

THESE

présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Co-tutelle avec l'Université M. Lomonossov Moscou

Discipline: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

IRINA L. BRANDINA

Identification et rôles de nouveaux facteurs protéiques
cytosoliques impliqués dans l'import d'ARNt dans les
mitochondries de levure

Soutenue publiquement le 10 Mai 2006

Membres du jury :

M. Robert MARTIN	DR CNRS, UMR 7156, Strasbourg	Directeur de thèse
M. Igor KRASHENINNIKOV	Professeur Univ. Moscou, Russie	Co-Directeur de thèse
Mme Laurence Maréchal-Drouard	DR CNRS, IBMP, Strasbourg	Rapporteur Interne
M. Jean-Paul Di Rago	DR CNRS, IBGC, Bordeaux	Rapporteur Externe
M. Vyacheslav A. Kolb	Professeur Univ. Moscou, Russie	Rapporteur Externe
M. Serge Potier	Professeur ULP, UMR 7156, Strasbourg	Examineur

UMR 7156 CNRS-ULP
"Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie"
Département de Génétique Moléculaire et Cellulaire

Je remercie tous les membres du jury, Laurence Maréchal-Drouard, Jean-Paul Di Rago, Vyacheslav Kolb et Serge Potier, de critiquer et de juger le travail réalisé au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier Jean-Paul Di Rago et Vyacheslav Adamovitch Kolb d'avoir aimablement accepté de se déplacer à Strasbourg en tant que rapporteurs externes de ma thèse.

Je remercie les directeurs de ma thèse, Robert Martin et Igor Krasheninnikov de m'avoir accueillie dans leurs équipes.

I would like to thank particularly Robert Martin for days he has spent searching for logic in my written texts and his enormous help with the French translation of the thesis and critical analysis of results.

To people who are my Teachers in Molecular Biology – Ivan Tarassov and Nina Entelis - I am particularly grateful. Thank you for your disponibility, discussions, advices and training in everyday scientific (and not only) life in the laboratory in Strasbourg.

To all teachers of Molecular Biology department in Moscow State University who has taught me to study life by molecular biology tools my special thanks.

I would like to thank Olga Kolesnikova - my first courator in Molecular Biology and she is alsways the great example for me in many senses of this word. Her help with establishing genetic system for searching for import factors and many others expiriences is very valuable for me.

I am very gratefull to Sacha Smirnov, Piotr Kemansky, Olga K. Jr for different types of help and services they provided to me during thesis work.

I would like to thank again Ivan Tarassov, for his valuable help in obtaining sources for his research team. He made possible my visits to the Strasbourg laboratory.

I would like to thank Lee Sweetlove who accepted my for two short-time visits to his Oxford laboratory to perform enzymatic assays of glycolytic enzymes.

To reasearchers from IBM P Philippe Giege, Jerome Mutterer for their help in establishing different types of experimental approaches my special acknowledgements.

Thanks to Cristelle Lemaitre-Guillier for performed mass spectrometric analysis of proteins.

All members of our laboratory – Anne-Marie, Gladys, Galina, Alex, Chantal, Vanessa and Vanessa, Clelia, Abdeldjalil thank for discussions during our rare seminars and even more rare parties.

To Cathy who help us every day to improve our life in the laboratory and all around a special thanks.

I thank Sylvie Friant for helpful discussions of my experiments, provided fresh ideas, yeast strains and plasmids, for her enthusiasm and energy which helps me to go further.

Not sure if it's a right place to say it here, but I am very gratefull to Eric who helped me not only in thesis corrections, but who also inspires me everyday. Science for me is also a way of flying - over life secrets.

TABLE DE MATIERS

Abréviations:	7
INTRODUCTION	8
Situation du sujet et objectifs	
1. Généralités sur l'import d'ARNt dans les mitochondries	9
Publication 1	12
2. Données récentes sur l'import mitochondrial d'ARNt	13
2.1. Importation d'ARNt chez les plantes	13
2.2. Importation d'ARNt chez les trypanosomes	14
2.2.1. Nouvelles données sur le mécanisme d'importation.....	14
2.2.2. ARNt ^{Met} initiateur et élongateur dans les mitochondries de trypanosomes	14
2.3. Importation de l'ARNt(Lys) chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	15
MATERIELS ET METHODES	21
Matériels	22
1. Souches et milieux utilisés	22
1.1. Bactéries	22
1.2. Levure.....	22
1.3. Cellules humaines	24
2. Plasmides utilisées.....	25
3. Produits chimiques et biologiques.....	27
Méthodes.....	29
1. Manipulation de l'ADN.	29
1.1. Purification d'ADN.....	29
1.1.1. Préparation d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i>	29
1.1.2. Préparation d'ADN plasmidique ou génomique de levure	29
1.2. Amplification de l'ADN par PCR.....	29
1.3. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction.....	30
1.4. Déphosphorylation de l'extrémité 5' de fragments d'ADN.....	30
1.5. Ligation.....	30
1.6. Séquençage de l'ADN.....	30
2. Transformation des bactéries et de levures.....	31
2.1. Transformation d' <i>E.coli</i> par électroporation.....	31
2.2. Transformation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3. Techniques génétiques de la levure.....	32
3.1. Criblage d'une banque génomique de <i>S. cerevisiae</i> par la méthode du double- hybride.....	32
3.2. Criblage d'une banque d'ADNc par la méthode du triple hybride.....	33
3.3. Marquage des mitochondries de levure par le colorant Mito tracker.....	33
3.4. L'analyse d'effet d'inhibition de l'activité catalytique du protéasome 26S	33
4. Manipulation de l'ARN.....	34
4.1. Purification d'ARNt total de levure.	34
4.1.1. Purification au phénol chaud.....	34
4.1.2. Broyage des cellules avec des billes de verre.....	34
4.2. Transcription reverse et amplification d'ARNt	34

5. Localisation de protéines dans les mitochondries.....	35
5.1. Fractionation de protéines dans les compartiments mitochondrial	35
5.2. Localisation de l'énolase dans le compartiment mitochondrial.....	36
5.2.1. Synthèse de protéines in vitro	36
5.2.2. Importation des protéines dans le mitochondries isolées.....	36
5.2.3. Détection qualitative de l'énolase dans la fraction mitochondriale	36
5.2.4. Détection quantitative de l'énolase dans la mitochondrie.....	36
6. Test de l'activité des enzymes glycolytiques dans la fraction mitochondriale.....	37
7. Isolement de complexes protéiques mitochondriaux par électrophorèse dans des conditions natives	40
8. Immunoprécipitation d'un complexe mitochondrial contenant l'énolase.....	40
9. Identification de protéine par spectrométrie de masse	41
10. Essai d'activité protéolytique de protéasome.	41
10.1. Obtention d'un extrait postmitochondrial de protéines cytosoliques.....	41
10.2. Détermination de l'activité protéasique	42
11. Les divers.....	42
Publication 2	43

RESULTATS

CHAPITRE I. Etude des déterminants d'importation dans la structure de l'ARNt ^{Lys}	45
Publication 3	50
CHAPITRE II. L'énolase, une enzyme glycolytique, est un facteur d'importation mitochondriale d'ARNt chez la levure.....	51
II.1. Identification de l'énolase comme facteur essentiel pour l'importation d'ARNt ^{Lys} dans les mitochondries de levure.....	51
Publication 4	58
II.2. Mise en évidence d'un complexe multiprotéique contenant l'énolase, localisé à la surface de la mitochondrie.....	58
Publication 5	63
CHAPITRE III. Criblage de banques génomiques et d'ADNc de <i>S. cerevisiae</i> pour identifier des facteurs protéiques participant à l'import de tRK1	64
III.1. Criblages double hybride pour identifier des protéines interagissant avec la préMsk1p64	
III.2. Criblage triple hybride pour identifier des protéines interagissant avec tRK1	66
III.3. Analyse des résultats des cribles double- et triple hybrides.....	69
CHAPITRE IV. Etude du rôle du système ubiquitin-protéasome dans l'import mitochondrial de tRK1	71
IV.1. Introduction	
IV.1.2 Généralités sur le système ubiquitine-protéasome des cellules eucaryotes	71
IV.1.2. Rôles du système ubiquitine-protéasome dans les fonctions mitochondriales.	73
IV.2. Résultats et discussion.....	76
Publication 6	78

CONCLUSION GENERALE	97
Annexe 1. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.....	102
Annexe 2. Liste des publications et communications de l’auteur de la thèse.....	104
BIBLIOGRAPHIE.....	107

Abréviations:

aaRS – aminoacyl-ARNt synthétase

ACA –acide ϵ -amino-n-caproïque

ADNmt – ADN mitochondrial

Bis-Tris – N,N-bis (hydroxyethyl)-N-N-N-tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

BN-PAGE - bleu-native polyacrylamide gel électrophoresis

DH - déshydrogénase

ENO - énalase

GAPDH - glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GPM – phospho-glycéromutase

HXK - hexokinase

IDP - Import Directing Proteins ; protéines totales solubles

KRS - la lysyl-ARNt synthétase cytosolique

MIM – mitochondrial inner membrane

MOM – mitochondrial outer membrane

PCR- polymérase chain reaction

PFK - phosphofructokinase

PGI - glucoso-6-phosphate isomérase

PGK – 3 - phosphoglycérate kinase

préMsk1 – précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondrial

PYK - pyruvate kinase

RT-PCR – Reverse-Transcription PCR

TDH- glyceraldéhyde-3- phosphate déshydrogénase

tRK1 – ARNt^{Lys}_{CUU}, importé dans les mitochondries de levure

tRK2 - ARNt^{Lys}_{mnm⁵S²UUU}, cytoplasmique, non importé dans les mitochondries de levure

tRK3 - ARNt^{Lys}_{cmn⁵UUU} mitochondrial de levure

TPI – trioso-phosphate isomérase

UPS – système ubiquitin-protéasome

INTRODUCTION

Situation du sujet et objectifs

1. Généralités sur l'import d'ARNt dans les mitochondries

L'importation d'ARNt cytosoliques dans les mitochondries de certains organismes, suggérée pour la première fois en 1967 (Suyama and Eyer, 1967), n'est sérieusement étudiée que depuis le début des années 90. Le nombre d'ARNt cytosoliques importés dans la mitochondrie est très variable d'un organisme à l'autre. Chez *Phytophthora infectans* un seul ARNt est importé; chez les plantes supérieures, il y en a au moins une douzaine, tandis que chez les trypanosomes, ils le sont tous (Tableau I).

Les premières observations en faveur de ce phénomène ont été obtenues chez *Tetrahymena* (Suyama and Eyer, 1967) et la levure (Martin et al., 1979; Martin et al., 1977), puis chez les plantes (Marechal-Drouard et al., 1990), (Dietrich et al., 1992) et chez les trypanosomes (Schneider et al., 1994). Des preuves directes de l'importation mitochondriale d'ARNt ont été obtenues, d'une part, par des expériences de transgénose chez les plantes et les trypanosomes (Small et al., 1992), (Hauser and Schneider, 1995) et d'autre part, par des expériences d'importation d'ARNt dans les mitochondries isolées de levure (Tarassov and Entelis, 1992).

Les mécanismes qui président à l'adressage mitochondrial d'ARNt cytoplasmiques, de même que le mécanisme de leur translocation à travers la double-membrane mitochondriale, restent encore peu compris et semblent différer dans différents organismes. Les ARN importés dans différents organismes sont listés dans le Tableau I.

Tableau I. ARN codés par les génomes nucléaires et associés aux mitochondries

<i>Espèce</i>	<i>type d'ARN importé</i>	<i>Nombre d'ARNt importés</i>	<i>Preuves d'importation</i>	Source bibliographique
<u>Plantes</u>				
<i>Phaseolus vulgaris</i>	tRNAs «	>8	Hybridation, importation <i>in vivo</i>	(Marechal-Drouard et al., 1988), (Marechal-Drouard et al., 1990)
<i>Solanum tuberosum</i>	«	>11	Séquence mtADN, Hybridation, importation <i>in vitro</i>	OGMP, OGD ¹
<i>Triticum vulgaris</i>	«	>8	Hybridation quantitative	«
<i>Zea mais</i>	«	>8	«	(Akashi et al., 1998)
<i>Marchantia polymorpha</i>	«	3	«	(Duchene and Marechal-Drouard, 2001)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	«	16	Hybridation, importation <i>in vivo</i> , Séquence mtADN	«
<i>Chondrus crispus</i>	«	2	«	
<i>Porphyra purpurea</i>	«	2	«	
<u>Champignons</u>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	tRNAs	2	Hybridation, Séquence mtADN, importation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	(Martin et al., 1979; Martin et al., 1977), (Rinehart et al., 2005)
<i>Spizellomyces punctatus</i>	«	tous sauf 8	Séquence mtADN	OGMP, OGD
<i>Harpochitrium sp</i>	«	tous sauf 8	«	OGMP, OGD
<u>Protistes</u>				
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	tRNAs	26	Hybridation Séquence mtADN	(Chiu et al., 1975; Suyama and Eyer, 1967)
<i>Paramecium aurelia</i>	«	19	Séquence mtADN	OGMP, OGD
<i>Trypanosoma brucei</i>	«	tous sauf ARN ^{Met} _t	Hybridation, séquence mtADN, ARNt, import <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	(Hancock and Hajduk, 1990; Schneider et al., 1994)
<i>Leishmania tarentolae</i>	«	tous	Hybridation, séquence mtADN, importation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	(Lye et al., 1993), (Chen et al., 1994)
<i>Pedinomonas minor</i>	«	15	Séquence mtADN	OGMP, OGD
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	«	tous sauf 3	«	«
<i>Chysodidymus synuroides</i>	«	2	«	«
<i>Ochromonas danica</i>	«	2	«	«
<i>Cafeteria robergensis</i>	«	2	«	«
<i>Phytophthora infectans</i>	«	1	«	«
<i>Thraustochytrium aurelium</i>	«	2	«	«
<i>Theileria parva</i>	«	tous	«	«
<i>Plasmodium falciparum</i>	«	tous	«	«
<i>Dictyostellium discoideum</i>	«	4	«	«
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	«	7	«	«

¹ Predicted on the base of analysis by “Organelle Genome Megasequencing Program” (<http://www.bch.umontreal.ca/ogmp>) and „Organelle Genome Database“ (<http://www.bch.umontreal.ca/gobase>).

<i>Jacoba libera</i>	«	1	«	«
<i>Reclinomonas americana</i>	«	1	«	«
<u>Animaux</u>				
<i>Crassostrea gigas</i>	«	4	Séquence mtADN	OGMP, OGD
<i>Metridium senile</i>	«	tous sauf 2	«	«
<i>Monodelphis domestica</i>	tRNA ^{Lys}	1	Aminoacylation <i>in vitro</i> d'ARNt isolés, séquence mtADN	(Dorner et al., 2001)
<i>Homo sapiens</i>	5S rRNA MRP ARN, RNase P ARN	0	RT-PCR, import <i>in vivo</i> , séquence mtADN Séquence mtADN, hybridation «	(Entelis et al., 2001a; Magalhaes et al., 1998) (Chang and Clayton, 1987) (Doersen et al., 1985), (Li et al., 1994),(Kiss and Filipowicz, 1992), (Rossmannith and Karwan, 1998)

La variabilité du nombre et de la nature des ARN importés en fonction des organismes s'est très probablement traduite par une diversification des mécanismes d'importation. En effet, il apparaît que les déterminants d'importation au sein des ARN importés, de même que les facteurs d'importation protéiques, ne sont pas conservés d'un groupe phylogénétique à l'autre.

Le phénomène d'importation d'ARNt dans différents organismes est décrit plus en détail dans notre revue ci-jointe (**Publication 1:** Brandina I, Tarassov, I. (2003), « Importation d'ARN dans les mitochondries », *Regard sur la Biochimie*, v. 4, pp. 37-45).

Publication 1

Brandina I, Tarassov, I. (2003) « Importation d'ARN dans les mitochondries», *Regard sur la Biochimie*, v. 4, pp. 37-45.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Brandina Irina, Tarassov Ivan.

Importation d'ARN dans les mitochondries.

Regard sur la biochimie 4, 37-43 (2003)

Pages 37-43 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de la consulter dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

2. Données récentes sur l'import mitochondrial d'ARNt

Au cours de ces trois dernières années, le phénomène d'importation d'ARNt a été décrit chez d'autres espèces comme les marsupiaux qui semblent importer un ARNt^{Lys} (Dorner et al., 2001), ou *Toxoplasma gondii*, où tous les ARNt (à l'exception de l'ARNt^{Met}_i) sont importés (Esseiva et al., 2004). D'autre part, un travail récent a décrit l'import d'ARNt^{Gln} chez la levure *S. cerevisiae* (Rinehart et al., 2005), alors qu'il semblait acquis que seul l'ARNt^{Lys}_{CUU} était importé chez cet organisme (Martin et al., 1979). Rinehart et al. ont proposé que, contrairement à l'ARNt^{Lys}_{CUU}, l'import de l'ARNt^{Gln} ne nécessitait pas la participation de protéines cytosoliques.

2.1. Importation d'ARNt chez les plantes

Chez les plantes, les déterminants au sein des molécules d'ARNt, qui définissent leur sélectivité d'importation, restent encore mal définis. Il a été montré qu'une mutation ponctuelle dans le bras accepteur de l'ARNt^{Ala}, qui empêche son aminoacylation par l'alanyl-ARNt synthétase, inhibe l'importation mitochondriale de cet ARNt *in vivo* (Dietrich et al., 1996a). Le bras D et l'anticodon de l'ARNt^{Val} d'*Arabidopsis thaliana* sont importants pour son import mitochondrial dans des lignées transgéniques de tabac (Delage et al., 2003b). Récemment, en utilisant des versions mutantes des tRNA^{Met-e} cytoplasmique d'*A. thaliana* et de l'ARNt^{Val} du tabac exprimés dans les lignées transgéniques de tabac, il a été montré que la branche T est critique pour l'importation d'ARNt (Laforest et al., 2005). Les auteurs proposent l'hypothèse que le repliement correct de l'ARNt est nécessaire pour son importation.

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) mitochondriales semblent participer à l'adressage mitochondrial des ARNt chez les plantes (Dietrich et al., 1996b), (Mireau et al., 2000). Cependant, deux types de données récentes indiquent que si les aaRS jouent un rôle dans la sélectivité de l'import des ARNt, ce rôle n'est pas suffisant. Tout d'abord, chez *Solanum tuberosum*, les trois ARNt^{Gly} isoaccepteurs cytoplasmiques sont aminoacylés par la même glycyl-ARNt synthétase, mais seuls les ARNt^{Gly}(UCC) et -(CCC) sont importés, alors que l'ARNt^{Gly}(GCC) ne l'est pas, ce qui suggère que l'aminacylation n'est pas suffisante pour diriger l'ARNt vers les mitochondries (Brubacher-Kauffmann et al., 1999). L'échange de séquences entre ARNt^{Gly}(UCC) et ARNt^{Gly}(GCC) est démontré que l'anticodon et la branche D sont essentielles pour l'importation de ARNt^{Gly}(UCC), ce qui signifie l'importance

de la structure tridimensionnelle d'ARNt. Cependant les mutations reverse dans ARNt^{Gly}(GCC) ne sont pas suffisamment pour son importation dans les mitochondries de tabac (Salinas et al., 2005). Ensuite, le remplacement du bras D dans l'ARNt^{Val}(AAC), normalement importé, par celui de l'ARNt^{Met-e} (cytoplasmique) n'affecte pas son aminoacylation par la valyl-ARNt synthétase, mais la version mutante n'est pas importée dans les mitochondries (Laforest et al., 2005). Il se pourrait donc que l'aminacylation des ARNt soit nécessaire pour leur importation mais pas suffisante, suggérant l'existence d'autres facteurs de sélectivité. Il faut souligner qu'il n'existe pas de preuve directe de l'implication des aaRS comme facteurs d'importation essentiels chez les plantes, car *in vitro*, l'importation peut s'accomplir en absence de protéines cytosoliques solubles (Delage et al., 2003a).

2.2. Importation d'ARNt chez les trypanosomes

2.2.1. Nouvelles données sur le mécanisme d'importation

Chez les trypanosomes, le transport mitochondrial des ARNt semble utiliser un récepteur ARNt-spécifique localisé à la surface de la mitochondrie et sa translocation se ferait *via* un canal spécifique aux ARN et est dépendant de l'hydrolyse d'ATP (Adhya et al., 1997), (Mahapatra and Adhya, 1996). Récemment, une nouvelle approche a été utilisée dans le groupe de Samir Adhya (Calcutta, Inde) pour étudier le mécanisme d'importation de l'ARNt^{Tyr} chez *Leishmania*, en utilisant des vésicules phospholipidiques artificielles (Bhattacharyya and Adhya, 2004). Cette approche a permis de montrer que l'interaction entre l'ARNt^{Tyr} importé et son récepteur mitochondrial provoque l'hydrolyse d'ATP dans les vésicules, ce qui génère un potentiel électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne et l'ouverture du canal d'importation de l'ARNt (Bhattacharyya and Adhya, 2004). La translocation de l'ARNt à travers les membranes mitochondriales est dépendante d'un complexe protéique, appelé RIC (RNA Import Complex), localisé dans la membrane interne (Goswami et al., 2003). Ce complexe comprend au minimum deux protéines (de 45 et 21 kDa), qui interagissent spécifiquement avec l'ARNt importé.

2.2.2. ARNt^{Met} initiateur et élongateur dans les mitochondries de trypanosomes

Chez *Trypanosoma brucei*, tous les ARNt cytoplasmiques, à l'exception de l'ARNt^{Met} initiateur qui est cytosol-spécifique, sont importés. Ceci implique que les mitochondries ne contiennent qu'un seul ARNt^{Met}, celui qui participe à l'élongation de la traduction dans le cytoplasme. Il a été montré qu'une fois méthionylé, cet ARNt sert à la fois d'initiateur (après

formylation par une transformylase mitochondriale spécifique) et d'élongateur de la synthèse protéique mitochondriale (Tan et al., 2002).

En utilisant des lignées transgéniques de *T. brucei* exprimant des variants d'ARNt^{Met} initiateur et élongateur, suivis de fractionnements sub-cellulaires, le laboratoire d'André Schneider (Fribourg, Suisse) a montré que l'hélice du bras T était nécessaire et suffisante pour spécifier la localisation cytosolique et mitochondriale respective des deux ARNt^{Met} (Crausaz Esseiva et al., 2004). De plus, l'analyse des nucléotides modifiés de l'ARNt^{Met} (initiateur) *in vivo* a montré que la localisation cytoplasmique de cet ARNt ne requiert pas résidus modifiés (Crausaz Esseiva et al., 2004). Par contre, ces mêmes auteurs ont proposé que des nucléotides modifiés dans l'ARNt^{Met} élongateur pourrait jouer le rôle d'anti-déterminant pour la localisation mitochondriale de cet ARNt, par analogie avec la situation rencontrée chez *Leishmania tarentolae* pour la localisation des ARNt^{Glu/Gln} (Kaneko et al., 2003). Chez *T. brucei*, l'initiation de la traduction mitochondriale dépend de la formylation de la méthionine chargée sur l'ARNt^{Met} importé grâce à une méthionyl-ARNt formyltransférase spécifiquement mitochondriale. Récemment, le facteur d'initiation IF2 de la traduction mitochondriale a été identifié et il a été montré que ce facteur se fixait spécifiquement sur la forme initiateur de l'ARNt^{Met}, son déterminant de reconnaissance majeur étant très probablement le groupement formyl-méthionine attaché sur l'ARNt (Charriere et al., 2005).

2.3. Importation de l'ARNt(Lys) chez la levure *S. cerevisiae*

Les travaux effectués au laboratoire d'accueil durant ces dernières années ont été consacrés à l'étude des mécanismes d'importation de l'ARNt^{Lys} chez la levure *S. cerevisiae*. L'importation d'ARNt^{Lys} semble être un processus très sélectif chez la levure, car seul l'ARNt^{Lys}_{CUU} (appelé tRK1) est importé dans la matrice mitochondriale, alors que le deuxième isoaccepteur cytoplasmique de la lysine, l'ARNt^{Lys}_{mnm⁵s²UUU} (tRK2), n'est pas importé (Martin et al., 1977), (Martin et al., 1979). Bien que la fonction de tRK1 dans l'organite est inconnue, son abondance intra-mitochondriale est comparable à celle des ARNt codés par le génome mitochondrial. En plus des deux ARNt^{Lys} cytoplasmiques, la cellule de levure contient l'ARNt^{Lys}_{cmnm⁵UUU} (tRK3), codé par le génome mitochondrial et exclusivement localisé dans la mitochondrie (Figure 1). Le résidu cmnm⁵U dans la position du "wobble" de l'anticodon devrait permettre au tRK3 de reconnaître A et G en troisième position des codons AAA et AAG de la lysine, suggérant que cet ARNt est, en principe, suffisant pour la synthèse protéique mitochondriale (Martin et al., 1990). Cependant, tRK1 importé (ou du moins des variants de cet

ARNt) est capable de participer à la synthèse protéique mitochondriale (Kolesnikova et al., 2000).

D'autres fonctions mitochondriales ont également été proposées pour tRK1. Une hypothèse, basée sur une complémentarité de séquence entre tRK1 et plusieurs jonctions intron-exon de pré-messagers mitochondriaux, suggère sa participation dans l'épissage d'introns (Soidla, 1983; Soidla, 1986). Une autre hypothèse est que tRK1 prend part à la transcription inverse ou à la réplication de l'ADN dans la mitochondrie (Martin et al., 1979).

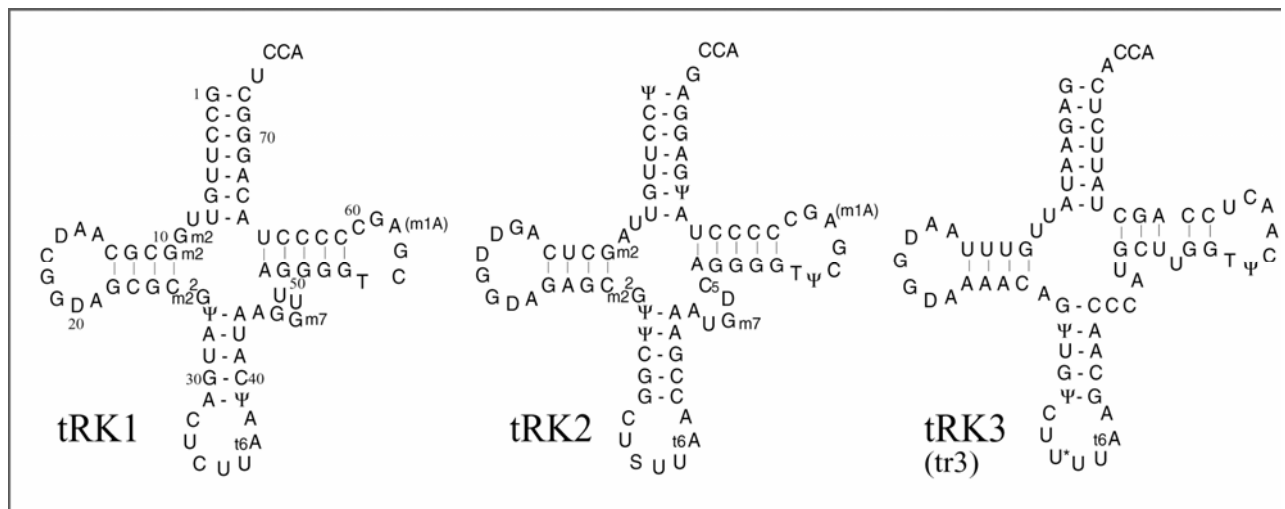


Figure 1. Structures secondaires des trois ARNt^{Lys} de levure, deux cytoplasmiques, ARNt^{Lys}_{CUU} (tRK1) et ARNt^{Lys}_{SUU} (tRK2), et un mitochondrial, ARNt^{Lys}_{U*UU} (tRK3) (Martin et al., 1979), (Martin and Dirheimer, 1983), (Smith et al., 1971). tRK1 est localisé à >95% dans le cytosol et à 2-5% dans la matrice mitochondriale; tRK2 est localisé à 100% dans le cytosol et tRK3 - à 100% dans les mitochondries. S= $\text{mm}^5\text{s}^2\text{U}$, U*= cmm^5U .

Dans le but d'étudier le mécanisme de l'importation mitochondriale de tRK1, un test d'importation spécifique de tRK1 dans des mitochondries isolées a été mis au point dans notre laboratoire. Dans ce système, le transport mitochondrial de l'ARNt s'est révélé être dépendant de l'énergie (hydrolyse de l'ATP), du potentiel électrochimique à travers la membrane interne, de la présence des protéines associées à la membrane mitochondriale externe, et de la présence de protéines cytoplasmiques solubles (Tarassov and Entelis, 1992). Les récepteurs de la membrane mitochondriale externe, Tom20p et Tom70p, interviennent dans le ciblage mitochondrial des pré-protéines (Pfanner et al., 1996). Les mitochondries déplétées en Tom70p avaient la même capacité à diriger l'importation de tRK1 que celles de la souche sauvage, alors que les mitochondries déplétées en Tom20p en étaient incapables. Ce dernier récepteur est donc

important pour l'importation de tRK1 ou, du moins, pour l'importation d'une ou plusieurs protéines nécessaires à l'importation de l'ARNt. La protéine Tim44p de la membrane mitochondriale interne est essentielle pour la translocation mitochondriale des pré-protéines munies de préséquence d'adressage N-terminal (Pfanner and Geissler, 2001). La déplétion en Tim44p causait une baisse de la concentration mitochondriale en tRK1 *in vivo* et interférait avec la capacité des mitochondries isolées à diriger l'importation de tRK1 *in vitro*, indiquant que Tim44p était également essentiel pour l'importation de l'ARNt. Enfin, le blocage de complexes intermédiaires d'importation des pré-protéines (déplétion partielle de l'ATP et dissipation réversible du potentiel électrochimique de la membrane par l'oligomycine), a permis de détecter la formation, à la surface des mitochondries, d'un complexe ribonucléoprotéique impliquant tRK1. La formation de ce complexe est réversible, car l'addition d'ATP permet d'achever l'importation de tRK1 même sans restauration du potentiel trans-membranaire, exactement comme pour les complexes intermédiaires d'importation des pré-protéines. L'ensemble de ces résultats indique que l'appareil d'importation des protéines est aussi impliqué dans le transport de tRK1 et qu'une protéine importée dans la mitochondrie est probablement utilisée comme transporteur de l'ARNt (Tarassov et al., 1995b).

Contrairement à l'importation mitochondriale des pré-protéines, l'importation *in vitro* de tRK1 est dépendante de la présence de protéines cytosoliques solubles. Il a été démontré que la lysyl-ARNt synthétase cytoplasmique (Krs1p) et le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale (préMsk1p) étaient toutes deux requises pour l'importation de tRK1. Ces deux synthétases sont codées par des gènes nucléaires distincts (respectivement, *KRS1* et *MSK1*).

Krs1p aminoacyle tRK1 mais n'est pas importée dans la mitochondrie, alors que la préMsk1p est incapable d'aminoacyler tRK1 mais est importée. Les travaux effectués dans notre laboratoire avaient démontré que la synthétase cytoplasmique était nécessaire pour l'importation *in vitro* de tRK1 uniquement lorsqu'il est déacylé, ce qui indique que l'importation de l'ARNt nécessite son aminoacylation préalable. Par contre, la synthétase mitochondriale est indispensable, *in vivo* et *in vitro*, pour l'importation de tRK1, qu'il ait été préalablement aminoacylé ou non. En effet, une version tronquée de la préMsk1p ne contenant plus son signal d'adressage mitochondrial n'est plus importée dans la mitochondrie et en même temps ne peut plus diriger l'importation de tRK1, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, la préMsk1p, bien qu'incapable d'aminoacyler tRK1, est capable de former un complexe stable ribonucléoprotéique avec tRK1 lysynylé. Tous ces résultats suggèrent fortement que la préMsk1p joue le rôle de transporteur mitochondrial pour l'ARNt (Tarassov et al., 1995b). En

se basant sur ces résultats, un modèle à été proposé qui suggère que 2-5% de tRK1 aminoacylé par la lysyl-ARNt-synthétase cytoplasmique (Krs1p) devient la cible de la préMsk1p, le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale. Le complexe tRK1/préMsk1p est ensuite dirigé vers la mitochondrie et l'ARNt est importé dans la matrice avec la pré-protéine interaction avec l'appareil d'importation mitochondriale de pré-protéines (Figure 2).

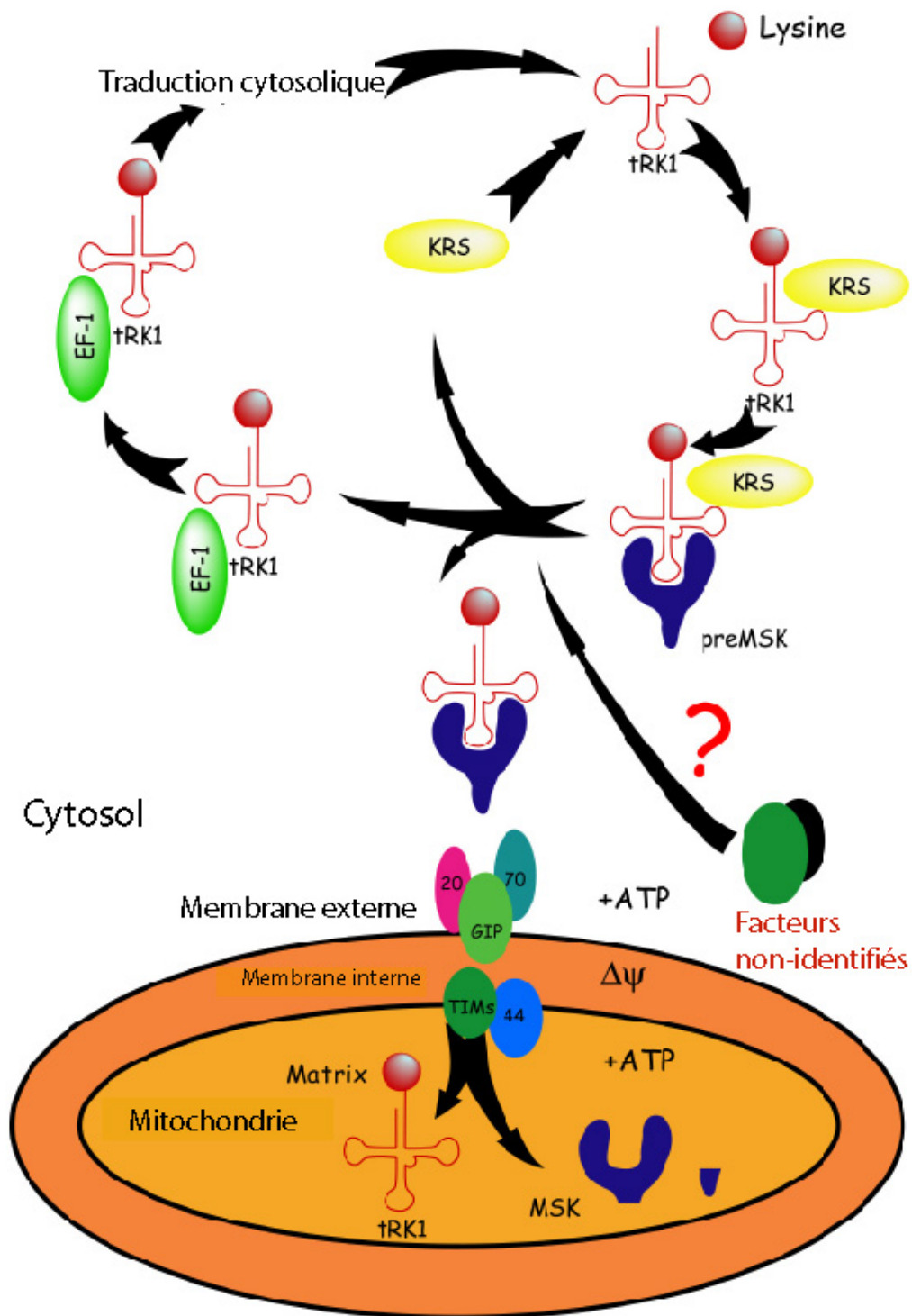


Figure 2. Modèle des interactions ARNt-protéines menant à l'importation de tRK1 dans les mitochondries de levure. GIP, "Général insertion pore", le complexe d'importation de la membrane externe. TIMs, les protéines de l'appareil de translocation des pré-protéines à travers la membrane interne. $\Delta\Psi$, potentiel électrochimique à travers la membrane interne. Pour les détails, voir le texte.

Cependant, ces deux aminoacyl-ARNt-synthétases, Krs1p et préMsk1p, ne sont pas suffisantes pour diriger l'import de tRK1 dans la mitochondrie, ce qui suppose l'existence d'autres facteurs protéiques impliqués dans ce processus.

L'objectif de mes travaux de thèse a été d'identifier de nouveaux facteurs participant à l'importation d'ARNt dans les mitochondries de levure et d'étudier leurs rôles dans ce processus. Pour cela, nous avons fait appel à deux types d'approches :

- Une approche biochimique qui consistait à séparer les protéines cytosoliques solubles par différents types de fractionnements chromatographiques et à tester leur capacité de diriger l'importation de tRK1 dans des mitochondries isolées. Cette partie de notre travail a mené à l'identification de l'énolase et à la démonstration que cette enzyme glycolytique était, à côté de la préMskp, le seul autre facteur d'importation essentiel.
- Une approche génétique qui consistait à rechercher des protéines cytosoliques interagissant spécifiquement soit avec le seul autre facteur d'importation connu (cet à dire la préMsk1p), soit avec l'ARNt importé, en utilisant les systèmes double-hybride et triple-hybride, respectivement. Ce travail a abouti à l'identification de plusieurs protéines candidates, dont des composants du système ubiquitine-protéasome, qui pourraient intervenir dans la régulation de l'import mitochondrial de tRK1.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

1. Souches utilisés

1.1. Bactéries

1.1.1. *Escherichia coli*

Pour amplifier l'ADN plasmidique et les clonages, nous avons utilisé la souche de bactéries *Escherichia coli* XL1-Blue : F[']::Tn10 proA+B+lacI^q Δ(LacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1v lac (Sikorski and Hieter, 1989).

1.1.2. Milieu et conditions de culture d'*E.coli*

E.coli a été cultivé à 37°C en milieu liquide LB (bactotryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7,5) ou sur milieu solide contenant 2% de bactoagar. L'ampicilline a été utilisée à une concentration finale de 100 µg/ml pour sélectionner les plasmides portant le gène *AMP^r* assurant la résistance à cet antibiotique. Pour la sélection de clones contenant le gène *LacZ*, nous avons ajouté le 5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal, 40 µg/ml) et IPTG (5 µg/ml).

1.2. Levure

1.2.1. Souches de levure

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées dans cette étude sont les suivantes :

A. Pour le système double-hybride:

- Y187** *MATα ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*
- CG1945** *MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3,112 GAL4-542 gal80-538 cyhr2 LYS2::GAL1; UAS-GAL; 1TATA-HIS3; URA3::GAL417-mers(x3)-CYCITATA-lacZ*

B. Pour le système triple-hybride:

- L_{40coat}** *MATα URA3-52, LEU2-3,112, HIS3Δ200, TRP1Δ1, ade2, LYS2:: (LexA op)₄-IS3, URA3:: (LexA-op)₈-LacZ, LexA-MS2 coat (TRP1) (SenGupta et al., 1996).*
- R_{40coat}** identique à L_{40coat}, mais de signe *MATα*, pour permettre son croisement avec la souche L_{40coat} (SenGupta et al., 1996)

C. Pour la purification de protéines et des mitochondries

- YPH499** *MATα, [ρ⁺], URA3-52, lys2-801 amber, ade2-101 ochre, TRP1-Δ63, HIS3-Δ200,*

LEU2-Δ1 (Sikorski and Hieter, 1989);

YPH501 *MATa/α, URA3-52/URA3-52, lys2-801 amber/ lys2-801 amber, ade2-101 ochre/ade2-101 ochre, TRP1-Δ63/ TRP1-Δ63, HIS3-Δ200/ HIS3-Δ200, LEU2-Δ1/ LEU2-Δ1*

D. Souches avec des gènes délétés (« Euroscarf », Francfort, Allemagne)

BY4743 *MATa/MATa; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0;*

WT *ura3Δ0/ura3Δ0*

doa1 *BY4742; MAT α; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YKL213c::kanMX4*

rpn13 *BY4741; MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR421c::kanMX4*

E. Souches utilisées pour étudier le rôle du système ubiquitine-protéasome dans l'importation d'ARNt

- Souche Udo**, obtenue par transfection de la souche *doa1* avec le plasmide YEp352-UBI4.

- Souche utilisée pour inhiber la fonction catalytique du protéasome 26S avec l'inhibiteur MG132 (Friant et al., 2003):

type sauvage RH449 *MATα, HIS4, URA3, LEU2, BAR1*

erg6 (RH4237) *MAT α erg6::LEU2 his4 lys2 ura3 leu2 bar1*

- Souches avec des mutations dans les gènes *PRE1* et *PRE2* codant des sous-unités catalytiques du protéasome (Heinemeyer et al., 1991) :

type sauvage WCG 4 *MATa, pra1-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his3*

pre1-1 *MATa, pra1-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his3, pre1-1*

pre 2-2 *MATa, pra1-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his⁻, pre2-2*

pre1-1/ pre2-2 *MATa, pra1-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his⁻, pre1-1 pre2-2*

1.2.2. Milieux et conditions de culture de *S. cerevisiae*

Les cellules de levure ont été cultivées en milieu liquide ou sur milieu solide (contenant 2% de bactoagar) à 30°C, à 25°C (souches thermosensibles) ou à 37°C. Les milieux de sélection utilisés (SC : synthétique complet) sont des milieux minimaux supplémentés par tous les acides aminés, excepté la leucine, l'histidine, le tryptophane ou l'uracile selon les gènes marqueurs à sélectionner. La généticine G418 a été rajoutée au milieu

solide (concentration finale 250 µg/ml) pour sélectionner les cellules portant le gène de résistance *kanMX4*.

Pour la préparation des milieux de culture, de l'eau bidistillée MilliQ a été utilisée (Kaiser, 1994). Les milieux prêts ont été stérilisés en autoclave à 121°C pendant 1h ou par filtration sur Millex-GS (0.22 µm, Millipore).

A. Milieux complets avec différentes sources de carbone :

glucose (YPD) : 1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% D-glucose;

glycérol (YPGly): 1% yeast extract, 2% bactopectone, 3% glycerol (p/v), 0,5% D- glucose;

glycérol - éthanol: YPGly + 2% éthanol (p/v), ajouté après stérilisation par autoclave;

galactose (YPGal): 1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% D-galactose;

lactate: 1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% lactate de sodium;

B. Le milieu YPD contenant du 3-aminotryazole, 3-AT (quantité variable de 0,5 mM au 10 mM) a été utilisé pour tester l'interaction entre une protéine donnée et l'ARN hybride dans le système triple-hybride.

C. Milieux synthétiques complets – acide aminé X : milieu sélectif CSM sans un acide aminé donné (quantité variable selon le fournisseur), yeast nitrogene base 0,67%, glucose 2%.

D. Milieux synthétiques complets sélectifs CSM avec 0.1% de l'acide 5-fluoro-orotique, 5-FoA, a été utilisé pour sélectionner les levures qui ont perdu le plasmide car les levures *ura+* sont sensibles à 5-FoA.

1.3. Cellules humaines

1.3.1. Lignées humaines

Les cellules HepG2 humaines (fournies R. Lightowers, Newcastle UK) ont été utilisées pour la purification des mitochondries.

1.3.2. Milieu de culture

Le milieu utilisé est le Milieu Essentiel Minimum de Eagle avec sels de Earle's modifié par Dulbecco EMEM, (Sigma) avec antibiotiques et avec 10% de sérum foetal de veau.

2. Plasmides utilisés.

** les plasmides marqués avec des étoiles ont été construits pendant ma thèse.

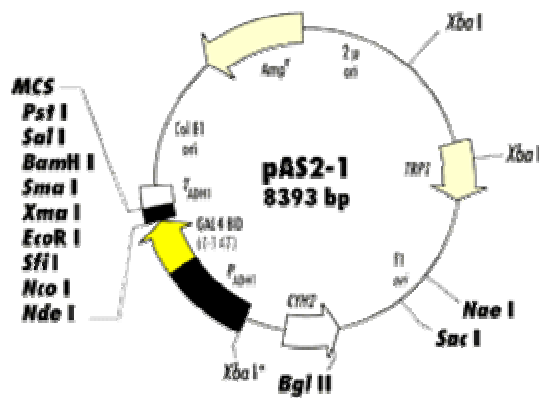
Les plasmides décrits ci-après peuvent être amplifiés ou sous-clonés aussi bien dans *E.coli* que dans *S. cerevisiae*, car ils portent en plus d'une origine de répllication bactérienne et d'un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de répllication chez la levure (centromérique ou 2 μ) et un gène marquer de levure.

pAS2-1 (figure 3, A) : plasmide multicopie portant l'origine de répllication 2 μ et le gène marqueur *TRP1*. Il a été utilisé dans le système du double hybride; il contient le promoteur fort du gène *ADHI* (alcool déshydrogénase) qui contrôle l'expression du domaine de fixation à l'ADN (DBD) de l'activateur de transcription Gal4p (aa 1-147) (Fromont-Racine et al., 1997).

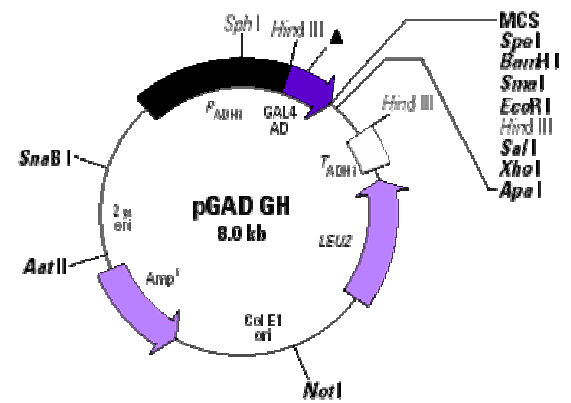
** **pAS2+MSKI** : construit à partir du pAS2-1 par clonage du gène *MSKI* dans le site *Sma* I, pour créer la fusion de préMsk1p avec le DBD de Gal4p et utilisé pour le criblage double hybride.

** **pAS2+N-MSKI** : ce plasmide contient les aa 1-258 de Msk1p (cloné par *Bam*HI et *Bgl*II) et fusionné avec le DBD pour le criblage de la banque génomique par le système du double hybride également.

