστική αλυσίδα παίζει καταλυτικό ρόλο στην παραγωγή και καταπολέμηση των ελεύθερων μορφών οξυγόνου (ROS), καθώς και ότι υπάρχουν συγκεκριμένες κυστεϊνικές θειόλες, στα σύμπλοκα που συμμετέχουν σε αυτήν, που έχουν αναγνωρισθεί ως στόχοι των ROS κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες (Drose et al, 2014). Θελήσαμε λοιπόν να ελέγξουμε κατά πόσο η μοναδική κυστεΐνη της πρωτεΐνης στο κατάλοιπο 28 έχει την δυνατότητα σουλφενυλίωσης (-SOH) και άρα κάποιο ρόλο στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση της ATPάσης και του

μιτοχονδρίου γενικότερα. Το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με  $\alpha$ -dimedone που πραγματοποιήθηκε έδωσε ένα θετικό αποτέλεσμα, παρόλα αυτά χρειάζονται επιπρόσθετα πειράματα προς αυτή την κατεύθυνση. Μια πιθανή προσέγγιση θα ήταν να πραγματοποιήσουμε ένα *in vitro* πείραμα σουλφενυλίωσης με την χρήση του αλκυλιωτικού παράγοντα AMS. Αυτό το χημικό μόριο μπορεί να προσδέεται σε ελεύθερες κυστεΐνες και να προσδίδει στην πρωτεΐνη επιπλέον 0,5kDa. Λόγω όμως της μοναδικής κυστεΐνης δεν είναι βέβαιο ότι θα δούμε κάποια εμφανή διαφορά στο πηκτωμα ηλεκτροφόρησης. Θα μπορούσαμε επίσης να πραγματοποιήσουμε ένα πείραμα *in vitro* σουλφενυλίωσης χρησιμοποιώντας dimedone και διαφορετικές ποσότητες  $H_2O_2$ . Με την χρήση αντισώματος για το dimedone και protein A σφαιριδίων θα μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε το εύρος συγκεντρώσεων του  $H_2O_2$  που χρειάζονται για την σουλφενυλίωση του Tim11.

Συμπεραίνοντας, τόσο η είσοδος της Tim11 όσο και ο ρόλος της εντός του μιτοχονδρίου δεν έχουν ακόμα ξεκαθαριστεί. Παρόλα αυτά, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ικανότητα εισόδου και αγκυροβόλησης της στα μιτοχόνδρια ανεξάρτητα από την παρουσία δυναμικού αλλά και από τα γνωστά μονοπάτια εμπέδωσης πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη. Επίσης, ενώ ο ρόλος και η λειτουργία της έχει μελετηθεί εκτενώς από αρκετές ερευνητικές ομάδες, η ικανότητα της να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια απουσία τόσο του δυναμικού αλλά και του αμινοτελικού της άκρου που την αγκυροβολεί στην εσωτερική μεμβράνη πιθανώς να της αποδίδει κάποιο επιπλέον ρόλο. Η παρουσία της ως υπομονάδας της ATPάσης και της αναπνευστικής αλυσίδας γενικότερα την κατατάσσει ως πιθανό στόχο των ROS που παράγουν τα σύμπλοκα της αλυσίδας.

# ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

---

ATP.....adenosine triphosphate  
ROS.....reactive oxygen species  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....hydrogen peroxide  
Su e/ Tim11.....subunit e/ translocase of the inner membrane (11kDa)  
MICOS....mitochondrial contact site complex  
MINOS....mitochondrial inner membrane organizing system  
MitOS.....mitochondrial organizing structure  
Mia40.....mitochondrial import and assembly  
Erv1.....essential for respiration and viability  
DTT.....dithiotreitol  
IM.....inner membrane  
IMS.....intermembrane space  
OM.....outer membrane  
MISS.....mitochondrial IMS sorting signal  
PK.....proteinase K  
SBTI.....soybean trypsin inhibitor  
PMSF.....PhenylMethaneSulphonylFluoride  
SAM.....sorting and assembly machinery  
TCA.....trichloroacetic acid  
Su9.....subunit 9 of the ATPase  
TOM.....translocase of the outer membrane  
TIM.....translocase of the inner membrane  
OXPHOS.....oxidative phosphorylation  
PAM.....presequence translocase associated motor  
MPP.....mitochondrial processing peptidase



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Abkevich, V.I., and Shakhnovich, E.I. (2000). What can disulfide bonds tell us about protein energetics, function and folding: simulations and bioinformatics analysis. *J. Mol. Biol.* *300*, 975–985.
- Ackerman, S.H., and Tzagoloff, A. (2005). Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *80*, 95–133.
- Ackerman, S.H., and Tzagoloff, A. (2007). Methods to determine the status of mitochondrial ATP synthase assembly. *Methods Mol. Biol.* *372*, 363–377.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., and Nussberger, S. (2001). Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* *153*, 1151–1160.
- Allen, R.D., Schroeder, C.C., and Fok, A.K. (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J. Cell Biol.* *108*, 2233–2240.
- Amutha, B., Gordon, D.M., Gu, Y., and Pain, D. (2004). A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance. *Biochem. J.* *381*, 19–23.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* *290*, 457–465.
- Aon, M.A., Stanley, B.A., Sivakumaran, V., Kembro, J.M., O'Rourke, B., Paolocci, N., and Cortassa, S. (2012). Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission: an experimental-computational study. *J. Gen. Physiol.* *139*, 479–491.
- Arnold, I., Bauer, M.F., Brunner, M., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1997). Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase: the novel subunit e is identical to Tim11. *FEBS Lett.* *411*, 195–200.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., and Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* *17*, 7170–7178.
- Arselin, G., Giraud, M.-F., Dautant, A., Vaillier, J., Brèthes, D., Couлары-Salin, B., Schaeffer, J., and Velours, J. (2003). The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane. *Eur. J. Biochem.* *270*, 1875–1884.
- Arselin, G., Vaillier, J., Salin, B., Schaeffer, J., Giraud, M.-F., Dautant, A., Brèthes, D., and Velours, J. (2004). The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J. Biol. Chem.* *279*, 40392–40399.
- Banci, L., Bertini, I., Cefaro, C., Ciofi-Baffoni, S., Gallo, A., Martinelli, M., Sideris, D.P., Ktrakili, N., and Tokatlidis, K. (2009). MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 198–206.

- Baradaran, R., Berrisford, J.M., Minhas, G.S., and Sazanov, L.A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* *494*, 443–448.
- Becker, T., Vögtle, F.-N., Stojanovski, D., and Meisinger, C. Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1777*, 557–563.
- Becker, T., Böttlinger, L., and Pfanner, N. (2012). Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem. Sci.* *37*, 85–91.
- Bellance, N., Benard, G., Furt, F., Begueret, H., Smolková, K., Passerieux, E., Delage, J.P., Baste, J.M., Moreau, P., and Rossignol, R. (2009). Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 2566–2577.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* *9*, 42–49.
- Bornhövd, C., Vogel, F., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2006). Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. *J. Biol. Chem.* *281*, 13990–13998.
- Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 717–749.
- Brand, M.D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* *45*, 466–472.
- Brand, M.D., Buckingham, J.A., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Murphy, M.P., Pakay, J.L., Talbot, D.A., and Echtay, K.S. (2004). Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem. Soc. Symp.* 203–213.
- Brix, J., Rüdiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., and 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.
- Brunner, S., Everard-Gigot, V., and Stuart, R.A. (2002). Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase forms homodimers. *J. Biol. Chem.* *277*, 48484–48489.
- Bustos, D.M., and Velours, J. (2005). The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* *280*, 29004–29010.
- Chaban, Y., Boekema, E.J., and Dudkina, N. V (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta* *1837*, 418–426.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* *23*, 3735–3746.

- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* *138*, 628–644.
- Davies, K.M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J.D., and Kühlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 13602–13607.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* *111*, 471–481.
- Deponte, M., and Hell, K. (2009). Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria. *J. Biochem.* *146*, 599–608.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M., and Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* *388*, 195–200.
- Dröse, S., Brandt, U., and Wittig, I. (2014). Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1844*, 1344–1354.
- Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H.-P., and Boekema, E.J. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 664–670.
- Dudkina, N. V., Sunderhaus, S., Braun, H.-P., and Boekema, E.J. (2006). Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.* *580*, 3427–3432.
- Efremov, R.G., Baradaran, R., and Sazanov, L.A. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature* *465*, 441–445.
- Endo, T., Yamano, K., and Kawano, S. (2011). Structural insight into the mitochondrial protein import system. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 955–970.
- Ernster, L., and Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* *91*, 227s–255s.
- Everard-Gigot, V., Dunn, C.D., Dolan, B.M., Brunner, S., Jensen, R.E., and Stuart, R.A. (2005). Functional analysis of subunit e of the F1Fo-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryot. Cell* *4*, 346–355.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 97–112.
- Fronzes, R., Chaignepain, S., Bathany, K., Giraud, M.-F., Arselin, G., Schmitter, J.-M., Dautant, A., Velours, J., and Brèthes, D. (2003). Topological and functional study of subunit h of the F1Fo ATP synthase complex in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* *42*, 12038–12049.
- Fronzes, R., Weimann, T., Vaillier, J., Velours, J., and Brèthes, D. (2006). The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry* *45*, 6715–6723.

- Gabriel, K., Milenkovic, D., Chacinska, A., Müller, J., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007). Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J. Mol. Biol.* *365*, 612–620.
- Gavin, P.D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2005). F1F0-ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e. *J. Bioenerg. Biomembr.* *37*, 55–66.
- Giraud, M.-F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brèthes, D., di Rago, J.-P., and Velours, J. (2002). Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim. Biophys. Acta* *1555*, 174–180.
- Glick, B.S., Beasley, E.M., and Schatz, G. (1992). Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* *17*, 453–459.
- Goyon, V., Fronzes, R., Salin, B., di-Rago, J.-P., Velours, J., and Brèthes, D. (2008). Yeast cells depleted in Atp14p fail to assemble Atp6p within the ATP synthase and exhibit altered mitochondrial cristae morphology. *J. Biol. Chem.* *283*, 9749–9758.
- Grumbt, B., Stroobant, V., Terziyska, N., Israel, L., and Hell, K. (2007). Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* *282*, 37461–37470.
- Guo, J., and Lemire, B.D. (2003). The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J. Biol. Chem.* *278*, 47629–47635.
- Hansen, J.M., Zhang, H., and Jones, D.P. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 138–145.
- Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., and Neupert, W. (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* *30*, 4356–4370.
- Hell, K. (2008). The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 601–609.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2250–2255.
- Herrmann, J.M. (2011). MINOS is plus: a Mitofilin complex for mitochondrial membrane contacts. *Dev. Cell* *21*, 599–600.
- Herrmann, J.M., and Köhl, R. (2007). Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria. *J. Cell Biol.* *176*, 559–563.
- Herrmann, J.M., and Riemer, J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 1341–1358.

- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., and Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395, 516–521.
- Hofhaus, G., Lee, J.-E., Tews, I., Rosenberg, B., and Lisowsky, T. (2003). The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre. *Eur. J. Biochem.* 270, 1528–1535.
- Hoppins, S., Collins, S.R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., Devay, R.M., Lackner, L.L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J.S., and Nunnari, J. (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* 195, 323–340.
- Houtkooper, R.H., and Vaz, F.M. (2008). Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2493–2506.
- Kallergi, E., Kalef-Ezra, E., Karagouni-Dalakoura, K., and Tokatlidis, K. (2014). Common players in mitochondria biogenesis and neuronal protection against stress-induced apoptosis. *Neurochem. Res.* 39, 546–555.
- Kehrer, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 21–48.
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333–343.
- Krayl, M., Lim, J.H., Martin, F., Guiard, B., and Voos, W. (2007). A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol. Cell. Biol.* 27, 411–425.
- Krems, B., Charizanis, C., and Entian, K.D. (1995). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr. Genet.* 27, 427–434.
- Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Krüger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., et al. (2008). Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* 132, 1011–1024.
- Van der Laan, M., Hutu, D.P., and Rehling, P. (2010). On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 732–739.
- Van der Laan, M., Bohnert, M., Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2012). Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends Cell Biol.* 22, 185–192.
- Lee, J., Hofhaus, G., and Lisowsky, T. (2000). Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* 477, 62–66.
- Lill, R., and Mühlhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 669–700.

- Von der Malsburg, K., Müller, J.M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D., et al. (2011). Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev. Cell* 21, 694–707.
- Mannella, C.A. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 542–548.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Müller, H., Meyer, H.E., Wagner, R., and Pfanner, N. (2001). Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2337–2348.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059–1069.
- Mitra, K. (2013). Mitochondrial fission-fusion as an emerging key regulator of cell proliferation and differentiation. *Bioessays* 35, 955–964.
- Moberg, P., Nilsson, S., Ståhl, A., Eriksson, A.-C., Glaser, E., and Måler, L. (2004). NMR solution structure of the mitochondrial F1beta presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Mol. Biol.* 336, 1129–1140.
- Mossmann, D., Meisinger, C., and Vögtle, F.-N. Processing of mitochondrial presequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 1098–1106.
- Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064–49073.
- Müller, J.M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2008). Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Biol. Cell* 19, 226–236.
- Naoé, M., Ohwa, Y., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S.-I., Yamamoto, H., and Endo, T. (2004). Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 279, 47815–47821.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723–749.
- Paulsen, C.E., and Carroll, K.S. (2009). Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. *Chem. Biol.* 16, 217–225.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brèthes, D., di Rago, J.-P., and Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21, 221–230.
- Petrova, V.Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V, and Schmitt, M.J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* 380, 393–400.

- Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Körner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., et al. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *J. Cell Biol.* *185*, 1047–1063.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N., and Pfanner, N. (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* *299*, 1747–1751.
- Reijnders, L. (1975). The origin of mitochondria. *J. Mol. Evol.* *5*, 167–176.
- Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T., and Kohda, D. (2007). Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* *26*, 4777–4787.
- Schatz, G. (2013). Getting mitochondria to center stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 407–410.
- Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., Granvogel, B., Go, N.E., Nargang, F.E., Neupert, W., and Nussberger, S. (2005). Role of Tom5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. *J. Biol. Chem.* *280*, 14499–14506.
- Senior, A.E., Nadanaciva, S., and Weber, J. (2002). The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* *1553*, 188–211.
- Seo, Y.H., and Carroll, K.S. (2011). Quantification of protein sulfenic acid modifications using isotope-coded dimedone and iododimedone. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *50*, 1342–1345.
- Shariff, K., Ghosal, S., and Matouschek, A. (2004). The force exerted by the membrane potential during protein import into the mitochondrial matrix. *Biophys. J.* *86*, 3647–3652.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., et al. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13207–13212.
- Sideris, D.P., and Tokatlidis, K. (2010). Oxidative protein folding in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 1189–1204.
- Sideris, D.P., Petrakis, N., Katrakili, N., Mikropoulou, D., Gallo, A., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., Bertini, I., and Tokatlidis, K. (2009). A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J. Cell Biol.* *187*, 1007–1022.
- Soubannier, V., Vaillier, J., Paumard, P., Couлары, B., Schaeffer, J., and Velours, J. (2002). In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. *J. Biol. Chem.* *277*, 10739–10745.
- Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P. V., Grandier-Vazeille, X., and Velours, J. (1998). Evidence of a subunit 4 (subunit b) dimer in favor of the proximity of ATP synthase complexes in yeast inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* *1414*, 260–264.