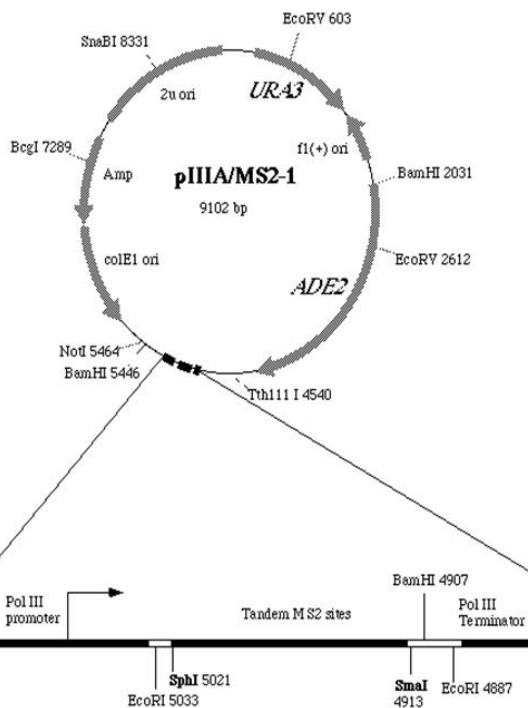
A.



B.



C.



D.

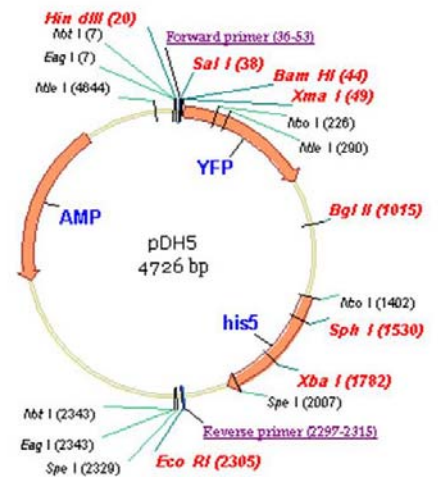


Figure 3. Les plasmides utilisés pendant ce travail.

pGAD-GH (figure 3,B) : plasmide multicopie portant l'origine de replication 2μ , le gène marqueur *LEU2* et le domaine d'activation de la transcription de Gal4p (TAD, aa 768–881) sous le contrôle du promoteur du gène *ADHI*.

Pour tester l'interaction de protéines individuelles dans le système triple-hybride sur la base de pGAD-GH, nous avons construit une série de plasmides contenant le gène des protéines suivantes (les endonucléases utilisées pour le clonage sont indiqués):

****pGAD-RPN8** (*NcoI* et *XhoI*) ;

****pGAD-RPN13** (*NcoI* et *XhoI*) ;

****pGAD-DOA1** (*NcoI* et *XhoI*) ;

****pGAD-ENO1** (*BamHI* et *SacI*) ;

****pGAD-ENO2** (*BamHI* et *SacI*) ;

****pGAD-MTH1** (*NcoI* et *XhoI*)

Banque pGAD-R : banque de fragments d'ADNc de *S. cerevisiae* porté par le plasmide pGAD-GH (**obtenue de R. Bourdonne, Montpellier**).

Banque FRYL : banque de fragments génomiques de *S. cerevisiae* porté par plasmide pGAD-GH et insérés dans le site *Hind III* (**fournie par B. Winsor, IPCB, Strasbourg**).

pIII/MS2-1 (figure 3,C), *ori 2μ*, *ADE2*, *URA3*. Plasmide utilisé dans le système du triple hybride; il contient un fragment du gène de l'ARN du phage MS2, le promoteur et le terminateur de la ARN de RNase P pour la transcription de l'ARN hybride par l'ARN polymérase III.

Pour le criblage triple hybride, nous avons cloné les gènes *TRK1* ou *TRK2* (codant pour les ARNt^{Lys}_{CUU} et ARNt^{Lys}_{U*UU}, respectivement) dans le site *Sma I* :

****pIII/MS2-1-TRK1**

****pIII/MS2-1-TRK2**

pDH5 (figure 3, D) : plasmide utilisé pour le marquage d'Eno2p par la protéine YFP, car il contient le phase codant de la YFP et le marqueur de *Saccharomyces pombe HIS5*, qui peut compléter le gène *HIS3* de *S. cerevisiae*. Cette cassette permet de fusionner la YFP en C-terminal d'une protéine donné afin de déterminer la localisation cellulaire de cette dernier *in vivo* (Wach et al., 1997).

YEp352-UBI4, *ori 2μ*, *URA3* : plasmide contenant le gène *UBI4* de la polyubiquitine inséré dans le site *BamHI* (Hochstrasser et al., 1991).

3. Produits chimiques et biologiques

La majorité des produits chimiques et de biologie moléculaire proviennent des sociétés Amersham-Biosciences, Bio-Rad, Roche ou Sigma. Les constituants des milieux de culture proviennent de Difco. Les oligonucléotides (présentées dans l'Annexe 1) ont été fournis par

les sociétés Eurogentec, Gibco et MWG Biotech AG. Les produits radioactifs, [³²P]-ATP et [³⁵S]-Met ont été fournis par Amersham.

Les enzymes de restriction ou de modification utilisées proviennent des fournisseurs Boehringer-Mannheim, Biolabs, Gibco-BRL, Amersham-Bioscience, New England Biolabs, Roche, Promega et Qiagene.

Méthodes.

Les méthodes de biologies moléculaire (clonage, séquençage, transcription *in vitro* etc.) ont été utilisées comme décrites dans le manuel (Maniatis, 1998). La plupart des méthodes concernant la manipulation génétique de la levure ont été effectuées selon (Guertin, 1991). Les méthodes relatives aux mitochondries ont été utilisées comme décrites dans le manuel (Darley-Usmar, 1987).

Les approches méthodologiques originales mises au point dans le cadre de ce travail sont décrites dans la publication ci-jointe (**Publication 2**).

METHODES

1. Manipulation de l'ADN.

1.1. Purification d'ADN.

1.1.1. Préparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

L'ADN plasmidique d'*E.coli* a été isolé avec le kit Qiagene ou JetStar Plasmid Midi/ou Maxi-prep (Genomed) basé sur une extraction de l'ADN des cellules bactériennes par lyse alcaline.

1.1.2. Préparation d'ADN plasmidique ou génomique de levure

Cette méthode est adaptée de (Hoffman and Winston, 1987). Les cellules de levure, après culture sur milieu sélectif, sont incubées dans 2 ml d'YPD à 30°C pendant 18h. Les cellules sont récoltées par centrifugation (30 sec, 12,000 g) et resuspendues dans 200 µl de tampon 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 et 1 mM EDTA dans un tube Eppendorf de 2 ml. Environ 200 µl de billes de verre (0,35 mm diamètre) et 200 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1, v/v) sont rajoutés à cette suspension. Les cellules sont vortexées 10 min à 4°C. Après centrifugation (5 sec, 12,000 g), le surnageant est mélangé avec 3 volumes d'éthanol absolu et 0.1 volume d'acétate de sodium, puis incubé 30 min à 20°C. L'ADN précipité est centrifugé (5min, 12,000g), le culot est lavé une fois avec de l'éthanol à 70% et une fois avec de l'éthanol à 96%, séché brièvement à température ambiante et resuspendu dans 50 µl d'eau bidistillée.

1.2. Amplification de l'ADN par PCR.

L'amplification de l'ADN purifié été réalisé par la technique de PCR (Polymerase Chain le kit fourni par le fabricant. La réaction est réalisé dans un volume 20-100 µl, dans le tampons 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP contenant 5U de Taq polymérase et 100-500 ng d'ADN à amplifier. Les oligonucléotides (20 pmol par réaction) utilisés sont décrits dans l'Annexe 1. L'ADN amplifié a ensuite été purifié avec le kit Qiagene PCR purification kit (Qiagene).

Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur des minigels horizontaux (1% agarose ou 12% polyacrylamide, selon la taille des fragments). Le tampon du gel et d'électrophorèse est le TBE (89 mM Tris base, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA, pH 8,0). L'ADN est déposé avec 1/6 de volume de tampon de charge (30% glycérol, 0,025% bleu

de bromphénol, 0,025% xylène cyanol). La migration est effectuée à 5-10 V/cm. La taille des différents fragments est estimée par rapport à une échelle de fragments d'ADN-marqueur de tailles connues ("1kb Ladder", Promega). L'ADN est visualisé par coloration au bromure d'éthidium (1 mg/l) et l'image du gel est photographiée avec un "Baby-Imager". Le fragment d'ADN souhaité est extrait du gel et purifié avec le kit « Qiagen gel extraction kit » (Qiagen).

1.3. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction.

La digestion est réalisée selon les recommandations des fournisseurs, dans les tampons fournis avec l'enzyme. La réaction se fait dans un volume de 10 à 100 µl pendant 1 heure à 37 °C. Si nécessaire, l'enzyme est inactivé par extraction au phénol/chloroforme ou par dénaturation à la chaleur (10 min à 65°C). L'efficacité de la réaction est estimée par visualisation des produits de digestion après séparation sur gel d'agarose.

1.4. Déphosphorylation de l'extrémité 5' de fragments d'ADN.

Pour éviter que durant l'étape de ligation le vecteur ne se religature sur lui-même, le groupement phosphate de l'extrémité 5' de l'ADN est éliminé par la phosphatase alcaline. L'ADN digéré est incubé à 37°C pendant 1 heure avec 1 U de phosphatase alcaline AP (Alkaline Phosphatase, Roche) dans le tampon fourni avec l'enzyme. L'enzyme est inactivé par une extraction au phénol/chloroforme 1:1 (v/v). Le mélange est vortexé 1 min et, après centrifugation (5 min, 12,000g), l'ADN de la phase aqueuse est précipité à l'éthanol et repris dans du TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

1.5. Ligation.

La ligation des extrémités compatibles (franches ou cohésives) des fragments d'ADN est catalysée par 20 U d'ADN ligase du phage T4 (Biolabs). La réaction s'effectue pendant 30 min à la température ambiante dans le tampon fourni avec l'enzyme. L'enzyme est ensuite inactivée par la chaleur (5 min à 65°C).

1.6. Séquençage de l'ADN

La plupart de séquences ont été effectuées par Service de séquençage du site de l'Esplanade (IBMP, Strasbourg) avec un séquenceur APE Biosystems (modèle 373).

Dans les autres cas, la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977) a été utilisée pour séquencer l'ADN. 0.9 µg d'ADN double-brin sont dénaturés durant 5 min à température ambiante avec 1 µl de NaOH 5M ; après refroidissement, l'ADN est précipité à l'éthanol. L'ADN est ensuite repris dans 10 µl de tampon 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl et hybridé à une amorce oligonucléotidique (1.5 pmoles). Pour la réaction de

marquage, l'ADN est mélangé avec les 4 dNTP (quantité limitante de dATP sous forme de [³⁵S]-dATP), en présence 5 U d'ADN polymérase T7 (Promega). La réaction est réalisée 5 min à 37°C et terminée aléatoirement en ajoutant de 20 µmoles de 2',3'-didésoxy-analogues des 4 NTP (ddNTP ; "FmolTM Sequencing System", Promega). Après 5 min à 37°C la réaction est arrêtée par addition de 4 µl d'une solution "stop" contenant du 0.05% bleu de bromophénol, 10 mM NaOH, 0.5% formamide, 0.05% xylène cyanol. Les fragments marqués sont alors séparés sous haut voltage (1400 V) sur un gel de polyacrylamide dénaturant (6% PAAG, 8M urée) dans du tampon TBE. Le gel est fixé dans 10% d'acide acétique pendant 20 min, transféré sur du papier Wattman 3MM, séché à 80°C sous vide pendant 1h et autoradiographié sur film Kodak X-Omat.

2. Transformation des bactéries et de levures.

2.1. Transformation d'*E.coli* par électroporation.

Pour préparer des bactéries compétentes de la souche *E.coli XL1Blue*, les bactéries sont inoculées dans le milieu LB à 37°C sous agitation pendant la nuit (12-18h). La culture obtenue est inoculée dans 100 ml de milieu LB frais et incubée jusqu'à obtenir une culture en phase de croissance logarithmique (l'absorbance à 600 nm atteint environ 0.8-1.0). Toutes les manipulations sont effectuées dans des conditions stériles et à 4°C.

Les cellules sont précipitées par centrifugation (10 min, 1000 g) et lavées 3 fois avec 50 ml d'eau bidistillée, puis avec 50 ml de glycérol 10% (stérile). Les bactéries sont ensuite reprises dans 1 ml de glycérol 10% et conservées dans la glace. Des parties aliquotées (100 µl) peuvent être congelées dans l'azote liquide et gardées à -70°C pendant plusieurs mois. Pour la transformation, 50 µl de bactéries sont mélangées avec l'ADN (minimum 100 ng), transférées dans une cuvette d'électroporation (2 mm, Biorad). Après l'électroporation (200 Ω, 25 µF, 2,5 kV) dans un "E.coli Pulser" (Bio-Rad), les bactéries sont reprises dans 500 µl de LB puis incubées à 37°C sous agitation pendant 1h (pour l'expression phénotypique du gène *Amp^r*), centrifugées (30 sec, 12,000g) et étalées sur milieu sélectif LB-Amp (100 µg/ml). Les colonies de bactéries transformées contenant le plasmide apparaissent après environ 10h d'incubation à 37°C.

2.2. Transformation de *Saccharomyces cerevisiae*

La transformation de levure *S. cerevisiae* par l'ADN plasmidique a été réalisée par la méthode de Hill en utilisant du Li-PEG (Hill et al., 1991). Deux séries de transformations par

des banques d'ADN génomiques ou d'ADNc de *S. cerevisiae* ont été effectuées pour les criblages par les systèmes double-hybride et triple-hybride.

3. Techniques génétiques de la levure

3.1. Criblage d'une banque génomique de *S. cerevisiae* par la méthode du double-hybride.

Le criblage par le système du double hybride a été réalisé par croisement des souches portant l'une le plasmide pAS et l'autre le plasmide pGAD-GH (Fromont-Racine et al., 1997). Pour cela, nous avons transformé la souche CG1945 avec le plasmide pAS-Msk1 ou pAS-N-Msk (N-Msk code pour les aa 1–258 de préMsk1p). B.Winsor (UMR 7156, Strasbourg) nous a fourni les aliquotes congelées des cellules de souche Y187, transformé par la banque génomique FRYL (Hill et al., 1991). Les deux souches CG1945 et Y187 transformées sont mélangées, concentrées sur les filtres Millipore 0.22 µm (White GSPW, diamètre 47 mm), et incubées dans du milieu YPD, sous agitation pendant 4.5 h à 30°C. Les cellules sont collectées, et une dilution au 1/1000 est placée sur des milieux SCM–Trp, SCM–Leu, SCM–Trp–Leu, pour calculer le nombre de cellules parentales et de diploïdes obtenus. Le reste de la suspension de cellules est étalé sur des boîtes de milieu SCM-His-Trp-Leu et incubé pendant 3-5 jours à 30°C. Les clones obtenus (1.2×10^6) sont analysés sur les filtres pour l'activité du gène rapporteur *LacZ* par le test au chromogène X-Gal. Pour cela, les colonies sont transférées sur des filtres de nitrocellulose BA85 (Schleicher & Schuell), qui sont ensuite trempés dans de l'azote liquide pour 10 sec. Les filtres sont mis sur les boîtes de Pétri avec 2 couches de papier Wattman 3MM et 3 ml de tampon Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM 2-mercaptoéthanol, pH 7.0) et 0.05% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside). Les colonies sur les filtres sont incubées à 30°C pendant 6 h et analysées pour l'apparence de la couleur bleue.

Pour identifier les plasmides contenant un insert d'ADNc l'ADN plasmidique de levure est isolé, utilisé pour transformer *E.coli*, re-purifié et séquencé. Les séquences des inserts ont été analysées avec le logiciel BLAST sur le site Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu>).

3.2. Criblage d'une banque d'ADNc par la méthode du triple hybride.

Pour ce criblage, la souche $L_{40\text{coat}}$ est co-transformée par les plasmides pIII/MS2-1-tRK1 et pGAD-R (contenant la banque d'ADNc) par la méthode à l'acétate de lithium (Gietz and Woods, 2002). Les clones transformés sont mis sur milieu sans uracile, histidine, leucine et tryptophane (SCM-HLWU). L'activité de *lacZ* est testée par l'essai X-Gal sur filtres. Pour estimer l'activité du gène *HIS3*, les cellules sont placées sur le milieu YPD avec du 3-amino-1,2,4-triazole, (3-AT, 0-10 mM en concentration finale), un inhibiteur compétitif de l'histidine. Ceci nous a permis de sélectionner 405 clones contenant les deux gènes rapporteurs actifs.

Pour sélectionner les protéines qui interagissent spécifiquement avec tRK1, nous avons croisé la souche $L_{40\text{coat}}$ (*MAT α* , contenant le vecteur pGAD-GH dans lequel est inséré soit la banque d'ADNc, soit le gène complet d'une protéine donnée) avec la souche $R_{40\text{coat}}$ (*MAT α* , avec le plasmide codant l'ARN hybride avec ou sans tRK1 ou tRK2). Les diploïdes obtenus sont testés pour l'expression des deux gènes rapporteurs (*HIS3* et *lacZ*).

3.3. Marquage des mitochondries de levure par le colorant Mito tracker.

Aux cellules de levure en phase exponentielle de croissance ($A_{600\text{nm}} \sim 0.5$) dans le milieu YPD ou YPGly à 25, 30 ou 37 °C, 1 μmole du marqueur mitochondrial Mitotracker Red (Molecular Probes, Invitrogen) a été ajoutée. L'incubation est réalisée sous agitation à la température de croissance des cellules dans des tubes protégés de la lumière, pendant 30 min. Les cellules sont centrifugées et rincées 3 fois avec du PBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) stérile, pH 7.4 (Euromedex). Les cellules sont finalement resuspendues dans 100 μl de PBS et observées par microscopie confocale (microscope Zeiss LSM 510 ; avec l'aide de J. Mutterer, IPCB, Strasbourg).

3.4. L'analyse d'effet d'inhibition de l'activité catalytique du protéasome 26S

Les cellules de levure (souche contenant la deletion du gène *ERG6*) sont incubées dans le milieu YPGly à 30°C jusqu'en phase exponentielle de croissance. L'inhibiteur du protéasome MG132 (Z-leu-leu-leucinal ; Sigma) est ensuite ajouté à une concentration finale 20 μM , et l'incubation est poursuivie durant 3h à 30°C sous agitation. Les mitochondries sont isolées et l'ARNt mitochondrial total est purifié, comme décrit dans (Genetic engineering). Le niveau d'importation de tRK1 est mesuré par hybridation Northern. Les protéines

cytosoliques solubles (surnageant post-mitochondrial) sont purifiées et utilisées pour mesurer l'activité catalytique du protéasome.

4. Manipulation de l'ARN

4.1. Purification d'ARNt total de levure.

Les cellules de levure sont inoculées dans 20 ml du milieu de culture (riche ou sélectif) et incubées sous agitation à 30°C jusqu'à absorbance $A_{600} \sim 1.0$. L'isolement de l'ARN total de levure est effectué par deux méthodes alternatives, soit par extraction avec du phénol chaud ou par broyage des cellules avec des billes de verre (Kaiser, 1994). Toutes les manipulations sont effectuées à 4°C.

4.1.1. Purification au phénol chaud

Les cellules sont centrifugées (5 min, 1,000 xg, Beckmann L6-HC), lavées trois fois avec de l'eau bidistillée et resuspendues dans 2 ml d'eau stérile. Un volume de phénol préchauffé à 60°C est ajouté, et le tube est vortexé pendant 20 min à 4°C. Les phases aqueuse et organique sont séparées par centrifugation (15 min, 12,000 g) à +4°C, et l'ARN est précipité à l'éthanol en présence d'acétate de sodium.

4.1.2. Broyage des cellules avec des billes de verre

Les cellules sont centrifugées (5 min, 1,000 g, Beckmann L6-HC), lavées par 0.5xSTE (0.5 M NaCl, 200 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) et resuspendues dans 300 µl de 0.5xSTE (Kaiser, 1994). Un volume de billes de verre (diamètre 0.35 mm) et 300 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) sont rajoutés à cette suspension. Les cellules sont vortexées durant 2 min à 4°C. Après centrifugation (1 min, 12,000 g), le surnageant subit une deuxième extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. L'ARN est précipité à l'éthanol. La quantité d'ARN purifié est visualisé par électrophorèse dans 7% PAAG (1* TBE, 8 M urée) ou estimé par l'absorbance à 260 nm.

4.2. Transcription reverse et amplification d'ARNt

Pour la détection d'ARNt dans des complexes protéiques contenant l'énolase, nous avons utilisé la transcription reverse et amplification par PCR. Pour cela, nous avons utilisé le kit "one-step RT-PCR" (Qiagen). L'ARN a été isolé du complexe immunoprécipité par

extraction au phénol chaud. Après RT-PCR, les produits de la réaction ont été visualisés par électrophorèse dans 8% PAAG (1* TBE, 8 M urée).

5. Localisation de protéines dans les mitochondries

5.1. Fractionation de protéines dans les compartiments mitochondrial

Les mitochondries ont été purifiées comme décrit dans la **Publication 2**. Pour obtenir des mitoplastes, les mitochondrie sont incubées sur de la glace avec 10 mM MOPS, pendant 20 min. Les mitoplastes sont récupérés après centrifugation (5 min, 12,000g) et les réactifs suivants sont ajoutés :

- Protéinase K (1 U pour 50 µg de protéines mitochondriales)
- 200 mM NaCl dans 20 mM MOPS.
- solution fraîche de 200 mM Na₂CO₃
- 1% Triton X-100 ou 1% dodecylmaltoside dans 20 mM MOPS.

L'incubation est effectuée durant 20 min à 4 °C et la réaction de digestion est arrêtée par addition de PMSF (concentration finale 5 mM). Les mitoplastes traités sont centrifugés (10 min, 14,000 g à 4 °C) et le culot obtenu est analysé par détection Western.

Les protéines sont séparées par électrophorèse dénaturante dans le système de Laemmli: gel de concentration 4% PAAG (1.5 M Tris-HCl, pH6.8, 0.4% SDS) et gel de séparation 10% PAAG (1.5 M Tris-HCl, pH8.8, 0.4% SDS) dans un tampon tris-glycine pH8.8.

Le transfert électrophorétique des protéines sur une membrane de nitrocellulose Protran-P ou de nylon PVDF Immobilon-P (Amersham) est réalisé dans un tampon 4.1 mM Tris-HCl, pH8.5, 32 mM glycine, 0.01% SDS et 13% éthanol (ou méthanol pour la membrane PVDF), pendant 2h à 100 V, 200 mA à 4°C dans le système Protran Bio-Rad. Pour vérifier l'efficacité du transfert des protéines, la membrane été colorée durant 5 min dans du 0.1% amido-black 10B (Sigma), 45% éthanol , 10% acide acétique ; puis décolorée par rinçages successifs avec une solution 50% éthanol, 5% acide acétique jusqu'à obtention du contraste désiré.

L'Immunodétection des protéines est effectuée après blocage de la membrane pendant 1h dans du Tween-TBS-Lait (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 2% Tween-20 et 5% de lait écrémé en poudre). La membrane est incubée durant 1h avec l'anticorps primaire diluée au 1:1000 dans du Tween-TBS-Lait à la température ambiante sous agitation. Après trois lavages de 10 min dans le même tampon, l'anticorps secondaire dilué (1:2000-1 :5000)

est ajouté et l'incubation est poursuivie pendant 2 h. La membrane est ensuite lavée 3x10 min par du Tween-TBS-Lait et les complexes antigène-anticorps sont révélés par chimioluminescence en utilisant le kit SuperSignal-Pico (Pierce) et autoradiographie.

5.2. Localisation de l'énolase dans le compartiment mitochondrial

5.2.1. Synthèse de protéines *in vitro*

Pour obtenir les protéines individuelles marquées, nous avons utilisé un système *in vitro* de traduction couplée à la transcription (kit TNT-T7 quick, Promega). Le gène d'intérêt est amplifié par PCR sur de l'ADN génomique avec des oligonucléotides spécifiques (voir Annexe 1). Le produit de PCR est ajouté dans le tampon TNT-T7 quick en présence de ³⁵S-méthionine (7 µCi, correspondant à une concentration finale de 1.5 mM) et le mélange est incubé durant 1,5 h à 30 °C. La taille et la quantité de protéine synthétisée sont contrôlées par électrophorèse Laemmli et autoradiographie.

5.2.2. Importation des protéines dans les mitochondries isolées

³⁵S-Eno1p, ³⁵S-Eno2p et ³⁵S- préMsk1p ont été utilisées dans un test d'importation *in vitro* de protéines. L'incubation des protéines avec les mitochondries isolées est effectuée dans un tampon 20 mM Hepes-KOH, pH 6.8, 44 mM sorbitol, 50 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 5 mM succinate, 5 mM phosphoénolpyruvate, en présence de 0,1 mM PMSF et 1 U pyruvate kinase. L'incubation est effectuée durant 10 min à 25 °C, 10 min à 30 °C.

5.2.3. Détection qualitative de l'énolase dans la fraction mitochondriale

Après l'importation des protéines marquées dans les mitochondries isolées, les mitochondries sont traitées avec protéinase K, ou NaCl ou Na₂CO₃ (voir la localisation de protéines mitochondriale), centrifugées 10 min, 14,000 *xg* à 4°C, et les protéines du surnageant et des mitochondries sont précipitées par de l'acide trichloracétique 12%, séparées par électrophorèse dénaturante et le gel est autoradiographié.

5.2.4. Détection quantitative de l'énolase dans la mitochondrie

Pour quantifier les protéines associées aux membranes mitochondriales, nous avons utilisé la méthode de séparation de protéines mitochondriales des membranes mitochondriales par centrifugation dans un gradient de saccharose (Rapaport et al., 2001).

Après importation des protéines marquées dans les mitochondries de levure isolées, les mitochondries sont centrifugées (5 min, 14,000 g), et incubées avec 0.1 M Na₂CO₃ 30 min à

4°C. Ensuite, trois couches de saccharose dans 0.1 M Na₂CO₃ sont ajoutées, la première à une concentration finale en saccharose de 1,5 M, la deuxième de 1.4 M et la troisième de 0.25 M. Le tube est centrifugé durant 2h à 337,000 *xg* à 4°C (centrifugeuse LKB Ultraspinn ; rotor SW60). Ceci permet de séparer les membranes mitochondriales (qui flottent dans la première couche de saccharose) des protéines qui sont agrégées (dans la couche intermédiaire) et des protéines solubles (dans le fond du tube). Chaque couche de gradient est séparée des autres, et les protéines sont précipitées par 12% d'acide trichloracétique, séparé par électrophorèse Laemmli et le gel est autoradiographié. Les résultats sont quantifiés sur PhosphoImager Fuji muni du logiciel MacBas-2000.

6. Test de l'activité des enzymes glycolytiques dans la fraction mitochondriale

Les fractions mitochondriales ont été purifiées à partir de cellules HepG2 et de levure, comme décrit dans la **Publication 2**. Pour calculer la quantité de protéines associées à la fraction mitochondriale par rapport à la quantité totale dans la cellule, le surnageant post-mitochondrial (obtenu après centrifugation des mitochondries à vitesse élevée) a été utilisé.

L'activité des enzymes de la glycolyse a été mesurée par un essai spectrophotométrique basé sur la formation/oxydation de NAD(H) ou NADP(H). Si nécessaire, la réaction enzymatique a été couplée à la réaction suivante ou précédente de la chaîne glycolytique (Bergmeyer H.U., 1974), (Wu and Racker, 1959). L'absorbance du NAD/NADP a été mesurée à 340 nm, en déduisant l'absorbance de base d'un contrôle sans substrat. Chaque mesure a été répétée trois fois, avec des quantités de protéines mitochondriales ou cytoplasmiques différentes. L'activité enzymatique est exprimées en nmoles NADH/ NADPH*min⁻¹ formées ou oxydées pendant l'essai. Les conditions réactionnelles sont décrites dans le tableau II.

Pour estimer le rendement de purification des mitochondries et le degré de contamination cytoplasmique dans les préparations mitochondriales, nous avons déterminé l'activité de trois enzymes témoins : l'alcool déshydrogénase comme marqueur cytoplasmique, la cytochrome c oxydase (membrane interne) et la citrate synthase (matrice) comme marqueurs mitochondriaux. L'activité de l'alcool déshydrogénase a été mesurée d'après la méthode de (Modig et al., 2002). L'activité citrate synthase a été mesurée comme décrit dans (Faloona and Srere, 1969). L'activité cytochrome c oxydase est définie sous forme consommation d'oxygène par 10-100 µg de protéines mitochondriales ou cytosoliques, en présence d'acide ascorbique (5 mM), 05% (p/v) Triton X-100, cytochrome c (25 µm) dans 20 mM KH₂PO₄, 0.2 M mannitol, 100 mM TES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl₂ et 0.1% (p/v)

albumine de sérum de bœuf (Sweetlove et al., 2002). Une électrode de type Clark a été utilisée pour mesurer la consommation d'oxygène.

Tableau II. Conditions réactionnelles pour mesurer l'activité des enzymes glycolytiques.

Enzyme	Composants de la réaction	Concentration	Enzyme	Composants de la réaction	Concentration	
Alcohol dehydrogenase	MOPS pH 7.0	50m	Glucoso-6-phosphate isomerase	glycylglycine pH 8.5	75mM	
	ADP	1mM		MgCl ₂	10mM	
Aldolase	KCl	100mM		NAD	0.5mM	
	lactate DH	6U		G6PDH	0.5U	
	MgCl ₂	10mM	Fructose-6-Phosphate	10mM		
	NADH	0.15mM	HEPES pH 7.6	100mM		
	Phosphoenolpyruvate	5mM		EDTA	1mM	
	HEPES pH 7.7	40mM		MgSO ₄	2mM	
	NADH	0.3mM		NADH	0.3mM	
	Glycerol 3-phosphate DH	1.72U		PGA	6.5mM	
	TPI	5U		GAPDH	3.32U	
	Fructose-1,6-biphosphate	5mM		ATP	1mM	
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	HEPES pH 8.0	100mM		Tris pH 7.6	60mM	
	EDTA	1mM	MgSO ₄		4mM	
	NADH	0.3mM	ADP		2.3mM	
	MgSO ₄	8mM	NADH		0.3mM	
	DTT	2mM	enolase		0.92U	
	glyceraldehyde-3-phosphate	6mM	pyruvate kinase		3U	
	PGK	4U	lactate DH		6U	
	ATP	2mM	glyceraldehyde-3-phosphate		3mM	
Hexokinase	HEPES pH 7.5	30mM	3-phospho-glycerate kinase	MOPS pH 7.0	50m	
	MgCl ₂	2mM		KCl	10mM	
	EDTA	0.6mM		MgCl ₂	10mM	
	Pyruvate Kinase	KCl	9mM	NADH	0.15mM	
				Phosphoenolpyruvate	5mM	
		NAD	1mM	lactate DH	6U	
		ATP	1mM	ADP	1mM	
		Glucose-6phosphate-DH	1U	Triosphosphate isomerase	HEPES pH 8.0	100mM
		Glucose	2mM		EDTA	5mM
Phosphofructokinase		Tris pH 8.0	100mM		NADH	0.2mM
		MgCl ₂	5mM		glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1U
	Fructose-6-Phosphate	5mM	Glyceraldehyde-3-phosphate	1.5mM		
	NADH	0.1mM	DH - dehydrogenase GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase PGK - 3-phosphoglycerate kinase TPI - trioso phosphate isomerase			
	Aldolase	1U				
	Glycerol-dehydrogenase	1.376U				
	TPI	2.52U				
ATP	1mM					

7. Isolement de complexes protéiques mitochondriaux par électrophorèse dans des conditions natives

Les complexes mitochondriaux ont été séparés par électrophorèse dans des conditions natives BN-PAGE (Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis), selon le protocole décrit par (Schagger et al., 1994), (Brookes et al., 2002). Pour cela, 500 µg de protéines mitochondriales sont solubilisées dans le tampon de lyse : 750 mM acide aminocaproïque, (ACA), 50 mM Bis-Tris, contenant comme détergent soit du Triton X-100, soit du Nonidet-P40, soit du n-dodecyl-β-D-maltoside, soit de la digitonine (rapport détergent : protéine 1:1, v/p), pendant 45 min sur de la glace avec une homogénéisation douce par pipetage. Les membranes et les composants non solubilisés sont enlevés par centrifugation (30 min, 60,000 xg) et le surnageant est resuspendu dans 5% p/v de Coomassie Brilliant blue G-250 (Serva) dans 500 mM ACA et les protéines sont séparées sur un gel en gradient 5-10% de polyacrylamide. Le gel contient 500 mM ACA et 50 mM BisTris. Le tampon de l'anode est du 50 mM BisTris. Le tampon de la cathode est du 50 mM tricine, 15 mM BisTris et 0.02% Serva Bleu G-250 pendant la première heure d'électrophorèse, puis est échangé contre le même tampon avec 0.002% de bleu de Serva. Comme marqueurs de poids moléculaires, nous avons utilisé le kit de calibration "High Molecular weight" de Amersham Pharmacia Biotech (USA). Pour l'électrophorèse en deuxième dimension sur gel 10% PAA-SDS, une bande du gel bleu natif est découpée, traitée dans du 1M Tris pH 6.8, 10% SDS, 1% β-mercaptoéthanol pendant 30 min à la température ambiante pour dénaturer les protéines, et déposée sur le gel SDS.

Pour l'immunodétection des protéines, après la 1^{ère} dimension BN-PAGE (suivie d'une dénaturation pendant 2h) ou après la 2^{ème} dimension BN/SDS-PAGE, les protéines sont électro-transférées sur une membrane PVDF Immobilon-P (Amersham) dans 4 mM Tris, 32 mM glycine, 0.01% SDS, 20% méthanol pendant 12h à 4°C, sous 200 mA. La présence d'enzymes glycolytiques dans les complexes séparés a été visualisée par détection Western avec des anticorps anti-α-énolase (C-19:sc-7455, Santa Cruz Biotechnology) ou anti-aldolase (C-16: sc-12061, Santa Cruz Biotechnology). Comme anticorps secondaire, des IgG anti-chèvre (Calbiochem, Merck) ont été utilisées.

8. Immunoprécipitation d'un complexe mitochondrial contenant l'énolase

Les protéines mitochondriales (1 mg) sont solubilisées par du Triton X-100 dans 750 mM ACA (ratio détergent : protéines 1:1, v/p) comme décrit ci-dessus (§ 7), en présence de 1

mM PMSF et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases ("Complete" EDTA free; Roche). Après centrifugation (10 min, 60,000g), le surnageant est pré-clarifié par incubation sous rotation durant 1h à 4 °C avec 50% de billes de protein-A Sepharose (CL 4-B Fast Flow, Amersham Biosciences). Le surnageant obtenu après centrifugation (20 sec à 12,000g) est incubé durant 1h à 4°C avec les anticorps anti-énolase, puis mélangé avec les billes de protein-A Sepharose, et l'incubation est poursuivie pendant 1h à 4°C. Comme témoins, des immunoprécipitations sans anticorps ou avec les anticorps anti-chèvre ont été réalisées. Les complexes immobilisés sur les billes de protein-A Sepharose sont lavés à 4°C, trois fois avec le tampon de lyse et une fois avec du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. Les protéines sont récupérées par chauffage durant 5 min à 95°C dans le tampon de charge de Laemmli, puis séparées par électrophorèse sur gel 10% PAGE-SDS et colorées au nitrate d'argent (Shevchenko et al., 1996). Après transfert électrophorétique sur membrane, les protéines éluées du complexe ont été immunodétectées avec des anticorps anti-énolase, anti-aldolase, anti- préMsk1p et anti-porine mitochondriale. D'autre part, les bandes de protéines ont été découpées du gel et analysées par spectrométrie de masse.

9. Identification de protéine par spectrométrie de masse

Les bandes protéiques découpées du gel sont décolorées par traitement au ferricyanure de potassium à 0.2% dans 0.02% de thiosulfate de sodium, puis rincées à l'eau bidistillée. Les protéines sont digérées dans le gel comme décrit par (Rabilloud et al., 2001). Identification de protéine par spectrométrie de masse a été réalisé par C. Lemaitre-Guillier (Plateforme Protéomique Esplanade, IBMC, Strasbourg) sur un appareillage BIFLEX III™ MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Allemagne).

10. Essai d'activité protéolytique de protéasome.

10.1. Obtention d'un extrait postmitochondrial de protéines cytosoliques

Les protéines cytosoliques totales sont préparées à partir de 10 ml d'une culture fraîche de *S. cerevisiae* ($A_{600nm} \sim 0.6-0.8$). Ils correspondent à le surnageant postmitochondrial obtenu après la deuxième centrifugation à la vitesse haute comme décrit dans la **Publication 2**. Les protéines cytosoliques obtenues de cette manière peuvent être aliquotées et conservées à -20°C pendant plusieurs mois sans perdre leur activité.

10.2. Détermination de l'activité protéasique

Pour déterminer l'activité catalytique du protéasome *in vitro*, nous avons mesuré la dégradation d'un substrat synthétique, le N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC ; Sigma), dans les conditions décrites par (Kleinschmidt et al., 1988). Pour la réaction, 10-50 µg de protéines cytosoliques totales sont dilués dans 1ml de 0.1 M Tris-HCl (pH 8.2) et incubés durant 5 min à 30°C. Après addition de 1 µl d'une solution à 10 mM de Suc-LLVY-AMC, l'incubation est poursuivie pendant 5 min à 30°C et la réaction est arrêtée par refroidissement sur de la glace. La quantité de fluorescence formée est déterminée par le spectrophotomètre de fluorescence (Beckman) (excitation à 366 nm, émission à 405 nm). Pour calculer la quantité de substrat hydrolysé, la fluorescence obtenue dans la réaction est comparée à une courbe standard obtenue avec une gamme étalon du substrat Suc-LLVY-AMC dans le même tampon. Une milliunité d'activité protéasique correspond à la dégradation d'1 nmole de substrat dégradé par µg de protéine et par minute 1 min.

11. Les divers.

Les techniques de purification des mitochondries, de marquage et d'importation d'ARNt dans les mitochondrie isolées, ainsi que les méthodes de quantification de l'ARNt importé *in vivo* (hybridation Northern, RT-PCR) ont été mises au point au cours de cette thèse et sont décrites en détail dans la ci-jointe **Publication 2**.

Publication 2

Entelis N, Kolesnikova O, Kazakova H, **Brandina I**, Kamenski P, Martin R P, Tarassov I. (2002) “Import of nuclear-encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications”. *Genetic Engineering: Principles & Methods, Kluwer Academic/Plenum Publishers (U.S.A.), 24, pp.191-215.*

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Entelis N., Kolesnikova O., Kazakova H., **Brandina Irina**, Kamenski P., Martin R.P., Tarassov Ivan.

Import of nuclear-encoded RNAs into yeast and human mitochondria : experimental approaches and possible biomedical applications.

Dans « Genetic engineering : principles & methods », Kluwer Academic/Plenum Publishers (U.S.A.), 24, 191-215 (2003)

Pages 191-215 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est également possible de la consulter dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

RESULTATS

CHAPITRE I. Etude des déterminants d'importation dans la structure de l'ARNt^{Lys}

Publication 3: Kolesnikova O, Entelis N, Kazakova H, Brandina I, Martin R P, Tarassov I. (2002) “Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria: the role of anticodon nucleotides”, *Mitochondrion*, 2, 95-107.

• Introduction

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, seul un des deux ARNt^{Lys} isoaccepteurs codés par l'ADN nucléaire, l'ARNt^{Lys}_{CUU} (appelé tRK1) est importé dans la matrice mitochondriale, alors que l'autre, l'ARNt^{Lys}_{mm⁵s²UUU} (tRK2), ne l'est pas (Martin et al., 1977), (Martin et al., 1979). On peut donc se demander dans quoi réside la sélectivité d'importation de tRK1. Cette sélectivité pourrait résulter des différences de séquence/structure entre ces deux ARNt et/ou des différences dans leur capacité d'interagir avec des facteurs d'importation spécifiques. Nous avons commencé à chercher la réponse à cette question par l'analyse des différences structurales entre l'isoaccepteur importé et l'isoaccepteur non importé.

Le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale (préMsk1p) est incapable d'aminocycler tRK1, mais est capable d'interagir avec sa forme aminocylée et de diriger son importation dans la mitochondrie (Tarassov et al., 1995b). Les travaux sur le rôle de la lysyl-ARNt synthétase cytoplasmique, Krs1p, dans l'importation de tRK1 ont montré que l'aminocyclation de cet ARNt est cruciale pour sa reconnaissance par la préMsk1p et pour son importation mitochondriale.

Il est bien connu que pour plusieurs aminoacyl-ARNt synthétases, y compris la LysRS de *E. coli* (Giege et al., 1993), l'anticodon des ARNt représente une région importante pour leur aminocyclation. Alors il est suggéré que l'anticodon de tRK1 est aussi important pour l'aminocyclation de tRK1 par Krs1. D'autre part, il avait été démontré précédemment dans le laboratoire que le remplacement de l'uridine modifiée (mm⁵s²U) en position du “wobble” de l'anticodon de tRK2 (position 34) par une cytidine confère à ce dernier la capacité d'être importé, *in vitro* et *in vivo* (Entelis et al., 1998). Ce résultat démontre l'importance de cette position comme déterminant d'importation de l'ARNt. Pour étendre cette étude, nous nous sommes proposés de changer systématiquement, par mutagenèse dirigée, les trois positions de

l'anticodon de tRK1 et d'étudier les effets de ces changements sur l'aminacylation et l'importation de l'ARNt *in vitro*. Une telle étude *in vitro* est rendue possible par le fait que les mitochondries isolées sont capables d'importer un transcrit de tRK1 synthétisé *in vitro* (donc, ne contenant pas de nucléosides modifiés) avec une efficacité voisine de celle de l'ARNt naturel (Entelis et al., 1996).

Notre étude sur l'effet de mutations dans l'anticodon de tRK1 sur son import mitochondrial a non seulement été réalisée avec des mitochondries isolées de levure, mais également avec des mitochondries isolées de cellules humaines (HeLa, HepG2). Normalement, les mitochondries humaines n'importent pas d'ARNt *in vivo*, mais l'import d'autres "petits" ARN a été décrite par différents groupes, tels l'ARN de l'endonucléase MRP (Chang and Clayton, 1987), (Doersen et al., 1985), (Li et al., 1994), l'ARN de la RNase P (Puranam and Attardi, 2001), (Kiss and Filipowicz, 1992), (Rossmannith and Karwan, 1998); et ARNr 5S (Magalhaes et al., 1998), (Yoshionari et al., 1994). Cependant, il a été montré dans notre laboratoire que les mitochondries isolées de cellules humaines étaient capables d'importer tRK1 (et des versions mutées dérivant de tRK1 ou tRK2), dans des conditions voisines de celles décrites pour les mitochondries de levure. La fonctionnalité de l'ARNt importé dans la traduction mitochondriale a d'ailleurs ouvert la possibilité d'utiliser la voie de l'import d'ARNt dans les mitochondries humaines comme outil pour développer des modèles de thérapie génique pour des maladies mitochondriales associées à des mutations pathogéniques dans des ARNt mitochondriaux (Kolesnikova et al., 2004).

• Résultats

Pour identifier les déterminants d'importation dans la molécule de tRK1, des transcrits d'ARNt chimériques contenant en partie des séquences de l'isoaccepteur importé (tRK1) et en partie celles de l'isoaccepteur non importé (tRK2) ont été construits. Les versions mutantes ont été systématiquement analysées pour leurs capacités à être aminacylées par la Krs1p et à être importées dans les mitochondries *in vitro*.

1. Des mutations dans l'anticodon de tRK1/2 affectent l'aminacylation par la lysyl-ARNt synthétase cytoplasmique

Pour analyser le rôle de l'anticodon des ARNt^{Lys} dans l'identité d'aminacylation par la Krs1p, nous avons construit des transcrits de tRK1 et de tRK2 avec toutes les substitutions monobasiques possibles dans l'anticodon. Cette étude a révélé que la plupart de ces changements des bases de l'anticodon diminuent le niveau d'aminacylation par Krs1.

La substitution de la base centrale U35 par A ou G a montré l'effet le plus drastique, ce qui suggère que l'uracile dans cette position est l'un des déterminants d'identité principaux pour la Krs1p. Une cytidine dans cette position diminue l'aminacylation par un facteur 10. Un effet similaire (diminution de 5-15 fois) est observé quand la première position de l'anticodon est occupée par une purine ou quand la troisième position (U) est remplacée l'une des trois autres bases. Ces résultats démontrent que l'uridine en position 35 de l'ARNt^{Lys} est cruciale pour son aminacylation par la Krs1p, alors que les positions 34 et 36 paraissent être moins importantes.

2. Des mutations dans l'anticodon de tRK1/2 affectent moins leur interaction avec le précurseur de la lysyl-ARNt synthetase mitochondriale

La préMsk1p a été identifiée comme étant un facteur essentiel pour l'importation de tRK1 dans l'organite (Tarassov et al., 1995b), ce qui implique que sa capacité d'interagir avec l'ARNt importé est cruciale pour ce processus. Contrairement à un effet important sur l'aminacylation par Krs1p, les différentes substitutions dans l'anticodon de tRK1/2 ont un effet beaucoup moins prononcé sur leur affinité pour la préMsk1p. En fait, seul le remplacement de la première position par une guanosine cause une baisse importante de l'affinité pour la préMsk1p (>90 % par rapport à tRK1 sauvage). Tous les autres remplacements aboutissent à une baisse moindre (entre 20 et 80%).

Pour être reconnu par la préMsk1p, tRK1 doit être préalablement aminacylé par la Krs1p, tandis que sa forme déacylée n'est pas reconnue. Pour les versions de tRK1 avec des mutations dans l'anticodon, nous n'avons pas observé de relation directe entre leur capacité d'être aminacylé par la lysine et leur affinité pour la préMsk1. Cependant, la plupart des versions mutantes interagissaient mieux avec la préMsk1p après leur pré-incubation avec la Krs1p. Par contre, les transcrits tRK1_{G35} et tRK1_{G36} étaient mieux reconnus par la préMsk1p en absence de Krs1p. Enfin, pour les transcrits tRK1_{U34} et tRK1_{C36}, la pré-incubation avec la Krs1p a eu peu ou pas d'effet sur l'affinité pour la préMsk1.

Cette étude a révélée qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'efficacité d'aminacylation par la Krs1p et l'efficacité de formation d'un complexe avec la préMsk1p, pour les transcrits de tRK1 ou tRK2 obtenus *in vitro*. Le fait que certaines mutations qui permettent l'interaction de l'ARNt avec la préMsk1p en absence de Krs1p pourrait s'expliquer par un changement de conformation d'ARNt induit par ces mutations.

Pour la majorité de versions de tRK1 avec des mutations dans l'anticodon, nous avons trouvé que l'efficacité d'importation variait entre 5 et 120% par rapport à tRK1. La seule

version qui n'est pas importée du tout correspond au remplacement C34G. Cette version est également incapable d'interagir avec la préMsk1p.

3. Des versions d'ARNt^{Lys} misacylées ou deacylées peuvent être importées

Pour expliquer le fait que l'aminacylation de tRK1 est nécessaire pour sa reconnaissance par la préMsk1p, nous avons proposé l'hypothèse que l'aminacylation de tRK1 induisait un changement conformationnel de l'ARNt lui permettant d'être reconnu par la préMsk1, et donc d'être importé (Tarassov et al, 1995, Entelis et al, 1998). Le travail présenté ici montre que certaines versions mutantes ayant perdu la capacité d'être aminoacylées de façon efficace par la Krs1 restent néanmoins capables de se lier à la préMsk1 et d'être importé *in vitro*. Pour mieux cerner la relation entre l'importation de ces versions mutées d'ARNt^{Lys} et leur état d'aminacylation, nous les avons exprimé dans la levure dans un vecteur centromérique et déterminé leurs niveaux d'expression, d'aminacylation et d'importation *in vivo*.

Dans plusieurs cas, il s'est en fait avéré que ces versions mutées étaient importées sous une forme misacylée. Par exemple, nous avons démontré qu'un mutant de tRK1 contenant un anticodon CAU (tRK1_{CAU}), complémentaire au codon AUG de la méthionine, était aminoacylé par la MetRS et importé sous forme méthionylée, *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, une version de tRK2, contenant un anticodon CUA (complémentaire au codon-stop *ambre*) et deux mutations supplémentaires dans le bras accepteur (G3:U70), introduisant un déterminant fort pour l'aminacylation par l'AlaRS, est reconnue par la préMsk1 sous sa forme alanylée et est importée. Ces résultats démontrent que si l'aminacylation est un facteur important pour l'importation de l'ARNt, la nature de l'acide aminé fixé sur l'ARNt est moins cruciale. Ceci permet donc d'importer dans les mitochondries des ARNt ayant des spécificités d'aminacylation altérées.

4. Des versions d'ARNt^{Lys} de levure peuvent être importées dans les mitochondries humaines isolées

L'analyse de l'importation de versions mutées de tRK1 ou tRK2 dans les mitochondries humaines isolées a donné des résultats similaires à ceux obtenus avec les mitochondries de levure. Toutes les versions d'ARNt^{Lys} qui ne sont pas importées dans les mitochondries de levure ne le sont pas non plus dans les mitochondries humaines. D'autre part, nous avons montré que les facteurs cytosoliques isolés de cellules humaines étaient interchangeable avec ceux de levure. Ce résultat est remarquable, d'autant plus que les mitochondries humaines n'importent pas d'ARNt du cytoplasme *in vivo*.

- **Conclusions et perspectives**

Nos résultats montrent que le système d'importation d'ARNt dans les mitochondries est flexible. Le changement d'un seul nucléotide dans l'ARNt importé peut changer l'efficacité de son importation ou même l'arrêter complètement, et *vice versa* pour un ARNt non-importé. Pour certaines versions d'ARNt^{Lys}, l'aminacylation est nécessaire alors que pour d'autres elle est dispensable. De plus, la nature de l'acide aminé fixé sur l'ARNt peut être changée (misacylation) sans gêner l'importation. Cette flexibilité du système d'importation d'ARNt dans les mitochondries de levure et de cellules humaines est exploitée dans notre laboratoire pour développer des systèmes de transfert d'ARN in vivo dans les mitochondries de cellules humaines en culture. Récemment, notre laboratoire a démontré que les défauts associés à la mutation A8344G dans l'ARNt^{Lys} mitochondrial humain (syndrome MERRF) pouvaient être compensés par l'expression hétérologue de variants d'ARNt^{Lys} cytosoliques de levure dans des cellules cybrides en culture (Kolesnikova et al., 2004).

Publication 3

Kolesnikova O, Entelis N, Kazakova H, Brandina I, Martin R P, Tarassov I. (2002)
“Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria: the role of anticodon nucleotides”,
Mitochondrion, 2, 95-107.

[signallement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

O. Kolesnikova, N. Entelis, H. Kazakova, I. **Brandina**, R.P. Martin, I. Tarassov.

Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria : the role of anticodon nucleotides.

Mitochondrion 2, 95-107 (2002)

Pages 95-107 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur /

[http://dx.doi.org/10.1016/S1567-7249\(02\)00013-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-7249(02)00013-2)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

CHAPITRE II. L'énolase, une enzyme glycolytique, est un facteur d'importation mitochondriale d'ARNt chez la levure

II.1. Identification de l'énolase comme facteur essentiel pour l'importation d'ARNt^{Lys} dans les mitochondries de levure

(**Publication 4:** Entelis N, Brandina I, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I. “A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a co-factor of tRNA targeting towards mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genes & Development* 2006, sous presse).

• Introduction

La spécificité d'importation de l'ARNt^{Lys}_{CUU} (tRK1) dans les mitochondries de levure est non seulement déterminée par des déterminants d'importation au sein de sa structure mais également par des facteurs protéiques d'importation cytosoliques interagissant avec l'ARNt importé. Il avait été démontré précédemment dans notre laboratoire que le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale était essentielle pour diriger l'import mitochondrial de tRK1 (Tarassov et al, 1995). Cependant, la présence de préMsk1 recombinante (produite dans *E. coli*) n'est pas suffisante pour l'import de tRK1 dans les mitochondries isolées de levure, ce qui suppose l'existence d'autres facteurs protéiques cytosoliques impliqués dans ce processus.

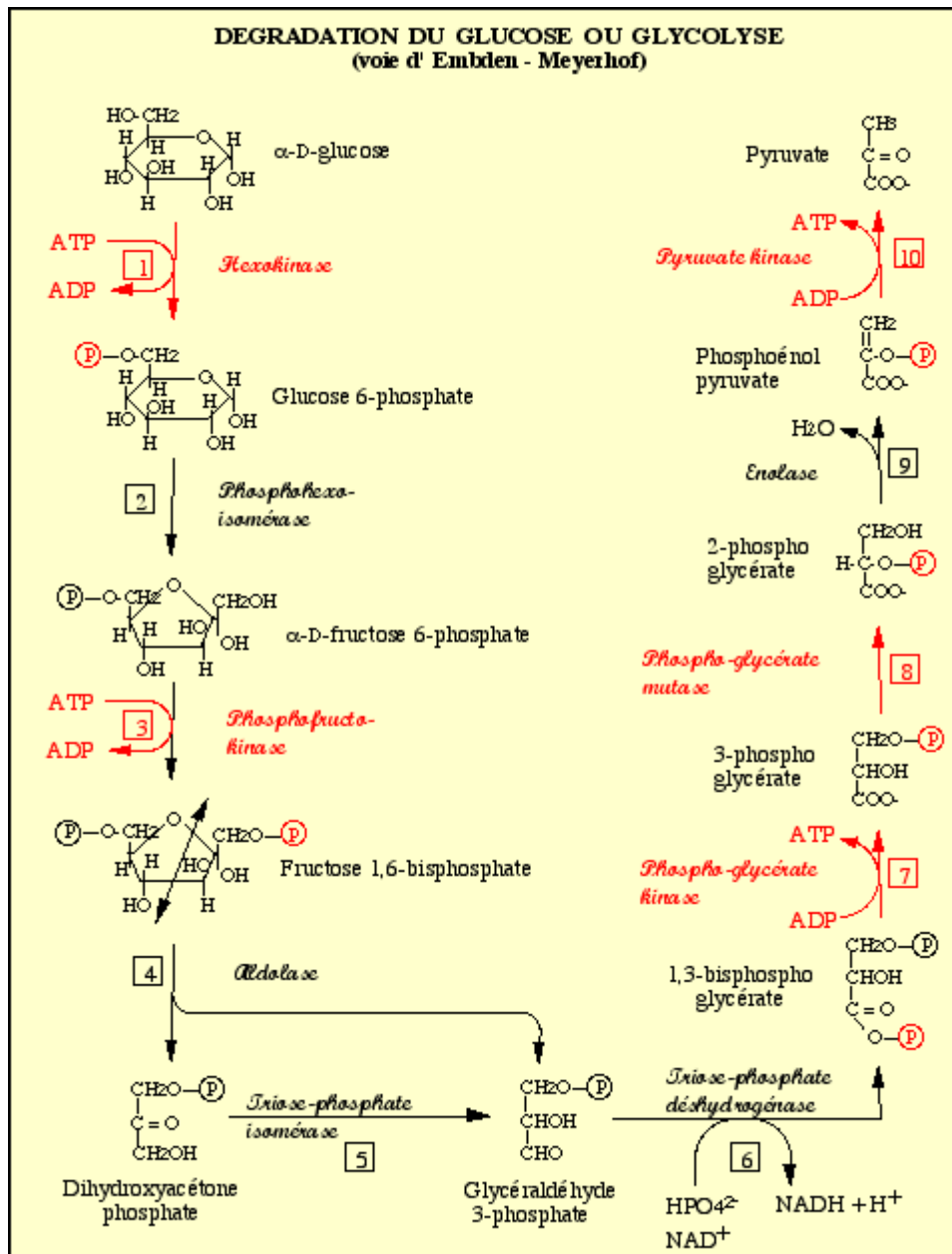
L'objectif principal de mes travaux de thèse était d'identifier de nouveaux facteurs participant à l'importation d'ARNt dans les mitochondries de levure et d'étudier leurs rôles dans ce processus. Dans cette optique, nous avons dans un premier temps utilisé une approche biochimique consistant à séparer les protéines cytosoliques par différents types de fractionnements chromatographiques et à tester leur capacité à diriger l'import de tRK1 dans des mitochondries isolées en présence de préMsk1p recombinante. Cela a permis d'identifier un deuxième facteur d'importation essentiel qui, de façon inattendue, s'est avéré être l'énolase, une enzyme glycolytique.

• L'enzyme glycolytique – émolase - chez la levure

L'énolase est une enzyme glycolytique catalysant la transformation de 2-phosphoglycerate en phosphoénolpyruvate, correspondant à l'avant-dernière réaction de la glycolyse (figure 4). Cette enzyme très abondante dans les cellules et facile à purifier, a été l'une des premières à être caractérisée au début du 20^{ième} siècle. Ses caractéristiques

biochimiques et enzymatiques, sa structure et la régulation de son activité et de son expression ont été étudiés en détail (pour une revue, voir (Reed et al., 1996)).

Figure 4. Le schéma de glycolyse (extrait de Biomedica : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/>)



La levure contient deux isoformes d'énolase, Eno1p et Eno2p, qui ne diffèrent que par 20 acides aminés, mais ayant des points isoélectriques différents (Eno1p : $\text{pI}=6.6$; Eno2 : $\text{pI}=5.9$). Dans la cellule, l'énolase fonctionne comme un dimère. L'expression des isoformes d'énolase dépend de la source de carbone du milieu de culture de la levure (McAlister and Holland, 1982) : sur le milieu fermentescible (glucose), Eno1p est 20 fois plus abondante que

Eno2p, mais sur milieu respiratoire (éthanol, glycérol, ou lactate), les quantités des deux isozymes sont équivalentes. La transcription d'*ENO1* est réprimée en présence de glucose, mais induite en phase stationnaire ou dans des conditions des stress (thermique ou osmotique). Par contre, la transcription d'*ENO2* est réprimée en phase stationnaire et induite en présence de glucose (Entian et al., 1987).

Figure 5.

(A). Comparaison de structure primaire de deux isoformes d'énolase, Eno1p et Eno2p de *S. cerevisiae*. Les différences de séquence entre les deux isozymes sont indiquées en couleur.
 (B). Modèle de structure tridimensionnelle de l'énolase 1 (Wedekind et al., 1994).

```

ENO1 : 1  MAVSKVYARSVYDSRGNPTVEVELTTEKGVFRSIVPSGASTGVHEALEMRDGDKSKWMGK
ENO2 : 1  MAVSKVYARSVYDSRGNPTVEVELTTEKGVFRSIVPSGASTGVHEALEMRDEDKSKWMGK
*****

ENO1 : 61  GVLHAVKNVNDVIAPAFVKANIDVKDQKAVDDFLISLDGTANKSKLGANAILGVSLAASR
ENO2 : 61  GVMNAVNNVNNVIAAAFVKANLDVKDQKAVDDFLLSLDGTANKSKLGANAILGVSMAAAR
**  **  ***  ***  *****  *****  *****  *****  *****  **  *

ENO1 : 121  AAAAEKNVPLYKHLADLSKSKTSPYVLPVPFLNVLNGGSHAGGALALQEFMIAPTGAKTF
ENO2 : 121  AAAAEKNVPLYQHLADLSKSKTSPYVLPVPFLNVLNGGSHAGGALALQEFMIAPTGAKTF
*****

ENO1 : 181  AEALRIGSEVYHNLKSLTKKRYGASAGNVGDEGGVAPNIQTAEEALDLIVDAIKAAGHDG
ENO2 : 181  AEAMRIGSEVYHNLKSLTKKRYGASAGNVGDEGGVAPNIQTAEEALDLIVDAIKAAGHDG
***  *****

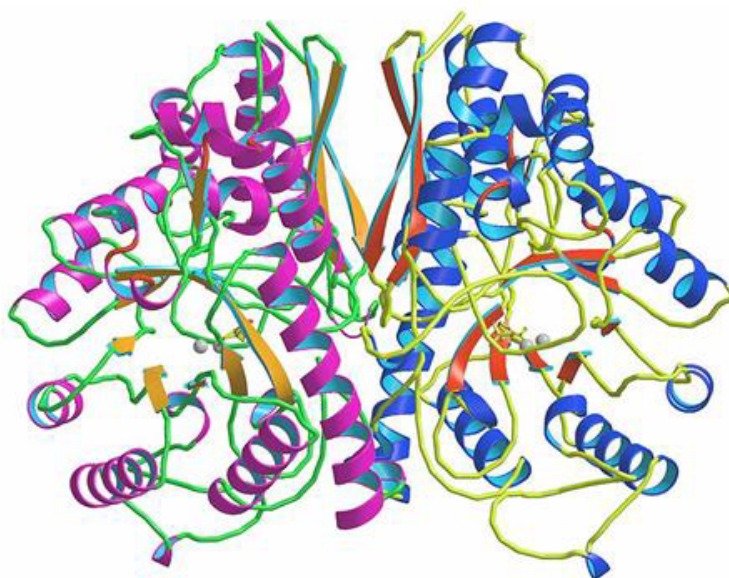
ENO1 : 241  KIKIGLDCASSEFFKDGKYDLDFKNPNSDKSKWLTGPQLADLYHSLMKRYPIVSIEDPFA
ENO2 : 241  KVKIGLDCASSEFFKDGKYDLDFKNPESDKSKWLTGVELADMYHSLMKRYPIVSIEDPFA
*  *****  *****  ***  *****

ENO1 : 301  EDDWEAWSHFFKTAGIQIVADDLTVTNPKRIATAIEKKAADALLKVNQIGTLSESIKAA
ENO2 : 301  EDDWEAWSHFFKTAGIQIVADDLTVTNPARIATAIEKKAADALLKVNQIGTLSESIKAA
*****

ENO1 : 361  QDSFAAGWGVMSHRSGETEDTFIADLVVGLRTGQIKTGAPARSERLAKLNQLLRIEEEL
ENO2 : 361  QDSFAANWGVMSHRSGETEDTFIADLVVGLRTGQIKTGAPARSERLAKLNQLLRIEEEL
*****

ENO1 : 421  GDNAVFAGENFHHGDKL
ENO2 : 421  GDKAVYAGENFHHGDKL
**  **  *****
  
```

B



- **Résultats**

1. L'énolase est indispensable pour l'importation de tRK1 dans les mitochondries de levure

Nous avons montré qu'une fraction protéique, purifiée à partir de protéines cytosoliques totales de levure par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (50-60% de saturation), suivie de chromatographies par échange d'ions sur colonne de SP-Sepharose et Mono-Q cellulose, est capable de diriger l'import de tRK1 dans les mitochondries isolées, en présence de préMsk1p recombinante. Cette fraction contient une protéine de 49 kDa interagissant avec tRK1 marqué, en présence de préMsk1p. Cette protéine a été identifiée par analyse MALDI-TOF comme étant l'énolase. L'identité de l'énolase comme facteur d'importation de tRK1 a été confirmée par le fait que de l'énolase recombinante (Eno2p ou, à une moindre mesure, Eno1p), produite dans *E. coli*, est capable de diriger l'import de tRK1 dans le système d'importation *in vitro*, en présence de préMsk1p recombinante. L'utilisation des versions mutées d'Eno2p ayant une activité catalytique réduite, a montré que sa capacité de diriger l'import de tRK1 dans les mitochondries n'est pas dépendante de son activité enzymatique.

D'autre part, nous avons mis en évidence une interaction spécifique entre Eno2p et tRK1 par la méthode du triple hybride. Dans les mêmes conditions, aucune interaction d'Eno1p avec tRK1 n'a été détectée. Cette observation est en accord avec les résultats d'importation *in vitro*, où Eno1p s'est révélée être moins efficace que Eno2p. De plus, par des expériences de gel-retardation avec tRK1 marqué, nous avons montré que la présence d'énolase favorisait l'interaction de tRK1 avec la préMsk1p.

2. Eno2p est partiellement localisée à la surface des mitochondries

Nous avons montré qu'une partie du "pool" cellulaire d'énolase était fortement associée à la membrane mitochondriale externe, et ceci par trois approches indépendantes :

- par fractionnement des sous-compartiments mitochondriaux et visualisation des protéines associées par immunodétection avec des anticorps anti-énolase et des anticorps contre des protéines spécifiques de chacun de ces sous-compartiments.
- par des expériences d'importation *in vitro* d'énolase synthétisée *in vitro* dans un système de transcription-traduction couplé, suivies du fractionnement des protéines mitochondriales après extraction au NaCl ou au Na₂CO₃.
- par localisation d'une protéine de fusion Eno2-YFP dans les mitochondries *in vivo* et microscopie confocale.

Enfin, nous avons montré que Eno2p pouvait interagir de façon spécifique avec le PI3P (immobilisé sur membrane), un phosphoinositide présent dans la membrane mitochondriale externe.

3. La délétion des gènes d'énolase cause l'arrêt de l'importation de tRK1 *in vivo* et une baisse de la synthèse protéique mitochondriale

Nous avons montré que la délétion simultanée des deux gènes d'énolase (*ENO1* et *ENO2*) avait pour conséquence (i) une perte de l'activité enzymatique de l'énolase, (ii) une forte diminution de la consommation d'oxygène, (iii) un phénotype de croissance thermosensible sur milieu respiratoire et (iv) une baisse importante de la quantité de tRK1 présente dans la matrice mitochondriale. Le phénotype de croissance thermosensible sur milieu respiratoire et le niveau d'importation de tRK1 sont restaurés après transformation du double mutant avec un plasmide exprimant le gène *ENO2*. Par contre, un plasmide exprimant *ENO1* ne permet pas de restaurer ces deux défauts, même si l'activité de l'enzyme glycolytique est rétablie. Enfin, l'expression de mutants d'Eno2p ayant une activité enzymatique fortement diminuée permet de restaurer le niveau d'import de tRK1 et la respiration, même si l'activité enzymatique n'est pas restaurée. Ces résultats démontrent un rôle prédominant pour l'isoforme Eno2p dans l'import de tRK1 et permettent de dissocier l'activité glycolytique de cette enzyme de son rôle dans l'import de tRK1.

D'autre part, la synthèse protéique mitochondriale est fortement perturbée dans le mutant *eno1 eno2*, et ce défaut est rétabli par l'expression plasmide-dépendante de Eno2p ou de versions d'Eno2p ayant une activité glycolytique fortement diminuée, en même temps que le niveau d'import de tRK1 est rétabli.

4. La fraction soluble du pool d'énolase est nécessaire pour l'importation de tRK1

Pour déterminer si c'est la fraction soluble du pool d'énolase ou la fraction associée aux mitochondries qui intervient dans l'import de tRK1, nous avons pré-incubé soit les mitochondries isolées, soit les protéines cytosoliques solubles avec des anticorps anti-énolase. Le traitement des organites avec les anticorps n'a eu aucun effet sur l'import de tRK1 *in vitro*, alors que la déplétion de l'énolase dans les protéines cytosoliques solubles a fortement compromis leur capacité de diriger l'import de tRK1. Ce résultat implique que c'est la fraction d'énolase soluble qui intervient dans l'adressage mitochondrial de tRK1.

D'autre part, nous avons montré que les ARNm d'Eno1/2p sont associés à la fraction des polysomes cytosoliques, alors que le messenger de la préMsk1p est surtout trouvé dans des polysomes associés à la surface de la mitochondrie.

Ces résultats sont à la base du modèle que nous proposons pour le rôle de l'énolase dans l'import de tRK1 (voir ci-après).

- **Conclusion et discussion**

Nos résultats démontrent une nouvelle fonction pour l'énolase, indépendante de son activité dans la glycolyse. Cette découverte du rôle de l'énolase dans le transport de tRK1 dans les mitochondries ne constitue pas le premier exemple de fonction additionnelle (et non conventionnelle) pour une enzyme de la glycolyse. En effet, la lactate dehydrogenase a une activité ADN-helicase et est impliquée dans le turn-over d'ARNm, la glyceraldehyde-3-phosphodehydrogénase a une activité uracile-DNA glycosylase intervenant dans la régulation transcriptionnelle, et la phosphoglucose isomerase est sécrétée par les cellules de mammifères et joue le rôle de neuroleukine. Pour ce qui est de l'énolase, des fonctions additionnelles ont également été décrites chez divers organismes: chez *E.coli*, elle fait partie du dégradosome intervenant dans la dégradation des ARN; chez la levure, elle a été identifiée comme une protéine de choc thermique, Hsp48, associée à la paroi cellulaire; chez de nombreux eucaryotes, elle est présente à la surface cellulaire et agit comme récepteur du plasminogène; enfin, chez les mammifères, elle participe à la régulation transcriptionnelle en réponse aux chocs hypoxique et thermique.

Pour ce concerne le rôle de l'énolase, et plus spécifiquement d'Eno2p, dans l'import mitochondrial de tRK1 chez la levure, nos résultats nous conduisent à proposer le modèle suivant (cf. Fig. 7 de la publication) : l'énolase synthétisée sur les polysomes cytosoliques, fixe la forme aminoacylée de tRK1 dans le cytoplasme et lui sert de véhicule pour diriger l'ARNt vers la périphérie des mitochondries, où est localisée la préMsk1p ; cette interaction entre tRK1 et l'énolase provoquerait un changement conformationnel chez l'ARNt, facilitant et stabilisant ainsi son interaction avec la préMsk1p, qui servirait ensuite de transporteur pour sa translocation mitochondriale. Ce modèle suppose donc deux fonctions pour l'énolase dans l'import de tRK1 : un rôle de **véhicule** pour son adressage mitochondrial et un rôle de **chaperon** d'ARN pour son interaction avec la préMsk1p.

A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a co-factor of tRNA targeting towards mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*

Nina Entelis*¹, Irina Brandina*^{1,2}, Piotr Kamenski^{1,2}, Igor A. Krasheninnikov², Robert P. Martin¹ and Ivan Tarassov¹⁺

¹ UMR N°7156, CNRS – Université Louis Pasteur, Department "Molecular and Cellular Genetics", 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France;

² Department of Molecular Biology, Biology Faculty of Moscow State University, 119992 Moscow, Russia.

⁺ Corresponding author: Tarassov, Ivan A., UMR N°7156 CNRS - ULP, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France
Tél. +33 3 90 24 14 81
Fax: +33 3 88 41 70 70
E-mail: i.tarassov@ibmc.u-strasbg.fr

* These authors contributed equally to this work

Running head: Enolase and tRNA import

Keywords: mitochondria / targeting / transfer RNA / enolase / glycolysis / yeast

Characters count: 63,223

Abstract

In many organisms, mitochondria import nuclear DNA - encoded small RNAs. In yeast *Saccharomyces cerevisiae*, one out of two cytoplasmic isoacceptor tRNAs^{Lys} is partially addressed into the organelle. Mitochondrial targeting of this tRNA was shown to depend on interaction with the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase, preMsk1p. However, preMsk1p alone was unable to direct tRNA targeting, suggesting the existence of additional protein factor(s). Here, we identify the glycolytic enzyme, enolase, as such a factor. We demonstrate that recombinant enolase and preMSK1p are sufficient to direct tRNA import *in vitro* and that depletion of enolase inhibits tRNA import *in vivo*. Enzymatic and tRNA targeting functions of enolase appear to be independent. Three newly characterized properties of the enolase can be related to its novel function: (1) specific affinity to the imported tRNA, (2) ability to facilitate formation of the complex between preMsk1p and the imported tRNA; (3) partial targeting towards the mitochondrial outer membrane. We propose a model suggesting that the cell exploits mitochondrial targeting of the enolase in order to address the tRNA towards peri-mitochondrially synthesized preMsk1p. Our results indicate to an alternative molecular chaperone function of glycolytic enzyme enolase in tRNA mitochondrial targeting.

Introduction

A double lipid-bilayer membrane protects the mitochondrial matrix, the inner compartment of the mitochondria, where mtDNA replication, transcription and mRNA translation occur. During a permanent crosstalk between nucleo-cytoplasmic and mitochondrial compartments of the cell, this barrier is crossed by a variety of molecules using controlled and, for the majority of cases, active mechanisms involving multi-protein complexes located at the

mitochondrial outer-, inner membrane, or at both (Scheffler 2001). Mitochondrial DNA codes for only a small subset of organellar macromolecules, while the majority of proteins and some small RNAs are expressed from nuclear genes and targeted into mitochondria (Neupert 1997; Entelis *et al.* 2001b).

RNA import, far less understood than the protein mitochondrial import, may now be considered as quasi-universal. Import of nuclear-encoded RNA into mitochondria has been identified in protozoans, fungi, animals and plants, however the type and number of imported RNAs vary from species to species (Schneider and Marechal-Drouard 2000; Entelis *et al.* 2001b). Among extensively studied cases, it appears that RNA import mechanisms are similar in human (5S rRNA) and yeast (tRNA) but differ from those operating in trypanosomes and plants (Mahapatra and Adhya 1996; Entelis *et al.* 2001a; Delage *et al.* 2003). One notable difference concerns the need of soluble (cytosolic) proteins to achieve the import. In fact, in our experimental systems with yeast and human isolated mitochondria, the presence of such factors was essential, while for plant or trypanosomal mitochondria the presence of soluble factors was dispensable in the *in vitro* assay. On the other hand, numerous indirect data favour the idea that such factors may be recruited *in vivo* to provide the selectivity of RNA targeting in plant or protozoan mitochondria (Dietrich *et al.* 1996; Rusconi and Cech 1996a; Rusconi and Cech 1996b; Schneider and Marechal-Drouard 2000). Although these pathways are diverse, their physiological significance and molecular mechanisms remain largely unknown.

In the yeast *S. cerevisiae*, two nuclear DNA-encoded tRNAs were reported as mitochondrially targeted, tRNA^{Gln} (Rinehart *et al.* 2005) and tRNA^{Lys}_{CUU} (further referred to as tRK1) (Martin *et al.* 1979), whose import appears to proceed by different mechanisms. Mitochondrial functions of tRK1 are not completely clear, although our previous results demonstrated that its mutant versions are functional in mitochondrial translation, since they are able to suppress a nonsense mutation in mitochondrial DNA-localized gene (Kolesnikova *et al.*

2000). tRK1 import is highly specific, since the second cytosolic tRNA^{Lys}_{UUU} (tRK2) is not imported (Entelis et al. 1998). The mitochondrial targeting process requires interaction of the aminoacylated form of tRK1 with the cytosolic precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase (preMsk1p) (Tarassov et al. 1995a). Our hypothesis suggested that preMsk1p, which is able to recognize aminoacylated tRK1, targets this RNA to the outer mitochondrial membrane and can function as a tRNA mitochondrial carrier. Nevertheless, preMsk1p is not the only protein needed, because alone it was not able to direct the tRK1 import *in vitro*.

Here we present results of a search for other proteins implicated in the tRK1 mitochondrial import process. Unexpectedly, we identified a glycolytic enzyme, enolase, as a factor of tRK1 import. We show that this protein is able to recognise the imported tRNA and favours its binding to preMsk1p prior the import. We also found that this enzyme, responsible for the last but one step of glycolysis, is partially targeted to the outer membrane surface. This mitochondrial targeting, probably aimed to compartmentalize glycolytic reactions, could also be exploited for tRK1 delivery towards the mitochondria. These findings give new insights onto the mechanisms of RNA mitochondrial import and establish a link between two pathways previously thought to be independent.

Results

Identification of enolase as a factor of tRNA mitochondrial import

To search for proteins implicated in tRNA mitochondrial import, a crude protein extract from wild-type yeast strain W303 was separated by differential ammonium sulphate (SA) precipitation. Fractions were tested for their ability to direct the import of tRK1 into isolated mitochondria using 5'-[³²P]-labeled and aminoacylated tRK1 (Fig. 1A). The proteins

precipitated by 30-40% and 40-50% SA, contained a known import factor, preMsk1p (identified by Western analysis, Fig. 1A), and were unable to direct tRK1 mitochondrial import. In contrast, proteins precipitated by 50-60% SA did not contain any detectable preMsk1p though were active in the tRK1 mitochondrial import assay in the presence of recombinant preMsk1p. This protein fraction was subjected to further fractionation by chromatography on Sepharose SP and Mono-Q. One of the MonoQ-retained fractions, Q8, which demonstrated a high yield of import directing activity, still contained several proteins. North-Western analysis revealed a single protein of apparent molecular weight 49 kDa interacting with [³²P]-labeled aminoacylated tRK1 (Fig. 1B). This interaction was specific, since neither tRK2 nor deacylated tRK1 interacted with this protein. The 49 kDa protein was identified by N-terminal sequencing as the glycolytic enzyme, enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase, EC 4.2.1.11).

Yeast cells contain two enolase isoforms: Eno1p encoded by the gene *YGR254w* and Eno2p by *YHR174w*. They differ by 20 out of 437 amino acids and are characterized by different pI (6,6 and 5,9 respectively) and different modes of transcriptional regulation (McAlister and Holland 1982; Pancholi 2001). To demonstrate the participation of enolase in tRK1 import and to compare the import-directing capacities of the two isozymes, we over-expressed Eno1p and Eno2p in *E. coli*. Tag-purified recombinant Eno2p was able to direct tRK1 import *in vitro* in the presence of preMsk1p (Fig. 1C), whereas Eno1p showed a significantly lower import-directing ability (10-20% with respect to Eno2p). No tRK1 import was detected in the absence of preMsk1p. "Mock-import" tests without mitochondria allowed excluding artefactual protection of the tRNA by the recombinant proteins. These experiments demonstrate that Eno1/2p and preMsk1p are sufficient to direct tRK1 import *in vitro* and constitute a minimal tRNA import vehicle.

Determination of recombinant Eno1p and Eno2p enzymatic activities showed very similar specific activities for the two isozymes (53 U/mg for Eno1p and 58 U/mg for Eno2p, comparable to 65 U/mg for commercial baker's yeast enolase). In contrast, their abilities to direct tRK1 import were different, Eno1p being significantly less efficient than Eno2p. This suggests that their participation in glycolysis and in tRK1 import are distinct and unrelated functions. The absence of correlation between two enolase functions was further supported using several mutant versions of Eno2p. It has been previously shown that mutations N207A, H159F and H373F in Eno1p affected its catalytic activity in a differential manner (Brewer et al. 2003). We introduced the same mutations in the Eno2p and found that the recombinant mutant proteins demonstrated indeed reduced enzymatic activity: 13 U/mg (22% of the wild-type protein activity) for the N207A version, 0.6 U/mg (1%) for H373F and 0.2 U/mg (0.3%) for the H159F version. In contrast, the Eno2(N207A)p was as efficient as the wild-type Eno2p in tRK1 import (Fig. 1D). Eno2(H159F)p had completely lost the import directing capacity while Eno2(H373F)p had intermediate import activity (30% versus the wild type Eno2p). It appears therefore that there was no direct relation between the enzymatic enolase activity of and its tRK1 import directing capacity.

To further investigate the mechanism of enolase participation in the tRNA import process, we have measured the affinity of enolase to imported and non-imported tRNAs and studied its intracellular localization.

Eno2p binds to tRK1 and enhances formation of tRK1-preMsk1p complex

The first evidence of RNA-binding properties of enolase was obtained by using the North-Western analysis (Fig. 1B). To verify if tRK1-Eno2p interaction can also occur *in vivo*, we used the three-hybrid system (SenGupta et al. 1996). To this end, two hybrid proteins were

expressed in yeast: the first consisted of the DNA binding domain of LexA fused to the MS2 coat protein, the second contained the Gal4 transcription activation domain fused to either Eno1p or Eno2p (Fig. 2A). The two fusion proteins can be bridged by a bi-functional hybrid RNA molecule containing a fragment of bacteriophage MS2 RNA and tRK1 (or tRK2), providing that the tRNA moiety can interact with enolase. Only tRK1 revealed a positive reaction with Eno2p in the presence of 10 mM 3-amino-triazole (3-AT) in the medium (Fig. 2A), suggesting that enolase has RNA-binding capacity *in vivo*. This interaction proved to be specific since tRK2 (which is not imported) as well as MS2 RNA alone, did not interact with Eno2p. Furthermore, no interaction of tRK1 with Eno1p was detected, even at a lower concentration of 3-AT (2 mM). This was in agreement with our *in vitro* results and suggests that the capacity of Eno1p to direct tRK1 import is significantly lower than that of Eno2p.

Using gel-retardation assay with labeled tRK1 and increasing amounts of recombinant proteins, we observed that aminoacylated tRK1 could form a stable complex with both preMsk1p (Fig. 2B) and Eno2p (Fig. 2C). In both cases, the interaction was tRK1-specific, since neither tRK2, nor deacylated tRK1 did form any complex. Similarly, no complexes were detected between tRK1 and Eno1p (not shown). tRK1 interacted with preMsk1p with an apparent dissociation constant $K_d=180\pm 20$ nM (dimer concentration), comparable well with K_d reported for complexes of lysyl-tRNA synthetases (LysRS) with non-cognate tRNAs (Francin et al. 2002). The affinity of tRK1 to Eno2p (apparent $K_d=2.5\pm 0.2$ μ M) was one order lower than to preMsk1p. When both preMsk1p and Eno2p were present in the mixture, no ternary complex tRK1/preMsk1p-Eno2p was detected (Fig. 2C, left panel). Instead, in the presence of very low preMsk1p concentration, the tRK1/Eno2p complex was rapidly shifted to the tRK1/preMsk1p one. The presence of Eno2p significantly increased the efficiency of tRK1/preMsk1p complex formation (apparent $K_d=40\pm 10$ nM opposed to $K_d=180$ nM in the absence of enolase) (Fig. 2D).

One can therefore conclude that Eno2p could specifically bind the imported tRNA and enhance formation of the complex between this tRNA and its import carrier, preMsk1p.

Eno2p is partially localized on the surface of mitochondria

We have observed that 2 to 7% of the total enolase glycolytic activity was co-purified with mitochondria (not shown). To verify if this co-purification was not artefactual, we analyzed the cellular localization of Eno2p in details (Fig. 3). The submitochondrial localization of enolase was determined using antibodies against proteins of different mitochondrial compartments (Diekert et al. 2001). Proteins of mitochondrial pellets after different treatments of mitochondria were gel-separated and immunodetected (Fig. 3A). The co-purification of enolase with mitochondria was resistant to swelling (hypotonic shock) and to treatment with NaCl or Na₂CO₃, but enolase was completely released from mitochondria by proteinase K treatment. In this respect, enolase behaves similarly to the outer membrane receptor Tom70p.

To further investigate the submitochondrial localization of the Eno1p and Eno2p isozymes, we used an assay of protein import into isolated mitochondria (Diekert et al. 2001; Ryan et al. 2001). For this purpose, [³⁵S]-labeled enolases were incubated with isolated yeast mitochondria in conditions permitting protein import (preMsk1p, an imported mitochondrial protein, was used as a control) (Fig. 3B, C). As expected, preMsk1p was protected from proteinase K degradation and processed. Eno2p was not protected from proteinase K but was partially (10-15% of input) associated with the mitochondrial pellet. Eno1p was also partially co-purified with mitochondria, but to a lower extent (1-2%). The association of enolase with mitochondria was resistant to NaCl treatment and was only partially disrupted by Na₂CO₃.

To investigate if the *in vitro* and mitochondrial fractionation data correlate with the *in vivo* situation, we analysed subcellular localization of Eno2p after expression of the fusion of the *ENO2* gene with YFP by confocal microscopy. As stressed above, only a small portion (<7%) of cellular enolase activity was associated with mitochondria, so it was expected that the most of the protein would be distributed in the cytoplasm. It was indeed the case: we reproducibly observed non-homogenous cytosolic distribution of YFP-Eno2p, while a fraction of enolase co-localized with the mitochondria, which become detectable on the merge image (Fig. 3D). Therefore, *in vivo* and *in vitro* data are not contradictory and support the hypothesis that a portion of the enolase is associated with mitochondria.

Since soluble or peripheral membrane proteins can usually be released from mitochondria by treatment with sodium carbonate in alkaline conditions (Diekert et al. 2001; Ryan et al. 2001), our results indicate that enolase could be anchored in the outer mitochondrial membrane. This anchoring may proceed either by interaction with other proteins or by direct interaction with the lipids of the mitochondrial membrane. Inspection of Eno1/2p amino acid sequences revealed the presence of potential transmembrane domains at positions 33-44 (Pancholi 2001) and 101-130 (Tmap program EMBOSS). To study if enolases possess any affinity to the lipids present in the mitochondrial membranes, we assayed the interaction of [³⁵S]-labeled proteins with a set of membrane-immobilized lipids (Fig. 3E). Indeed, we found that Eno2p (but not Eno1p) has a specific affinity to phosphatidyl-inositol-3-phosphate (PI3P). No interaction with major mitochondrial phospholipids (phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine) were detected (Fig. 3E), as well as with cholesterol or sphingomyelin (not shown).

These results do not provide a definitive proof by which mechanism enolase is anchored in the outer membrane, however they strongly indicate that this protein might be tightly bound

to mitochondrial surface. For Eno2p the affinity to the mitochondrial surface was shown to be at least 10-fold higher than for Eno1p.

Inactivation of the two *S. cerevisiae* ENO genes impairs tRK1 import *in vivo*

To investigate the involvement of the two enolase isoforms in tRK1 import *in vivo*, we analysed yeast strain with deletions of the two *ENO* genes. Double deletion strain was obtained by mating *eno1* and *eno2* haploids and subsequent tetrad analysis and was tested for mitochondrial phenotype (growth on a non-fermentable carbon source), respiration (measurement of oxygen consumption) and for the presence of tRK1 in the mitochondria (Northern hybridization).

The strain double deletant strain *eno1 eno2 (eno1/2)* was characterized by the absence of growth on glucose-containing media and by a poor growth on glycerol at 30°C while, at 37°C, it failed to grow (Fig. 4A). Concomitantly, tRK1 was undetectable in the mitochondria of this strain (Fig. 4B). Glucose-positive growth could be restored by expression of either Eno1p or Eno2p from centromeric plasmids (pE1 or pE2), which correlated with restoration of the enolase enzymatic activity to a nearly wild-type level (Fig. 4A, C).

In contrast, the thermosensitive growth on glycerol of the double deletant was complemented only by plasmid-driven expression of *ENO2* but not of *ENO1*. Likewise, the low level of oxygen consumption of this strain was cured by *ENO2* expression but only partially by *ENO1* expression. Although wild-type levels of enolase enzymatic activity were reached in *eno1/2+pE1* cells, the absence of Eno2p was manifested by a slow growth on glycerol and by a decreased level of oxygen consumption, and this correlated with a low level of imported tRK1 at 30°C. At elevated temperature, strain *eno1/2+pE1* did not grow on glycerol media and was characterized by extremely low level of respiration and by the absence of tRK1 in the

mitochondria (Fig. 4A, B, C). We can conclude that Eno2p is the enolase isoform primarily involved in tRK1 import *in vivo*. In the absence of Eno2p, Eno1p can only partially substitute for the Eno2p function in tRK1 import, and this conclusion stands in line with our *in vitro* data.

To investigate if the reduced tRK1 import was related to the organellar translation, we compared patterns of mitochondrially-synthesized polypeptides in the deletant strains. Non-detectable or very low level of translation was found in organelles from the double deletant *eno1 eno2* cells, while in Eno1p bearing cells, mitochondrial translation was reduced with respect to the wild type cells (Fig. 4D). These data suggest that the imported tRNA has a role in organellar protein synthesis. However, it could also mean that defects in mitochondrial import and translation in *eno1/2* and *eno1/2+pE1* strains were due to secondary defects in respiration. To rule out this possibility, we tested Eno2p with H373F mutation, characterized *in vitro* by a very low enzymatic activity, but relatively good import directing capacity (see above, Fig. 1D). Expression of the Eno2p-H373F in *eno1/2* strain resulted, as expected, in a dramatically decreased enolase enzymatic activity in the cells ($9\pm 3\%$ of the wild type activity at 30°C and $<5\%$ at 37°C) and in a low level of respiration ($20\pm 4\%$ and $9\pm 2\%$, respectively) (Fig. 4 C). In contrast, tRK1 mitochondrial import was partially restored ($58\pm 5\%$ and $37\pm 4\%$, respectively) as well as the overall mitochondrial translation (Fig. 4B, D). Indeed, at 30°C mitochondrial translation pattern appeared as normal, while at 37°C , we observed the appearance of minor additional bands, which may be explained by abortive termination of translation due to reduced tRK1 import at elevated temperature.

We observe therefore that mitochondrial translation is inhibited or perturbed when *ENO2* gene is deleted and that this effect coincides with the inhibition of tRK1 import and not with the respiration defects. Furthermore, the *in vivo* data confirms the results of *in vitro* experiments and suggest that the two enolase functions (enzymatic and tRNA import) are distinct.

The soluble pool of Eno2p is required for tRK1 import

The fact that a fraction of cellular enolase is bound to the mitochondrial surface raises a question: does the organelle-bound form of enolase participate in tRNA mitochondrial import? To this end, we tested the capacity of isolated mitochondria to import tRK1 after pre-treatment of the organelles with anti-enolase antibodies. Such a treatment had no effect on tRK1 import, contrary to the anti-Tom20p antibodies, which, by obstructing the General Insertion Pore, were shown to inhibit the import (Tarassov *et al.* 1995b). In contrast, anti-enolase pre-treatment of the soluble import directing proteins (IDP) inhibited their tRNA import directing capacity in a dramatic way (Fig. 5A). These results were confirmed by *in vitro* import assays with IDP or mitochondria isolated from *eno1/2+pE1* and *eno1/2+pE2* yeast strains (Fig. 5B). IDP and mitochondria from *eno1/2+pE2* strain were both active in tRK1 *in vitro* import. Mitochondria isolated from *eno1/2+pE1* cells had an import capacity comparable to the wild-type ones. In contrast, the IDP from this strain were unable to direct tRK1 import into mitochondria of all strains tested. Addition of purified recombinant Eno2p to IDP from *eno1/2+pE2* cells restored their import capacities. We therefore concluded that the soluble form of Eno2p is needed for tRK1 import.

What is the role of soluble enolase in tRK1 import? It has been shown that the mRNAs of numerous mitochondrially-addressed proteins are translated in the vicinity of the mitochondria to facilitate their compartmentalisation (Marc *et al.* 2002). This may also be the case for preMsk1p, which is essential for mitochondrial translocation of tRK1. If so, this precursor should be not available in the cytosol for tRK1 binding. Thus, soluble enolase, which was shown to have tRK1-binding capacity and ability to enhance tRK1-preMsk1p complex

formation, may serve as a vehicle to address the tRNA towards the mitochondria where the main protagonists of tRK1 import form the "import directing" complex.

To test this hypothesis, we have quantified the mRNAs for preMsk1p and Eno1/2p in mitochondria-associated and cytosolic polysomes. For this purpose, RNA was isolated from whole cells, cytosolic polysomes and mitochondria after treatment of the cells with cycloheximide, which permits to fix ribosomes in their respective subcellular compartments (Corral-Debrinski *et al.* 2000). Real-time RT-PCR was next used to measure the amounts of mRNAs coding for Eno1/2p, preMsk1p and two control proteins, Krs1p (cytosolic lysyl-tRNA synthetase) and Atp1p (previously reported to be peri-mitochondrially translated (Marc *et al.* 2002)) (Fig. 6). The percentage of mitochondria-associated mRNAs, compared to either cytosolic polysomes or total cell mRNA, were calculated. As expected, the Atp1p mRNA was found to be associated with mitochondria to an extent of up to 45%. This value is in agreement with the previously reported one (Marc *et al.* 2002) and reflects the fact that a portion of mitochondria-bound polysomes were released during mitochondria isolation. Up to 35% of the preMsk1p mRNA was found to be mitochondria-associated, which is comparable to the Atp1p mRNA. In contrast, for Eno1/2p mRNAs and Krs1p the percentage of mitochondrial association was <2%, which suggests cytosolic translation (Fig. 6). Withdrawal of cycloheximide during the isolation of mitochondria (expected to lead to a dissociation of the cytosolic ribosomes from mitochondria) results in a release of the most of mitochondrially-associated preMsk1p mRNA. This strongly suggests that mitochondrially-associated portion of preMsk1p mRNA is a part of translationally active polysomes.

The mRNA quantification experiments led us to conclude that preMsk1p mRNA localized mainly to mitochondria-associated polysomes, while Eno1/2p mRNAs were translated by cytoplasmic ones. This result can explain the fact that the soluble form of enolase

is needed for tRK1 import. The subpopulation of soluble enolase that is addressed towards the mitochondrial surface may be exploited to address the tRNA towards the organelle.

Discussion

Enolase, another protein with multiple functions

The total number of protein coding genes does not increase from organism to organism commensurately with the increase in complexity of those organisms. One possibility to explain the relative dearth of protein coding genes is that many proteins may have previously unsuspected or unappreciated "second jobs", a situation commonly termed as "protein moonlighting". An increasing number of proteins are found to have two or more different functions, which can be switched as a consequence of changing of their cellular localization, oligomeric state or ligand concentration (Jeffery 1999). Several glycolytic enzymes were also found to have additional functions. For example, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as an uracil-DNA glycosylase, an activator of transcription, is involved in tubulin assembly and in the regulation of apoptosis; lactate dehydrogenase has a DNA unwinding activity and is implicated in the regulation of mRNA turnover (Pioli et al. 2002); phosphoglucose isomerase can be secreted by mammalian cells and plays a role of neuroleukin (Jeffery 1999).

Enolase is also supposed to have additional non-glycolytic functions. In yeast, it was identified as Hsp48p and was also found in association with the cell wall (Edwards et al. 1999). Enolase was identified as tau-crystallin of turtle eye lens and as a strong plasminogen-binding receptor expressed on the surface of a variety of eukaryotic cells (for review see (Pancholi 2001)). Finally, in *E.coli*, enolase is an integral component of the RNA degradosome (Kuhnel and Luisi 2001; Carpousis 2002). Its role was hypothesized to direct subcellular

compartmentalization of degradosome to the plasma membrane (Liou et al. 2001; Morita et al. 2004).