- Stojanovski, D., Milenkovic, D., Müller, J.M., Gabriel, K., Schulze-Specking, A., Baker, M.J., Ryan, M.T., Guiard, B., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2008). Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase. *J. Cell Biol.* *183*, 195–202.
- Stojanovski, D., Bohnert, M., Pfanner, N., and van der Laan, M. (2012). Mechanisms of protein sorting in mitochondria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.
- Stuart, R. (2002). Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxal complex. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*, 79–87.
- Stuart, R.A. (2008). Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* *40*, 411–417.
- Tokatlidis, K., Junne, T., Moes, S., Schatz, G., Glick, B.S., and Kronidou, N. (1996). Translocation arrest of an intramitochondrial sorting signal next to Tim11 at the inner-membrane import site. *Nature* *384*, 585–588.
- Toledano, M.B., Delaunay-Moisan, A., Outten, C.E., and Igarria, A. (2013). Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 1699–1711.
- Tzagoloff, A., Macino, G., and Sebald, W. (1979). Mitochondrial genes and translation products. *Annu. Rev. Biochem.* *48*, 419–441.
- Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P. V., Camougrand, N., and Velours, J. (1999). Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene ATP18. *J. Biol. Chem.* *274*, 543–548.
- Velours, J., and Arselin, G. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* *32*, 383–390.
- Velours, J., Dautant, A., Salin, B., Sagot, I., and Brèthes, D. (2009). Mitochondrial F1F0-ATP synthase and organellar internal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1783–1789.
- Velours, J., Stines-Chaumeil, C., Habersetzer, J., Chaignepain, S., Dautant, A., and Brèthes, D. (2011). Evidence of the proximity of ATP synthase subunits 6 (a) in the inner mitochondrial membrane and in the supramolecular forms of *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* *286*, 35477–35484.
- Venditti, P., Napolitano, G., and Di Meo, S. (2014). Role of enzymatic and non-enzymatic processes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal by rat liver and heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* *46*, 83–91.
- Vergnolle, M.A.S., Baud, C., Golovanov, A.P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L.-Y., and Tokatlidis, K. (2005). Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition. *J. Mol. Biol.* *351*, 839–849.
- Vial, S., Lu, H., Allen, S., Savory, P., Thornton, D., Sheehan, J., and Tokatlidis, K. (2002). Assembly of Tim9 and Tim10 into a functional chaperone. *J. Biol. Chem.* *277*, 36100–36108.



- Wagner, K., Rehling, P., Sanjuán Szklarz, L.K., Taylor, R.D., Pfanner, N., and van der Laan, M. (2009). Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase: the small subunits e and g associate with monomeric complexes to trigger dimerization. *J. Mol. Biol.* *392*, 855–861.
- Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C.D., and van der Laan, M. (2010). Stepwise assembly of dimeric F(1)F(o)-ATP synthase in mitochondria involves the small F(o)-subunits k and i. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1494–1504.
- Walker, J.E., Collinson, I.R., Van Raaij, M.J., and Runswick, M.J. (1995). Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *Methods Enzymol.* *260*, 163–190.
- Watson, W.H., Chen, Y., and Jones, D.P. (2003). Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *Biofactors* *17*, 307–314.
- Webb, C.T., Gorman, M.A., Lazarou, M., Ryan, M.T., and Gulbis, J.M. (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol. Cell* *21*, 123–133.
- Wiedemann, N., Pfanner, N., and Ryan, M.T. (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.* *20*, 951–960.
- Van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., et al. (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* *401*, 485–489.
- Wittig, I., and Schägger, H. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* *1777*, 592–598.
- Yao, H., Stuart, R.A., Cai, S., and Sem, D.S. (2008). Structural characterization of the transmembrane domain from subunit e of yeast F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase: a helical GXXXG motif located just under the micelle surface. *Biochemistry* *47*, 1910–1917.
- Zick, M., Rabl, R., and Reichert, A.S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 5–19.