We show here that, in addition to its principal role in glycolysis, enolase allows addressing of a cytosolic tRNA towards the mitochondrial surface, possibly acting as an RNA chaperone. Although the two yeast enolase isoforms lack any known RNA-binding motif (analysed by PROSITE), Eno2p can specifically bind the imported tRK1. Interaction of yeast Eno1/2p with single-stranded DNA was reported previously (al-Giery and Brewer 1992). Numerous other proteins, including glycolytic enzymes, were already found to have RNA- or tRNA-binding capacities (Singh and Green 1993; Hentze 1994; Pioli et al. 2002; Bringaud et al. 1997). In the majority of cases, there was no direct evidence of the functional importance of these RNA-binding capacities of well known enzymes, but additional roles in RNA turnover and compartmentalization were suggested.

Besides the specific affinity to the imported tRNA, Eno2p was found here to have the capacity to reduce the *K_d* of tRK1-preMsk1p complex formation. At the same time, in the presence of the both proteins, no ternary complex was observed, and only tRK1-preMsk1p one was detectable (Fig. 4 **C,D**). As we suggested previously (Entelis et al. 1998; Kolesnikova et al. 2002), formation of this latter complex requires some conformational changes in the tRNA molecule. Now we can hypothesise that Eno2p induces these conformational changes in the tRNA or stabilises the conformation of the tRNA that is better recognised or is more tightly bound by preMsk1p. If this hypothesis reveals true, Eno2p function in tRNA mitochondrial import would be not only as targeting factor, but also as an RNA-chaperone.

We have also found that a portion of the cellular enolase pool is tightly bound to the outer mitochondrial membrane. For the moment, we cannot be sure about de mechanism by which the enolase molecule is bound to the mitochondria. We show that it can specifically recognise (PI3P). However, PI3P was not found in association with mitochondrial membranes

in yeast (Gillooly et al. 2000). On the other hand, no interaction was detected with phospholipids and sphingolipids that are abundant in the outer mitochondrial membrane (Ardail et al. 1990). These results likely indicate onto an indirect interaction of the enolase with mitochondrial surface, which may be mediated by other proteins. What may be the role of the partial localization of enolase on the mitochondrial surface? In fact, enolase as well as other glycolytic enzymes have already been detected in association with mitochondria (Giege et al. 2003; Taylor et al. 2003). In *Arabidopsis* cells, the entire glycolytic pathway (3-12% of enzyme activities) was localized on the cytosolic face of the outer membrane (Giege et al. 2003). We have also shown the presence of all the glycolytic enzymes activities on the surface of mitochondria in yeast and found that enolase takes part in a mitochondrial outer membrane-associated macromolecular complex (Brandina et al., submitted). Glycolysis resumes in a pyruvate molecule, which is imported into mitochondria to serve as a substrate for respiration. The compartmentalization of this pathway may allow direct delivery of pyruvate to the site of its consumption. We hypothesise that yeast cells exploited the RNA-binding properties and the mitochondrial localization of enolase for the targeting of tRK1 towards the mitochondrial surface.

The mechanism of enolase action in tRNA import

tRK1 mitochondrial import in yeast requires stable and specific interaction of the aminoacylated tRNA with the cytoplasmic precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase (preMsk1p), which is likely to act as a carrier for its mitochondrial transport (Tarassov et al. 1995a). Experiments of quantification of mRNA subcellular pools presented above permit us to hypothesize that the mRNA of preMsk1 is mainly translated peri-mitochondrially, which would facilitate mitochondrial import of this pre-protein. This implies that there must be an extremely

low amount of this precursor available in the cytoplasm. On the other hand, tRK1 takes part in the cytoplasmic translation and thus is expected to localize mainly in the vicinity of cytoplasmic polysomes. Therefore, to meet one another, tRK1 and preMsk1p need an additional targeting factor, enolase, to serve as a vehicle to deliver the tRNA to newly synthesized preMsk1p molecules at the mitochondrial surface (see Fig. 7).

We found that masking of membrane-bound enolase with antibodies did not affect tRK1 mitochondrial import, while withdrawing the soluble portion of enolase from import directing proteins abolished it. We suggest that enolase can bind tRK1 in the cytosol and deliver it towards the mitochondrial surface. Enolase would then favour tRK1/preMsk1p complex formation for translocation into the mitochondrial matrix (Fig. 7). This model is in agreement with the fact that tRK1 has higher affinity to preMsk1p than to enolase (taking into account the 14-fold decrease in apparent K_d , the difference in free energy of binding is 1.6 kcal/mol), and in the presence of both proteins only the preMsk1p/tRK1 complex is formed. Besides preMsk1p and Eno2p, additional proteins may participate in tRK1 mitochondrial targeting *in vivo*, for example, to regulate tRK1-enolase interaction and to target the complex towards the mitochondria.

Our experiments show that Eno2p is much more efficient than Eno1p for directing tRK1 mitochondrial import *in vitro*, and its affinity to tRK1 is much higher. Furthermore, the mitochondrial localization of Eno2p is more obvious than the one of Eno1p. However, in the absence of Eno2p (strain *eno1/2+pE1*), Eno1p can perform tRK1 targeting, but less efficiently. tRK1 mitochondrial import *in vivo* was completely abolished only in the strain with deletions of both enolase genes.

The model we propose for tRK1 import involves therefore a non-cognate aminoacyl-tRNA synthetase (mitochondrial enzyme for a cytosolic-type tRNA) and a glycolytic enzyme. Why the yeast cell would use a so strange pair of actors to address a single tRNA species into

mitochondria? When one compares the yeast system with tRNA import events in other organisms, it appears that only two imported tRNA species were detected in yeast and from several to all tRNA species in some other cases. It would be logical that in such organisms as trypanosomatids that import all tRNA species into the organelle (Simpson et al. 1989), a mitochondrially-bound tRNA-specific receptor was postulated (Mahapatra and Adhya 1996), while in yeast two bi-functional proteins, preMsk1p and Eno2p, which possess the needed RNA-binding and compartmentalization properties were adapted to perform the targeting. The second point is that this targeting was evolutionary retained in *S. cerevisiae*, if even mtDNA encodes another tRNA^{Lys}. In this context, the fact that the absence of tRK1 in the mitochondria of enolase-depleted strain correlates with inhibition of mitochondrial translation indicates on participation of the imported tRNA^{Lys} in the organellar protein synthesis. This effect proves not to depend on the cellular enolase enzymatic activity and to be more pronounced at 37°C. One could suggest therefore that inhibited or perturbed translation (appearance of additional translation products) is due to a decrease of imported tRK1. This is in agreement with our previous observation of suppression of a mtDNA mutation by imported tRNAs (Kolesnikova et al. 2000) and with a more recent hypothesis suggesting the need of several cytoplasmic tRNAs to provide a complete decoding in yeast mitochondria (Rinehart et al. 2005). It may occur that we obtained here the first evidence that, at least at higher temperature, tRK1 is recruited by mitochondrial translation machinery.

All the data presented confirm the new role of glycolytic enzyme enolase in the mitochondrial targeting of tRNA in yeast. We suppose that this pathway should be precisely regulated in yeast cell, and its regulation includes tRNA-enolase recognition, interaction and transport of this complex to the vicinity of the mitochondria. On the mitochondrial surface, enolase might facilitate interaction between the imported tRNA and the carrier protein, the precursor of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase. We can hypothesise that enolase-

tRNA interaction induces required conformational changes in the tRNA structure, suggesting an RNA-chaperone function as a "second job" for this glycolytic enzyme.

Material and methods

Strains, antibodies and plasmids

E. coli strain BL21 RIL3 codon plus (Stratagene) was used for expression of recombinant proteins. Yeast strain W303 was used to isolate mitochondria and protein extracts. *ENO1* gene was deleted in W303 yeast strain by *KanMX4* cassette replacement (Wach et al. 1994). Deletion was PCR-verified at 3'- and 5'-ends. Yeast strain MJ196 with deletion of *ENO2* gene (YM4587 YHR174W/yhr174w::gfp-HIS3) was kindly provided by Dr. J. Hegemann (Dusseldorf, Germany) (Niedenthal et al. 1999). Strain with a double deletion of the both enolase-coding genes was obtained in this work by mating *eno1* and *eno2* haploid strains and subsequent tetrad analysis. To allow the unequivocal comparison of isogenic strains, only the final *eno1 eno2* strain (also referred to as *eno1/2*) was used for all genetic and phenotypic analyses. This strain, when transfected with plasmids expressing both enolases, does not demonstrate any phenotype on all media tested, as the wild type strain W303 used as a control. One can affirm therefore, that the genetic background of the initial strains does not influence the observed phenotypes.

Antibodies against human alfa-enolase were from Molecular probes (C-19: sc-7455, Santa Cruz Biotechnology), against yeast cytochrome oxidase I from Calbiochem, against Msk1p were kindly provided by A. Tzagoloff (Columbia Univ.), against α -Aco1p and CC₁HLp were kindly provided by R. Lill (Marburg Univ.), against Tom20p, Tom70p and ATP-ADP carrier were kindly provided by N. Pfanner (Freiburg Univ.).

For overexpression of yeast proteins in *E. coli*, *MSK1*, *ENO1* and *ENO2* genes containing C-terminal His6-tags were cloned in pET3a vector (Novogen).

For expression of proteins in yeast cells, *ENO1* and *ENO2* genes with 300 bp flanking regions were PCR-cloned into the centromeric vector pRS416 with *URA3* marker, to give pE1 and pE2 plasmids.

For yeast three-hybrid assay *ENO1* and *ENO2* genes were cloned into 2- μ m/LEU2 vector pGAD-GH, which contains the GAL4 (768–881) activation domain under *ADHI* promoter. The shuttle plasmid pIII/MS2-1 with a *URA3* marker was used to express hybrid RNA molecules in yeast (Kraemer et al. 2000). To create plasmids coding hybrid RNAs, genes of imported tRNA^{Lys} (*tRK1*) and cytoplasmic tRNA^{Lys} (*tRK2*) were cloned into the plasmid pIII/MS2-1 in the 3'-position of phage MS2 RNA.

For cellular localization experiments, we used the plasmid pDH5 containing the ORF for a pH-tolerant yellow-fluorescent protein (YFP). Gene coding YFP was inserted in the yeast genome by homologous recombination with 3' flank of the *ENO2* gene. Localization experiments were performed by visualizing of mitochondria using Mitotracker Red (Molecular Probes) and confocal microscope Zeiss LSM 510.

Isolation of mitochondria, import assays, translation and oxymetry

Mitochondria were isolated and verified for intactness and functionality as described previously (Entelis et al. 2002). The tRNA import assay was done as described (Entelis et al. 2002): each assay contained 50 μ g of mitochondria (mitochondrial protein), 3 pmoles of gel-purified 5' [³²P]-labeled tRNA (aminoacylated and refolded) and either 5 μ g of crude import directing proteins (IDP) or 0.2 μ g of recombinant proteins in 100 μ l, then mitochondria were RNAase-treated and re-purified by differential centrifugation. Import efficiency was quantified,

after separation of mitochondrial RNA on denaturing polyacrylamide gels, by scanning autoradiography using Phosphor-Imager (Fuji, MacBAS2000 program).

For tRNA import immunoinhibition we used a modified protocol developed for protein import (Ryan et al. 2001): isolated mitochondria were suspended in binding buffer (0.6 M sorbitol, 10 mM HEPES-KOH pH 6.7, 1 mM EDTA) without labeled RNA and IDP in the presence of the appropriate amount of antibodies at 4°C for 30 min, then purified by percoll gradient centrifugation. For IDPs, antibodies were added in the binding buffer without mitochondria, the mixture was incubated 30 min at 4°C and either used directly for import or depleted by protein A Sepharose beads and then used for import. Both approaches gave similar results.

Protein import assays were done with [³⁵S]-labeled proteins synthesized on PCR-amplified DNA fragments in a coupled transcription-translation reticulocyte lysate-dependent system TNT[®] Quick for PCR DNA (Promega). The *in vitro* import assay was performed as described elsewhere (Ryan et al. 2001).

Mitochondrial translation was analyzed essentially as described (Fox et al. 1991) with minor modifications: cells were grown in YPD to $A_{600}=1.0$, transferred to synthetic complete medium lacking Met (0.67% yeast nitrogen base, 0.08% CSM-Met (BIO101), 2% raffinose) with addition of 200 µg/ml of cycloheximide and incubated for 10 min at 30°C with shaking. Cells were then labeled with 10 µCi of [³⁵S]-methionine (1.4 Ci/mmol, Amersham) for 20 min and chased with unlabeled 2 mM methionine for 10 min before breaking cells with glass beads. The proteins were TCA-precipitated and analyzed on 15% SDS-PAGE.

The rate of oxygen consumption by yeast cells ($A_{600}=0.3$) cultured in 1 ml of YPD medium was measured in thermostated chamber at 30°C or 37°C using a Clark type electrode and the SI oxygen meter for 10 min followed by addition of myxothiazol (750 nM) to measure non-mitochondrial oxygen uptake, which was then subtracted from all values.

Isolation and analysis of proteins

Crude import directing protein fraction (IDP) was isolated as described previously (Entelis *et al.* 2002). Proteins were then subjected to differential ammonium sulfate precipitation. Fractions were dialyzed against Pipes-NaOH buffer (pH 6.5) 20 mM, NaCl 20 mM and passed through the SP Sepharose column (Pharmacia). The flow-through fraction was dialyzed against TrisHCl (pH 7.5) 20mM, NaCl 20 mM, DTT 5 mM, glycerol 10% and fractionated on Mono-Q column with a linear NaCl gradient up to 1M. Fractions were dialyzed against the buffer Hepes-KOH (pH 6.8), 20mM, KCl, 20mM, glycerol 50%, DTT, 2mM. N-terminal protein sequencing was performed by Neosystems.

Recombinant enolases 1 and 2 were expressed in *E. coli* BL21 strain and purified on Ni-NTA agarose (Qiagen) under native conditions. Enolase enzymatic activity was assayed as described (Sangadala *et al.* 1995): protein solutions were added to assay medium containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM MgCl₂ et 2 mM 2-phosphoglyceric acid at room temperature. Absorbance at 230 nm was monitored as a function of time and divided by enzyme concentration. One unit of activity measured as ($\Delta A_{230}/\Delta A_{280}$)/min corresponds to 0,32 Units/mg (Westhead and McLain 1964).

For North-Western analysis, proteins from Laemmli SDS-PAGE were electro-blotted onto nitrocellulose membrane Protran (0.45 μ m), renaturated in TrisHCl (pH7.5), 100 mM, Nonidet P-40, 0.1% (v/v) for 6 hours at 4°C. The filter was blocked in TrisHCl (pH7.5), 10 mM, Mg acetate, 5mM, DTT, 2mM, BSA, 1%, for 30 min prior incubation with the binding buffer (Hepes-KOH (pH6.8), 20mM, KCl, 20mM, MgCl₂, 0.5mM, ATP, 1mM), containing 1000 Cpm/cm² of labeled tRNA and 1 μ g/cm² of recombinant preMSK1p at 4°C overnight. Filters were washed with the binding buffer without ATP and exposed to Fuji Imaging Plate.

For Western blot analysis, the ECL-Plus Western Detection system (Amersham Biosciences, Inc) was used. Tests for interaction enolases with lipids was done by incubation of 50 kCpm of [³⁵S]-labeled Eno1p or Eno2p with either PIP strips (P-6001) or SphingoStrips (S-6000) (Echelon Biosciences Inc.) in PBS for 1h at 30°C with shaking, followed by triple washing with PBS and autoradiography.

Isolation and analysis of RNA

Total and mitochondrial RNAs were isolated by use of Trizol-reagent (Invitrogen). For import, North-Western and gel-shift analysis we used purified natural tRK1 and tRK2. tRNA was dephosphorylated, [³²P]-labeled by T4 polynucleotide kinase, gel-purified, refolded and aminoacylated with recombinant cytosolic lysyl-tRNA synthetase as described previously (Entelis *et al.* 1998).

For gel-shifts, appropriate amounts of proteins and labeled RNAs were mixed in the volume of 20µl of buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10% Glycerol, 0.1 mg/ml BSA and incubated at 30°C for 10 min. Separation was done in a native 6% PAGE, Tris-borate buffer (pH 8.3), 20mM, Glycerol 5% as described (Kaminska *et al.* 2000). Free and bound tRNA were quantified by Fuji Phosphor Imager, apparent dissociation constants for tRNA-protein complexes were estimated as in (Francin *et al.* 2002).

The following oligonucleotide probes: anti-tRK1: CCTAACCTTATGATTAAGAGT; anti-mt tRNA Leu: TGGTTGCTATTTAAAGGACTTG; anti-tRK2: GCCGAACGCTCTACCAACTCAGC were used for Northern analyses.

To isolate cytoplasmic polysomes, we used the method proposed in (Marc *et al.* 2002) with minor modifications. Yeast YPH500 cells were grown to A₆₀₀=5-10 on YPGal medium.

Spheroplasts were generated by zymolyase and treated with 300 µg/ml of cycloheximide (20 min at 30°C). After 2 washings with 1M sorbitol, 200 µg/ml of cycloheximide, the spheroplasts were broken in a vibro-homogeniser with glass beads (0.5mm) in the polysome buffer (PA): 0.6M mannitol, 30 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM MgAcetate, 100 mM KCl, 5 mM DTT, 200 µg/ml of cycloheximide, 500 µg/ml of heparine, protease inhibitor cocktail without EDTA (Roche). Mitochondria were pelleted and purified by differential centrifugation as described before (Entelis et al. 2002). Cytoplasmic polysomes were isolated by loading the postmitochondrial lysate on a succrose gradient 2M - 0.5M in the PA buffer and centrifuged at 190000g for 16h at 6°C.

To quantify mRNAs, real time RT-qPCR was performed (MyQ cyclor BIO-Rad) using the one-step RT-PCR with SYBR-green system (BIO-RAD). All samples were analysed in triplicate and in three serial dilutions. Before quantification, all the RNA isolates were tested by PCR for the absence of contamination with DNA. To calculate absolute amounts of mRNAs in the isolates, we used as calibration controls known amounts of transcripts corresponding to the tested mRNAs. For this, the fragments of corresponding ORFs were PCR-amplified under control of the T7 promoter, transcribed by T7 RNA-polymerase, the transcripts were gel-purified and their amount determined by spectroscopy.

Acknowledgements

We thank N. Pfanner, R. Lill and A. Tzagoloff for providing antibodies against mitochondrial proteins, J. Hegemann and J. Brewer for providing yeast strains, and L. Sweetlove for helpful discussion and communication of results before publication. We are grateful to J. Mutterer (IPCB, Strasbourg) for a confocal microscopy experiments assistance. This work was partially supported by the CNRS, ULP, AFM, ANR, RFFI (grant N°00-04-

48488) and GIS "Institut de Maladies Rares". IB was supported by a Thesis Fellowship from French Government (BGF), PK was supported by an Eiffel Ph.D. fellowship.

References

- al-Giery, A.G. and Brewer, J.M. 1992. Characterization of the interaction of yeast enolase with polynucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* **1159**: 134-140.
- Ardail, D., Privat, J.P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F. and Louisot P. 1990. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* **265**: 18797-18802.
- Brewer, J.M., Glover, C.V., Holland, M.J. and Lebioda, L. 2003. Enzymatic function of loop movement in enolase: preparation and some properties of H159N, H159A, H159F, and N207A enolases. *J. Protein Chem.* **22**: 353-361.
- Bringaud, F., Stripecke, R., Frech, G.C., Freedland, S., Truck, C., Byrne, E.M. and Simpson, L. 1997. Mitochondrial glutamate dehydrogenase from *Leishmania tarentolae* is a guide RNA-binding protein. *Mol. Cell Biol.* **17**: 3915-3923.
- Carpousis, A.J. 2002. The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 150-155.
- Corral-Debrinski, M., Blugeon, C. and Jacq C. 2000. In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol. Cell Biol.* **20**: 7881-7892.
- Delage, L., Dietrich A., Cosset A. and Marechal-Drouard, L. 2003. In vitro import of a nuclear encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*. *Mol. Cell Biol.* **23**: 4000-4012.

- Diekert, K., de Kroon, A.I.P.M., Kispal G. and Lill R. 2001. Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Mitochondria* (ed. L.A. Pon and E.A. Schon), pp. 37-51. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Dietrich, A., Marechal-Drouard, L., Carneiro, V., Cosset, A. and Small, I. 1996. A single base change prevents import of cytosolic tRNA(Ala) into mitochondria in transgenic plants. *Plant J.* **10**: 913-918.
- Edwards, S.R., Braley, R. and Chaffin, W.L. 1999. Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**: 211-216.
- Entelis, N., Kolesnikova, O., Kazakova, H., Brandina, I., Kamenski, P., Martin, R.P. and Tarassov, I. 2002. Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet. Eng. (N Y)* **24**: 191-213.
- Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A.. 1998. Structural requirements of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 2838-2843.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. 2001a. 5 S rRNA and tRNA Import into Human Mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J. Biol. Chem.* **276**: 45642-45653.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. 2001b. RNA delivery into mitochondria. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **49**: 199-215.
- Fox, T.D., Folley, L.S., Mulero, J.J., McMullin, T.W., Thorsness, P.E., Hedin, L.O. and Costanzo, M.C. 1991. Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Methods Enzymol.* **194**: 149-165.

- Francin, M., Kaminska, M., Kerjan, P. and Mirande, M. 2002. The N-terminal domain of mammalian Lysyl-tRNA synthetase is a functional tRNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* **277**: 1762-1769.
- Giege, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J. and Sweetlove, L.J. 2003. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell* **15**: 2140-2151.
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G. and Stenmark, H. 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* **19**: 4577-4588.
- Hentze, M.W. 1994. Enzymes as RNA-binding proteins: a role for (di)nucleotide-binding domains? *Trends Biochem. Sci.* **19**: 101-103.
- Jeffery, C.J. 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 8-11.
- Kaminska, M., Denziak, M., Kerjan, P., Barciszewski, J. and Mirande, M. 2000. A recurrent general RNA binding domain appended to plant methionyl-tRNA synthetase acts as a cis-acting cofactor for aminoacylation. *EMBO J.* **19**: 6908-6917.
- Kolesnikova, O., Entelis, N., Kazakova, H., Brandina, I., Martin, R.P. and Tarassov, I. 2002. Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria : the role of anticodon nucleotides. *Mitochondrion* **2**: 95-107.
- Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. 2000. Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* **289**: 1931-1933.
- Kraemer, B., Zhang, B., SenGupta, D., Fields, S. and Wickens, M. 2000. Using the yeast three-hybrid system to detect and analyze RNA-protein interactions. *Methods Enzymol.* **328**: 297-321.

- Kuhnel, K. and Luisi, B.F. 2001. Crystal structure of the Escherichia coli RNA degradosome component enolase. *J. Mol. Biol.* **313**: 583-592.
- Liou, G.G., Jane, W.N., Cohen, S.N., Lin, N.S. and Lin-Chao, S. 2001. RNA degradosomes exist in vivo in Escherichia coli as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 63-68.
- Mahapatra, S. and Adhya, S. 1996. Import of RNA into Leishmania mitochondria occurs through direct interaction with membrane-bound receptors. *J. Biol. Chem.* **271**: 20432-20437.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M. and Jacq, C. 2002. Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* **3**: 159-164.
- Martin, R.P., Schneller, J.M., Stahl, A.J. and Dirheimer, G. 1979. Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry* **18**: 4600-4605.
- McAlister, L. and Holland, M.J. 1982. Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J. Biol. Chem.* **257**: 7181-7188.
- McKee, E.E., McEwen, J.E., and Poyton, R.O. 1984. Mitochondrial gene expression in saccharomyces cerevisiae. II. Fidelity of translation in isolated mitochondria from wild type and respiratory- deficient mutant cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 9332-9338.
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T. and Aiba, H. 2004. Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **54**: 1063-1075.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 863-917.

- Niedenthal, R., Riles, L., Guldener, U., Klein, S., Johnston, M. and Hegemann, J.H. 1999. Systematic analysis of *S. cerevisiae* chromosome VIII genes. *Yeast* **15**: 1775-1796.
- Pancholi, V. 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 902-920.
- Pioli, P.A., Hamilton, B.J., Connolly, J.E., Brewer, G. and Rigby, W.F. 2002. Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1. *J. Biol. Chem.* **277**: 35738-35745.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D. and Soll, D. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes & Dev.* **19**: 583-592.
- Rusconi, C.P. and Cech T.R. 1996a. The anticodon is the signal sequence for mitochondrial import of glutamine tRNA in *Tetrahymena*. *Genes & Dev.* **10**: 2870-2880.
- . 1996b. Mitochondrial import of only one of three nuclear-encoded glutamine tRNAs in *Tetrahymena thermophila*. *EMBO J.* **15**: 3286-3295.
- Ryan, M.T., Voos, W. and Pfanner, N. 2001. Assaying protein import into mitochondria. *Methods Cell Biol.* **65**: 189-215.
- Sangadala, V.S., Glover, C.V., Robson, R.L., Holland, M.J., Lebioda, L. and Brewer, J.M. 1995. Preparation by site-directed mutagenesis and characterization of the E211Q mutant of yeast enolase 1. *Biochim. Biophys. Acta* **1251**: 23-31.
- Scheffler, I.E. 2001. Mitochondria make a come back. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**: 3-26.
- Schneider, A. and Marechal-Drouard, L. 2000. Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol.* **10**: 509-513.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. and Wickens, M. 1996. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 8496-8501.

- Simpson, A.M., Suyama, Y., Dewes, H., Campbell, D.A. and Simpson L. 1989. Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA and also contain small minicircle and maxicircle transcripts of unknown function. *Nucleic Acids Res.* **17**: 5427-5445.
- Singh, R. and Green, M.R. 1993. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**: 365-368.
- Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R. 1995a. Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* **14**: 3461-3471.
- Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R.P. 1995b. An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J. Mol. Biol.* **245**: 315-323.
- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson B.W. et al. 2003. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.* **21**: 281-296.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Westhead, E.W. and McLain, G. 1964. A Purification of Brewers' and Bakers' Yeast Enolase Yielding a Single Active Component. *J. Biol. Chem.* **239**: 2464-2468.

Legends to the figures

Figure 1. Identification of import factors. (A) Strategy of proteins fractionation. IDP, protein extract (Import Directing Proteins). *In vitro* import assays (upper and lower right panels) - autoradiographs of protected tRK1 after the incubation with isolated yeast mitochondria. Input, an aliquot (1%) of labeled tRK1 used in each import assay. Ammonium sulphate saturation percentage and the numbers of mono-Q fractions are indicated. The middle panel represents results of Western immunodetection of preMsk1p in the same ammonium sulphate fractions as above. (B) North-Western analysis of the proteins from the mono-Q fraction 8 (Q8). The left panel is the coomassie-stained gel, the right two - autoradiographs after incubation of proteins with 5'-[³²P]-labeled tRK1 or tRK2. (C) *In vitro* tRK1 import assay with fraction Q8 proteins and recombinant Eno1p or Eno2p in the presence or absence of preMsk1p. IDP(-M), Import Directing Proteins (IDP) lacking preMsk1p. tRK1 import efficiencies are indicated below the autoradiograph. (D) Comparison of enzymatic and tRK1 import directing activities of a normal (WT) and mutant recombinant versions of Eno2, containing the following substitutions: N207A, H159F or H373F. On the left, the *in vitro* import assay in the presence of recombinant preMsk1p and Eno2p versions indicated above; on the right - the quantification of import directing efficiency and enolase enzymatic activity of the recombinant proteins.

Figure 2. Interaction of Eno2p with tRK1. (A) Detection of the interaction between Eno1/2p and tRK1 *in vivo* by the 3-hybrid approach. The strategy is presented on the upper panel. MS2 RNA-fused tRK1 or tRK2 (non-imported RNA) were assayed for interaction with either Eno1p or Eno2p. Empty MS2 RNA gene-containing vector ("MS2") and empty pGAD-GH plasmid (pGAD) were used as controls. To detect interaction, yeast L40-coat strain

transfected cells were grown in the absence or in the presence of 10 mM 3AT, as indicated. **(B-D)** Analysis of RNA-protein interactions by gel-shift. Autoradiographs of native PAGE-separations of labeled tRK1 in the presence of preMsk1p **(B)** and/or Eno2p **(C)**. Deacylated tRK1 (tRK1(da)) and aminoacylated tRK2 (tRK2(aa)) were used as controls of the specificity of interaction. Concentrations of the recombinant proteins in nM are indicated below the panels. KMC, tRK1-preMsk1 complex; KEC, tRK1-Eno2p complex; tRK1, unbound labeled tRNA. **(D)** The effect of Eno2p presence on tRK1-preMsk1p complex formation.

Figure 3. A part of Eno2p co-localizes with mitochondria. **(A)** Western analyses of mitochondrially-associated proteins. After the treatment indicated below the picture, the mitochondrial pellets or the total material were analysed, as indicated. Antibodies used: Aco1p, aconite hydratase, 85 kD, matrix (MM) localization; Tom70p, 70 kD, outer membrane (MOM) associated; CCH1HLp, Cytochrome *c* heme lyase, 30 kD, inner membrane space (IMS) protein. Aco1p and CCH1HLp are known to be resistant to carbonate treatment (Diekert et al. 2001). **(B, C)** *In vitro* assay of mitochondrial localization using reticulocyte lysate-synthesized [³⁵S]-labeled proteins incubated with isolated organelles. **(B)** Autoradiographs of gel-fractionated proteins after treatment of mitochondria as indicated - I, input; SW, swelling; NaCl, treatment with 200 mM of salt; Na₂CO₃, washing with 200 mM carbonate; Triton X100, treatment with 10 % detergent. P, pellet; S, supernatant. **(C)** Autoradiograph of the gel-fractionated proteins after treatment of the mitochondria with 50 μg/ml of proteinase K (PK). Mitochondrially imported preMsk1p was used as a reference. **(D)** Analysis of Eno2p localization in yeast cells by confocal microscopy. Eno2p was YFP-labeled, mitochondria were localized by mito-tracker red. Zones of co-localization are indicated by white arrows on the merge image. **(E)** Assay for Eno1/2p interaction with immobilized phospholipids. LPA, Lisophosphatidic Acid; LPC, Lisophosphocholine; PI, Phosphatidyl-inositol; PI3/4/5, Phosphatidyl-inositol-3/4/5-phosphate;

PE, Phosphatidylethanolamine; PC, Phosphatidylcholine; S1P, Sphingosine-1-phosphate; PI3,4/3,5/4,5P2, Phosphatidyl-inositol-3,4/3,5/4,5-diphosphate; PI3,4,5P3, Phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate; PA, Phosphatidic Acid; PS, Phosphatidylserine.

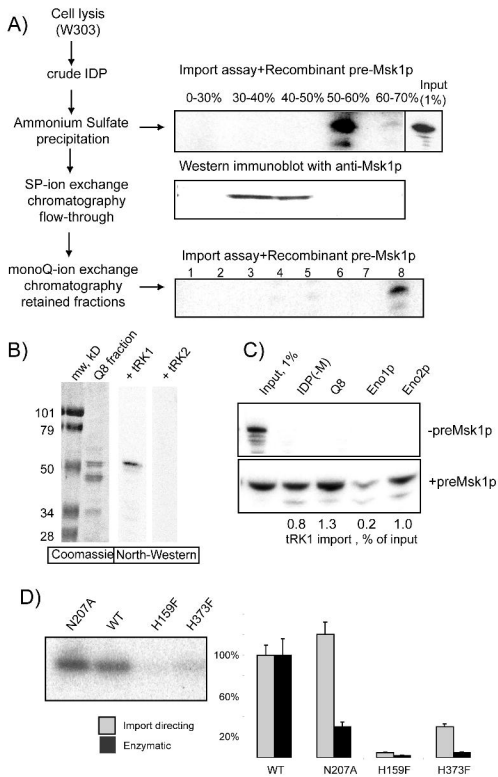
Figure 4. Effect of *ENO1/2* genes inactivation on tRK1 import and mitochondrial functions. (A) The effect of *ENO1* and *ENO2* genes deletion on yeast cells growth on non-fermentable carbon source (Gly for Glycerol, YPEG medium), YPGal medium (Gal) or YPD (Glu). Culture growing temperature is indicated above the panel, the duration of growing - at the bottom (hours). WT, wild type strain W303, +pE1 and +pE2 – strains expressed *Eno1p* or *Eno2p* from centromeric plasmids pE1 or pE2. (B) The effect of *ENO2* gene deletion or mutation on tRK1 import *in vivo*. Northern hybridisation detection of tRK1 and control tRNAs (mitochondrial tRNA(Leu) and cytoplasmic non-imported tRNA(Lys), tRK2) are presented. On the left – M, for RNA isolated from purified mitochondria, T, for total RNA. On the top - strains and temperature of cultivation, *eno1/2*, for *eno1 eno2* deletant strain; pE2-H373F, for the plasmid expressing *Eno2p* with substitution H373F. Equal amount of RNAs were analysed for each strain. The ratio between the signals for tRK1 and mt tRNA(Leu) used as a criterion of import efficiency is presented in the middle. (C) Quantification of tRK1 import efficiency, respiration and enolase enzymatic activity in the crude cell lysates of different strains (listed on the left side of the panel). (D) Effect of *ENO2* gene deletion or mutation on mitochondrial translation. The autoradiograph of the PAGE-separated [³⁵S]-labeled mitochondrially synthesised polypeptides is presented. Strains and the temperature of incubation during the translation reaction are indicated above. Polypeptides were identified by comparison with standard mitochondrial translation pattern (McKee et al. 1984). Cox 1, 2 and 3: subunits 1-3 of cytochrome *c* oxidase; Cyt b: cytochrome *c*; ATPase 9, subunit 9 of ATP synthase. Additional bands appearing at 37°C with the H373F *Eno2p* version are indicated with the asterisks.

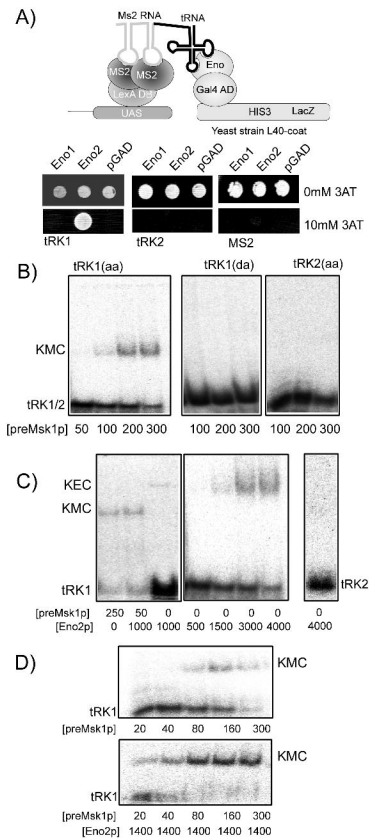
Figure 5. Soluble pool of Eno2p is required for tRK1 import. (A) Effect of antibodies on tRK1 mitochondrial import. The antibodies used are indicated at the top. As 1x concentration, we used the concentration of antibodies with the same immunological capacity (determined by Western analysis). The left panel corresponds to tRK1 import into antibody pre-treated mitochondria, the right one - to tRK1 import directed by immunodepleted IDP (Import Directing Proteins). (B) tRK1 import assays directed by IDP isolated from yeast strains indicated at the first line on the top (see explanations below the panel) into mitochondria isolated from different strains (second line). At the bottom - efficiency of tRK1 import. "+Eno2p", addition of 0.1µg of recombinant Eno2p to the IDP of the strain indicated.

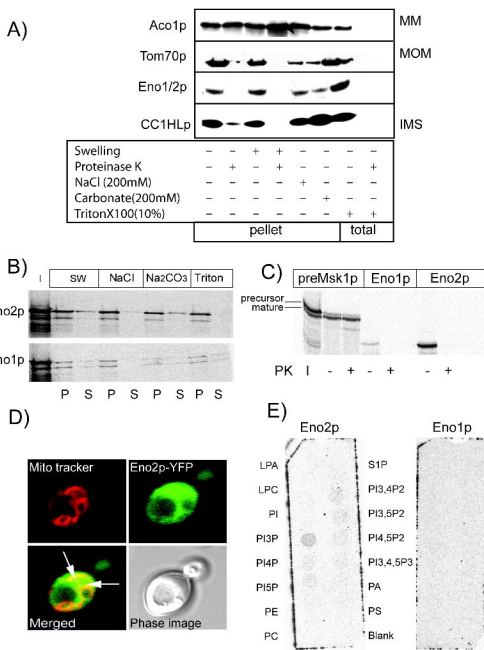
Figure 6. Translation of *MSK1* mRNA is compartmentalized. Quantification results obtained after RT-qPCR measurement of mRNAs coding for: Atp1, 1st subunit of the mitochondrial ATP synthase; Krs1, cytoplasmic lysyl-tRNA synthetase; Msk1, preMsk1p; Eno1/2, enolase 1 and 2 (oligonucleotide primers used do not distinguish between the two mRNAs). To obtain the indicated values, the absolute amounts of mRNAs were first calculated using purified T7-transcripts corresponding to each analysed mRNA, then the ratio between each mRNA amount in the mitochondrially-associated RNA pool and in the total RNA was calculated. In control experiment, the isolation of mitochondria for RNA purification was performed in the absence of cycloheximide (-CYH).

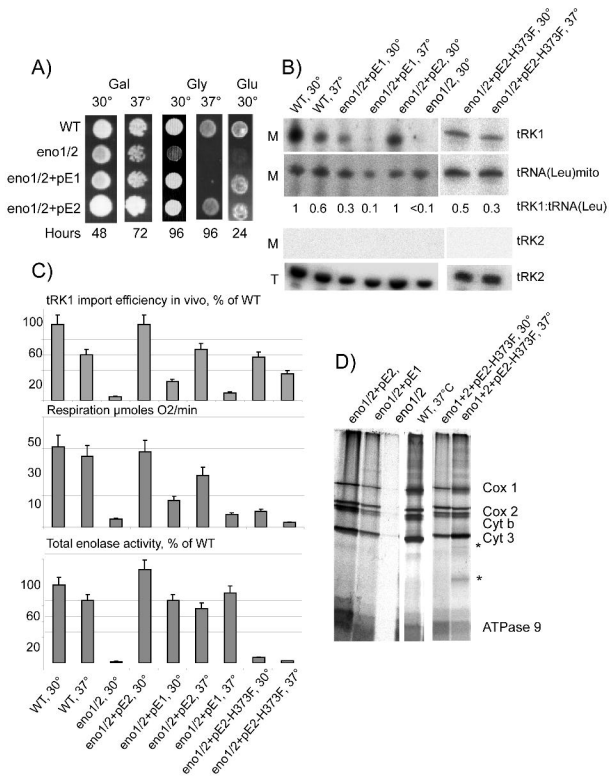
Figure 7. Proposed mechanism of enolase involvement in tRK1 mitochondrial targeting. GIP, General Insertion Pore, the outer membrane pre-protein import complex composed of TOM proteins. Aminoacylated tRK1 is recognised by enolase (most probably Eno2p) in the cytoplasm and addressed towards the mitochondrial surface, where the tRNA is

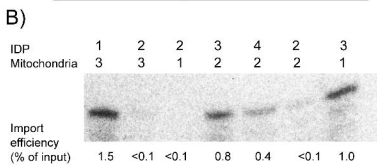
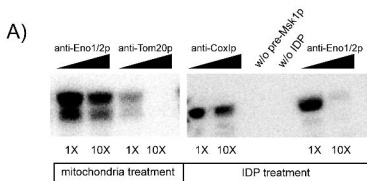
transferred to the peri-mitochondrially synthesized preMsk1p, while enolase inserts in the hypothetical glycolytic multi-protein complex, whose role may be the channelling of the pyruvate to the organelle. Further targeting of tRK1 to the mitochondrial matrix involves the functional GIP (Tarassov et al. 1995b).



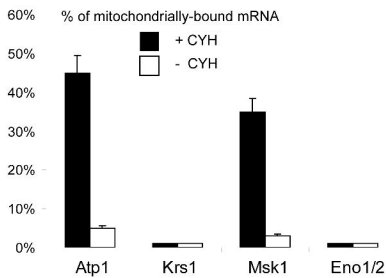


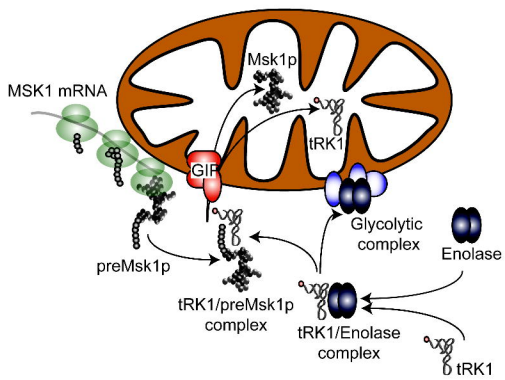






- 1 eno1/2 + pE2
- 2 eno1/2 + pE1
- 3 eno1/2 + pE1 + pE2
- 4 eno1/2 + pE1 + Eno2p





II.2. Mise en évidence d'un complexe multiprotéique contenant l'énolase, localisé à la surface de la mitochondrie

Publication 5: Brandina I, Graham J, Lemaitre-Guillier C, Entelis N, Krashennikov IA, Sweetlove L, Tarassov I, Martin R.P. (2006) "Enolase takes part in a macromolecular complex associated with mitochondria in yeast", *soumis à BBA Bioenergetics*.

• Introduction

Pendant longtemps, les enzymes de la glycolyse ont été considérées comme des marqueurs du cytoplasme, parce qu'on pensait que cette chaîne enzymatique était exclusivement localisée dans ce compartiment. Cette situation a changé avec la découverte d'une association de l'hexokinase avec des protéines apoptotiques à la surface des mitochondries (Danial et al., 2003). De plus, l'utilisation des techniques de protéomique a indiqué la présence d'enzymes glycolytiques, y compris l'énolase, dans des préparations mitochondriales de levure, et ceci a été rapporté dans plusieurs études indépendantes (Grandier-Vazeille et al., 2001), (Zischka et al., 2003), (Ohlmeier et al., 2004), (Prokisch et al., 2004). Néanmoins, cette présence était considérée comme provenant de la contamination par des protéines cytoplasmiques. Enfin, une étude menée avec des mitochondries d'*Arabidopsis thaliana* a abouti à la conclusion qu'une partie de l'activité de toutes les enzymes glycolytiques étaient localisées, en partie, à la surface des mitochondries chez cette plante (Giege et al., 2003). Ces auteurs ont proposé que cette micro-compartmentalisation de la chaîne glycolytique permettait de favoriser le ciblage du pyruvate (métabolite terminal de la glycolyse) vers la matrice mitochondriale où il est consommé.

Ayant démontré précédemment (**Publication 4**) que l'énolase intervenait comme facteur d'importation de tRK1 dans la mitochondrie de levure et qu'une fraction de cette enzyme était associée à la membrane mitochondriale externe, il nous a paru important de déterminer si cette association se faisait sous forme de complexe(s) avec d'autres enzymes glycolytiques et des protéines mitochondriales. Nous avons utilisé deux méthodes pour tenter de mettre en évidence l'existence de tels complexes multi-protéiques associés à l'organite: d'une part la caractérisation de complexes mitochondriaux contenant l'énolase par électrophorèse bi-dimensionnelle sur gel bleu natif (2D BN-PAGE) et d'autre part, la co-immunoprécipitation de protéines mitochondriales avec des anticorps anti-énolase.

- **Résultats**

- 1. Une fraction de l'activité de toutes les enzymes de la glycolyse est associée à des préparations hautement purifiées de mitochondries de levure**

Des mesures de l'activité des enzymes de la glycolyse, réalisées sur des préparations hautement purifiées de mitochondries de levure, ont révélé qu'une fraction de l'activité de toutes ces enzymes (variant de 3 à 25%, selon l'enzyme) était associée aux mitochondries de *S. cerevisiae*. Ces pourcentages d'activité sont comparables à ceux détectés dans les préparations de mitochondries d'*Arabidopsis* (Giege et al., 2003). Cette association de la chaîne glycolytique avec les mitochondries pourrait favoriser le ciblage du pyruvate vers cet organelle et son transport dans la matrice mitochondriale, où il est utilisé dans le cycle tricarboxylique. Ce résultat soulève la question de la nature de l'interaction entre les enzymes glycolytiques et la surface de la mitochondrie. Cette interaction pourrait se faire par intégration de certaines enzymes glycolytiques dans la membrane mitochondriale externe : l'analyse *in silico* de la structure des enzymes de la glycolyse (programme Tmap) a montré la présence de deux domaines trans-membranaires putatifs dans l'énolase et la phosphoglycérate kinase, et d'un domaine trans-membranaire dans la phosphohexose isomérase. Une autre possibilité est que cette association se fasse à travers d'interactions protéine-protéine avec des récepteurs de la membrane mitochondriale externe. Une telle interaction a été décrite pour l'hexokinase et la porine mitochondriale chez la levure (Krause et al., 1986).

- 2. Une fraction du pool d'énolase se comporte comme une protéine intégrale de la membrane mitochondriale externe**

Pour déterminer si l'énolase était intégrée dans les membranes mitochondriales, nous avons utilisé une approche biochimique consistant à séparer les protéines intégrées ou fortement associées à ces membranes. Pour cela, les mitochondries de levure purifiées ont été incubées en présence d'Eno1p ou d'Eno2p (marquées à la [³⁵S]-methionine) dans des conditions d'import protéique, puis soumises à un choc osmotique suivi d'une extraction au carbonate de sodium et d'une centrifugation sur des coussins de saccharose, selon la méthode décrite par (Rapaport et al., 2001). Nous avons observé que 3 % de la protéine Eno2p était présente dans la fraction membranaire, tandis que Eno1p y est indétectable. Ce résultat suggère que l'isoforme Eno2p pourrait servir d'ancre pour attacher le complexe des enzymes glycolytiques à la surface de la mitochondrie.

- 3. Caractérisation de complexes mitochondriaux contenant l'énolase par électrophorèse sur gel natif**

Pour identifier les protéines mitochondriales complexées à l'énolase, nous avons solubilisé les protéines mitochondriales avec un détergeant doux et les avons séparées par BN-PAGE (Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). L'immunodétection avec des anticorps anti-énolase a permis de visualiser trois complexes contenant l'énolase, ayant des tailles approximatives de 700, 520 et 350 kDa. Le complexe de 520 kDa, qui est le plus abondant, s'est révélé contenir également une autre enzyme glycolytique, l'aldolase. Les composants de ce complexe ont été identifiés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF ou nanoLC-MS/MS). Parmi les 7 protéines identifiées, se trouvent une troisième enzyme de la glycolyse, la glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogenase (Tdh3p), la porine mitochondriale (Por1p), deux transporteurs membranaires mitochondriaux (Aac2p, l'échangeur d'ATP/ADP, et Mir1p, le transporteur de phosphates), les sous-unités Atp1p et Atp2p de l'ATP-synthase et l'ubiquinol-cytochrome *c* reductase (Rip1p).

4. Co-immunoprécipitation de protéines mitochondriales avec des anticorps anti-énolase

Pour confirmer et approfondir les résultats obtenus par BN-PAGE, nous avons utilisé une autre méthode, la co-immunoprécipitation de protéines mitochondriales avec des anticorps anti-énolase immobilisés sur billes de protéine A Sepharose. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par SDS-PAGE, visualisées par coloration au nitrate d'argent et identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Des immunoprécipitations contrôles ont été réalisées avec des anticorps anti-chèvre ou sans anticorps. Cette approche a conduit à l'identification de 12 protéines, dont 6 avaient déjà été identifiées par BN-PAGE. En outre, nous avons identifié l'énolase-1 (Eno1p), une deuxième isoforme de la glyceraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase (Tdh1p), deux enzymes du cycle tricarboxylique (Cit1p et Mdh1p) et deux protéines interagissant avec l'ARN, le facteur d'élongation EF-1A (Tef1p) et sous-unité d'ARN-polimérase (Rpc34p). De plus, nous avons confirmé la présence de l'énolase, de l'aldolase et de la porine par immunodétection.

5. tRK1 et son transporteur protéique, la préMsk1p, sont également présents dans le complexe émolase

Ayant démontré le rôle de l'énolase dans l'import de tRK1 dans les mitochondries (Publication 4), nous avons voulu vérifier si l'ARNt importé et son carrier, la préMsk1p, étaient également présents dans le complexe émolase associé à l'organite. Par RT-PCR, nous avons détecté la présence de tRK1 mais non celle de tRK2, l'isoaccepteur non importé, dans

le complexe immunoprécipité. D'autre part, par analyse Western, nous avons montré la présence de la préMsk1p, aussi bien dans le complexe séparé par BN-PAGE que dans le complexe immunoprécipité. Ces résultats suggèrent que le complexe émolase associé à la mitochondrie pourrait jouer un rôle dans l'importation mitochondriale de tRK1.

- **Conclusion et discussion**

Nous avons démontré que les activités enzymatiques de tous les composants de la chaîne glycolytique étaient associées (à des degrés variables, allant de 3 à 25 %) à des préparations hautement purifiées de mitochondries de levure. D'autre part, nous avons montré qu'une fraction du pool d'émolase (surtout d'Eno2p) était fortement attachée à la surface de l'organite, suggérant que l'émolase sert de point d'ancrage pour la chaîne glycolytique à la mitochondrie. En utilisant deux approches protéomiques, l'électrophorèse sur gel bleu-natif et la co-immunoprécipitation, nous avons mis en évidence l'existence de complexes multiprotéiques associés à la mitochondrie et incluant l'émolase. Par spectrométrie de masse, nous avons identifié 13 protéines dans ces complexes, dont six ont été détectées par les deux méthodes. Les protéines ainsi identifiées correspondent à deux enzymes glycolytiques (Eno1p, Tdh1/3p), 3 transporteurs membranaires mitochondriaux (Por1p, Aac2p, Mir1p), un composant du complexe III de la chaîne respiratoire (Rip1p), deux enzymes du cycle tricarboxylique (Cit1p, Mdh1p) et deux protéines interagissant avec des ARN (Tef1p, Rpc34p). De plus, nous avons montré la présence d'émolase, d'aldolase et de préMsk1p par immunodétection.

Nous étions surpris de ne pas détecter l'ensemble des enzymes glycolytiques dans le(s) complexe(s) émolase, alors que nous avons trouvé que toutes les activités enzymatiques étaient associées à la mitochondrie. Il est cependant possible que la plupart des enzymes glycolytiques ne sont associées au complexe émolase que par des interactions protéine-protéine, incapables de résister aux procédures utilisées pour les analyses par BN-PAGE et par immunoprécipitation.

Nous proposons un modèle hypothétique pour l'organisation du complexe émolase associé à la mitochondrie. Ce modèle suppose que la porine interagit avec l'émolase à la surface de la mitochondrie et avec les transporteurs Aac2p et Mir1p au niveau de l'espace intermembranaire et de la membrane mitochondriale interne. Dans la mesure où l'identité du transporteur mitochondrial du pyruvate (métabolite terminal de la glycolyse) reste inconnue à ce jour (malgré plusieurs tentatives d'identification), on peut se demander si ces trois transporteurs ne seraient pas, directement ou indirectement, impliqués dans le transport

mitochondrial de ce métabolite ? De plus, la présence de deux enzymes du cycle de Krebs (citrate synthase et malade dehydrogenase) dans le complexe émolase suggère que ce complexe pourrait assurer un lien physique entre deux voies métaboliques fonctionnellement couplées mais situées l'une à l'extérieur (glycolyse) et l'autre à l'intérieur (cycle de Krebs) de la mitochondrie

Les résultats présentés dans la Publication 4 (cf. §II.1) nous ont conduits à proposer un modèle suggérant que la portion soluble de l'émolase qui est ciblée vers la mitochondrie, peut interagir spécifiquement avec tRK1 dans le cytosol et l'amener à la périphérie de la mitochondrie pour le délivrer à la préMsk1p et favoriser son interaction avec cette dernière. La présence de tRK1 et de préMsk1p dans le complexe émolase associé à la mitochondrie pose la question du rôle éventuel de ce complexe dans l'import mitochondrial de tRK1. Ce complexe pourrait servir d'échafaudage pour assurer la stabilité de l'interaction tRK1-préMsk1p. Une deuxième possibilité est que certains composants du complexe émolase pourraient aider à la translocation mitochondriale de l'ARNt, soit à travers le canal d'importation des protéines, soit à travers un autre canal (dont l'identité reste à découvrir) de la membrane mitochondriale interne. L'autre possible fonction de ce complexe avec l'émolase est l'importation de tRK1 dans les mitochondries. Cette hypothèse est soutenue par les présences de tRK1 et de préMsk1.

Publication 5

Brandina I, Graham J, Lemaitre-Guillier C, Entelis N, Krasheninnikov IA, Sweetlove L, Tarassov I, Martin R.P. (2006) “Enolase takes part in a macromolecular complex associated with mitochondria in yeast”, *soumis à BBA Bioenergetics*.

Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast

Irina Brandina^{1,2}, James Graham³, Christelle Lemaitre-Guillier⁴, Nina Entelis¹, Igor Krasheninnikov², Lee Sweetlove³, Ivan Tarassov¹ and Robert P. Martin^{1*}.

*Corresponding author:

Robert P. Martin,

Tel : (+33) 390 24 14 87

Fax: (+33)388 41 70 70

Email: r.martin@ibmc.u-strasbg.fr

1 - UMR 7156 "Génétique Moléculaire, Génétique & Microbiologie" CNRS – Université Louis Pasteur Strasbourg I. Institut de Physiologie & Chimie Biologique, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France;

2 – Molecular Biology Department, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, Leninskiye Gory, Russia 119992;

3 - Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3RB, UK.

4 - Plateforme Proteomique Esplanade, IBMC - IFR1589, 15, rue Rene Descartes, 67084 Strasbourg, France.

Summary

In eucaryotes, glycolytic enzymes are classically regarded as being localized in the cytosol. Here, we present evidence that enolase and other glycolytic enzymes are partly associated with the mitochondria in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Enzymatic activity assays indicated on mitochondrial association of all glycolytic enzymes, to extents which are similar to those previously reported for Arabidopsis cells. We found that a fraction of yeast enolase-2 is tightly bound to the mitochondrial outer membrane. Proteomic analyses indicated that enolase takes part in a large macromolecular complex associated to mitochondria. The identified components included additional glycolytic enzymes, mitochondrial membrane carriers, and enzymes of the TCA cycle. We suggest a possible role of the enolase complex in the channeling of pyruvate, the terminal product of glycolysis, towards the TCA cycle within mitochondria. Moreover, we show that the mitochondrial enolase-containing complex also contains the cytosolic tRNA^{Lys}_{CUU}, which is mitochondrially-imported, and its presumed import carrier, the precursor of the mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. This suggests an unsuspected novel function for this complex in tRNA mitochondrial import.

Keywords:

enolase, mitochondria, *Saccharomyces cerevisiae*, tRNA import

Abbreviations:

ACA – ϵ -amino-n-caproic acid

ACN - acetonitrile

Bis-Tris – N,N-bis (hydroxyethyl)-N-N-N-tris-(hydroxymethyl)-aminomethane

BN-PAGE - blue-native polyacrylamide gel electrophoresis

DH - dehydrogenase

EMC – enolase-containing mitochondrial complex

ENO - enolase

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GPM –phospho-glyceromutase

HXK - hexokinase

MIM – mitochondrial inner membrane

MOM – mitochondrial outer membrane

OXPPOS - oxidative phosphorylation

PFK - phosphofructokinase

PGI - glucoso-6-phosphate isomerase

PGK – 3 - phosphoglycerate kinase

PYK - pyruvate kinase

RT-PCR – Reverse-Transcription PCR

TDH- glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase

TPI – trioso-phosphate isomerase

VDAC – voltage dependent anion channel (mitochondrial porin, Por1p)

Names of genes/proteins are given according to the standard nomenclature for yeast and can be found on *Saccharomyces* Genome Database (www.yeastgenome.org).

1. Introduction

Mitochondria are essential organelles of eukaryotic cells performing a wide range of metabolic functions, beyond their critical bioenergetic role in supplying ATP. There is an increasing appreciation that optimal mitochondrial function requires a precise higher order organisation of proteins into functional complexes. While multi-subunit catalytic complexes are well established (the complexes of the mitochondrial respiratory chain are some of the most well studied complexes of this type [1]), the extent to which higher order complexes are prevalent is less well appreciated. There also appears to exist cytosolic complexes that are associated with the mitochondrial outer surface. For example, in mice, the mitochondrially-associated hexokinase forms a regulatory complex with apoptotic proteins [2]. In addition, using a combination of proteomic analysis and enzymes activity assays on a highly purified mitochondrial fraction, the entire glycolytic pathway was shown to be present on the surface of *Arabidopsis* mitochondria [3]. This association was confirmed to exist in vivo for enolase and aldolase. The active state of the glycolytic enzymes on the mitochondrial surface was demonstrated by enzymatic assays with isolated organelles. This micro-compartmentalisation of glycolysis was proposed to play a role in the channelling of pyruvate towards the mitochondria [3].

An association of glycolytic enzymes with mitochondria in yeast was also reported in three recent studies, but their presence was considered to result from cytosolic contamination ([4], [5], [6]). In another work, four subsequent glycolytic enzymes (from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to enolase) were found after resolution of yeast mitochondrial complexes by colourless native PAGE, but were also dismissed as contamination [7]. In a large-scale proteomic analysis of yeast multiprotein complexes, four glycolytic enzymes

(Eno2p, Fba1p, Tpi1p, and Pgc2p) were found to be components of a cytoplasmic complex [8]. Such a higher order organisation of glycolytic enzymes may play a functional role in metabolite channelling.

Mitochondria import not only metabolites from the cytoplasm but also macromolecules such as proteins and RNAs (for reviews, see [9], [10]). Whereas protein import mechanisms are rather well understood nowadays, the mechanisms by which RNA can enter mitochondria remain far less clear. Import of nucleus-encoded RNAs has been identified in phylogenetic groups as diverse as protozoans, fungi, plants and animals, and this pathway can now be considered as quasi-universal [10]. In the majority of cases the imported RNAs are cytosolic tRNAs. The number and type of imported tRNAs vary from one organism to another, ranging from one or two tRNA species in yeast ([11], [12]) to up to a dozen in plants and to a full complement in trypanosomatids, which totally lack mitochondrially-encoded tRNAs [13].

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, one of the two cytoplasmic lysine isoacceptors, tRNA^{Lys}_{CUU} (further referred to as tRK1), is partly imported into mitochondria whereas the second, tRNA^{Lys}_{UUU} (tRK2), is not imported. The import of tRK1 requires both external and internal ATP, the electronegative potential across the mitochondrial inner membrane, an intact mitochondrial protein import machinery, and soluble cytosolic protein factors [14]. Two of these factors have been identified as the cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases [15]. The cytoplasmic enzyme, KRS, is required for aminoacylation of tRK1 (which is a prerequisite for its import) whereas the precursor form of the mitochondrial synthetase, preMSK, is likely to act as a carrier for translocation across the protein import channel. The two lysyl-tRNA synthetases are however not sufficient to drive tRK1 import. Recently, we identified the glycolytic enzyme enolase as an additional essential tRK1 import factor [16]. We showed that enolase is able to recognize the imported tRNA and to favor its

binding to preMSK. We also found that enolase is partially targeted to the mitochondrial surface where it is tightly bound. We thus hypothesized that this mitochondrial targeting of enolase was exploited for delivering tRK1 to preMSK which is synthesized in the periphery of mitochondria. These findings shed new light on tRNA mitochondrial import mechanisms and establish a link between two pathways, glycolysis and tRNA import, previously thought to be independent.

To investigate whether other glycolytic enzymes are also associated with mitochondria in yeast cells, we measured their enzymatic activities in purified mitochondria preparations. Moreover, we characterized mitochondrial enolase-containing complexes by using two proteomic methods: blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) and immunoprecipitation with antibodies against enolase. These approaches allowed us to identify mitochondrial proteins interacting with enolase including RNA-binding proteins, mitochondrial transporters and metabolic enzymes. This complex also included the imported tRNA and its carrier protein, preMSK. A possible model of the enolase-containing mitochondrial complex is proposed and the role of this complex in the targeting of pyruvate towards mitochondria and in tRNA mitochondrial import is discussed.

2. Material and methods

Standard chemicals for electrophoresis and mitochondrial preparation were from Sigma (St. Louis, MO, USA), Serva (Heidelberg, Germany), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Antibodies used in this work were against human enolase (C-19:sc-7455 Santa Cruz Biotechnology, CA), aldolase (Santa Cruz) pre-Msk1 (were kindly provided by A. Tzagoloff, Columbia Univ.), porin 1 (gift from R.Lill, Univ. Marburg Germany), and anti-goat antibodies (Calbiochem, Merck Germany).

2.1. Preparation of mitochondrial fraction

The *Saccharomyces cerevisiae* strain YPH 501 was grown to logarithmic phase in YPEG medium (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glycerol, 2% ethanol) containing 0.5% of glucose. Mitochondria were isolated as previously described [17]. A crude mitochondrial fraction was obtained by shaking cells with 0.5 mm sterilized glass beads in breakage buffer BB (0.6M Sorbitol, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 6.7, 0.3% BSA). Cell debris and membranes were discarded after low speed centrifugations at 4,000g for 5 min. After centrifugation at 20,000g for 30 min, the post-mitochondrial supernatant was separated from the mitochondrial pellet and frozen in liquid nitrogen for further enzymatic assays. Contaminating membranes were further eliminated from the mitochondrial pellet by sucrose step-gradient (1.8M – 0.6M in BB buffer) centrifugation at 20,000g for 30 min. The mitochondrial fraction, located at the interface of the two sucrose layers was used for further analyses.

2.2. Assays of glycolytic enzymes

All glycolytic enzyme activities were measured by a spectrophotometric assay that relies on coupling the particular enzymatic step to the appropriate NAD⁺- or NADP⁺-linked reaction, with the use of commercially available enzymes, according to ([18], [19]). The assay conditions are listed in Table I. The absorbance of produced/oxidized NAD/NADP was measured at 340 nm and background absorbance measured in negative controls (without substrate) was subtracted from positive absorbance values. Triplicate samples with different amounts of purified mitochondria or of post-mitochondrial supernatant were used. Enzymes activity is expressed as nmoles NADH/NADPH*min⁻¹ generated or oxidised in the assay. The activity of mitochondrial citrate synthase was measured as described [20]. Cytochrome c oxidase activity was measured as ascorbate (5 mM), cytochrome c (25 µM)-dependent O₂ consumption in the presence of 0.05% (w/v) Triton X-100, as described [21]. A Clark-type O₂

electrode was used, and the reaction medium (1 ml) contained 20 mM KH₂PO₄, 0.2 M mannitol, 100 mM TES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl₂ and 0.1% (w/v) bovine serum albumin. Alcohol dehydrogenase activity was measured as described [22].

2.3. Localisation of enolase with mitochondrial membranes

For in vitro import experiments of preMsk1 and enolase, yeast mitochondria were isolated as described above, but omitting the sucrose step-gradient. ³⁵S-labeled proteins (Eno1/2p, preMSK) were synthesized from PCR-amplified DNA fragments in a coupled transcription-translation reticulocyte lysate-dependent system (TNT[®] Quick for PCR DNA; Promega) in the presence of [³⁵S]-methionine (1.4 Ci/mmol, Amersham). Oligonucleotides used to amplify the *ENO1/2* and *MSK1* genes were designed as advised by the manufacturer ('f' for forward and 'r' for reverse):

CCCTGATCATAATACGACTCACTATAGGGAGCCACCATGGCTGTCTCTAAAGTTT
ACGCTAGATCC (Eno1/2-f), CCCGGATCCCGGATACACGCGTCACCAC (Eno1-r),
CCCGGATCCCATGTTTTCTTATCATCC (Eno2-r),
CCCTGATCATAATACGACTCACTATAGGGAGCCACCATGAATGTGCTGTAAAAA
GACGCAG (Msk1-f), CCCTGATCACATTAGCTATAACTGAATATTTATATTGG
(Msk1-r).

Protein import assays were performed as described elsewhere [23]. The obtained ³⁵S-labeled proteins were incubated with 30-50 µg mitochondria in import buffer (0.5% BSA [wt/vol], 250 mM sucrose, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 10 mM MOPS-KOH, pH 7.2, 5U pyruvate kinase, 1mM PMSF) at 25°C for 10min and then at 30°C for 10 min. To determine if the ³⁵S-labeled proteins were inserted into the mitochondrial membranes, we used sucrose flotation gradients as described [24]. This allowed to avoid the possibility of having non-integrated protein aggregates present in the membranes fraction. For this purpose, mitochondria were pelleted after the import reaction, resuspended in 0.1 M Na₂CO₃, and

incubated for 30 min on ice. A solution of 2.4 M sucrose, 0.1 M Na₂CO₃ was added to a final concentration of 1.5 M sucrose. This cushion was overlaid with buffer containing 1.4 M sucrose, 0.1 M Na₂CO₃ and then with 0.25 M sucrose, 0.1 M Na₂CO₃. The gradient was centrifuged for 2 h at 337,000 × *g* in a Beckman SW60 rotor at 2°C, which causes the membranes to float on the upper layer of the gradient. Gradients were analyzed by removing aliquots from the top, middle and bottom zones of the gradient. Proteins in these fractions were TCA-precipitated and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The ³⁵S-labeled protein bands were quantified using a Phosphor-Imaging system (BAS 2500; Fuji Medical Systems, Stamford, CT).

2.4. Separation of yeast mitochondrial complexes by blue native electrophoresis

Mitochondrial complexes were separated by BN-PAGE as described [25], [26]. For this purpose, 500 µg of mitochondrial proteins were solubilized in lysis buffer (750 mM aminocaproic acid (ACA), 50 mM BisTris) containing either Triton X-100 or Nonidet-P40, or n-dodecyl-β-D-maltoside, or digitonine (detergent to protein ratio 1:1, v/w), by incubation on ice for 45 min. Samples were centrifuged at 60,000 × *g* for 30 min, and the supernatant was used for immunoprecipitation or BN-PAGE analysis.

For BN-PAGE, the supernatant was suspended in 5% w/v Coomassie Brilliant blue G-250 (Serva) in 500 mM ACA, and proteins were separated on a 5-10% gradient gel. The gel buffer comprised 500 mM ACA and 50 mM BisTris, anode buffer – 50 mM BisTris, cathode buffer – 50 mM tricine, 15 mM BisTris and 0.02% Serva Blue G-250 for the first hour of run and then was changed against buffer containing 0.002% Serva Blue. Molecular Weight Standards (High Molecular weight calibration kit, Amersham Pharmacia Biotech, USA) was used. For the second dimension 10% SDS-PAGE, a lane of the first dimension BN-PAGE was excised and treated with 1M Tris pH 6.8, 10% SDS, 1% β-mercaptoethanol for 30 min at room temperature.

For immunodetection, proteins from a lane of the first dimension BN-PAGE or from the gel after 2D BN/SDS-PAGE were electroblotted on a nitrocellulose membrane, Protran-P (Schleicher & Schuell, BioScience, Germany), using 4 mM Tris, 32 mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol for 12h at 200 mA, 4°C. Staining of proteins was performed with 0.1% Amido Black in 20% methanol, 10% acetic acid. For revelation of enolase-containing complexes, commercial antibodies against human α -enolase were used. The secondary antibodies were anti-Goat IgG. The ECL-Plus Western Detection kit (Amersham Biosciences, Inc) was used for detection.

2.5. Purification of enolase containing complexes by immunoprecipitation

Mitochondrial proteins (1 mg) were solubilized by Triton X-100 in 750 mM ACA (detergent/protein ratio 1:1, v/w), as described above for BN-PAGE, in the presence of 1 mM PMSF and a cocktail of protease inhibitors (“Complete” EDTA free; Roche Diagnostics). Insolubilized membranes were pelleted by centrifugation at 60,000g for 10 min, and the supernatant was pre-cleared by incubation for 1h at 4 °C with slurry of 50% protein A Sepharose CL 4-B Fast Flow (Amersham Biosciences, USA) by gently mixing on a rotating wheel. After centrifugation for 20 sec at 12,000g, the supernatant was incubated for 1h at 4°C on a rotating wheel with antibodies against human α -enolase, then mixed with protein A Sepharose beads and further incubated for 1h at 4°C. As negative controls, immunoprecipitations with protein A Sepharose beads without antibodies or with anti-Goat IgG were performed. Immobilized complexes were washed 3 times with lysis buffer at 4°C, once with 50 mM Tris pH 8. Proteins were eluted by boiling the beads during 5 min in 2x loading buffer, and separated by 10% SDS-PAGE followed by silver staining compatible with mass spectrometric analysis [27]. Protein bands were excised and proceeded for mass spectrometric analysis. Alternatively, after SDS-PAGE separation, immunoblotting was performed with antibodies against enolase, aldolase, porin, Msk1p.

2.6. Mass spectrometry identification

In-gel digestion : Each picked silver-stained lanes was destained with 0.2% potassium ferricyanide in 0.02% sodium thiosulphate and then rinsed with milli-Q water. The gel pieces were then submitted to the preparation process for in-gel digestion as described [28]. Gel fragments were washed with 25 mM NH_4HCO_3 and dehydrated with acetonitrile (ACN, Sigma). These operations were repeated twice and the gel pieces were dried under vacuum for 10 min before reduction (10 mM DTT / 25 mM NH_4HCO_3 buffer at 56°C, 1 hour) and alkylation (25 mM iodoacetamide / 25 mM NH_4HCO_3 buffer at room temperature, protected from light, 1 hour). Afterwards, gel spots were again washed 3 times for 5 min with alternately 25 mM NH_4HCO_3 and ACN. Following vacuum-drying, the gel pieces were dehydrated by three volumes of trypsin (Promega, V5111) in 25 mM NH_4HCO_3 buffer and incubated overnight at room temperature. Tryptic peptides were extracted from the gel by sonication for 30 min in 35% H_2O /60% ACN/5% HCOOH.

MALDI-MS analysis : Mass measurements were carried on a BIFLEX III™ MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Germany) equipped with the SCOUT™ High Resolution Optics with X-Y multisample probe and girdles reflector. This instrument was used in positive ion reflector mode at a maximum accelerating potential of 19 kV. A saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma, Saint Louis, USA) was used as a matrix. Mass spectra were internally calibrated with trypsin autolysis peaks ($m/z = 842.510$ and $m/z = 2211.105$). Monoisotopic peptide masses were assigned and the peak list transferred through MS BioTools™ program (Bruker Daltonics) as input to search against the NCBI protein Database using MASCOT software (Matrix Science, UK). Up to one missed tryptic cleavage and optional methionine oxidation were considered and the mass accuracy was limited to 100 ppm. As an example, the identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is shown in Fig. 4.

Nano LC-MS/MS analysis of the digested proteins were performed using a CapLC capillary LC system (Waters, Altrincham, UK) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Q-TOF Micro, Waters). The sample (5 μ L) was first loaded, concentrated and cleaned up onto a C18 PepMap precolumn cartridge (LC Packings) and then separated on-line by the analytical reversed-phase capillary column (Pepmap C18, 75 μ m i.d., 15 cm length; LC Packings) under a 200 μ L min⁻¹ flow rate. The gradient profile used consisted ~~in of~~ a linear gradient from 97% A (97.9% H₂O/2% ACN/0.1% [v/v] HCOOH) to 95% B (98%ACN/1.9%H₂O/0.1% [v/v] HCOOH) in 45 min followed by a linear gradient to 95% B in 3 min. Internal calibration was assumed by the Lockspray module (Waters) that switches to the reference source (leucine enkephalin M²⁺ = 556.2551m/z) every 10 sec during the acquisition run. The spray system (liquid junction) was used at 3.6 kV. Mass data acquisitions were piloted by MassLynx 4.0 software (Waters). Nano-LC-MS/MS data were collected by data-dependent scanning, that is, automated MS to MS/MS switching. Fragmentation was performed using argon as the collision gas and with a collision energy profile optimized for various mass ranges of ion precursors. 4 ion precursors were allowed to be fragmented at a time. Mass data collected during a NanoLC-MS/MS analysis were processed automatically with the ProteinLynx Process (Waters) module. Data analysis was performed with Mascot (Matrix Science Ltd., London, UK) against NCBI (National Center for Biotechnology Information Information) database with carbamidomethylation (Cys),oxidation (Met), 0.25 Da mass error and one miss cleavage but without any taxonomy restriction.

2.7. RT-PCR

RNA was eluted from mitochondrial enolase-containing complexes after immunoprecipitation. For that, protein A Sepharose beads with immobilized protein complexes were mixed for 10 sec at 4 °C with lysis buffer, 10% of SDS, 5 mM EDTA, 0.2%

glycogen and RNAsine (Promega). Beads were spun at 14,000 g for 1 min, and the RNA was recovered from the supernatant by phenol:chloroform 25:24 (w/w) extraction and ethanol precipitation. The RNA was then submitted to RT-PCR using the following pairs of oligonucleotides ("f" for forward and "r" for reverse): gccttggtggcgccatc (tRK1f), tggagccctgtaggggg (tRK1r); and tccttgtagctcagtt (tRK2f), tggtcctcataggggg (tRK2r). Amplification was done by using the single-step RT-PCR kit (Qiagen) in the following conditions: 50°C, 30 min; 95°C, 15 min, 15 cycles at 95–55–72°C, 10 cycles at 95–58–72°C and 5 cycles at 95–62–72° (each step for 1 min), with the final step at 72°C for 10 min. In all cases, a control PCR was included, performed in similar conditions as RT-PCR using *Taq* DNA polymerase, to control the absence of DNA contamination in RNA samples.

3. Results

3.1. Functionally active glycolytic enzymes presents in yeast mitochondrial fraction

To investigate whether glycolytic enzymes are present on the surface of yeast mitochondria, we measured their activity in a purified mitochondrial fraction and compared it to their total activity in the cell. The yield of mitochondria isolation was estimated on the basis of recovery of cytochrome *c* oxidase (a mitochondrial intermembrane space protein) activities in the mitochondrial fraction (1,6 nmol/min, recovered from 1 g of yeast cells) and post-mitochondrial fraction (14,89 nmol/min). Total activity in the cell was calculated as the sum of activities in the mitochondrial and post-mitochondrial fractions (16,5 nmol/min). The deduced efficiency of mitochondria isolation was 9 ± 3 %. The activity of a mitochondrial matrix enzyme, citrate synthase, was measured and the efficiency of mitochondria purification was found to be very similar. The yield of mitochondria recovery was low but comparable to the yields described in the literature, and can be explained by a significant extent of breakage of mitochondria during cell disruption with glass beads [29]. For quantitative assessment of the degree of mitochondria purification achieved, the enzymatic

activity of the cytoplasmic marker enzyme, alcohol dehydrogenase, was measured in the mitochondrial fraction (1.04 ± 0.07 , nmol/min, recovered from 1 g of yeast cells) and then divided by the sum of activity in the mitochondrial fraction (1.04 ± 0.07) plus the post-mitochondrial one (27.1 ± 3). The deduced degree of cytoplasmic contamination was 3.8 ± 0.2 %, a value which was subtracted from the calculated enzyme activity in the mitochondrial fraction.

The extent of mitochondria association of each of the 10 glycolytic enzymes was calculated as a percentage of enzymatic activity detected in the mitochondrial fraction (corrected for the yield of purified mitochondria and taking into account cytoplasmic contamination) in comparison to total cellular activity (the sum of mitochondrial fraction activity plus post-mitochondrial one) as in [3]. The deduced results are presented in Table II.

We detected the enzymatic activities of all glycolytic enzymes in the yeast mitochondrial fraction, with percentages of mitochondria-associated enzyme activities comparable to those reported for *Arabidopsis* cells (Table II and Fig. 1) [3]. We can thus conclude that the whole glycolytic pathway is, to some extent, associated with the mitochondria in yeast. The dominating presence of terminal phase enzymes (phosphoglyceromutase, enolase and, mostly, pyruvate kinase) may have a functional implication for the targeting of pyruvate towards the mitochondria.

This raises the question of how the glycolytic enzymes interact with the surface of mitochondria. One possibility is that some glycolytic enzymes are integrated into the mitochondrial outer membrane (MOM). In silico analysis of glycolytic enzymes sequences with the program Tmap from EMBOSS (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/Apps/tmap.html>) revealed the presence of putative transmembrane domains in Pgi1p (aa 279-299), Pfk1p (aa 228-245 and 274-291), and Eno1p/Eno2p (aa 102-130 and aa 33-44 [30]). Another possibility is that glycolytic

enzymes are attached to MOM receptors through protein:protein interactions. This was reported to occur in yeast between hexokinase and porin [31].

3.2. Enolase is partly integrated in the outer membrane of yeast mitochondria.

Previously, we have shown that part of the cellular enolase pool is associated with mitochondria in yeast [16]. This association was resistant to swelling of the organelles (hypotonic shock) and to treatment with either NaCl or Na₂CO₃. In contrast, enolase was completely released from mitochondria by proteinase K treatment. This behaviour of enolase resembles that of a bona fide mitochondrial outer membrane protein.

To determine if enolase is indeed integrated into the mitochondrial outer membrane, we performed, after carbonate extraction, a sucrose flotation gradient [24]. This method allows to separate integrated membrane proteins (floating on the top) from soluble proteins (in the bottom part of the gradient) and from protein aggregates (in the middle part of the gradient), and thus avoids the possibility that non-integrated enolase aggregates contaminate the membrane fraction. In this experiment, we compared, after separation on sucrose flotation gradients, the localization of the two yeast enolase isoforms, (³⁵S-Met labelled Eno1p and Eno2p were synthesized in vitro in a coupled transcription-translation system) to that of ³⁵S-Met labelled preMsk1p, which is known to be imported in the mitochondrial matrix. After incubation of the labelled proteins with isolated mitochondria in protein import conditions, mitochondria were pelleted, carbonate-extracted and submitted to separation by sucrose flotation. As a result, we detected 78% of preMsk1p in the soluble proteins fraction and 5% in the membranes fraction (Fig. 2). The soluble proteins fraction contained both the non-imported precursor synthetase and the imported matrix-associated mature protein whereas the membranes fraction contained only the precursor form inserted in the protein import channel. For the two enolase isoforms, we observed that 3% of Eno2p was associated to mitochondrial membranes whereas 22% was in aggregates and 75% in soluble proteins. In contrast, Eno1p

was not detected in the membranes fraction but almost exclusively in the soluble proteins fraction (98%). We thus concluded that a small but significant portion of Eno2p but not of Eno1p (the two isoforms differ in 20 out of 437 amino acids [32]) is inserted in - or at least tightly bound to - mitochondrial membranes.

Since part of the cellular enolase pool is integrated in the mitochondrial outer membrane, we considered the possibility that enolase could anchor other glycolytic enzymes to the mitochondrial surface. To search for other proteins interacting with enolase at the mitochondrial surface, we used two proteomic approaches: blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) and immunoprecipitation with antibodies against enolase.

3.3. Separation and analysis of yeast mitochondrial enolase containing complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis

BN-PAGE is a widely used approach to study mitochondrial complexes [33]. It allows the separation of native macromolecular complexes of mitochondrial proteins and their further identification. Mitochondrial proteins were solubilized with different detergents (Nonidet-P40, n-dodecyl- β -D-maltoside or Triton X-100) using different detergent:protein ratios. After separation by two-dimensional BN/SDS-PAGE, complexes were identified by Western blot analysis with anti-enolase antibodies. The best resolution of enolase-containing complexes was observed after solubilization of mitochondria with Triton X-100, at a detergent-to-protein ratio of 1:1 (v/w) (fig.3A). These conditions were further used in all our experiments.

After immunoblotting, we observed three forms of e nolase containing mitochondrial complexes, referred to as EMC 1, EMC2 and EMC3 (Fig. 3B), their respective sizes being estimated at around 700 kDa, 520 kDa and 350 kDa. Enolase was the most abundant in the 520 kDa EMC2, which also contained another glycolytic enzyme, aldolase (Fig. 3B). To identify the protein components of EMC2, part of the lane after first dimension BN-PAGE

was excised, immunoblotted and decorated with antibodies against enolase and aldolase to estimate the position and size of the band containing EMC2 on the gel. The rest of the EMC2 band was then excised, in-gel trypsin digested and the resulting peptides were analysed by mass spectrometry (MALDI-TOF or capillary HPLC coupled with mass-spectrometry ESI-Q/TOF, nanoLC-MS/MS). As an example, the identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Tdh3p) by MALDI-TOF is shown in Fig. 4.

In five independent experiments, we identified a set of 7 different proteins (see Table III): POR1/YVDAC1 (mitochondrial porin), Aac2p (ADP/ATP carrier), Atp1p and Atp2p (α and β subunits of the F1 sector of ATP synthase), Mir1p (the mitochondrial phosphate carrier), Rip1p (ubiquinol-cytochrome-c reductase, a subunit of respiratory chain complex III), and Tdh3p (the major form of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Fig. 4).

3.4. Purification of a mitochondrial enolase containing complex by Immunoprecipitation.

To confirm and improve our data on the protein composition of mitochondrial enolase-containing complex(es), immunoprecipitation with antibodies against enolase in combination with mass spectrometry analysis was used. Purified yeast mitochondria were solubilized by Triton X-100, in the same conditions as for BN-PAGE, and enolase-containing complexes were immunocaptured by anti-enolase antibodies immobilized on protein A Sepharose. These commercial antibodies were raised against an epitope near the C-terminus of human α -enolase and cannot distinguish between the two yeast enolase isoforms. Immunoprecipitated proteins were separated by 10% SDS-PAGE, detected by silver staining (Fig. 5) and then identified by MALDI-TOF (Table III). Control immunoprecipitations with either non-specific anti-goat antibodies or protein A Sepharose without antibodies were

performed. Proteins non-specifically bound to protein A Sepharose and anti-goat IgG were identified as BSA and proline oxidase (Put1p).

Mass spectrometry analysis allowed us to identify 12 different proteins that coimmunoprecipitated with mitochondria-associated enolase. The results, shown in Table III, were obtained from four independent experiments. Among the 12 identified proteins, 6 have also been detected by BN-PAGE. In addition, we detected enolase 1 (Eno1p), the minor form of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Tdh1p), two mitochondrial matrix enzymes of the TCA cycle, citrate synthase (Cit1p) and malate dehydrogenase (Mdh1p), and two RNA-binding proteins, the cytoplasmic translation elongation factor EF1-A (Tef1p) and the subunit C34 of RNA-polymerase III (Rpc34p).

A limitation of the immunopurification method is that transient or weak protein-protein interactions might be unable to withstand the procedure, and corresponding proteins might be lost. This could explain the absence of the majority of glycolytic enzymes among proteins identified by this approach. On the other hand, we suggest that enolase was tightly retained by antigen-antibody interactions on the immobilised antibodies, so that its eluted amount was not enough for identification by mass spectrometric analysis.

To verify if other components of the enolase-containing complex, EMC2, identified by BN-PAGE are also present in the immunoprecipitated complex, we performed western analysis of proteins eluted after immunoprecipitation, a method which is more sensitive than mass spectrometry analysis. This demonstrated the presence of enolase, aldolase and porin in the proteins retained on immobilized anti-enolase antibodies (Fig. 5B).

Taken together, the two proteomic approaches permitted us to identify 13 candidate components in the mitochondrial complex containing enolase. The presence of glycolytic enzymes in this complex was not as abundant as expected. Nevertheless, our activity assays

demonstrated that all glycolytic enzymes activities were associated to some extent to highly purified yeast mitochondria.

3.5. Presence of both preMsk1p and tRNA^{Lys}_{CUU} in mitochondria-associated enolase complex

Recently, we have demonstrated that the glycolytic enzyme enolase-2 is an essential factor for directing the import of cytoplasmic tRNA^{Lys}_{CUU} (tRK1) into yeast mitochondria [16]. To evaluate whether mitochondria-associated enolase complex(es) could play a role in tRK1 mitochondrial import, we checked for the presence in these complex(es) of preMsk1p, the known import carrier of tRK1 [15]. Immunostaining with anti-Msk1p antibodies revealed the presence of preMsk1p, both in the EMC2 complex separated by BN/SDS PAGE (Fig. 3B) and in proteins that coimmunoprecipitated with immobilized anti-enolase antibodies (Fig. 5B). We also checked for the presence of tRK1 in the enolase complex isolated by immunoprecipitation. For this, we extracted RNA from the immunoprecipitate and used it as a matrix for RT-PCR amplification with oligonucleotide primers specific to either the imported tRK1 or the non-imported tRK2. We found that tRK1 was present in the immunoprecipitated material (Fig. 6). This association of tRK1 with the enolase complex appears to be specific since the non-imported tRK2 was not detected in the same conditions (result not shown). These data are in favour of a possible implication of a mitochondrial enolase-containing complex in the tRNA import pathway.

4. Discussion

Here we present evidence that, in yeast, all enzymes activities of the glycolytic pathway are, to some extent, associated to purified mitochondria (Table II). Such a compartmentalisation of glycolysis has been shown previously to exist in *Arabidopsis thaliana* cells and was proposed to play a role in the channelling of pyruvate towards the

mitochondria [3]. Organisation of enzymes into macromolecular complexes may be beneficial both in terms of catalytic efficiency (direct channelling of metabolites can occur between sequential enzymes) and regulation (via the controlled presence or absence of enzymes within a complex), and may have other advantages such as maintenance of salivation capacity and sequestration of toxic metabolites [34]. The OXPHOS complexes of the mitochondrial inner membrane are organized in a “functional multiprotein unit” as a supramolecular complex [33]. Mitochondrial matrix enzymes of the TCA cycle were also shown to exist in the form of a sequential complex, or metabolon, bound to the matrix side of the inner membrane [35].

In yeast, glycolytic enzymes may form a macromolecular complex bound to the mitochondrial surface. This hypothesis is supported by the fact that a fraction of enolase-2 was found to be tightly bound to (or integrated into) mitochondrial membranes, as shown by using sucrose flotation gradients. We therefore searched for mitochondria associated enolase-containing complex(es) by using two complementary approaches, either blue-native gel electrophoresis or immuno-purification with immobilized anti-enolase antibodies, followed by mass spectrometric analysis or immunodecoration. The results obtained are in favour of the existence of such an enolase complex and allowed to identify several candidate components. A total of 13 proteins were identified by either BN-PAGE or immuno-purification, of which 6 were detected by both methods. They include three glycolytic enzymes (enolase, aldolase, GAPDH), three mitochondrial transporters (the outer membrane porin and the inner membrane ADP/ATP carrier Aac2p and inorganic phosphate carrier Mir1p), two ATP synthase subunits (Atp1p, Atp2p), the Rieske iron-sulfur protein of respiratory chain complex III (Rip1p), two enzymes of the TCA cycle (citrate synthase and malate dehydrogenase), and two proteins involved in RNA metabolism (translation elongation factor EF-1A, subunit C34 of RNA polymerase III) (see Table III, Fig. 3 and 5). In addition, the mitochondrially-imported tRNA^{Lys}_{CUU} as well as its presumed import carrier, the

precursor of the mitochondrial lysyl-tRNA synthetase [15], were also found to be present (Figs. 3, 5 and 6).

It must be stressed that the majority of glycolytic enzymes were not detected in the characterized mitochondrial enolase complex(es), whereas all their enzymes activities were found to be associated (to some extent) to purified mitochondria preparations. A possible explanation for this discrepancy is that most of these enzymes may bind by weak protein: protein interactions to the complex and may have been lost during BN-PAGE separation and immunoprecipitation.

A hypothetic model for the organisation of the mitochondria associated enolase complex is shown in Fig.7. Porin (Por1p) was one of the major proteins identified in complex EMC2 separated by BN-PAGE and was reproducibly detected in immunoprecipitation experiments. Thus we suggest that its presence is not due to contamination. We propose that porin interacts with enolase (or another glycolytic enzyme) on the cytoplasmic side of the outer membrane and with the ADP/ATP transporter and inorganic phosphate carrier in the intermembrane space and inner membrane. It is assumed that the mitochondrial permeability transition pore is formed by porin in the outer membrane and by the ADP/ATP carrier in the inner membrane [36]. The mitochondrial phosphate transporter Mir1p contains 6 transmembrane segments [37]. Since it was shown that mitochondrial transport proteins do not face to a significant extent out of the mitochondrial membrane [38], we suggest that Mir1p and Aac2p may interact through their transmembrane parts.

What might be the role of the mitochondrial permeability transition pore and associated phosphate carrier Mir1p in the mitochondrial enolase complex? Such a role may be related to the mitochondrial transport of pyruvate, the terminal product of glycolysis. It has been suggested that the protein encoded by YIL006w/NDT1, another member of the mitochondrial carrier family, corresponds to the mitochondrial pyruvate transporter [39]. This

assumption was based on the fact that the YIL006w deletion mutant exhibited no inhibitor-sensitive pyruvate transport. However, it was recently demonstrated that YIL006w/NDT1 encodes in fact a mitochondrial transporter for NAD^+ , and that recombinant and reconstituted Ndt1p does not transport pyruvate [40]. Thus, the identity of the mitochondrial pyruvate transporter remains still elusive.

The presence of two TCA cycle enzymes, citrate synthase and malate dehydrogenase, in the mitochondria-associated enolase complex may be of functional significance, since mitochondrially-imported pyruvate is consumed in the TCA cycle. We therefore suggest that the characterized enolase complex provides a physical link between the glycolytic pathway and the TCA cycle and serves as a device to bring pyruvate to the site of its consumption within mitochondria.

The fact that tRK1 and its possible import carrier, preMsk1p, were both detected in the mitochondrial enolase complex is in line with a role of enolase in the tRNA import process. Indeed, we have shown previously that soluble enolase can specifically interact with tRK1 in the cytoplasm and favor the binding of the tRNA to preMsk1p [16]. We therefore proposed a model suggesting that a portion of cellular enolase, which is delivered towards mitochondria, may recognize tRK1 in the cytosol and deliver it to preMsk1p, which is synthesized on mitochondria-attached polysomes. We propose here that, once the tRK1 molecule is detached, enolase may be inserted in a mitochondrial multiprotein complex on the mitochondrial outer membrane. This complex may serve as a scaffold for this process and some of its components could help in transmembrane translocation of the tRNA, either through the protein import channel (as a tRK1-preMsk1p complex, [15]) or through another mitochondrial membrane channel. In plants, VDAC/porin has been suggested to be involved in tRNA mitochondrial import [41] and, also, the permeability transition pore was proposed to play role in DNA

import [42]. A better understanding of the mechanism of tRNA translocation across mitochondrial membranes in yeast awaits further investigation.

In conclusion, the present work provides evidence for the existence of a complex involving enolase and other glycolytic enzymes on the surface of yeast mitochondria. This complex might have two roles. On one hand, it could allow and regulate the channelling of pyruvate (the terminal product of glycolysis) towards its site of consumption within mitochondria. On the other hand, this complex appears to be also involved in the process of tRNA import into mitochondria. Therefore, our results provide a heretofore unsuspected link between glycolysis and tRNA mitochondrial import, previously thought to be independent cellular processes.

Acknowledgements

We would like to thank P.Giege (IBMP, Strasbourg, France) for helpful assistance in establishing the BN-PAGE system and productive discussion about the choice of methods to study enolase complexes. This work was supported by the CNRS, AFM (Association Française contre les Myopathies), GIS IMR (Institut des Maladies Rares), MitEuro (concerted action PCRDT 5), and RFBR. IB was supported by a scholarship from the French Government (BGF). LS was financially supported by the Biological and Biotechnological Sciences Research Council, UK.

References:

- [1] H. Eubel, J. Heinemeyer, S. Sunderhaus and H.P. Braun, Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria, *Plant Physiol Biochem* 42 (2004) 937-42.
- [2] N.N. Danial, C.F. Gramm, L. Scorrano, C.Y. Zhang, S. Krauss, A.M. Ranger, S.R. Datta, M.E. Greenberg, L.J. Licklider, B.B. Lowell, S.P. Gygi and S.J. Korsmeyer, BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis, *Nature* 424 (2003) 952-6.
- [3] P. Giege, J.L. Heazlewood, U. Roessner-Tunali, A.H. Millar, A.R. Fernie, C.J. Leaver and L.J. Sweetlove, Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells, *Plant Cell* 15 (2003) 2140-51.
- [4] H. Zischka, G. Weber, P.J. Weber, A. Posch, R.J. Braun, D. Buhringer, U. Schneider, M. Nissum, T. Meitinger, M. Ueffing and C. Eckerskorn, improved proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis, *Proteomics* 3 (2003) 906-16.
- [5] S. Ohlmeier, A.J. Kastaniotis, J.K. Hiltunen and U. Bergmann, The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth, *J Biol Chem* 279 (2004) 3956-79.
- [6] H. Prokisch, C. Scharfe, D.G. Camp, 2nd, W. Xiao, L. David, C. Andreoli, M.E. Monroe, R.J. Moore, M.A. Gritsenko, C. Kozany, K.K. Hixson, H.M. Mottaz, H. Zischka, M. Ueffing, Z.S. Herman, R.W. Davis, T. Meitinger, P.J. Oefner, R.D. Smith and L.M. Steinmetz, integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast, *PLoS Biol* 2 (2004) e160.
- [7] X. Grandier-Vazeille, K. Bathany, S. Chaignepain, N. Camougrand, S. Manon and J.M. Schmitter, Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex, *Biochemistry* 40 (2001) 9758-69.

- [8] A.C. Gavin, M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J.M. Rick, A.M. Michon, C.M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M.A. Heurtier, R.R. Copley, A. Edlmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer and G. Superti-Furga, Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes, *Nature* 415 (2002) 141-7.
- [9] S.A. Paschen and W. Neupert, Protein import into mitochondria, *IUBMB Life* 52 (2001) 101-12.
- [10] N.S. Entelis, O.A. Kolesnikova, R.P. Martin and I.A. Tarassov, RNA delivery into mitochondria, *Adv Drug Deliv Rev* 49 (2001) 199-215.
- [11] R. Martin, J.M. Schneller, A. Stahl and G. Dirheimer, Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria, *Biochemistry* 18 (1979) 4600-4605.
- [12] J. Rinehart, B. Krett, M.A. Rubio, J.D. Alfonzo and D. Soll, *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion, *Genes Dev* 19 (2005) 583-92.
- [13] A. Schneider and L. Marechal-Drouard, Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol* 10 (2000) 509-13.
- [14] I. Tarassov, N. Entelis and R.P. Martin, An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA, *J Mol Biol* 245 (1995) 315-23.
- [15] I. Tarassov, N. Entelis and R.P. Martin, Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases, *Embo J* 14 (1995) 3461-71.

- [16] N. Entelis, Brandina, I, Kamenski, P, Krasheninnikov, I, and R. Martin, Tarassov, I, A glycolytic enzyme, enolase, is a co-factor of tRNA targeting towards mitochondria in yeast, *Mol Cell Biol*, submitted (2006).
- [17] N. Entelis, O. Kolesnikova, H. Kazakova, I. Brandina, P. Kamenski, R.P. Martin and I. Tarassov, Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications, *Genet Eng (N Y)* 24 (2002) 191-213.
- [18] G.K.G.M.V. Bergmeyer H.U., 2nd edn. Academic Press, New York., *Enzymes as Biochemical Reagents*, Vol. 1, Academic Press, New York., 1974.
- [19] R. Wu and E. Racker, Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. III. Limiting factors in glycolysis of ascites tumor cells, *J Biol Chem* 234 (1959) 1029-35.
- [20] G.R. Faloona and P.A. Srere, *Escherichia coli* citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties, *Biochemistry* 8 (1969) 4497-503.
- [21] L.J. Sweetlove, J.L. Heazlewood, V. Herald, R. Holtzapffel, D.A. Day, C.J. Leaver and A.H. Millar, The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria, *Plant J* 32 (2002) 891-904.
- [22] T. Modig, G. Liden and M.J. Taherzadeh, Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase, *Biochem J* 363 (2002) 769-76.
- [23] M.T. Ryan, W. Voos and N. Pfanner, Assaying protein import into mitochondria, *Methods Cell Biol* 65 (2001) 189-215.
- [24] D. Rapaport, R.D. Taylor, M. Kaser, T. Langer, W. Neupert and F.E. Nargang, Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria, *Mol Biol Cell* 12 (2001) 1189-98.

- [25] H. Schagger, W.A. Cramer and G. von Jagow, Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis, *Anal Biochem* 217 (1994) 220-30.
- [26] P.S. Brookes, A. Pinner, A. Ramachandran, L. Coward, S. Barnes, H. Kim and V.M. Darley-Usmar, High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes, *Proteomics* 2 (2002) 969-77.
- [27] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm and M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal Chem* 68 (1996) 850-8.
- [28] T. Rabilloud, M. Heller, M.P. Rigobello, A. Bindoli, R. Aebersold and J. Lunardi, The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress, *Proteomics* 1 (2001) 1105-10.
- [29] K. Diekert, A.I. de Kroon, G. Kispal and R. Lill, Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Cell Biol* 65 (2001) 37-51.
- [30] V. Pancholi, Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases, *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 902-20.
- [31] J. Krause, R. Hay, C. Kowolik and D. Brdiczka, Cross-linking analysis of yeast mitochondrial outer membrane, *Biochim Biophys Acta* 860 (1986) 690-8.
- [32] L. McAlister and M.J. Holland, Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes, *J Biol Chem* 257 (1982) 7181-8.
- [33] H. Schagger, native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes, *Methods Enzymol* 260 (1995) 190-202.

- [34] J. Ovadi and P.A. Srere, Macromolecular compartmentation and channeling, *Int Rev Cytol* 192 (2000) 255-80.
- [35] J.B. Robinson, Jr., L. Inman, B. Sumegi and P.A. Srere, Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon, *J Biol Chem* 262 (1987) 1786-90.
- [36] A.P. Halestrap and C. Brennerb, The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death, *Curr Med Chem* 10 (2003) 1507-25.
- [37] A. Phelps and H. Wohlrab, Homodimeric mitochondrial phosphate transport protein. Transient subunit/subunit contact site between the transport relevant transmembrane helices A, *Biochemistry* 43 (2004) 6200-7.
- [38] R. Belenkiy, A. Haefele, M.B. Eisen and H. Wohlrab, 1. Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Braun HP: Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 2004, 42:937-942.
- [39] J.C. Hildyard and A.P. Halestrap, Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem J* 374 (2003) 607-11.
- [40] S. Todisco, G. Agrimi, A. Castegna and F. Palmieri, Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 281 (2006) 1524-31.
- [41] T. Salinas, A-M. Duchêne, L. Delage, S. Nilsson, E. Glaser, M. Zaepfel and L. Maréchal-Drouard. Unexpected requirement of VDAC and TOM proteins for tRNA import into plant mitochondria, *Curr Biol*, submitted (2006).
- [42] M. Koulintchenko, Y. Konstantinov and A. Dietrich, Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex, *Embo J* 22 (2003) 1245-54.

Legends to figures.

Figure 1. (A) Schematic representation of the glycolytic pathway. Pyruvate, the final product of glycolysis, is transported into mitochondria. (B) The diagram gives the percentages of mitochondria-associated glycolytic enzymes activities in *S.cerevisiae* compared to *Arabidopsis* cells (the latter values were taken from [3]).

Figure 2. Localisation of enolases (Eno1p, Eno2p) and preMsk1p in mitochondrial fractions separated by sucrose flotation gradients. [³⁵S] methionine-labelled enolases and preMsk1p were incubated with isolated yeast mitochondria in conditions of protein import, then mitochondria were carbonate-treated and samples were analyzed on sucrose flotation gradients. Membranes and integral membrane proteins float on the top of the gradient (I), aggregated proteins migrate to the middle zone (II), and soluble proteins are in the bottom part (III). Proteins from fractions I-III were precipitated with trichloroacetic acid and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Percentages of radiolabelled proteins associated to each fraction are indicated.

Figure 3. Separation of yeast mitochondrial complexes by two-dimensional blue native gel electrophoresis. Mitochondria were solubilized by Triton X-100 (detergent/protein ratio 1:1, v/w) in the presence of 750 mM ACA. (A). The first dimension was BN-PAGE, the second was SDS-PAGE. Separated proteins were electro-blotted on a Protran-P membrane and stained with amidoblack. (B) Immunodetection of enolase containing mitochondrial complexes (EMC1-3) using anti-enolase (@Eno) antibodies. Immunostaining with anti-aldolase (@Aldo) and anti-Msk1p (@Msk1) antibodies is also shown.

Figure 4. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 (NCBI accession number N° 6321631) by MALDI-TOF.

Figure 5. Characterization of protein components of the immunopurified enolase containing complex. (A). Silver staining of SDS-PAGE separated proteins eluted from the complex immunoprecipitated with anti-enolase antibodies (lane 1). Lane M, molecular weight standards. Control immunoprecipitations with non-specific anti-goat antibodies (@Goat, lane 2) and without antibodies (lane3) are presented. The signals corresponding to non-specific bands, marked with asterisks, were not analysed by mass spectrometric analysis. (B). Immunodetection of SDS-PAGE separated proteins eluted from the enolase complex using antibodies against enolase, aldolase, porin, and mitochondrial lysyl-tRNA synthetase (Msk1).

Figure 6. Presence of the mitochondrially-imported $\text{tRNA}^{\text{Lys}}_{\text{CUU}}$ in the immunocaptured enolase complex. Detection of $\text{tRNA}^{\text{Lys}}_{\text{CUU}}$ (tRK1) was by RT-PCR followed by polyacrylamide gel electrophoretic separation of the amplified products. RNA was extracted from the complex and used as a template for RT-PCR and PCR (IP antiEno). Control RT-PCR's and PCR's were performed with water (mQ), with RNA extracted from complexes precipitated without antibodies (IP w/out ab), and with RNA extracted from mitochondria (Total mito). A DNA Ladder is presented on the left (L).

Figure 7. Cartoon representation of the mitochondrial enolase complex. Glycolytic enzymes (Aldolase, GAPDH, ENO), associated to the mitochondrial outer membrane (MOM), are indicated in yellow, mitochondrial membrane proteins (POR1, AAC2, MIR1, ATP1/2, RIP1) in blue, and matrix enzymes of the TCA cycle (CIT1 and MDH1) in green. CIT1 and MDH1 are supposed to be associated to the matrix side of the MIM. The precursor of the mitochondrial lysyl-tRNA synthetase (MSK1) and the cytoplasmic translation elongation factor EF-1A (TEF1) are represented in association with the tRNA.

Table I. The assay conditions for functional tests of enzymes.

Enzyme	Assay components	Concentration	Enzyme	Assay components	Concentration	
Alcohol dehydrogenase	MOPS pH 7.0	50mM	Glucoso-6-phosphate isomerase	glycylglycine pH 8.5	75mM	
	ADP	1mM		MgCl ₂	10mM	
Aldolase	KCl	100mM		NAD	0.5mM	
	lactate DH	6U		G6PDH	0.5U	
	MgCl ₂	10mM	Fructose-6-Phosphate	10mM		
	NADH	0.15mM	HEPES pH 7.6	100mM		
	Phosphoenolpyruvate	5mM	EDTA	1mM		
	HEPES pH 7.7	40mM	MgSO ₄	2mM		
	NADH	0.3mM	NADH	0.3mM		
	Glycerol 3-phosphate DH	1.72U	PGA	6.5mM		
	TPI	5U	GAPDH	3.32U		
	Fructose-1,6-biphosphate	5mM	ATP	1mM		
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	HEPES pH 8.0	100mM	3-Phospho-glycerate kinase	Tris pH 7.6	60mM	
	EDTA	1mM		MgSO ₄	4mM	
	NADH	0.3mM		ADP	2.3mM	
	MgSO ₄	8mM		NADH	0.3mM	
	DTT	2mM		enolase	0.92U	
	glyceraldehyde-3-phosphate	6mM		pyruvate kinase	3U	
	PGK	4U		lactate DH	6U	
ATP	2mM	glyceraldehyde-3-phosphate	3mM			
Hexokinase	HEPES pH 7.5	30mM	Phospho-glyceromutase	MOPS pH 7.0	50mM	
	MgCl ₂	2mM		KCl	10mM	
	EDTA	0.6mM		MgCl ₂	10mM	
	Phosphofruktokinase	KCl	9mM	Pyruvate Kinase	NADH	0.15mM
					Phosphoenolpyruvate	5mM
		NAD	1mM		lactate DH	6U
		ATP	1mM		ADP	1mM
		G6PDH	1U	Triosphosphate isomerase	HEPES pH 8.0	100mM
		Glucose	2mM		EDTA	5mM
Tris pH 8.0		100mM	NADH		0.2mM	
MgCl ₂		5mM	glycerol-3-phosphate dehydrogenase		1U	
Fructose-6-Phosphate	5mM	Glyceraldehyde-3-phosphate	1.5mM			
NADH	0.1mM	Abbreviations used : GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase PGK - 3-phosphoglycerate kinase TPI - trioso phosphate isomerase				
Aldolase	1U					
Glycerol-dehydrogenase	1.376U					
TPI	2.52U					
ATP	1mM					

Table II. Subcellular localisation of glycolytic enzymes.

Enzyme	Gene(s)	Activity (nmol·min ⁻¹) recovered from 1 g of yeast cells		Percentage of total activity associated with mitochondria	
		Mitochondrial	Total activity in the cell ^{a)}	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis</i> [3]
Hexokinase	HXK1, HXK2	0.8±0.04	7.6±0.4	10	12
Glucoso-6-phosphate isomerase	PGI1	6±0.8	272±12	2	5
Phosphofructokinase	PFK1, PFK2	5.6±1.2	228±1	2	3
Aldolase	FBA1	10.8±1.6	420±12	3	3
Triosophosphate isomerase	TPI1	680±20	5520±80	12	3
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	TDH1, TDH2, TDH3	252±0.5	11400±600	2	10
3-Phospho- glycerate kinase	PGK1	125±2	7600±80	2	4
Phospho- glyceromutase	GPM1	105±1.5	1360±60	7	3
Enolase	ENO1, ENO2	25±0.8	340±40	7	3
Pyruvate Kinase	PYK1, CDC19	265±25	1040±172	25	5

a) Total activity in the cell was calculated as the sum of the measured mitochondrial activity (without any correction) plus the activity measured in the post-mitochondrial fraction.

Table III. Yeast proteins identified in mitochondrial enolase containing complex by mass spectrometric analysis.

Protein	Protein description (SGD database: www.yeastgenome.org)	Localisation	PubMed Access number	Approach used for identification				Total number of identifications
				IP	BN-PAGE	mass spectrometry method	Sequence coverage, % (Number of peptides recovered by NanoLC-MS/MS)	
Mitochondrial transporters								
POR1 (YVDAC1)	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel)	MOM	<u>6324273</u>		+	MALDI-TOF	36	4
			<u>P04840</u>	+		MALDI-TOF	49	
			<u>P04840</u>		+	NanoLC-MS/MS	30 43 (11 peptides)	
AAC2	Major ADP/ATP carrier of the mitochondrial inner membrane	MIM	<u>63222537</u>	+		MALDI-TOF	33	6
			<u>P18239</u>	+		MALDI-TOF	54	
				+	+		37 43	
			<u>6319441</u>		+	MALDI-TOF	42	
			<u>P18239</u>		+	NanoLC-MS/MS	33 (16 peptides)	
MIR1	Mitochondrial phosphate carrier	MIM	<u>P23641</u>	+		MALDI-TOF	27	5
				+			27 45 38	
			<u>P23641</u>		+	NanoLC-MS/MS	24 (7 peptides)	
ATP synthase								
ATP1	Alpha subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase	MIM	<u>1660995</u>	+	+	MALDI-TOF NanoLC-MS/MS	33 45 (18 peptides)	3
	Alpha subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase precursor		<u>171116</u>	+		MALDI-TOF	18	
ATP2	Beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase	MIM	<u>6322581</u>		+	MALDI-TOF	18	2

	Beta subunit of the mitochondrial ATP synthase precursor	MIM	<u>P00830</u>		+	NanoLC-MS/MS	62 (15 peptides)	
Carbohydrate metabolism								
ENO1	Enolase I - catalyzes the first common step of glycolysis and gluconeogenesis	Cyto	<u>P00924</u>	+		MALDI-TOF	29	1 ¹
TDH3	Major glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	CW, Cyto	<u>6321631</u>	+	+	MALDI-TOF	33 55	3
			<u>P00359</u>	+		MALDI-TOF	23	
TDH1	Minor glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	CW, Cyto	<u>6322409</u>	+		MALDI-TOF	26 44	2
CIT1	Citrate synthase	MM	<u>6324328</u>	+		MALDI-TOF	26 44	2
MDH1	Mitochondrial malate dehydrogenase	MM	<u>6322765</u>	+		MALDI-TOF	51 33	2
Oxidative phosphorylation								
RIP1	Ubiquinol-cytochrome-c reductase, a Rieske iron-sulfur protein	MIM	<u>14277713</u>	+	+	MALDI-TOF	63 40	2
RNA metabolism								
TEF1	Translational elongation factor EF-1 alpha	Cyto	<u>6325337</u>	+		MALDI-TOF	46 44 49	3
RPC34	RNA polymerase III subunit C34	Nucleus	<u>P32910</u>	+		MALDI-TOF	29 38	2

Abbreviation used for protein localisation:

Cyto – cytoplasm

CW – cell wall

IMS – intermembrane space

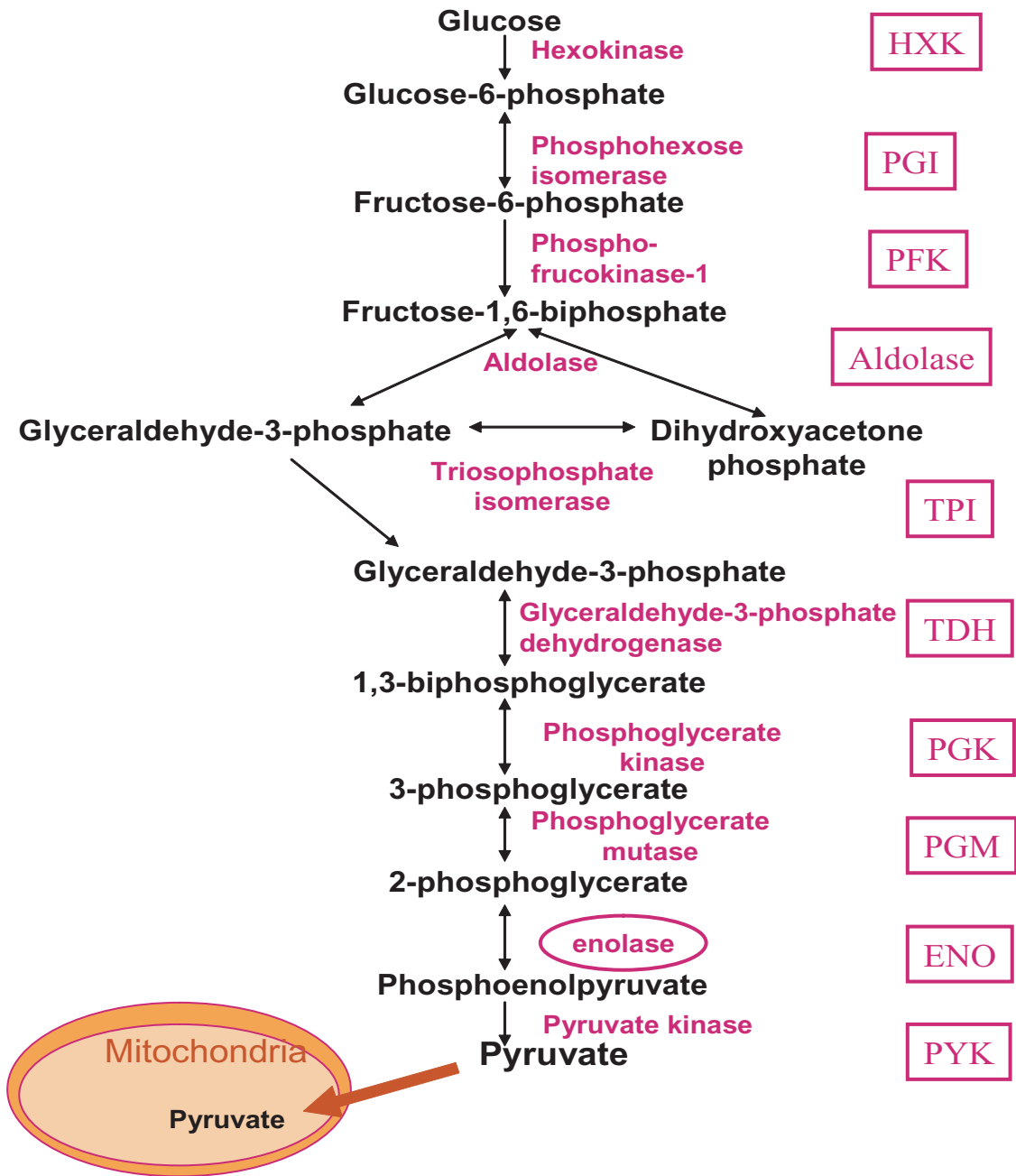
Mito - mitochondria

MIM – mitochondrial inner membrane

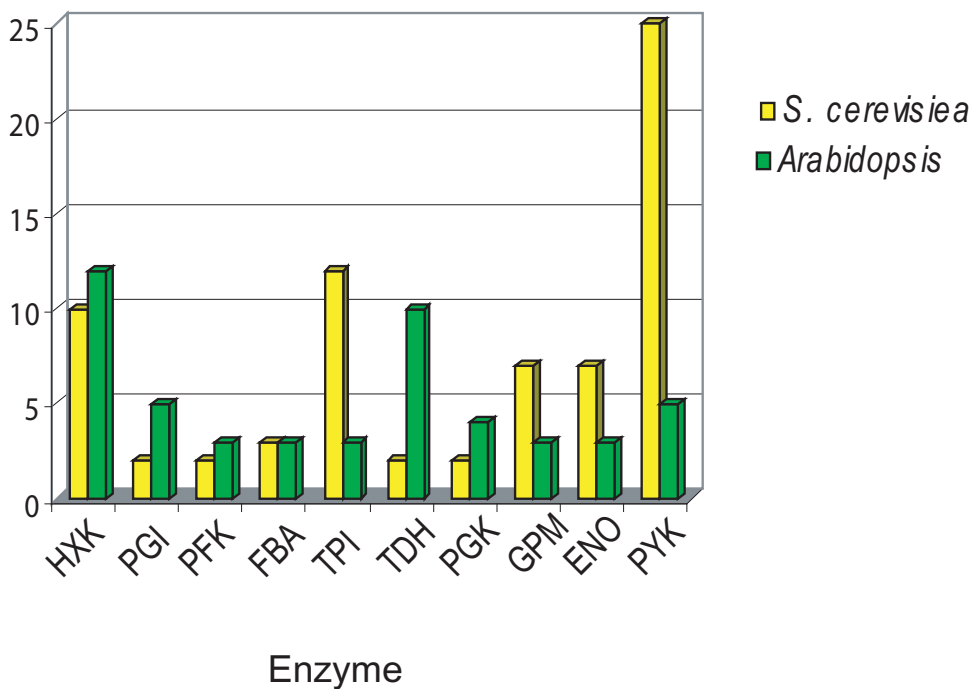
MM – mitochondrial matrix

¹ - Enolase presence was confirmed in all experiments by Western- blot analysis

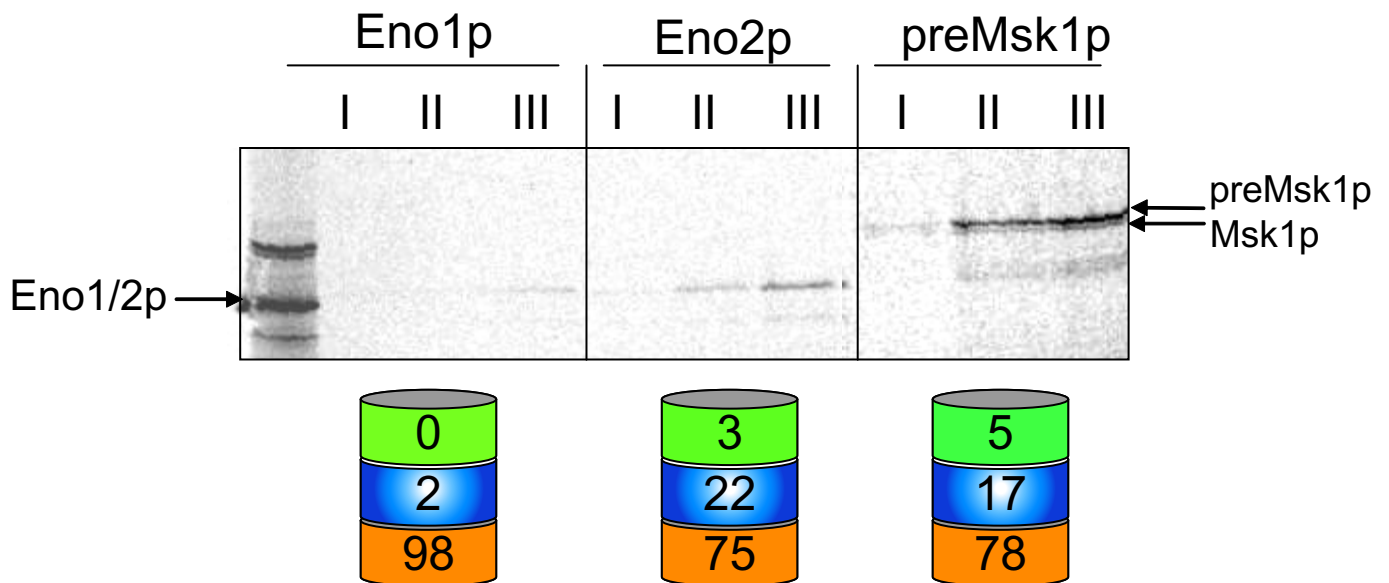
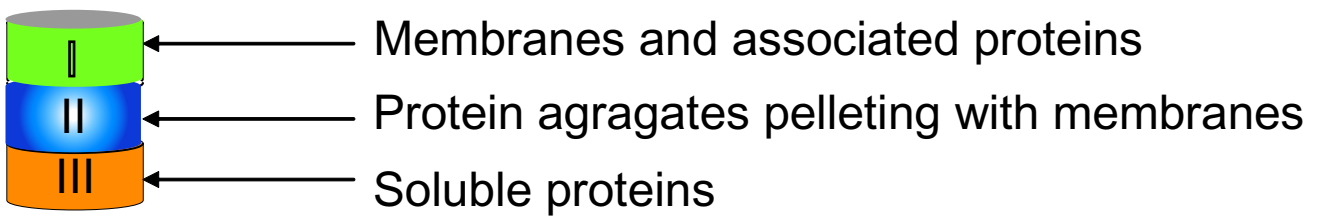
MOM – mitochondrial outer membrane



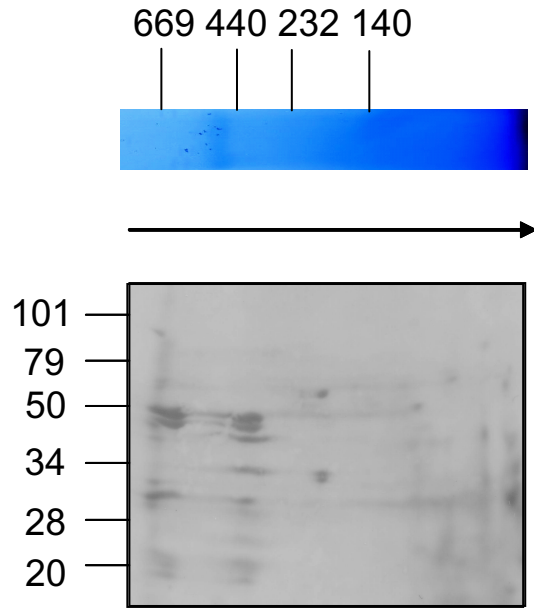
Percentage of total activity associated with mitochondria



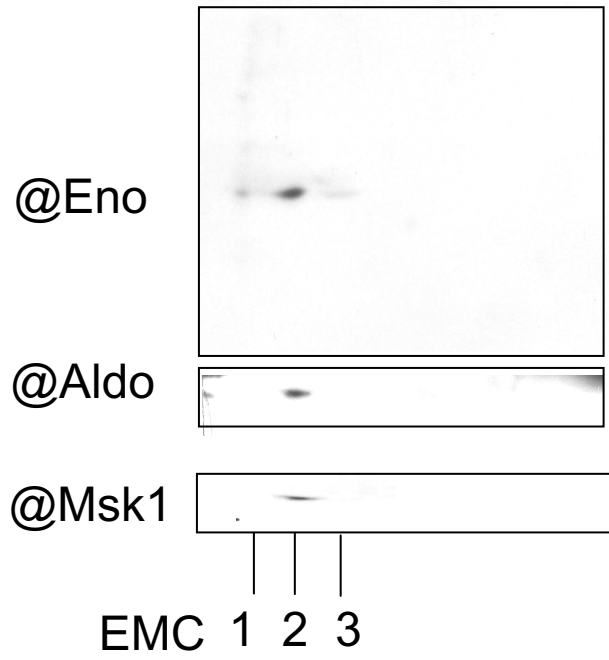
Sucrose flotation gradient:

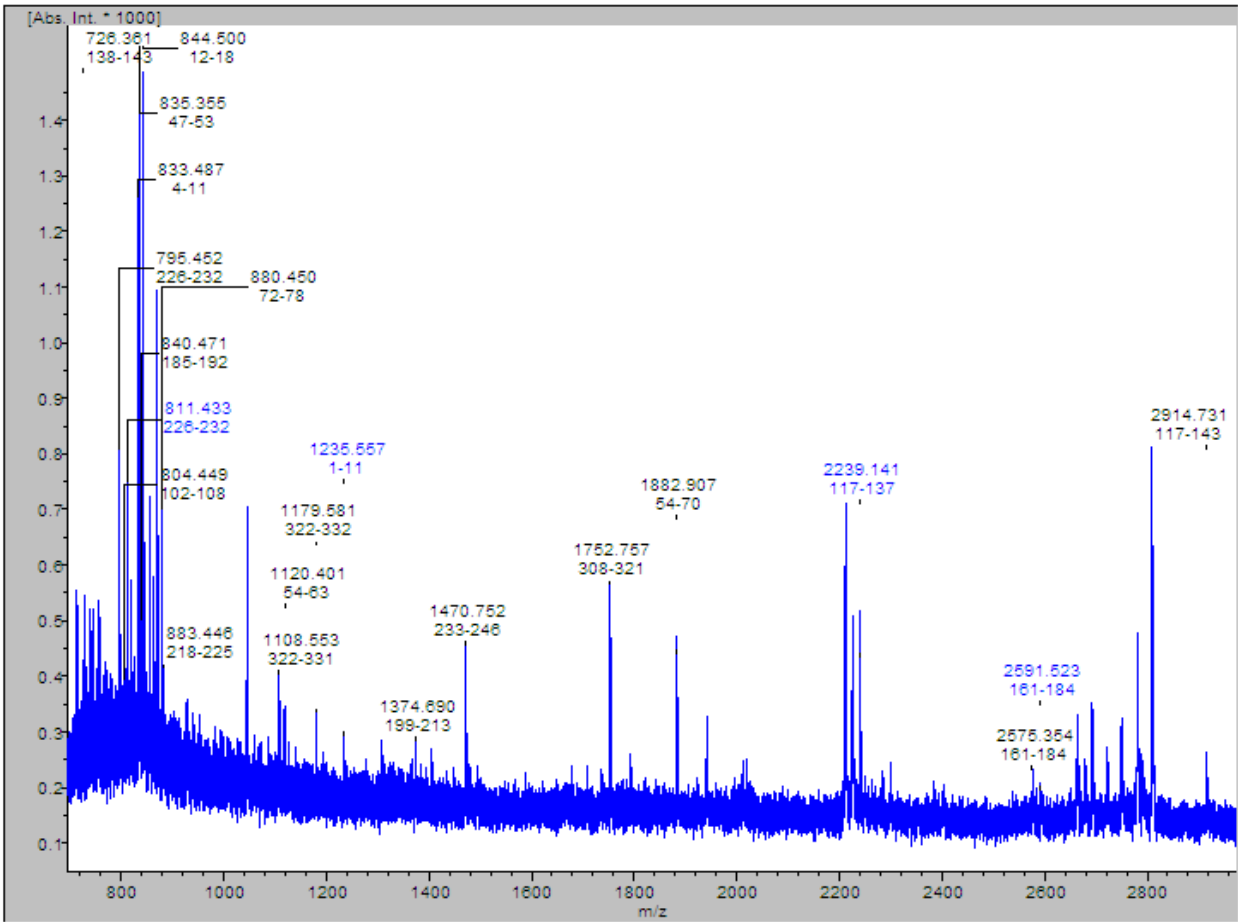


A



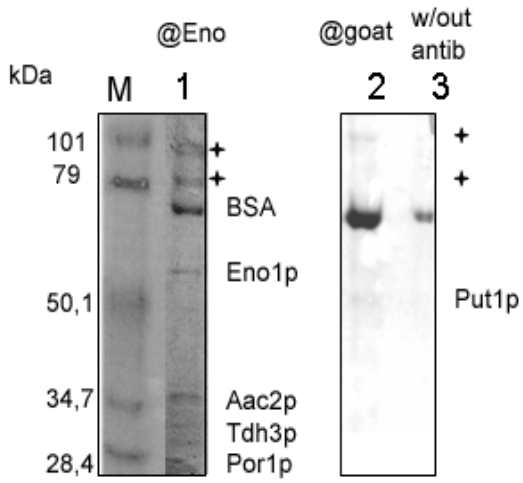
B





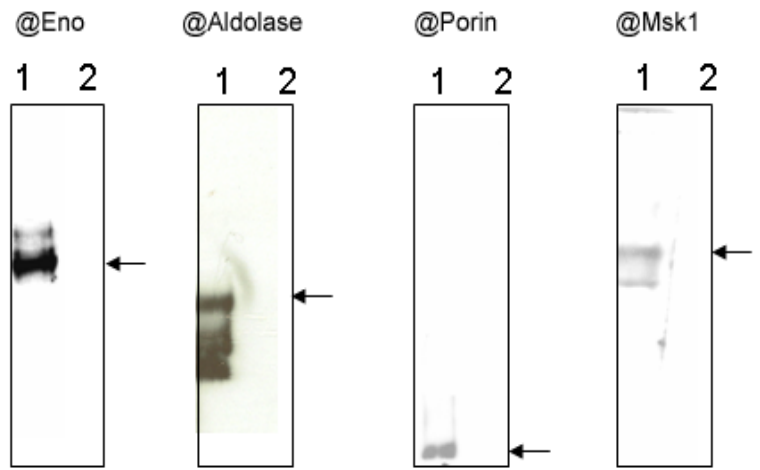
A

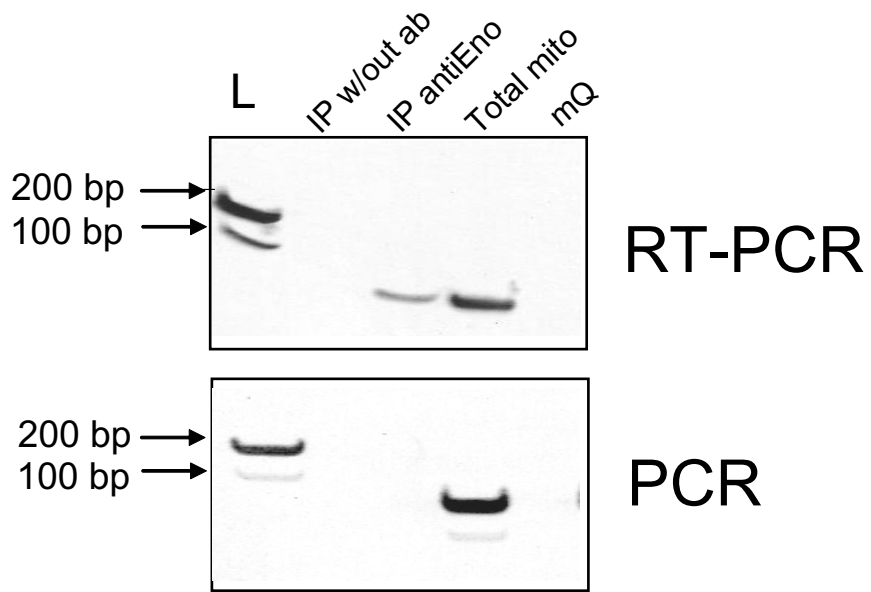
Silver staining

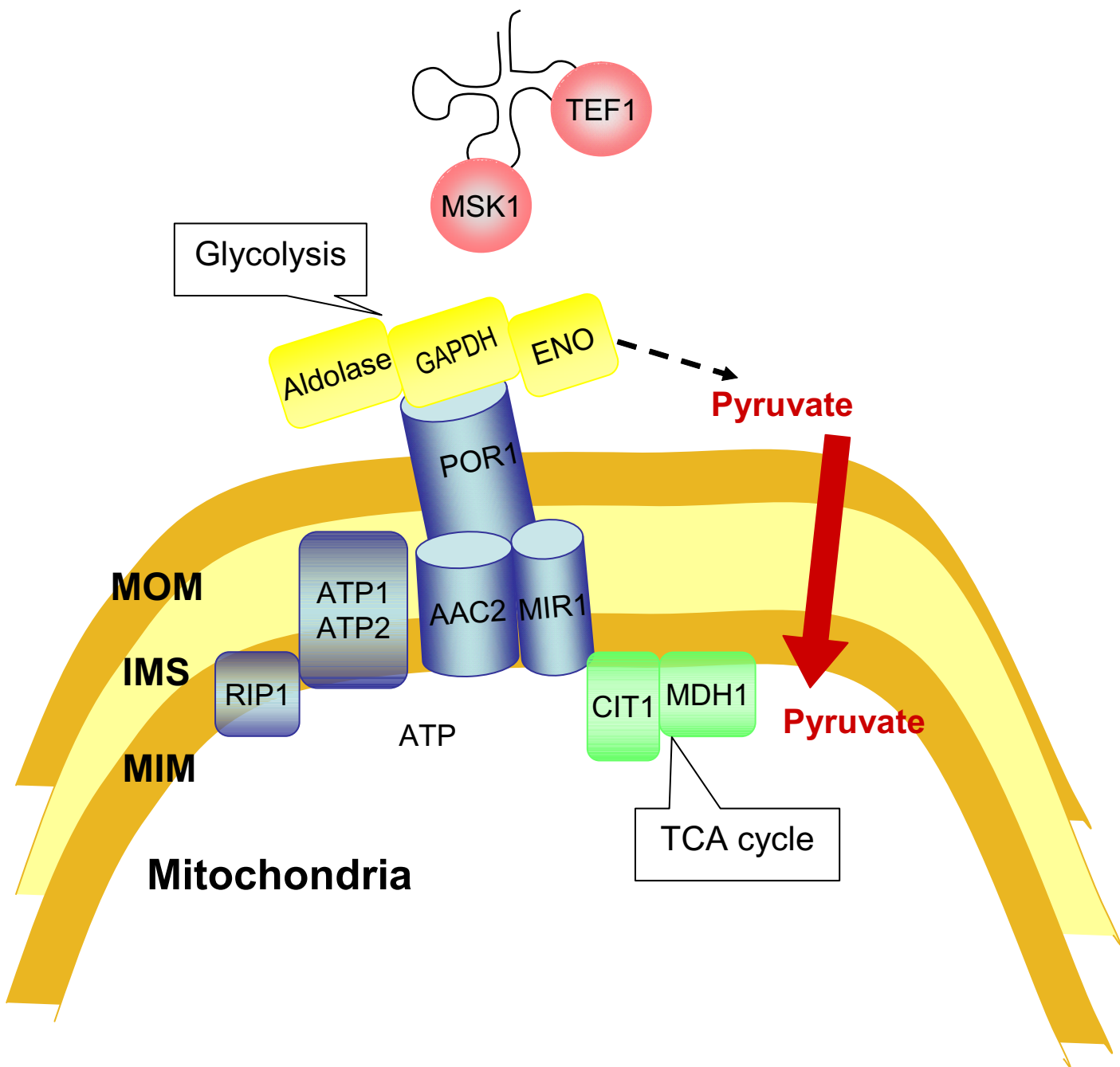


B

Immunodecoration







CHAPITRE III. Criblage de banques génomiques et d'ADNc de *S. cerevisiae* pour identifier des facteurs protéiques participant à l'import de tRK1

Le but de cette partie de notre travail a été d'identifier d'autres facteurs protéiques participant à l'import mitochondrial de tRK1 et d'étudier leurs rôles dans ce processus. Pour développer une stratégie d'identification de tels facteurs, notre raisonnement était que de ces protéines devaient être capables d'interagir spécifiquement soit avec l'ARNt importé, soit avec la préMsk1p (son "carrier" mitochondrial présumé), soit avec les deux. C'est pourquoi, nous avons utilisé deux méthodes génétiques : la méthode du double hybride pour rechercher des protéines interagissant avec la préMsk1p et la méthode du triple hybride pour sélectionner des protéines ayant de l'affinité pour tRK1.

III.1. Criblages double hybride pour identifier des protéines interagissant avec la préMsk1p

La première approche utilisée a été le système double hybride (Phizicky and Fields, 1995). Nous avons réalisé deux criblages indépendants d'une banque FRYL d'ADN génomique de *S. cerevisiae* (obtenu de B. Winsor, Strasbourg, banque contient 3.5 million d'insertions génomiques (Fromont-Racine et al., 1997)), en utilisant comme appât soit la préMsk1p entière, soit son domaine amino-terminal non-catalytique (aa 1-258). L'utilisation du domaine non-catalytique de la préMsk1p comme appât est justifiée par le fait que ce domaine (exprimé dans *E. coli*) peut être substitué à la préMsk1p entière pour diriger l'import de tRK1 *in vitro*. Les résultats obtenus dans ces deux criblages sont présentés dans le Tableau III. Avec la préMsk1p entière comme appât, nous avons identifié 5 protéines : Drs1p, Lsb4p, Pillp, Rpn13p et la préMsk1p elle-même. La présence de la préMsk1p dans les protéines identifiées n'est pas une surprise, étant donné que cette enzyme fonctionne sous forme d'un homodimère. Avec le domaine non-catalytique de la préMsk1p comme appât, 4 protéines additionnelles ont été sélectionnées. Il s'agit de Alr1p, Doa1p, Mth1p et Sen1p.

Bien que les protéines sélectionnées avec ces deux appâts ne soient pas les mêmes, certaines d'entre elles appartiennent à une même catégorie fonctionnelle, comme par exemple les ARN hélicases Drs1p et Sen1p ou les composants du système ubiquine-protéasome Rpn13p et Doa1p.

Tableau III. Protéines identifiées par les criblages double hybride.

Bait used in screening	ORF name, systematic name	Molecular function (data from Yeast Genome Database; www.yeastgenome.org)	Protein localisation	Length of ORF, bp	Similarity to known ORF, %
Msk1p	<i>DRS1</i> , YLL008w	ATP-dependent RNA helicase activity. Nucleolar DEAD-box protein required for ribosome assembly and function, including synthesis of 60S ribosomal subunits.	nucleolus	50*	100
	<i>LSB4</i> , YHR016c	Protein involved in the organization of the actin cytoskeleton; contains SH3 domain	actin cortical patch	71*	100
	<i>MSK1</i> , YNL073W	Mitochondrial lysine-tRNA synthetase, required for import of both aminoacylated and deacylated forms of tRNA(Lys) into mitochondria	mitochondrion	450 738	98 100
	<i>PIL1</i> , YGR086c,	Long chain base-responsive inhibitor of protein kinases Phk1p and Phk2p, acts along with Lsp1p to down-regulate heat stress resistance via regulation of the Pkc1p and Ypk1p pathways; protein kinase inhibitor activity.	cytoplasm; mitochondrion; mitoch.outer membrane	84*	91
	<i>RPN13</i> , YLR421c	Subunit of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome lid	proteasome regulatory particle	99*	100
N-terminus of preMsk1 (aa 1-258.)	<i>ALR1</i> , YOL130W	Plasma membrane Mg(2+) transporter, expression and turnover are regulated by Mg(2+) concentration.	plasma membrane	630	100
	<i>DOA1</i> , YKL213C	WD repeat protein required for ubiquitin-mediated protein degradation, forms complex with Cdc48p, plays a role in controlling cellular ubiquitin concentration; also promotes efficient double-strand break repair via nonhomologous end-joining in postdiauxic/stationary phase.	cytoplasm nucleus	689	100
	<i>MTH1</i> , YDR277C	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway, required for repression of transcription by Rgt1p; interacts with Rgt1p and the Snf3p and Rgt2p glucose sensors; phosphorylated by Yck1p, triggering Mth1p degradation.	nucleus	819	100
	<i>SEN1</i> , YLR430W	Nuclear protein, putative helicase required for processing of tRNAs, rRNAs, and small nuclear RNAs; potential Cdc28p substrate; ATP-dependent RNA helicase activity.	nucleus	373	100

* - Sequencing was performed manually by Sanger methods, thus the length of identified ORF is shorter than those for automatic sequencing performed for others ORF fragments.

III.2. Criblage triple hybride pour identifier des protéines interagissant avec tRK1

Pour sélectionner des protéines interagissant avec tRK1, nous avons utilisé la méthode du triple hybride (SenGupta et al., 1996) (Figure 6), technique bien connue pour permettre d'identifier des protéines avec un ARN donné (SenGupta et al., 1996). Pour cela, deux protéines hybrides sont exprimées dans les cellules de levure. La première consiste en une fusion entre le domaine "DNA binding" de LexA et la protéine de coque du phage MS2 (qui contient un domaine de liaison à l'ARN du phage). Le gène codant pour cette protéine de fusion est intégré dans le génome de la souche $L_{40\text{coat}}$. La seconde protéine hybride est exprimée à partir d'un plasmide (pGAD-R) et contient le domaine transactivateur de Gal4p en fusion avec une banque d'ADNc de *S. cerevisiae*. Les deux protéines de fusion sont réunies par l'intermédiaire d'un ARN hybride bifonctionnel contenant un fragment de l'ARN du phage MS2 fusionné à l'ARN pour lequel on veut chercher des interactants. Dans notre cas, l'ARN hybride consistait en l'ARN du phage MS2 fusionné en 3' soit avec tRK1, soit avec tRK2 (exprimés à partir du vecteur pIIIA/MS2-1). L'expression de l'ARN hybride dans l'orientation 5' - ARN MS2-tRK1/2 - 3', devrait permettre la maturation et l'aminoacylation correctes de sa partie ARNt. L'interaction entre la partie ARNt de l'ARN hybride et une protéine donnée de la banque d'ADNc (permettant de reconstituer un transactivateur lexA-Gal4 fonctionnel) est testée grâce à l'expression de deux gènes rapporteurs, *LacZ* and *HIS3*.

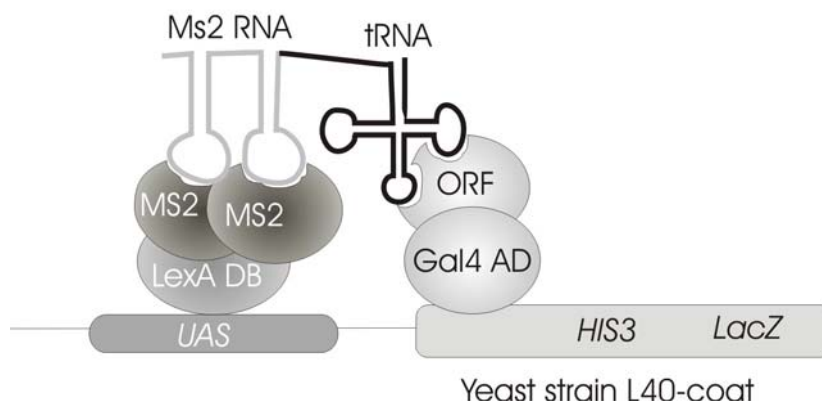


Figure 6. Principe de la technique du triple hybride

En utilisant tRK1 comme appât, le criblage de la banque d'ADNc pGAD-R a permis de sélectionner 404 clones capables de pousser sur milieu sélectif sans histidine et d'exprimer *lacZ*. Pour identifier, parmi ces clones (dans la souche $L_{40\text{coat}}$), ceux exprimant (à partir du

plasmide pGAD-R) une protéine capable d'interagir spécifiquement avec tRK1 (mais non avec tRK2 ou l'ARN du phage MS2), nous les avons croisé avec une souche de signe opposé (R_{40coat}) contenant le plasmide pIII/MS2-1 exprimant l'ARN hybride (soit MS2-tRK1, soit MS2-tRK2, soit l'ARN MS2 seul). Les clones diploïdes obtenus sur milieu sélectif sans histidine ont ensuite été testés pour leur activité β -galactosidase par un test sur filtre. Après séquençage, nous avons ainsi identifié 2 protéines interagissant uniquement avec l'ARN hybride MS2-tRK1 (Leu9p et Pnc1p), 12 protéines interagissant avec MS2-tRK1 et MS2-tRK2 et 11 protéines interagissant avec MS2-tRK1 et l'ARN MS2 seul (Tableau IV). Tous les autres clones exprimaient des protéines interagissant avec les 3 ARN testés.

Cette méthode de croissance nous permet de distinguer les protéines interagissant avec les trois ARN testés, et celles qui interagissent spécifiquement avec tRK1. Néanmoins, les protéines qui interagissent avec MS2-tRK1 et avec l'ARN MS2 seul (et n'interagissent pas avec MS2-tRK2) sont également importantes, car elles peuvent distinguer entre tRK1 et tRK2. Cela peut être dû à la différence de structure des ARN hybrides contenant tRK1 ou tRK2. A priori, on ne peut pas exclure que des protéines interagissant à la fois avec tRK1 et tRK2 ne soient pas également impliquées dans l'import de tRK1. Parce que ces protéines n'interagissent qu'avec l'ARNt, mais pas l'ARN de phage MS2, il sera important de tester s'ils interagissent avec les ARNt différentes ou uniquement avec les ARNt^{Lys}.

Par le système triple hybride nous avons identifié les protéines ribosomales Rpl41A et Rpl11A à plusieurs reprises. Ceci s'explique par le fait que ces sont des protéines avec les motifs « RNA-binding ». Mais leur absence d'interaction avec tRK2 dans le contexte d'ARN hybride est plus surprenante. Cela peut être expliqué par l'hypothèse de structures tridimensionnelles d'ARN hybrides MS-tRK1 et MS2-tRK2 non identiques.

Tableau IV. Liste des gènes identifiés dans le criblage triple hybride de la banque d'ADNc de *S. cerevisiae*.

Hybrid RNA found to interact with	ORF name, systematic name	Molecular function (Yeast Genome Database; www.yeastgenome.org)	Protein localisation
tRK1	LEU9, YOR108w	α -isopropylmalate synthase II, catalyzes the first step in the leucine biosynthesis pathway; the minor isozyme.	mitochondrion
	Pnc1p, YGL037c	Nicotinamidase, part of the NAD(+) salvage pathway, required for life span extension by calorie restriction.	cytoplasm; nucleus; peroxisome
tRK1 and tRK2	PLB1, YMR008c	Isozymes of phospholipase B (lysophospholipase) involved in lipid metabolism, required for deacylation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine but not phosphatidylinositol.	cell wall
	PLB2, YMR006c		
	PLB3, YOL011w		
	FAA1, YOR317w	Long chain fatty acyl-CoA synthetase; involved in the activation of imported fatty acids.	mitochondrial outer membrane; lipid particles
	GLT1, YDL171c	NAD(+)-dependent glutamate synthase.	mitochondrion
	GUA1, YMR217w	GMP synthase catalyzes the second step in the biosynthesis of GMP from inosine 5'-phosphate	cytoplasme
	TIR4, YOR009w	Cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins; required for anaerobic growth.	cell wall
	TOS1, YBR162c	Covalently-bound cell wall protein of unknown function.	cell wall, vacuole
	YMR317w	Hypothetical protein, uncharacterised	unknown
	NIC96, YFR002w	Component of the nuclear pore complex, required for nuclear pore formation, participates in mRNA/ rRNA/ tRNA/ snRNA/ snRNP export from nucleus, in protein import/export from nucleus	nuclear pore complex
	ERP2, YAL007c	Member of the p24 family involved in ER to Golgi transport and localized to COPII-coated vesicles	ER, COPII-coated vesicles
RPN8, YOR261c	Essential, non-ATPase regulatory subunit of the 26S proteasome.	cytoplasme nucleus	
tRK1 and MS2 phage RNA	RPL11A, PR102c	Protein components of 60S ribosomal subunit	cytoplasme
	Rpl41B - YDL133c		
	DRS1, YLL008w	Nucleolar DEAD-box protein required for ribosome assembly and function, including synthesis of 60S ribosomal subunits.	nucleolus
	TDH3, YGR192c	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3, involved in glycolysis and gluconeogenesis.	cytoplasme cell-wall
	YNL050c	Hypothetical protein	unknown
	GLN1, YPR035w	Glutamine synthetase	cytoplasme
	MAP1, YLR244c	Methionine aminopeptidase, catalyzes the cotranslational removal of N-terminal methionine from nascent polypeptides	cytoplasme
	YLR198c	Hypothetical protein	unknown
	CRP1, YHR146w	Protein that binds to cruciform DNA structures	nucleus
	NPL3, YDR432w	RNA-binding protein that carries poly(A)+ mRNA from the nucleus into the cytoplasm.	cytoplasme nucleus
RSN1, YMR266W	Membrane protein of unknown function	unknown	

III.3. Analyse des résultats des cribles double- et triple hybrides

Pour nous aider à choisir de “bons” candidats pour des protéines impliquées dans l’import mitochondrial de tRK1, notre raisonnement a été de considérer en priorité des protéines retrouvées dans nos cribles double- et triple hybride ou des protéines appartenant à une même catégorie fonctionnelle. Parmi les 34 protéines identifiées dans les deux types de cribles (Tableaux III et IV), seule la Drs1p, appartenant à la famille des ARN hélicase à boîte DEAD, est retrouvée dans les 2 cribles. D’autre part, Sen1p, une autre ARN hélicase de la même famille, a été sélectionnée comme interagissant avec le domaine N-terminal non-catalytique de la préMsk1p. Les ARN hélicases pourraient être des candidats prometteurs au rôle de facteur d’import de tRK1 puisqu’elles pourraient promouvoir des changements conformationnels dans l’ARNt et ainsi aider à son interaction avec la préMsk1p ou à sa translocation mitochondriale. Cependant, une étude plus approfondie de ces deux hélicases et de leur relation avec l’import de tRK1 sera nécessaire pour étayer cette hypothèse.

Il est également à noter que nous avons détecté la glyceraldehyde-3-phospho dehydrogénase (Tdh3p) dans le crible triple hybride. Cette enzyme de la glycolyse est retrouvée dans le complexe émolase associé à la mitochondrie (voir publication 5) et, par ce biais, pourrait être impliquée dans l’import de tRK1. Son rôle dans ce processus reste à être précisé.

Nos cribles double- et triple hybrides, ont également conduit à l’identification de deux ARN-helicases de la famille « DEAD-box » : Drs1p et Sen1p. Dans nos criblages, nous n’avons détecté l’interaction que d’un fragment de Drs1p avec tRK1 et d’un fragment de Sen1p avec le domaine N-terminal de la préMsk1p, et les fragments identifiés ne contiennent pas les motifs caractéristiques des ARN hélicases. Il faudra donc tester si les deux protéines entières sont également capables d’interagir dans les systèmes 2- et 3-hybrides avec tRK1 et/ou la préMsk1p. Il faudra également déterminer si les protéines correspondantes purifiées sont capables de diriger l’importation de tRK1 dans les mitochondries isolées. Enfin, il faudra également déterminer si ces deux hélicases sont les seules de la famille DEAD-box à être impliquées dans l’import de tRK1. Pour cela, il faudra tester les interactions des autres ARN-helicases de cette famille avec tRK1 et la préMsk1p dans les systèmes double- et triple hybrides et tester si elles ont un effet sur l’import mitochondrial de tRK1 dans les mitochondries isolées.

Parmi les autres protéines sélectionnées dans nos cribles génétiques, on retrouve trois protéines appartenant au système ubiquitine-protéasome. Il s’agit de Rpn8p, Rpn13p et

Doa1p. Rpn8, une sous-unité de la particule régulatrice 19S du protéasome, a été détectée par son interaction avec tRK1 et tRK2 dans le système du triple hybride. Rpn13p, une autre sous-unité de la particule 19S, a été sélectionnée par son interaction avec la pré-Msk1p. Enfin, Doa1p, une autre protéine du système ubiquitine, a été trouvée par son interaction avec le domaine N-terminal non-catalytique de la préMsk1p. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister un lien fonctionnel entre le système ubiquitine-protéasome et l'import d'ARNt dans les mitochondries.

La suite de nos travaux a été consacré à l'étude du rôle éventuel du système ubiquitine-protéasome dans l'import de tRK1 et est présentée sous forme de manuscrit en préparation (**Publication 6**, Brandina I, Kolesnikova O, Smirnov A, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I, « New role of the ubiquitin-proteasome system - regulation of tRNA(Lys) import into yeast mitochondria », manuscrit en préparation).

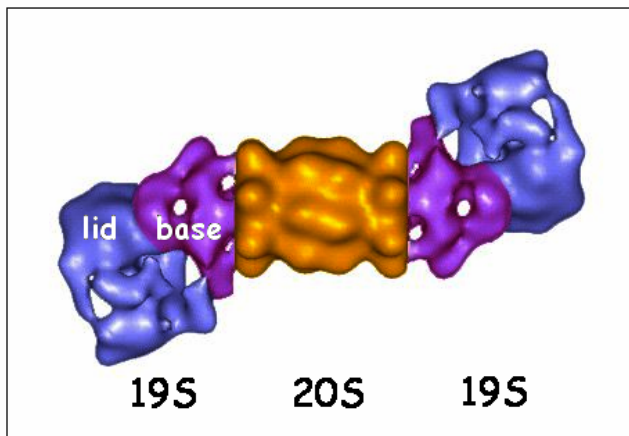
CHAPITRE IV. Etude du rôle du système ubiquitin-protéasome dans l'import mitochondrial de tRK1

IV.1. Introduction

IV.1.2 Généralités sur le système ubiquitine-protéasome des cellules eucaryotes

La dégradation régulée de nombreuses protéines des cellules eucaryotes passe par leur poly-ubiquitination suivie de leur reconnaissance et de leur protéolyse au niveau d'un complexe multi-protéique, appelé protéasome. Le protéasome 26S comprend deux parties : (i) la particule régulatrice 19S, responsable de la reconnaissance des protéines cibles de cette voie de dégradation modifiées par l'ubiquitine (une petite protéine de 76 acides aminés); et (ii) la particule 20S catalytique, qui est le siège de l'activité protéolytique (Figure 7).

Figure 7. La structure de la protéasome 26S.



Dans certains cas, les deux fonctions du système ubiquitine-protéasome peuvent fonctionner de façon indépendante l'une de l'autre. En effet, l'ubiquitination d'une protéine peut avoir un rôle régulateur sans mener à sa protéolyse par le protéasome et, vice versa, le protéasome peut dégrader certaines protéines sans qu'elles aient été préalablement ubiquitinées.

Le système ubiquitine-protéasome régule un grand nombre de fonctions cellulaires, comme la division cellulaire, la différenciation, la transduction de signaux, la réponse aux stress, l'embryogenèse, les réponses immunitaires et l'apoptose (pour une revue, voir (Pickart, 2004)).

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'ubiquitine est codée par 4 gènes : *UBI1*, *UBI2*, *UBI3*, *UBI4* (Pickart, 2004). Les trois premiers codent pour des protéines contenant l'ubiquitine dans leur partie N-terminale et une protéine ribosomique dans leur partie C-terminale, tandis que *UBI4* code pour un polypeptide renfermant 5 unités d'ubiquitine, qui est ensuite processé par des enzymes de déubiquitination (DUB) (Amerik et al., 1997).

Les substrats monoubiquitinés ne sont pas reconnus par le protéasome et ne sont donc pas dégradés. En fait, la monoubiquitination joue un rôle régulateur en affectant soit l'activité de la protéine, soit sa localisation, soit sa capacité d'être modifiée ou d'interagir avec d'autres protéines (Schnell and Hicke, 2003). L'ubiquitination des protéines est un processus réversible grâce aux enzymes de déubiquitination. Cependant, si la protéine est destinée à être dégradée par le protéasome (chez la levure, toutes les protéines à durée de vie courte sont dégradées par cette voie), alors elle est polyubiquitinée. Pour être utilisable dans le système ubiquitine-protéasome, l'ubiquitine libre doit être activée par une enzyme d'activation E1 (Uba1 chez *S. cerevisiae*) qui forme une liaison thio-éther entre l'ATP et l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. En même temps, le résidu Gly76 de l'ubiquitine se lie à un résidu Cys d'Uba1p. L'ubiquitine activée est transférée sur la cystéine active d'une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2), puis elle est attachée sur un résidu Lys du substrat grâce à des ubiquitine-protéines ligases (E3). L'enzyme E3 peut ajouter une ou plusieurs copies d'ubiquitine, ce qui détermine la destinée du substrat (Rotin et al., 2000). Précisons que c'est l'enzyme E3 qui est responsable de la spécificité du substrat à ubiquitiner et qu'il existe toute une famille d'ubiquitine-protéines ligases. Par conséquent, le système ubiquitine-protéasome est régulé par les changements d'expression, d'activité et de localisation des enzymes E3. Récemment, l'existence d'une enzyme E4 (Ufd2), qui catalyse l'addition d'ubiquitine à des substrats mono- ou di-ubiquitinés, a été décrite (Richly et al., 2005).

Les signaux destinant une protéine à sa dégradation par le système ubiquitine sont des sites spécifiques (ou "dégrons") contenus dans sa structure primaire, soit à son extrémité N-ter, soit plus à l'intérieur de sa séquence (Genschik et al., 1998). Une règle, appelée "N-end rule", a permis d'établir une relation entre la demi-vie d'une protéine *in vivo* et la nature de son résidu N-ter (Varshavsky et al., 1987). Dans ce cas, l'enzyme E3 se lie à l'extrémité N-terminale du substrat et ajoute la poly-ubiquitine sur une lysine interne de ce substrat.

Une autre façon de fixer une chaîne de poly-ubiquitine sur un substrat est de la lier au groupement amino du résidu N-ter du substrat, formant ainsi une chaîne d'ubiquitine non enlevable. La voie responsable de ce type d'ubiquitination est appelée voie UFD (Ubiquitin Fusion Degradation). Enfin, des chaînes de poly-ubiquitine peuvent également être ajoutées

sur des résidus modifiés (par exemple, phosphorylés) ou à l'aide d'adaptateurs spécifiques. (Varshavsky, 2005).

Des chaînes de poly-ubiquitine peuvent être formées par l'intermédiaire des lysines en positions 29, 48 ou 63 de l'ubiquitine et les fonctions de ces différents types de chaînes ne sont pas les mêmes. Les chaînes formées au niveau de la Lys63 ont un rôle non protéolytique et interviennent dans différents processus comme la réparation de l'ADN, l'endocytose, l'activation de la kinase I κ B ou la synthèse protéique (Pickart, 2001). Par contre, les chaînes formées au niveau des Lys29 et 48 constituent des signaux de dégradation et sont reconnues par le protéasome 26S.

IV.1.2. Rôles du système ubiquitine-protéasome dans les fonctions mitochondriales.

Le système ubiquitine-protéasome semble influencer la structure et la fonction des mitochondries de multiples façons. Par exemple, il a été démontré que la dégradation de certaines protéines mitochondriales était un processus dépendant de l'ATP et de l'ubiquitine, attribué au protéasome (Rapoport et al., 1985). Certaines protéines de la membrane mitochondriale externe pourraient être des cibles pour la dégradation par le protéasome. Il est même possible qu'une fraction du pool de protéasome fasse partie d'un système de contrôle de qualité des protéines au niveau de la membrane mitochondriale externe, de façon similaire à son rôle dans la dégradation de protéines associées au réticulum endoplasmique. Alternativement, l'ubiquitination pourrait être impliquée dans l'adressage de protéines à la mitochondrie (voir ci-dessous).

Des mutations dans des composants du système ubiquitine-protéasome affectent la morphologie et la distribution des mitochondries

Les premières évidences en faveur de l'existence de lien fonctionnel entre le système ubiquitine-protéasome et la mitochondrie proviennent de l'observation que des mutations dans des ubiquitin ligases E3 ont un effet sur la morphologie et l'hérédité des mitochondries. Ces effets ont été observés chez des mutants *mdm* (Mitochondrial Distribution and Morphology) de *S. cerevisiae* (Fisk and Yaffe, 1999). Parmi ces mutants, certains affectent l'ubiquitine-protéine ligase Rsp5, les enzymes de conjugaison E2, Ubc4p et Ubc5p, et la protéine Bul1p qui se lie à Rsp5 et participe à l'activation transcriptionnelle de *GLN3* et *GATI* par ubiquitination (Crespo et al., 2004). Ces mutations entraînent toutes des défauts dans la morphologie et la distribution des mitochondries (Fisk and Yaffe, 1999). D'autre part, il a été

montré que la surexpression d'ubiquitine mutée, avec la lysine 63 remplacée par un résidu arginine (Ub-K63R), à le même effet sur les mitochondries (Fisk and Yaffe, 1999). Par contre, la surexpression de Ub-K29R or Ub-K48R n'a aucun effet, indiquant qu'il est spécifique à la mutation K63R.

L'ubiquitine-protéine ligase Rsp5 a un large spectre de fonctions dans la levure : elle permet l'ubiquitination de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II (Huibregtse et al., 1995) et de protéines de la membrane plasmique, Fur4p (Galan et al., 1996) et Gap1p (Springael and Andre, 1998) ; elle participe à l'export du noyau d'ARNm, d'ARNt et de la sous-unité 60S du ribosome (Rodriguez et al., 2003), (Neumann et al., 2003). Par ailleurs, Rsp5 régule le pH intracellulaire (de la Fuente et al., 1997) et la biosynthèse de l'ergostérol (Kaminska et al., 2005). Il a également été montré que Rsp5 interagit fonctionnellement avec Mdm1 pour la transmission du noyau et des mitochondries dans le bourgeon des cellules de levure (Fisk and Yaffe, 1997). C'est pourquoi, il a été proposé que Mdm1 pourrait être une cible de Rsp5. Comme déjà mentionné, les chaînes de poly-ubiquitine sur la Lys63 ont une fonction non-protéolytique et affectent la distribution des mitochondries, impliquant que le rôle de Rsp5 dans l'ubiquitination est indépendant de la dégradation protéasomique. L'enzyme de deubiquitination Ubp16 a été localisée à la membrane mitochondriale externe (Kinner and Kolling, 2003).

Une autre connexion entre le système ubiquitine-protéasome et les mitochondries a été déduite des phénotypes mitochondriaux associés à des mutations dans deux sous-unités du protéasome :

- Les défauts mitochondriaux causés par une mutation dans la protéine mitochondriale Yme1 sont supprimées par une mutation au locus *rpt3* codant pour une sous-unité ATPase du protéasome (Campbell et al., 1994). Dans la mesure où Yme1 est localisée dans la membrane mitochondriale interne, il a été proposé que le rôle du protéasome serait indirect dans ce cas.
- Un exemple d'un effet plus direct provient d'une mutation dans l'extrémité C-ter de Rpn11 (mutation *mpr1-1*), une sous-unité de la particule régulatrice 19S du protéasome. La mutation *mpr1-1* affecte d'une part la morphologie des mitochondries et la respiration, et d'autre part, l'intégrité et la fonction du protéasome. La surexpression de Rpn8, une autre sous-unité de la particule 19S, permet de rétablir l'intégrité et la fonction du protéasome, mais est incapable de corriger les défauts mitochondriaux liés à *mpr1-1*. C'est pourquoi, il a été suggéré

que le rôle de Rpn11 dans la mitochondrie serait indépendant de son rôle dans la ubiquitination associée au protéasome (Rinaldi et al., 2004).

Ubiquitination de protéines et adressées vers la mitochondrie

L'ubiquitination est probablement impliquée dans l'adressage de protéines vers la mitochondrie ou dans la dégradation de protéines destinées à être importées. De tels exemples proviennent de l'étude des monoamines oxydases A et B (MAO A, MAO B), dont l'insertion dans la membrane mitochondriale externe est dépendante d'ATP et d'ubiquitine (Zhaung and McCauley, 1989), (Zhuang et al., 1992). MAO A et B ont été synthétisées *in vitro* dans un lysat de réticulocytes et leur insertion dans la membrane mitochondriale externe a été étudiée avec des mitochondries ou des vésicules de membrane externe isolées de foie de rat. En fait, la présence d'ATP s'est révélée nécessaire pour l'ubiquitination des MAO, celle-ci s'effectuant grâce à l'ubiquitine et aux enzymes d'ubiquitination présentes dans le lysat de réticulocytes. Cette ubiquitination des MAO induit un changement de conformation dans ces protéines, permettant ainsi leur insertion dans la membrane mitochondriale externe. D'autre part, le traitement à la trypsine des vésicules membranaires empêche l'insertion des MAO, suggérant que leur insertion requiert également des récepteurs de la membrane mitochondriale externe.

Le gène *MOD5* de *S. cerevisiae* code pour une enzyme de modification d'ARNt (N6-isopentenyladenosine transférase) qui fonctionne dans trois compartiments cellulaires : le cytoplasme, le noyau et les mitochondries (Boguta et al., 1994). Une version mutée de Mod5p (appelée Mod5-I,KR6), qui est localisée de façon prédominante dans le compartiment mitochondrial, a été utilisée pour rechercher des mutations extragéniques interférant avec sa localisation mitochondriale (Zoladek et al., 1995). Un des gènes ainsi identifiés est *MDP1*, allélique à *RSP5*, codant pour une ubiquitine-protéine ligase. Toutes les mutations *mdp1* ainsi sélectionnées se trouvent dans le domaine HECT de Rsp5p (domaine hautement conservé dans toutes les ubiquitine-protéines ligases) et sont supprimées par la surexpression de l'ubiquitine. Pour expliquer le rôle de Rsp5p dans la distribution intracellulaire de Mod5p, deux hypothèses ont été avancées: (i) soit Rsp5p est responsable de la mono-ubiquitination non protéolytique de Mod5p et cette mono-ubiquitination serait nécessaire pour sa localisation mitochondriale; (ii) soit Rsp5 intervient dans l'ubiquitination et la dégradation d'autres protéines intervenant dans la rétention de Mod5p dans le cytoplasme (Zoladek et al., 1997).

IV.2. Résultats et discussion

Notre stratégie d'identification de nouvelles protéines participant à l'importation d'ARNt était basée sur l'hypothèse qu'elles devaient interagir avec tRK1 et/ou avec son transporteur protéique, la preMsk1p. Pour identifier des protéines interagissant avec la preMsk1p, nous avons criblé une banque d'ADN génomique de *S. cerevisiae* par le système du double-hybride. Pour ce crible, nous avons utilisé comme appât soit la préMsk1p entière, soit son domaine N-terminal non catalytique (aminoacides 1-258). Pour rechercher des protéines interagissant avec tRK1, nous avons fait appel au système du triple-hybride pour cribler une banque d'ADNc de *S. cerevisiae*.

Les résultats obtenus avec ces cribles sont décrits dans le chapitre III de ce mémoire. Parmi les protéines identifiées, trois sont des composants du système ubiquitine-protéasome : Rpn8p, Rpn13p et Doa1p. Dans la cellule de levure, l'ubiquitination des protéines dirige leur dégradation régulée par le protéasome 26S. D'autre part, il est connu que la mono-ubiquitination peut modifier l'activité et la localisation cellulaire de certaines protéines. Nous avons émis l'hypothèse que le système ubiquitine-protéasome pourrait intervenir dans la régulation de l'importation d'ARNt. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé l'incidence entre l'activité catalytique du protéasome 26S et le niveau d'importation de tRK1, selon les trois approches suivantes :

1. Nous avons comparé les niveaux d'importation d'ARNt *in vivo* entre la souche sauvage et les souches contenant la disruption du gène *RPN13* ou du gène *DOA1* (le gène *RPN8* étant essentiel, n'a pas été analysé). La disruption du gène *RPN13* entraîne une augmentation d'un facteur 2.7 de l'efficacité d'importation. La disruption du gène *DOA1* (codant pour une protéine impliquée dans la régulation du niveau d'ubiquitine libre dans la cellule) a pour effet de doubler le niveau d'importation de tRK1. Un niveau d'import comparable à la souche sauvage est restauré après sur-expression du gène *UBI4* (codant pour l'ubiquitine) dans le mutant *Adoa1*. Ces résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse que le système ubiquitine-protéasome pourrait contrôler l'import de tRK1 en dégradant des répresseurs de son import.
2. Nous avons analysé les niveaux d'importation de tRK1 dans les souches possédant des mutations dans les gènes codant des sous-unités catalytiques du protéasome (mutations: *pre1-1*, *pre2-2* et *pre1-1/pre2-2*) et avons observé une corrélation directe entre l'activité catalytique du protéasome 26S et l'importation d'ARNt *in vivo*.

3. Nous avons traité une souche *Δerg6* (perméabilité augmentée des membranes) par l'inhibiteur MG132 du protéasome et observé une diminution de 75% de l'import d'ARNt et de 65% de l'activité catalytique du protéasome. Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse que le système ubiquitine-protéasome pourrait catalyser la dégradation de répresseur(s) de l'import de tRK1.

Cela nous permet de proposer l'hypothèse que la régulation de l'importation d'ARNt par le système ubiquitine-protéasome.

Publication 6: Brandina I, Kolesnikova O, Smirnov A, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I, « New role of the ubiquitin-proteasome system - regulation of tRNA(Lys) import into yeast mitochondria », manuscrit en préparation).

New role of the ubiquitin-proteasome system - regulation of tRNA(Lys) import into yeast mitochondria.

Irina Brandina^{1,2}, Olga Kolesnikova^{1,2}, Alexandre Smirnov^{1,2}, Nina Entelis¹, Igor Krasheninnikov², Robert P. Martin¹ and Ivan Tarassov^{1*}

1 - UMR 7156 "GMGM", CNRS - ULP, Strasbourg, France 67084;

2 – Molecular Biology Department, Moscow State University, Moscow, Leninskiye Gory, Russia 119992.

* Corresponding author:

Ivan Tarassov

Postal address:

UMR 7156

IPCB, 21 rue RENE DESCARTES

Strasbourg, 67084

Tel : (+33) 3 90 24 14 81

Fax: (+33)3 88 41 70 70

Email: i.tarassov@ibmc.u-strasbg.fr

Running title: Ubiquitin and proteasome: the role in tRNA import.

Abstract

RNA import into mitochondria is a widely spread phenomenon. In yeast one tRNA^{Lys} is imported and this process was shown to be dependent on several protein factors. In this work we identified a group of potential import factors some of which are components of the ubiquitin/proteasome system. We show that two regulatory proteasomal subunits Rpn8p and Rpn13p and a component of the UFD system - Doa1p - interact with both imported tRNA and its putative carrier preMsk1p. Deletions of RPN13 and DOA1 genes lead to increased tRNA import efficiency. This suggests a negative role of 26S proteasome in tRNA import regulation. Δ *doa1* strain has mitochondrial morphology defects on a non-fermentable medium at 37°C. In the case of Doa1 its effects on mitochondrial function and tRNA import seems to be dependent on protein ubiquitination. We also show positive correlation between tRNA import level and proteasomal proteolytic activity. Our results allow us to propose existence of a regulatory pathway connecting the ubiquitin/proteasome system with tRNA import into yeast mitochondria.

Keywords: mitochondria, tRNA import, proteasome, ubiquitin.

1. Introduction

tRNA import into mitochondria though not universal is widely spread among organisms (Entelis et al., 2001b), (Schneider and Marechal-Drouard, 2000). The number of imported tRNA species varies from two (in yeast) to the totality (in trypanosomatids). The mechanisms although differs in all organisms still have some similarity, especially with respect to energetic and physicochemical requirements.

In yeast *S. cerevisiae* one out of the two cytoplasmic lysine-tRNA species, tRNA^{Lys}_{CUU} (tRK1), is partially associated with the mitochondrial matrix (Martin et al., 1979; Rinehart et al., 2005). The second one, tRNA^{Lys}_{mm⁵S²UUU} (tRK2), is localized only in the cytoplasm. Mitochondrial DNA codes for the third lysine-tRNA, tRNA^{Lys}_{cmnm⁵UUU} (tRK3), which is localized within the organelle. The mechanism of protein import in mitochondria is well understood, while the mechanism of tRNA transport is still less studied. tRNA import is dependent on mitochondrial outer (Tom20p) and inner (Tim44p) membrane receptors; requires internal and external ATP, and the electrochemical potential (Tarassov et al., 1995a). It is also dependent on the presence of soluble proteins (so called **import factors**). Two of them are already identified: glycolytic enzyme é nolase-2 (Eno2p), targeting aminoacylated tRNA to mitochondrial surface, and precursor of mitochondrial lysyl-tRNA-synthetase (preMsk1p) which forms a non-classical complex with tRK1 and transfers it into organelles (Tarassov et al., 1995b), (Entelis et al., *in press*). The imported tRK1 pool represents only 3–5% of its cellular amount (Entelis et al., 1996). This suggests the existence of the tRNA import regulation in the cell. Probably it is due to existence of additional protein factor(s) regulating the efficiency of tRNA import.

The aim of this work was the identification of proteins regulating the efficiency of tRNA import into yeast mitochondria. For this we used two genetic approaches - two-hybrid and 3-hybrid system – which permitted to identify proteins interacting with preMsk1p and with tRK1. Thus we selected group of proteins potentially involved in tRNA import regulation and it contained three proteins of ubiquitin/proteasome system in yeast (UPS) so we suggested there can be a functional link between UPS and tRNA import.

2. Materials and methods

Strains and plasmids.

Saccharomyces cerevisiae were grown on standard mediums (Kaiser, 1994). YPD (1% bactopectone, 1% yeast extract, 2% glucose) media was used. Growth on the non-fermentable

medium YPEG (1% bactopectone, 1% yeast extract, 2% glycerol, 2% ethanol) was used as a principal criterion of the mitochondrial function.

Yeast two-hybrid screening was performed by mating strains Y187 (bearing genomic library FRYL) and CG1945 (transformed by bait - full-length pre-Msk1p or only its N-terminal segment, 1 – 258 aa, cloned in plasmid pAS2) as described (Fromont-Racine et al., 1997). For yeast three-hybrid screening $L_{40\text{ coat}}$ strain was co-transformed with the plasmids coding for hybrid RNA (pIII/MS2-1 containing tRK1) and pGAD-R cDNA library as described (Gietz and Woods, 2002). Strains $L_{40\text{ coat}}$ and $R_{40\text{ coat}}$ were kindly provided by M. Wickens (Madison, USA). Clones with active reporter genes *HIS3* and *LacZ* were selected. To identify the specificity of interaction for identified proteins with hybrid RNA, the strains $L_{40\text{ coat}}$ (transformed with vector pGAD-GH containing full-length ORF or its fragment identified in screening) and $R_{40\text{ coat}}$ (with plasmid coding for hybrid RNA containing tRK1, tRK2 or without tRNBA insertion) were mated. The diploid cells were selected on the synthetic medium lacking uracil, histidine and leucine and tested for *lacZ* expression by X-gal filter assay (Martin et al., 2000). Genes of full length proteins Rpn8, Rpn13 and Doa1 were cloned in pGAD-GH vector to be tested for interactions in 2- and 3-hybrid systems.

Strain with deletions $\Delta rpn13$ or $\Delta doa1$ (the background strain BY4743) were obtained from Euroscarf (Frankfurt-Main, Germany). To analyse the effect of ubiquitin level strain $\Delta doa1$ was transformed by YEp352-*UBI4* plasmid coding for polyubiquitin (kindly provided by S. Friant, Strasbourg) and tested for growth on YPEG media and for mitochondrial morphology. For the latter cells were grown in YPEG media to logarithmic phase, Mito Tracker Red (Molecular Probes) was added to 1 $\mu\text{g/ml}$, and cells were grown for 30 min more, then washed twice with $1\times\text{PBS}$ and cells were observed by fluorescence confocal microscopy by Zeiss LSM 510. To ensure that the restoring of mitochondrial function observed was due to overexpression of *UBI4* gene, plasmid was contreslected by growth on 5-FoA medium (complete synthetic medium with 0.1% 5-fluoroorotic acid) and obtained cells tested for grown on YPEG.

Strain $\Delta erg6$ with increased permeability of membranes and corresponding wild type RH449 were gift from Riezman H. (Geneva, Switzerland) and were used for experiment of proteasome inhibition by MG132. Strains with mutations in genes of 26S proteasome proteolytic subunits *PRE1* and/or *PRE2*; wild type WCG 4 were obtained from W. Heinemeyer (Martinsried, Germany) and used to analyse correlation between 26S proteasome catalytic activity and tRNA import.

Complete list of strains and plasmids used can be found in supplementary Tables S1 and S2 on-line, respectively.

tRNA import.

To quantify the import efficiency, we used Northern analysis. *In vivo* import efficiency was calculated as the ratio between the signal obtained with the total cellular RNA and mitochondrially extracted one as described previously (Entelis et al., 2002). To normalize the amount of mitochondrial RNA, hybridization with host mitochondrial tRNA (tRK3 or tRNA^{Leu}) was used as control. The oligonucleotide probes used to identify various RNAs are indicated in supplementary Table S3.

Inhibition of 26S proteasome proteolytic activity.

Yeast cells were grown in YPEG medium to exponential phase, then MG132 (Z-Leu-Leu-al, Sigma) was added to 20 μ M and cells were grown for 3h. Level of mitochondrial and cellular tRNAs were analysed by Northern hybridisation. Total cellular proteins obtained from postmitochondrial supernatant after disruption of cells by glass beads, followed by centrifugation 3 min at 3,000 g and 25 min at 20,000 g were used to test 26S proteasome proteolytic activity.

Assay of 26S proteasome proteolytic activity.

Proteolytic cleavage of N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC, Sigma) by total cellular proteins was measured in 1 ml of 0.1 M Tris-Cl, pH 8.2, as cleavage of the chromogenic substrates (Kleinschmidt et al., 1988). The amount of fluorescence formed was determined in a fluorescence spectrophotometer (Beckman) (excitation wavelength of 366 nm, emission wavelength of 405 nm). To determine molar quantity of substrate hydrolyzed, the fluorescence yield of samples was compared to a standard curve prepared with known concentrations of Suc-LLVY-AMC in the same buffer. Activities were expressed in milliunits as the amount of the release of 1 nmol product/min by 1 μ g of protein used for assay.

3. RESULTS

3.1. Identification of tRNA import factors.

The aim of this work was identification of proteins that participate in tRNA import regulation. The strategy of screening for these proteins was based on the suggestion that they should interact either with imported tRK1, or with its protein carrier – preMsk1.

The first genetic approach used was yeast two-hybrid system (Phizicky and Fields, 1995). We performed two independent screenings of the cDNA library using as baits full-size preMsk1p or its non-catalytic N-terminal domain (1-258 a.a.). The latter was selected since this domain obtained by overexpression in *E. coli* cells had been shown to target specifically tRK1 into isolated yeast mitochondria (P.Kamensky, personal communication). In screening with pre-Msk1p as bait we identified five proteins: Drs1p, Lsb4p, Pill1p, Rpn13p and preMsk1p (results are presented in Supplementary Table 4 on-line). Screening with N-terminal domain of preMsk1p as a bait revealed its interaction with four additional proteins: Alr1p, Doa1p, Mth1p and Sen1p. These two groups of proteins are not overlapping. However, some of them belong to the same functional categories: RNA-dependent helicases (proteins Drs1p and Sen1p) and ubiquitin/proteasome system (Rpn13p and Doa1p).

The second genetic system used was yeast three-hybrid system to identify proteins interacting with tRK1 (SenGupta et al., 1996) (Fig. 1, A). The hybrid RNA used in this study consisted of tRNA (tRK1 or tRK2) and phage MS2 RNA on its 5' end. Such a construction should have allowed both correct aminoacylation and maturation of tRNA. Of all proteins identified only two bound tRK1 specifically (Leu9p and Pnc1p), 11 proteins bound both to tRK1 and tRK2, 12 were found to interact with both tRK1 and MS2 phage RNA (Supplementary table 5). The remaining proteins were able to bind all tested RNAs and thus were excluded from further analysis.

Among the proteins selected by two types of genetic screenings we found three proteins belonging to the same functional category - ubiquitin/26S-proteasome system (UPS). Two of them are subunits of the 19S regulatory particle of proteasome - Rpn8 (interact with tRK1 and tRK2 in 3-hybrid system) and Rpn13 (with preMsk1p in 2-hybrid); the third is a protein implicated in regulation of cellular ubiquitin metabolism - Doa1 (bind to N-terminal domain of preMsk1p in 2-hybrid system).

To verify the results of screenings we tested full-length proteins for their interactions with tRK1, tRK2, MS2 RNA and with preMsk1 in 3- and 3-hybrid systems (Fig. 1, B). Both full-length Rpn8 and Rpn13 interact with preMsk1. They also bind both tRNA^{Lys} (tRK1 and tRK2) more efficiently than phage MS2 RNA. Doa1p demonstrated non-specific RNA-binding capacity.

3.2. Effect of deletion of RPN13 on tRNA import.

Rpn13p is a non-conservative protein of the lid part of 19S regulatory particle; its function is still unclear. In $\Delta rpn13$ strain (further strain with deleted gene is referred in *italic*) stabilisation of 26S proteasome substrates was demonstrated previously (Verma et al., 2000). $\Delta rpn13$ strain grows normally on both YPD and YPEG mediums (Fig. 1, D). Mitochondria of $\Delta rpn13$ strain stained with Mito tracker Red and visualised by confocal microscopy were found to have normal morphology (Fig. 1, C). This means that deletion of *RPN13* does not have apparent effect on mitochondrial function. However, in $\Delta rpn13$ mitochondria tRNA import efficiency was found to be 2.7-fold more than in wild type (Fig. 2, A). Thus deletion of *RPN13* coincides with increased tRNA import into mitochondria.

3.2. Role of Doa1 in tRNA import

We found that Doa1p physically interacts with N-terminal domain of preMsk1p in 2-hybrid and with all tested RNAs in 3-hybrid system (fig. 1, A). Strain $\Delta doa1$ has a slow growth at 37°C on the YPEG medium and its mitochondria have an aberrant morphology in these conditions (fig. 1, C and D). It has been shown that $\Delta doa1$ strain has a lower level of free cellular ubiquitin (Johnson et al., 1995).

We found that after transformation of $\Delta doa1$ strain by plasmid YEp352-*UBI4*, coding for polyubiquitin, cells were able to grow on YPEG medium at 37°C and mitochondrial morphology was restored (fig. 1, C and D). This effect is due to the higher level of ubiquitin since exclusion of the plasmid YEp352-*UBI4* after contraselection on 5-FoA medium leads to respiration phenotype of the initial strain.

$\Delta doa1$ strain has a higher level of tRNA import comparing to wild type after growth on YPEG medium at 30°C and 37°C (fig. 2, B). Level of tRNA import can be decreased almost to the level of wild type by overexpression of ubiquitin from plasmid YEp352-*UBI4*.

We demonstrated a direct correlation between tRNA import and proteolytic proteasome activity. Total cellular proteins purified from $\Delta doa1$ strain (after growth on YPEG at 30°C) have 1.9-fold more proteolytic 26S proteasome activity than wild type. But $\Delta doa1$ strain bearing YEp352-*UBI4* plasmid has just 85% proteolytic 26S proteasome activity comparing to wild type (fig. 4).

3.3. Proteolytic activity of 26S proteasome correlates with tRNA import.

Further we analysed effect of inhibition of chymotryptic proteolytic activity of 26S proteasome on tRNA import. First, we used yeast strains bearing mutations in genes coding for two proteolytic proteasome subunits: $\beta 4$ (*PRE1*) or $\beta 5$ (*PRE2*) (Groll et al., 1999). It is shown that mutant strains *pre1-1*, *pre2-2* and *pre1-1/pre2-2* have decreased chymotrypsin-

like proteasome activity (Heinemeyer et al., 1993). We found that *pre1-1* and *pre1-1/pre 2-2* strains show slightly slower growth on the YPEG medium at 25°C (Fig.3, A). Thus in certain conditions abolishing of proteolytic function of 26S proteasome affects mitochondrial function. This is in agreement with the fact that cells lacking Pre1p demonstrate strong defects in mitochondrial morphology as well as the large number of others mutants lacking proteins of UPS (Altmann and Westermann, 2005).

We compared tRNA import in mitochondria purified from strains *pre1-1*, *pre2-2*, *pre1-1/pre2-2* grown on YPEG medium at 30°C. We found that strains with decreased proteolytic proteasome activity have also lower level of tRK1 in mitochondria (Fig. 3, B, C). Decreasing of tRNA import is not as prominent as that of catalytic activity of 26S proteasome; however the direct correlation is obvious.

Second approach used was treatment of yeast cells $\Delta erg6$ with a inhibitor of chymotrypsin-like activity of the proteasome - MG132 (Steinhilb et al., 2001). Cells were treated by MG132 and then mitochondrial tRNAs were purified and analysed by Northern hybridisation. At the same time total cellular proteins were isolated to measure the level of proteasomal activity *in vitro*. In *erg6* cells treated with MG132, the tRNA import and level of proteasomal catalytic activity were decreased to 85% and 75% of wild type correspondently (fig. 4).

On the base of our results obtained by two different approaches we establish the strong correlation between the efficiency of tRK1 import into mitochondria and proteasomal proteolytic activity.

4. Discussion

Last years there is an increasing amount of evidence of UPS influence on mitochondrial function and morphology. It is shown that ubiquitination is involved in targeting or degradation of nuclear-encoded proteins on their way to be imported into mitochondria (Zhaung and McCauley, 1989), (Zhuang et al., 1992). Mutations in UPS components lead to defects in mitochondrial morphology and distribution (Rinaldi et al., 2004), (Fisk and Yaffe, 1999), (Altmann and Westermann, 2005).

In this work we identified three proteins possibly implicated in tRK1 import which are the components of UPS: Rpn8p, Rpn13p and Doa1p. This allowed us to suggest that there is a functional link between UPS and tRNA import.

We observed that two subunits of a proteasome 19S regulatory particle - Rpn8p and Rpn13p - physically interact with both tRK1 and preMsk1 (Fig. 1, A). Rpn8 is a non-ATPase component of the lid subassembly of the 19S regulatory proteasome complex, though its

function remains unknown, it is found to be essential for cell viability (Giaever et al., 2002). Interestingly, Rpn8 is most closely related to another lid protein Rpn11, which has deubiquitinating activity and was proposed to function in targeting of mitochondrial proteins participating in maintaining mitochondrial morphology (Fritz et al., 2003). We have not analysed a role of Rpn8p in tRK1 import in details since this gene is essential and even its partial depletion has a negative effect on mitochondrial morphology (Altmann and Westermann, 2005).

Function of another non-ATPase subunit of 19S regulatory proteasome particle - Rpn13p - is also unknown (Verma et al., 2000). Typically functions of Rpn subunits include binding of proteolytic substrates or soluble cofactors to 26S proteasome, maintaining of the architecture of the regulatory particle and targeting of proteasome to specific subcellular sites (Glickman et al., 1999). Here we propose a novel implication of Rpn13p in tRNA import regulation. We found that deletion of the *RPN13* gene does not apparently affect mitochondrial respiration and morphology but coincides with 2-fold increase of tRNA import compared to wild type. Thus we propose that Rpn13 negatively influence tRNA import by degradation of an import factor(s) or by abolishing its (their) mitochondrial targeting.

A non-proteasomal protein Doa1 implicated in regulation of the ubiquitin level in cell (Johnson et al., 1995) was also found to interact with both preMsk1p and all tested RNAs. Probably Doa1 plays role in tRNA import and mitochondrial function distinct from proteasome protein degradation. We suggest that changing of free ubiquitin level affects the manner of protein ubiquitination which is known to influence function and localisation of proteins; in particular mitochondrial ones (Zhaung and McCauley, 1989), (Zhuang et al., 1992). The fact that defective mitochondrial morphology in *Adoa1* strain at 37°C is restored by elevated expression of polyubiquitin from YEp352-UBI4 plasmid is in agreement with this suggestion. One may come to the same conclusion if takes into account that elevated tRNA import in *Adoa1* strain can also be decreased to the level close to wild type by overexpression of the *UBI4* gene from YEp352-UBI4. Taking together our data demonstrate that the cellular level of ubiquitin has an influence on tRNA import and on maintaining mitochondrial morphology (at 37°C).

Finally we analysed the level of tRNA import in cells with decreased chymotryptic 26S proteasomal activity. As result we found the direct correlation between the efficiency of tRK1 import and proteasomal proteolytic activity. This allows us to suggest that 26S proteasome plays a role in tRNA import regulation through degradation of proteins playing

role in the import repression. It gives us one more link connecting tRNA import with UPS function in yeast cells.

Here we propose a model of organisation of functional links between tRNA import and UPS in yeast cells (figure 5). We separate two kinds of proteins participating in tRNA import (so called **import factors**): positive and negative. Two of positive factors are already known: Eno2 which serves in tRK1 targeting to the mitochondrial surface; and preMsk1 which is protein carrier of tRK1 to organelle (Entelis et al., 2006, *Genes and Develop*), (Tarassov et al., 1995b). Probably there are others positive import factors regulating tRNA import efficiency. Negative factors are also unknown, but probably they can affect directly tRNA localisation or/and can influence positive factors, for instance targeting them to proteasome degradation.

We suggest that both positive and negative import factors can be affected by UPS-dependent pathways which are still obscure. First we suggest that subunit of 19S regulatory particle Rpn13 is implicated in tRNA import regulation on the level of regulation of positive import factors. Then another part of this model suggests influence of ubiquitin cellular concentration on tRNA import mediated by Doa1 also on the level of positive factor. Both Rpn13 and Doa1 can affect positive import factor degradation and/or abolish its mitochondrial targeting. Interactions of Rpn13, Rpn8 and Doa1 with preMsk1 in 2-hybrid system allow us to suggest that preMsk1 is possible target of such regulation.

At the same time 26S proteasome plays role in degradation of negative factors of tRNA import. We can propose feed-forward loops between influence of UPS on positive and negative factors, providing a balancing mechanism of regulation. Thus UPS may contribute to both increasing and decreasing of tRNA import efficiency. The sign of this influence will be the critical for regulation of tRNA import.

Our data suggest a new function of UPS in yeast cell – regulation of tRNA import. This makes a new part of sight into functional link between the UPS and mitochondrial function in yeast.

5. Acknowledgements

We are grateful to M. Wickens, W. Heinemeyer, H. Riezman and S. Friant for providing yeast strains and plasmids. We thank J. Mutterer (IBMP, Strasbourg) for assistance with confocal microscopy experiments. Project was supported by RFBI, PICS, AFM.

6. References

- Altmann, K. and Westermann, B. (2005) Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 16, 5410-5417.
- Chung, N., Jenkins, G., Hannun, Y.A., Heitman, J. and Obeid, L.M. (2000) Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, 275, 17229-17232.
- Emter, R., Heese-Peck, A. and Kralli, A. (2002) ERG6 and PDR5 regulate small lipophilic drug accumulation in yeast cells via distinct mechanisms. *FEBS Lett*, 521, 57-61.
- Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, I. and Martin, R., Tarassov, I. (2006) A glycolytic enzyme, enolase, is a co-factor of tRNA targeting towards mitochondria in yeast. *Mol Cell Biol*, submitted.
- Entelis, N., Kolesnikova, O., Kazakova, H., Brandina, I., Kamenski, P., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2002) Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet Eng (N Y)*, 24, 191-213.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2001) RNA delivery into mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev*, 49, 199-215.
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J. and Beach, D. (1994) Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res*, 22, 1502-1503.
- Fisk, H.A. and Yaffe, M.P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 145, 1199-1208.
- Fritz, S., Weinbach, N. and Westermann, B. (2003) Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell*, 14, 2303-2313.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C. and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet*, 16, 277-282.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418, 387-391.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 350, 87-96.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999) Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep*, 26, 21-28.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D.H. and Huber, R. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10976-10983.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. and Wolf, D.H. (1993) PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, 268, 5115-5120.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H. (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants

unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J*, 10, 555-562.

Hochstrasser, M., Ellison, M.J., Chau, V. and Varshavsky, A. (1991) The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4606-4610.

Jensen-Pergakes, K.L., Kennedy, M.A., Lees, N.D., Barbuch, R., Koegel, C. and Bard, M. (1998) Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 1160-1167.

Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, 270, 17442-17456.

Kaiser, C., Michaelis, S., Mitchell, A. (1994) *Methods in yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Kleinschmidt, J.A., Escher, C. and Wolf, D.H. (1988) Proteinase yscE of yeast shows homology with the 20 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett*, 239, 35-40.

Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Lightowlers, R.N., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet*, 13, 2519-2534.

Kraemer, B., Zhang, B., SenGupta, D., Fields, S. and Wickens, M. (2000) Using the yeast three-hybrid system to detect and analyze RNA-protein interactions. *Methods Enzymol*, 328, 297-321.

Martin, F., Michel, F., Zenklusen, D., Muller, B. and Schumperli, D. (2000) Positive and negative mutant selection in the human histone hairpin-binding protein using the yeast three-hybrid system. *Nucleic Acids Res*, 28, 1594-1603.

Martin, R., Schneller, J.M., Stahl, A. and Dirheimer, G. (1979) Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry*, 18, 4600-4605.

Phizicky, E.M. and Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, 59, 94-123.

Rinaldi, T., Pick, E., Gambadoro, A., Zilli, S., Maytal-Kivity, V., Frontali, L. and Glickman, M.H. (2004) Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem J*, 381, 275-285.

Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D. and Soll, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev*, 19, 583-592.

Schneider, A. and Marechal-Drouard, L. (2000) Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol*, 10, 509-513.

SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. and Wickens, M. (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8496-8501.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122, 19-27.

Sobel, S.G. and Wolin, S.L. (1999) Two yeast La motif-containing proteins are RNA-binding proteins that associate with polyribosomes. *Mol Biol Cell*, 10, 3849-3862.

Steinhilb, M.L., Turner, R.S. and Gaut, J.R. (2001) The protease inhibitor, MG132, blocks maturation of the amyloid precursor protein Swedish mutant preventing cleavage by beta-Secretase. *J Biol Chem*, 276, 4476-4484.

Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R.P. (1995a) An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J Mol Biol*, 245, 315-323.

Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R.P. (1995b) Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *Embo J*, 14, 3461-3471.

Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J. and Deshaies, R.J. (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell*, 11, 3425-3439.

Zhaung, Z.P. and McCauley, R. (1989) Ubiquitin is involved in the in vitro insertion of monoamine oxidase B into mitochondrial outer membranes. *J Biol Chem*, 264, 14594-14596.

Zhuang, Z.P., Marks, B. and McCauley, R.B. (1992) The insertion of monoamine oxidase A into the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 267, 591-596.

7. Figures legends:

Figure 1.

- (A) Scheme of the three-hybrid system used in this work.
- (B) Assay for *LacZ* activity on nitrocellulose filter to test interactions of bait proteins with different preys: with hybrid RNAs in 3-hybrid system and with preMsk1 - in 2-hybrid.
- (C) Confocal microscopy images: left, differential interference contrast (DIC) image; right, mitochondria stained by Mito Tracker Red. $\Delta rpn13$ strain has normal mitochondria, but $\Delta doa1$ strain has punctuated mitochondria at 37°C on YPEG medium which can be restored to normal one by the overexpression of ubiquitin from YEp352-*UBI4* (*doa1+UBI4*).
- (D) Respiratory phenotype of $\Delta doa1$ strain on YPEG medium at 37°C is restored by overexpression of ubiquitin from YEp352-*UBI4* ($\Delta doa1+UBI4$). This effect depends on the ubiquitin level, since after contreselection on 5FoA media ($\Delta doa1+UBI4+5FoA$) cells does not grow on YPEG at 37°C. Parental strain BY4743 served as a negative control (WT), consecutive 10-fold dilutions of yeast culture were plated.

Figure 2. tRNA import level in strains with deletions of ubiquitin-proteasome system components. Northern hybridisation of mitochondrial RNA from following strains:

- (A) YPH501 and $\Delta rpn13$ strains grown on YPEG media at 30°C;
- (B) $\Delta doa1$ strain and a background strain BY4743 (WT), grown on YPEG at 30°C and 37°C;
- (C) BY4743 (WT), $\Delta doa1$ and $\Delta doa1$ transformed with YEp352-*UBI4* for polyubiquitin overexpression (*doa1+UBI4*) grown on YPEG at 30°C.

Figure 3. **Effect of mutations in *PRE1* and *PRE2* genes on tRNA import.**

- (A) Strains *pre1-1* and *pre1-1/pre2-2* has slightly slower growth then wild type strain WCG4 on YPEG at 25°C.
- (B) Mutations in genes of proteasomal catalytic subunits coincide with decreased tRNA import. Northern hybridisation of mitochondrial tRNAs from strains *pre1-1*, *pre2-2*, *pre1-1/pre2-2* compared to wild type WCG4; all grown on YPEG at 37°C.

(C) Direct correlation between proteasome proteolytic activity measured for total cellular proteins *in vitro* and tRNA import measured by Northern analysis of mitochondrial tRNAs. Data is represented relatively to wild type, %.

Figure 4. **Direct correlation between 26S proteasome proteolytic activity and tRNA import.** Proteasome proteolytic activity measured *in vitro* of total soluble proteins purified from different strains relatively to those of wild type. Level of tRNA import was estimated by Northern analysis of mitochondrial tRNAs purified from the same strains.

Figure 5. **Model of tRNA import regulation by ubiquitin/proteasome system.**

Supplementary table 1. *S. cerevisiae* strains used in the work.

Name	Genotype	Source
CG1945	<i>MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3,112 GAL4-542 gal80-538 cyhr2 LYS2::GAL1; UAS-GAL;1TATA-HIS3; URA3::GAL417-mers(x3)-CYC1TATA-lacZ</i>	(Feilotter et al., 1994)
Δ doal	<i>BY4742;MAT α; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YKL213c::kanMX4</i>	Euroscarf (Germany)
Δ erg6	<i>MATα erg6::LEU2 his4 lys2 ura3 leu2 bar1</i>	(Emter et al., 2002)
L40 _{coat}	<i>L40-ura3 MATα, ura3-52, leu2-3112, his3D200, trp1D1, ade2, LYS2::(lexAop)-HIS3, ura3::(lexAop)-LacZ; pLexA-coat</i>	(Kraemer et al., 2000)
<i>pre1-1</i>	<i>MATα, pral-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his⁻, pre1-1</i>	(Heinemeyer et al., 1991)
<i>pre 2-2</i>	<i>MATα, pral-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his⁻, pre2-2</i>	(Heinemeyer et al., 1991)
<i>pre1-1/pre2-2</i>	<i>MATα, pral-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his⁻, pre1-1/pre2-2</i>	(Heinemeyer et al., 1991)
R40 _{coat}	<i>L40-ura3 MATα, ura3-52, leu2-3112, his3D200, trp1D1, ade2, LYS2::(lexAop)-HIS3, ura3::(lexAop)-LacZ; pLexA-coat</i>	(Kraemer et al., 2000)
Δ rpnl3	<i>BY4741;MAT α; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR421c::kanMX4</i>	Euroscarf (Germany)
Udo	doal strain transformed by plasmid YEp352-UBI4	this work
WCG 4	<i>MATα, pral-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3 ura3Δ5 leu 2-3, 112 his⁻</i>	(Feilotter et al., 1994)
YPH501	<i>MATα/α,URA3-52/URA3-52,lys2-801amber/lys2-801amber, ade2-101ochre/ade2-101ochre, TRP1-Δ63/TRP1-Δ63, HIS3-Δ200/HIS3-Δ200, LEU2-Δ1/LEU2-Δ1</i>	(Sikorski and Hieter, 1989), (Sobel and Wolin, 1999)

Supplementary table 2. Plasmids used in this work.

Plasmid name	Relevant characteristics	Source
YEp352-UBI4	Multicopy plasmid, <i>LacZ</i> , <i>Amp^r</i> , <i>URA3</i> , includes genome fragment Sau3a with gene <i>UBI4</i> , cloned by <i>BamHI</i>	Gift from S.Fiant,(Hochstrasser et al., 1991)
pAS2	Plasmid for yeast 2-hybrid system system, GAL4(1-147) DNA-binding domain under <i>ADHI</i> promoter, <i>TRP1</i> marker and a 2- μ m origin of replication. Lacks <i>CYH2</i> gene and the HA epitope	Clontech
pAS2+ <i>MSK1</i>	pAS2 fusion with preMsk1p	this work
pAS2+N- <i>MSK1</i>	pAS2 fusion with N-terminus of preMsk1p (1 – 258 a.a.)	this work
pGAD-GH	2- μ m/ <i>LEU2</i> plasmid, <i>ADHI</i> promoter and the GAL4 (768–881) activation domain; contains genomic FRYL library; for screenings by 2-hybrid system	Clontech
pIIIA/MS2-1	The shuttle vector used for expression of the hybrid RNA molecules in 3-hybrid system; contains <i>URA3</i> , RNase P RNA (<i>RPR1</i>) promoter	(Kraemer et al., 2000)
pIIIA/MS2-1-tRK1	For 3-hybrid system; expression of hybrid RNA containing imported tRK1 fused to phage MS2 RNA	this work
pIIIA/MS2-1-tRK2	For 3-hybrid system; expression of hybrid RNA containing cytoplasmic tRK2 fused to phage MS2 RNA	this work

Supplementary table 3. Oligonucleotides used in this study.

Oligonucleotide; 5'→3' direction	Method used

GGAATTCCATATGAATGTGCTGTTAAAAAG	Cloning of <i>MSK1</i> gene (using <i>NdeI</i>) into pAS2 for yeast two-hybrid system	
GGGAAACCATATGTTACTGCCTGTTTACATCATC		
CAGGATCCGTTTCTGTCGTCGAGAAAC (<i>BamHI</i> site underlined)	Cloning of the N-terminal fragment of preMsk1p (1 – 258 a.a.) into pAS2 for yeast two-hybrid system	
GGGAAACTGATCATGAATGTGCTGTTAAAAA GACGCAG (<i>BclI</i> site underlined)		
CAGGAAACAGACCCCGGGAATT	<i>SmaI</i> –mediated cloning of imported tRNA ^{Lys} (<i>tRK1</i>) in pIII/MS2-1 for yeast three-hybrid system	
CAAAACAGCCCGGGTTGCATGCCT		
CAGGAAACAGACCCCGGGAATT	<i>SmaI</i> –mediated cloning of cytoplasmic tRNA ^{Lys} (<i>tRK2</i>) in pIII/MS2-1 for yeast three-hybrid system	
CAAAACAGCCCGGGTTGCATGCCT		
TGGAGCCCTGTAGGGGG	imported tRK1	used for Northern hybridisation
TGGCTCCTCATAGGGGG	cytoplasmic tRK2	
CUUAAAAGACAACACTGTTTACCATTAAACAA TATTCTC	mitochondrial tRK3	
TGGTTGCTATTTAAAGGACTTG	mitochondrial tRNA ^{Leu}	

Supplementary table 4. Proteins identified in the result of two-hybrid screenings.

Bait used in screening	ORF name, systematic name	Molecular function (data from Yeast Genome Database; www.yeastgenome.org)	Protein localisation	Length of sequenced ORF, bp	Similarity to known ORF, %
Msk1p	<i>DRS1</i> , YLL008w	ATP-dependent RNA helicase activity. Nucleolar DEAD-box protein required for ribosome assembly and function, including synthesis of 60S ribosomal subunits.	nucleolus	50*	100
	<i>LSB4</i> , YHR016c	Protein involved in the organization of the actin cytoskeleton; contains SH3 domain	actin cortical patch	71*	100
	<i>MSK1</i> , YNL073W	Mitochondrial lysine-tRNA synthetase, required for import of both aminoacylated and deacylated forms of tRNA(Lys) into mitochondria	mitochondrion	450 738	98 100
	<i>PIL1</i> , YGR086c,	Long chain base-responsive inhibitor of protein kinases Phk1p and Phk2p, acts along with Lsp1p to down-regulate heat stress resistance via regulation of the Pkc1p and Ypk1p pathways; protein kinase inhibitor activity.	cytoplasm; mitochondrion; mitoch.outer membrane	84*	91
	<i>RPN13</i> , YLR421c	Subunit of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome lid	proteasome regulatory particle	99*	100
N-terminus of preMsk1 (1-258 aa.)	<i>ALR1</i> , YOL130W	Plasma membrane Mg(2+) transporter, expression and turnover are regulated by Mg(2+) concentration.	plasma membrane	630	100
	<i>DOA1</i> , YKL213C	WD repeat protein required for ubiquitin-mediated protein degradation, forms complex with Cdc48p, plays a role in controlling cellular ubiquitin concentration; also promotes efficient double-strand break repair via non homologous end-joining in postdiauxic/stationary phase.	cytoplasm nucleus	689	100
	<i>MTH1</i> , YDR277C	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway, required for repression of transcription by Rgt1p; interacts with Rgt1p and the Snf3p and Rgt2p glucose sensors; phosphorylated by Yck1p, triggering Mth1p degradation.	nucleus	819	100
	<i>SENI</i> , YLR430W	Nuclear protein, putative helicase required for processing of tRNAs, rRNAs, and small nuclear RNAs; potential Cdc28p substrate; ATP-dependent RNA helicase activity.	nucleus	373	100

* - Sequencing was performed manually by Sanger method, thus the length of identified ORF is shorter than those which sequences were obtained by automatic system.

Supplementary table 5. Results of cDNA library screening by three-hybrid with tRK1 as bait.

Hybrid RNA found to interact with	ORF name, systematic name	Molecular function (data from Yeast Genome Database; www.yeastgenome.org)	Protein localisation
tRK1	Leu9, YOR108w	α -isopropylmalate synthase II, catalyzes the first step in the leucine biosynthesis pathway; the minor isozyme.	mitochondrion
	Pnc1, YGL037c	Nicotinamidase, part of the NAD(+) salvage pathway, required for life span extension by calorie restriction.	cytoplasm; nucleus; peroxisome
tRK1 and tRK2	PLB1, YMR008c	Isozymes of phospholipase B (lysophospholipase) involved in lipid metabolism, required for deacylation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine but not phosphatidylinositol.	cell wall
	PLB2, YMR006c		
	PLB3, YOL011w		
	FAA1, YOR317w	Long chain fatty acyl-CoA synthetase; involved in the activation of imported fatty acids.	mitochondrial outer membrane; lipid particles
	GLT1, YDL171c	NAD(+)-dependent glutamate synthase.	mitochondrion
	GUA1, YMR217w	GMP synthase catalyzes the second step in the biosynthesis of GMP from inosine 5'-phosphate	cytoplasm
	TIR4, YOR009w	Cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins; required for anaerobic growth.	cell wall
	TOS1, YBR162c	Covalently-bound cell wall protein of unknown function.	cell wall, vacuole
	YMR317w	Hypothetical protein, uncharacterised	unknown
	NIC96, YFR002w	Component of the nuclear pore complex, required for nuclear pore formation, participates in mRNA/ rRNA/ tRNA/ snRNA/ snRNP export from nucleus, in protein import/export from nucleus	nuclear pore complex
	ERP2, YAL007c	Member of the p24 family involved in ER to Golgi transport and localized to COPII-coated vesicles	ER, COPII-coated vesicles
RPN8, YOR261c	Essential, non-ATPase regulatory subunit of the 26S proteasome.	cytoplasm, nucleus	
tRK1 and MS2 phage RNA	RPL11, PR102c	Protein components of 60S ribosomal subunit	cytoplasm
	Rpl41, YDL133c		
	DRS1, YLL008w	Nucleolar DEAD-box protein required for ribosome assembly and function, including synthesis of 60S ribosomal subunits.	nucleolus
	TDH3, YGR192c	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3, involved in glycolysis and gluconeogenesis.	cytoplasm, cell-wall
	YNL050c	Hypothetical protein	unknown
	GLN1, YPR035w	Glutamine synthetase	cytoplasm
	MAP1, YLR244c	Methionine aminopeptidase, catalyzes the cotranslational removal of N-terminal methionine from nascent polypeptides	cytoplasm
	YLR198c	Hypothetical protein	unknown
	CRP1, YHR146w	Protein that binds to cruciform DNA structures	nucleus
	NPL3, YDR432w	RNA-binding protein that carries poly(A) ⁺ mRNA from the nucleus into the cytoplasm.	cytoplasm, nucleus
RSN1, YMR266W	Membrane protein of unknown function	unknown	

CONCLUSION GENERALE

Au début de cette étude, les informations sur le rôle des facteurs protéiques intervenant dans l'importation mitochondriale de l'ARNt^{Lys}_{CUU} (tRK1) chez *Saccharomyces cerevisiae* étaient limitées. Les travaux précédents avaient indiqué que tRK1 était d'abord aminoacylé dans le cytoplasme par la lysyl-ARNt synthétase cytoplasmique (Krs1p), puis interagissait avec le précurseur de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale (préMsk1p) pour être transporté dans la mitochondrie par le canal d'importation des protéines, sous forme d'un complexe avec ce dernier. La préMsk1p aurait donc le rôle de transporteur de l'ARNt dans l'organite (Tarassov et al., J Mol Biol, 1995; Tarassov et al., EMBO J, 1995 ; Entelis et al 1998). Cependant, il s'est avéré que la présence de ces deux aminoacyl-ARNt synthétases n'était pas suffisante pour diriger l'import de tRK1 dans les mitochondries isolées, ce qui indique la nécessité de facteurs protéiques cytosoliques supplémentaires.

Au cours de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la recherche de nouveaux facteurs protéiques participant à l'importation d'ARNt dans les mitochondries de levure et à étudier leurs rôles dans ce processus. Nous avons commencé par l'analyse de l'interaction de tRK1 avec les facteurs déjà connus : Krs1p et préMsk1p. Des études par mutagenèse dirigée (substitutions de chaque base de l'anticodon de tRK1) ont permis de montrer l'importance de l'anticodon de tRK1 pour son aminoacylation par la Krs1p et pour son interaction avec la préMsk1p. Nos expériences d'importation des versions mutées de tRK1 ou tRK2 dans les mitochondries isolées de levure et de cellules humaines ont montré que seulement certaines versions mutantes nécessitent d'être aminoacylées par la lysine pour pouvoir interagir avec la préMsk1p et être importées dans les mitochondries isolées. A partir de ces observations, nous avons conclu que le système d'importation d'ARNt est très flexible, permettant à des versions dérivant de tRK1/2 d'être importées sans être aminoacylées ou en étant aminoacylées par un aminoacide différent de la lysine. Cette flexibilité du système d'importation d'ARNt est actuellement exploitée dans notre laboratoire pour développer des modèles de thérapie géniques de maladies à hérédité mitochondriales, basés sur l'ingénierie d'ARNt exprimés dans le noyau et importés du cytoplasme (Kolesnikova et al, 2000 ; Kolesnikova et al., 2004).

L'essentiel de mes travaux de thèse est consacré à la recherche de nouveaux facteurs protéiques d'importation. Dans un premier temps, l'utilisation d'une approche biochimique a permis d'identifier l'énolase, une enzyme glycolytique, comme un nouveau facteur essentiel pour l'import de tRK1. Cette découverte a permis de reconstruire un système minimal d'importation de tRK1 *in vitro* dans les mitochondries isolées, à partir de deux protéines recombinantes, la préMsk1p et l'énolase. Nous avons utilisé différentes techniques de

généétique, de biologie moléculaire et de biochimie pour préciser le rôle de l'énolase dans l'import. Les résultats obtenus nous ont conduit à émettre un modèle proposant que l'énolase (sous sa forme libre) fixe tRK1 dans le cytoplasme et lui sert de véhicule pour diriger l'ARNt vers la périphérie des mitochondries, où est localisée la preMsk1p ; cette interaction entre tRK1 et l'énolase provoquerait un changement conformationnel chez l'ARNt, facilitant et stabilisant ainsi son interaction avec la préMsk1p, qui servirait ensuite de transporteur pour sa translocation mitochondriale. Ce modèle implique donc deux fonctions pour l'énolase dans l'import de tRK1 : un rôle de véhicule pour son adressage mitochondrial et un rôle de chaperon d'ARN pour son interaction avec la préMsk1p. Ces travaux ont également démontré que le rôle de l'énolase dans l'import de tRK1 était indépendant de son rôle d'enzyme de la glycolyse. De plus, mes travaux ont permis d'apporter des informations intéressantes sur la localisation partiellement mitochondriale de l'énolase et des autres enzymes de la glycolyse. L'utilisation de deux approches protéomiques, l'électrophorèse bi-dimensionnelle en conditions natives et la co-immunoprécipitation de protéines avec des anticorps anti-énolase, a permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe multi-protéique localisé à la surface de la mitochondrie. Ce complexe renferme l'énolase et deux autres enzymes glycolytiques, des transporteurs membranaires mitochondriaux, deux enzymes du cycle de Krebs, de même que tRK1 et la preMsk1p. Nous proposons un modèle pour l'organisation de ce complexe et son possible rôle dans le ciblage du pyruvate (le métabolite terminal de la glycolyse) vers le cycle de Krebs localisé dans la matrice mitochondriale (où pyruvate est consommé) et dans l'import de tRK1 dans les mitochondries.

Notre deuxième stratégie d'identification de nouvelles protéines participant à l'importation de tRK1 était basée sur l'hypothèse qu'elles devaient interagir avec tRK1 et/ou avec son transporteur protéique, la preMsk1p. Nous avons criblé une banque d'ADN génomique de *S. cerevisiae* par le système du double hybride afin d'identifier des protéines interagissant soit avec la protéine pre-Msk1p entière; soit avec son domaine N-terminal non-catalytique (aminoacides 1-258). Cette approche nous a permis d'identifier 5 protéines interagissant avec preMsk1p (Pil1p, Lsb4p, Drs1p, Rpn13p et Msk1p) et 4 autres interagissant uniquement avec son domaine N-terminal (Alr1p, Doa1p, Mth1p et Sen1p). D'autre part, le criblage triple-hybride d'une banque d'ADNc de *S. cerevisiae* a permis d'identifier 2 protéines interagissant avec tRK1, 12 protéines interagissant avec tRK1 et tRK2 et 11 protéines interagissant avec tRK1 et l'ARN du phage MS2.

Parmi les protéines identifiées dans nos cribles double- et triple hybrides, trois sont des composants du système ubiquitine-protéasome (UPS) ; il s'agit de Rpn8p, Rpn13p et Doa1p.

Lors de ces dernières années, les travaux de différents laboratoires les ont amenés à proposer l'existence d'un lien entre le système ubiquitine-protéasome et les mitochondries. Cette conclusion était basée sur l'observation que des mutations dans le système UPS avaient des conséquences soit au niveau de la morphologie, de la distribution et de la transmission des mitochondries, soit au niveau de la localisation mitochondriale de certaines protéines ; cependant, les mécanismes qui interviennent restent encore mal compris. Pour la suite de notre travail de thèse, nous avons voulu voir s'il existait un lien entre le système UPS et l'import mitochondrial de tRK1. Nous avons analysé l'implication de Rpn13p et Doa1p (le gène *RPN8* étant essentiel, n'a pas été analysé) dans l'importation mitochondriale de tRK1. Par analyse Northern, nous avons observé une augmentation du niveau d'importation de tRK1 dans les mutants $\Delta rpn13$ et $\Delta doa1$ d'un facteur 2.7 et 2, respectivement, par rapport à la souche sauvage. Une interprétation possible de ce résultat est que le système UPS pourrait contrôler l'import de tRK1 en dégradant dans le cytoplasme un (ou des) répresseur(s) de son import. D'autre part, la sur-expression du gène *UBI4* (codant pour le polyubiquitine) dans le mutant $\Delta doa1$ rétablit un niveau d'importation de tRK1 similaire à celui de la souche sauvage, suggérant qu'une certaine concentration d'ubiquitine cellulaire libre serait nécessaire pour réguler l'import mitochondrial de tRK1.

Pour étudier si la fonction protéolytique du protéasome 26S intervient dans l'import de tRK1, nous avons analysé les niveaux d'importation de tRK1 dans les mitochondries de souches contenant des mutations dans les gènes codant des sous-unités catalytiques β du protéasome (mutations: *pre1-1*, *pre2-2* et *pre1-1/pre2-2*). Comme approche alternative, nous avons également mesuré le niveau d'importation de tRK1 dans une souche $\Delta erg6$ (ayant une perméabilité augmentée) après traitement par l'inhibiteur MG132 du protéasome. Dans les deux cas, nous avons observé une relation directe entre l'activité catalytique du protéasome 26S et le niveau d'importation de tRK1 *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une dégradation de répresseur(s) de l'import de tRK1 par la protéasome 26S.

En conclusion, nos résultats sont en faveur l'existence d'un lien entre le système ubiquitine-protéasome et l'import mitochondrial de tRK1. Cependant, le mécanisme par lequel le système UPS régule cet import reste à résoudre. Il sera en effet important d'identifier la (les) des cible(s) du système UPS régulant l'import de tRK1. Une question fondamentale est évidemment de savoir si l'UPS intervient dans la dégradation d'un répresseur spécifique de l'importation de tRK1 ou s'il intervient dans la localisation/insertion dans les membranes mitochondriales d'une protéine ayant un rôle plus général dans le fonctionnement de l'organite. L'ubiquitine ligase Rsp5p est une candidate pour un tel rôle plus général. Pour

cette protéine, la localisation à la surface mitochondriale ainsi que sa participation à l'importation mitochondriale des protéines ont été démontrées (Zoladek et al., 1997). Il faudrait donc tester si l'importation de tRK1 est également affectée dans des mutants *rsp5* thermosensibles (*RSP5* est un gène essentiel).

Annexe 1.

Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

Clonage du gène *TRK1* dans pIII/MS2-1

TRK1A_3H	ATTGAACCATCCCGGGCCTTGTTGGCGCAATCGG
TRK1B_3H	GATAGTCCGATGGGCCCTTAAAAAAAAAAAA GAAGCCTG

Clonage du gène *TRK2* dans pIII/MS2-1

3H TRK2A	ATTGAACCATCCCGGGTCCTTGTTAGCTCAGTTGG
3H TRK2B	GATAGTCCGATGGGCCCTTAAAAAAAAAAAAAGAACTCCTCA

Vérification d'insertion du gène d'ARNt dans pIII/MS2-1 :

3HSEQA	GGCGTGGGTGCTC
3HSEQB	GGATATGGGGGAATTC

Séquençage des inserts de pGAD-GH

pGAD_A	CTATCTATCGATGATG.
pGAD_B	CAGTGGTGCACGATGC

Hybridation par Northern:

anti-tRK1	TGGAGCCCTGTAGGGGG
anti-tRK2	TGGCTCCTCATAGGGGG
anti-tRK3	CUUAAAAGACAACCTGTTTTACCATTAAACAATATTCTC
anti-tRNA(Met)	CATTATTTATTTATGAGA

RT-PCR:

anti-tRK1:	tRK1_RT_AS GCC TTG TTG GCG CAA TC
	tRK1_RT_BR TGG AGC CCT GTA GGGGG
anti-tRK2:	tRK2_RT_AS TCC TTG TTA GCT CAG TT
	tRK2_RT_BR TGG CTC CTC ATA GGG GG

Marquage d'Eno2p par la YFP:

Eno2-pDH5-AS	GGCTGTCTACGCCGGTGAAAACTCCACCACGGTGACAAGTTGGGTGACGGATCCCCGGG
Eno2-pDH5-BR	GAAAAAATAAGCAGAAAAGACTAATAATTCCTTAGTTAAAAGCACTATCGATGAATTCGAGCTCG

Vérification de l'intégration d'YFP marqueur dans le génome de levure :

Eno2-YFP-AS GACTGTCACCAACCCAGCTAG
Eno2-YFP-BR CAGCACGTGTCTTGTAGTTCCC

Clonage de *MSK1* dans pAS2-1:

MSK_pas_As GGATTCCATATGAATGTGCTGTTAAAAAG
MSK_pas_Br GGGAAACCATATGTTACTGCCTGTTTACATCATC

Clonage du fragment du gène *MSK1* (1-774 pb) dans pAS2-1:

pAS_NMSK_Bam CAGGATCCGTTTCTGTCGTCGAGAAAC
MSK_pas_Br GGGAAACCATATGTTACTGCCTGTTTACATCATC

Transcription-traduction des protéines Eno1p, Eno2p et pre-Msk1p *in vitro*:

Eno1/2-T7-AS CCCTGATCATAATACGACTCACTATAGGGAGCCACCATGGCTGTCTCTAAAGTTTACGCTAGATCC

Eno1_BR CCC GGA TCC CGG ATA CAC GCG TCA CCA C
Eno2_BR CCC GGA TCC CCA TGT TTT CTT ATC ATC C
 CCCTGATCATAATACGACTCACTATAGGGAGCCACCAT

T7-MDH/MSK GTGTCAAGAGTAGCTAAACGTGC

Clonage des gènes *RPN8*, *RPN13*, *ENO1*, *ENO2* dans pGAD-GH:

RPN8_NCOI CGGGCATTATCCATGGTCTCTCTACAACACGAG
RPN8_XHOI GCGCGTTATTCTCGAGTTAATTTTTCTTGTTCTTTTCG
RPN13_NCOI CGGGCATTATCCATGGTTAGTATGAGTTCAACTG
RPN13_XHOI GCGCGTTATTCTCGAGTTAATCTTGCATACTAACATC
Eno_BamH CCCAAAGGATCCCTTGCTGTCTCTAAAGTTTACGCT
Eno1_SacI CCAACCGAGCTCTTATTATTTGTCACCGTG GTG
Eno2_SacI CCAACCGAGCTCTTACAACCTTGTCACCGTGGTG

Annexe 2.

Liste des publications et communications de l'auteur de la thèse

A. Publications

1. Entelis N, **Brandina I**, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I. (2006) "A glycolytic enzyme, enolase, is a co-factor of RNA targeting towards yeast mitochondria" (*Genes & Development, sous presse*).
2. **Brandina I**, Graham J, Lemaitre-Guillier C, Entelis N, Krasheninnikov IA, Sweetlove L, Tarassov I, Martin R.P. (2006) "Enolase takes part in a macromolecular complex associated with mitochondria in yeast". *Soumis (BBA Bioenergetics)*.
3. **Brandina I**, Kolesnikova O, Smirnov A, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. New role of the ubiquitin-proteasome system - regulation of tRNA(Lys) import into yeast mitochondria. *Manuscrit en préparation*.
4. Mager-Heckel A-M, Entelis N, **Brandina I**, Kamenski P, Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. (2006) "The analysis of tRNA import into mammalian mitochondria". *Humana Press, Methods in Molecular Biology/Methods in Molecular Medicine (2005). Totowa, NJ 07512, USA, in Press*.
5. **Brandina I**, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. (2004) "Yeast enolase is a part of macromolecular complexes on the outer mitochondrial membrane". *Molecular and Cellular Proteomics*, 3 (supplement), p.324
6. **Brandina I**, Tarassov, I. (2003) "Importation d'ARN dans les mitochondries ». *Regard sur la Biochimie, v. 4, pp. 37-45*.
7. Entelis N, Kolesnikova O, Kazakova H, **Brandina I**, Kamenski P, Martin R P, Tarassov I. (2002) "Import of nuclear-encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications". *Genetic Engineering: Principles & Methods, Kluwer Academic/Plenum Publishers (U.S.A.), 24, pp.191-215*.
8. Kolesnikova O, Entelis N, Kazakova H, **Brandina I**, Martin R P, Tarassov I. (2002) "Targeting of tRNA into mitochondria: the role of anticodon nucleotides." *Mitochondrion, The official journal of the Mitochondria Research Society, 2, pp. 95-107*.

B. Communications et posters

1. Brandina I, Smirnov A, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I (2006) "Proteasome implication into the regulation of tRNA mitochondrial import in yeast" *Israel Science Foundation Workshop "Mitochondria: Function and Dysfunction", Ein*

Gedi, Israel.

2. **Brandina I**, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. (2005) “A glycolytic enzyme, enolase, participates in tRNA targeting into yeast mitochondria”. *4th Annual World Congress of Human Proteome Organisation, Munich, Germany.*
3. **Brandina I**, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. (2005) “tRNA import into yeast mitochondria as a new function of an old enzyme - enolase.” *21st tRNA Workshop, Bangalore, India.*
4. Smirnov A, **Brandina I**, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. (2005) “The role of some elements of ubiquitin-dependent protein degradation system in tRNA import into yeast mitochondria”. *International Undergraduate and Postgraduate Students Conference on Fundamental Science “Lomonosov”, Moscow, Russia.*
5. **Brandina I**, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. (2004) “Yeast enolase is a part of macromolecular complexes on the outer mitochondrial membrane”. *3rd World Annual Congress of Human Proteomic Organization “Proteomics: decoding the genome”, Beijing, China.*
6. **Brandina I**, Kolesnikova O, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. (2003) “Genetic tool for search of proteins targeting tRNA into yeast mitochondria”. *20th tRNA Workshop, Banz, Germany.*
7. **Brandina I**, Kolesnikova O, Entelis N, Krasheninnikov I, Martin RP, Tarassov I. (2003) “Screening for proteins targeting tRNA into yeast mitochondria”. *MITEURO plenary conference, Ivalo, Finland.*
8. **Brandina I**, Kolesnikova O, Entelis N, Krasheninnikov I, Tarassov I. (2002) “The search for protein factors of RNA import into yeast mitochondria using yeast two- and three-hybrides systems” *Conference on Fundamental Science “Lomonosov”, Moscow, Russia.*
9. **Brandina I**, Kolesnikova O, Entelis N, Krasheninnikov I, (2001) “Cytoplasmic tRNA, importing into yeast mitochondria, participate in mitochondrial translation”. *Conference on Fundamental Science “Lomonosov”, Moscow, Russia.*

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Adhya, S., Ghosh, T., Das, A., Bera, S.K. and Mahapatra, S. (1997) Role of an RNA-binding protein in import of tRNA into Leishmania mitochondria. *J Biol Chem*, **272**, 21396-21402.
- Akashi, K., Takenaka, M., Yamaoka, S., Suyama, Y., Fukuzawa, H. and Ohyama, K. (1998) Coexistence of nuclear DNA-encoded tRNA^{Val}(AAC) and mitochondrial DNA-encoded tRNA^{Val}(UAC) in mitochondria of a liverwort *Marchantia polymorpha*. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2168-2172.
- Altmann, K. and Westermann, B. (2005) Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **16**, 5410-5417.
- Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D. and Hochstrasser, M. (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *Embo J*, **16**, 4826-4838.
- Bergmeyer H.U., G.K.G.M.V., 2nd edn. Academic Press, New York. (1974) *Enzymes as Biochemical Reagents*. Academic Press, New York.
- Bhattacharyya, S.N. and Adhya, S. (2004) tRNA-triggered ATP hydrolysis and generation of membrane potential by the leishmania mitochondrial tRNA import complex. *J Biol Chem*, **279**, 11259-11263.
- Boguta, M., Hunter, L.A., Shen, W.C., Gillman, E.C., Martin, N.C. and Hopper, A.K. (1994) Subcellular locations of MOD5 proteins: mapping of sequences sufficient for targeting to mitochondria and demonstration that mitochondrial and nuclear isoforms commingle in the cytosol. *Mol Cell Biol*, **14**, 2298-2306.
- Brookes, P.S., Pinner, A., Ramachandran, A., Coward, L., Barnes, S., Kim, H. and Darley-Usmar, V.M. (2002) High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes. *Proteomics*, **2**, 969-977.
- Brubacher-Kauffmann, S., Marechal-Drouard, L., Cosset, A., Dietrich, A. and Duchene, A.M. (1999) Differential import of nuclear-encoded tRNA^{Gly} isoacceptors into solanum *Tuberosum* mitochondria. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2037-2042.
- Campbell, C.L., Tanaka, N., White, K.H. and Thorsness, P.E. (1994) Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol Biol Cell*, **5**, 899-905.
- Chang, D.D. and Clayton, D.A. (1987) A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science*, **235**, 1178-1184.
- Charriere, F., Tan, T.H. and Schneider, A. (2005) Mitochondrial initiation factor 2 of *Trypanosoma brucei* binds imported formylated elongator-type tRNA(Met). *J Biol Chem*, **280**, 15659-15665.
- Chen, D.H., Shi, X. and Suyama, Y. (1994) In vivo expression and mitochondrial import of normal and mutated tRNA^{thr} in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **64**, 121-133.
- Chiu, N., Chiu, A. and Suyama, Y. (1975) Native and imported transfer RNA in mitochondria. *J Mol Biol*, **99**, 37-50.
- Crausaz Esseiva, A., Marechal-Drouard, L., Cosset, A. and Schneider, A. (2004) The T-stem determines the cytosolic or mitochondrial localization of trypanosomal tRNAs^{Met}. *Mol Biol Cell*, **15**, 2750-2757.
- Crespo, J.L., Helliwell, S.B., Wiederkehr, C., Demougin, P., Fowler, B., Primig, M. and Hall, M.N. (2004) NPR1 kinase and RSP5-BUL1/2 ubiquitin ligase control GLN3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**, 37512-37517.
- Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Datta, S.R., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., Gygi, S.P. and Korsmeyer, S.J. (2003)

- BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, **424**, 952-956.
- Darley-Usmar, V.M., D. Rickwood, et al. (1987) *Mitochondria: a practical approach*. Oxford, Washington DC, IRL Press.
- de la Fuente, N., Maldonado, A.M. and Portillo, F. (1997) Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *FEBS Lett*, **411**, 308-312.
- Delage, L., Dietrich, A., Cosset, A. and Marechal-Drouard, L. (2003a) In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*. *Mol Cell Biol*, **23**, 4000-4012.
- Delage, L., Duchene, A.M., Zaepfel, M. and Marechal-Drouard, L. (2003b) The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA(Val) import into mitochondria. *Plant J*, **34**, 623-633.
- Dietrich, A., Marechal-Drouard, L., Carneiro, V., Cosset, A. and Small, I. (1996a) A single base change prevents import of cytosolic tRNA(Ala) into mitochondria in transgenic plants. *Plant J*, **10**, 913-918.
- Dietrich, A., Small, I., Cosset, A., Weil, J.H. and Marechal-Drouard, L. (1996b) Editing and import: strategies for providing plant mitochondria with a complete set of functional transfer RNAs. *Biochimie*, **78**, 518-529.
- Dietrich, A., Weil, J.H. and Marechal-Drouard, L. (1992) Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 115-131.
- Doersen, C.J., Guerrier-Takada, C., Altman, S. and Attardi, G. (1985) Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J Biol Chem*, **260**, 5942-5949.
- Dorner, M., Altmann, M., Paabo, S. and Morl, M. (2001) Evidence for Import of a Lysyl-tRNA into Marsupial Mitochondria. *Mol Biol Cell*, **12**, 2688-2698.
- Duchene, A.M. and Marechal-Drouard, L. (2001) The chloroplast-derived *trnW* and *trnM-e* genes are not expressed in *Arabidopsis* mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 1213-1216.
- Emter, R., Heese-Peck, A. and Kralli, A. (2002) ERG6 and PDR5 regulate small lipophilic drug accumulation in yeast cells via distinct mechanisms. *FEBS Lett*, **521**, 57-61.
- Entelis, N., Kolesnikova, O., Kazakova, H., Brandina, I., Kamenski, P., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2002) Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet Eng (N Y)*, **24**, 191-213.
- Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (1998) Structural requirements of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2838-2843.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2001a) 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem*, **276**, 45642-45653.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2001b) RNA delivery into mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev*, **49**, 199-215.
- Entelis, N.S., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (1996) Mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA (Lys): possible roles of aminoacylation and modified nucleosides in subcellular partitioning. *FEBS Lett*, **384**, 38-42.
- Entian, K.D., Meurer, B., Kohler, H., Mann, K.H. and Mecke, D. (1987) Studies on the regulation of enolases and compartmentation of cytosolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **923**, 214-221.

- Esseiva, A.C., Naguleswaran, A., Hemphill, A. and Schneider, A. (2004) Mitochondrial tRNA import in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, **279**, 42363-42368.
- Faloon, G.R. and Srere, P.A. (1969) *Escherichia coli* citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry*, **8**, 4497-4503.
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J. and Beach, D. (1994) Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1502-1503.
- Fisk, H.A. and Yaffe, M.P. (1997) Mutational analysis of Mdm1p function in nuclear and mitochondrial inheritance. *J Cell Biol*, **138**, 485-494.
- Fisk, H.A. and Yaffe, M.P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **145**, 1199-1208.
- Friant, S., Meier, K.D. and Riezman, H. (2003) Increased ubiquitin-dependent degradation can replace the essential requirement for heat shock protein induction. *Embo J*, **22**, 3783-3791.
- Fritz, S., Weinbach, N. and Westermann, B. (2003) Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell*, **14**, 2303-2313.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C. and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet*, **16**, 277-282.
- Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C. and Haguenaer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem*, **271**, 10946-10952.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Giege, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J. and Sweetlove, L.J. (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, **15**, 2140-2151.
- Giege, R., Puglisi, J.D. and Florentz, C. (1993) tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **45**, 129-206.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, **350**, 87-96.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999) Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep*, **26**, 21-28.
- Goswami, S., Chatterjee, S., Bhattacharyya, S.N., Basu, S. and Adhya, S. (2003) Allosteric regulation of tRNA import: interactions between tRNA domains at the inner membrane of *Leishmania* mitochondria. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5552-5559.
- Grandier-Vazeille, X., Bathany, K., Chaignepain, S., Camougrand, N., Manon, S. and Schmitter, J.M. (2001) Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry*, **40**, 9758-9769.

- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D.H. and Huber, R. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10976-10983.
- Guertin, D.A., Fink, G.R. (1991) *Guide to yeast genetics and molecular cell biology*. Academic press.
- Hancock, K. and Hajduk, S.L. (1990) The mitochondrial tRNAs of *Trypanosoma brucei* are nuclear encoded. *J Biol Chem*, **265**, 19208-19215.
- Hauser, R. and Schneider, A. (1995) tRNAs are imported into mitochondria of *Trypanosoma brucei* independently of their genomic context and genetic origin. *Embo J*, **14**, 4212-4220.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. and Wolf, D.H. (1993) PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chrymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, **268**, 5115-5120.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H. (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J*, **10**, 555-562.
- Hill, J., Donald, K.A. and Griffiths, D.E. (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5791.
- Hochstrasser, M., Ellison, M.J., Chau, V. and Varshavsky, A. (1991) The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4606-4610.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. and Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2563-2567.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, **270**, 17442-17456.
- Kaiser, C., Michaelis, S., Mitchell, A. (1994) *Methods in yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Kaminska, J., Kwapisz, M., Grabinska, K., Orłowski, J., Boguta, M., Palamarczyk, G. and Zoladek, T. (2005) Rsp5 ubiquitin ligase affects isoprenoid pathway and cell wall organization in *S. cerevisiae*. *Acta Biochim Pol*, **52**, 207-220.
- Kaneko, T., Suzuki, T., Kapushoc, S.T., Rubio, M.A., Ghazvini, J., Watanabe, K., Simpson, L. and Suzuki, T. (2003) Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in *Leishmania tarentolae*: implication for tRNA sorting mechanism. *Embo J*, **22**, 657-667.
- Kinner, A. and Kolling, R. (2003) The yeast deubiquitinating enzyme Ubp16 is anchored to the outer mitochondrial membrane. *FEBS Lett*, **549**, 135-140.
- Kiss, T. and Filipowicz, W. (1992) Evidence against a mitochondrial location of the 7-2/MRP RNA in mammalian cells. *Cell*, **70**, 11-16.
- Kleinschmidt, J.A., Escher, C. and Wolf, D.H. (1988) Proteinase yscE of yeast shows homology with the 20 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett*, **239**, 35-40.
- Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowers, Z.M., Lightowers, R.N., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA

- mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet*, **13**, 2519-2534.
- Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science*, **289**, 1931-1933.
- Kraemer, B., Zhang, B., SenGupta, D., Fields, S. and Wickens, M. (2000) Using the yeast three-hybrid system to detect and analyze RNA-protein interactions. *Methods Enzymol*, **328**, 297-321.
- Krause, J., Hay, R., Kowollik, C. and Brdiczka, D. (1986) Cross-linking analysis of yeast mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta*, **860**, 690-698.
- Laforest, M.J., Delage, L. and Marechal-Drouard, L. (2005) The T-domain of cytosolic tRNA^{Val}, an essential determinant for mitochondrial import. *FEBS Lett*, **579**, 1072-1078.
- Li, K., Smagula, C.S., Parsons, W.J., Richardson, J.A., Gonzalez, M., Hagler, H.K. and Williams, R.S. (1994) Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J Cell Biol*, **124**, 871-882.
- Lye, L.F., Chen, D.H. and Suyama, Y. (1993) Selective import of nuclear-encoded tRNAs into mitochondria of the protozoan *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol*, **58**, 233-245.
- Magalhaes, P.J., Andreu, A.L. and Schon, E.A. (1998) Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol Biol Cell*, **9**, 2375-2382.
- Mahapatra, S. and Adhya, S. (1996) Import of RNA into *Leishmania* mitochondria occurs through direct interaction with membrane-bound receptors. *J Biol Chem*, **271**, 20432-20437.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1998) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marechal-Drouard, L., Guillemaut, P., Cosset, A., Arbogast, M., Weber, F., Weil, J.H. and Dietrich, A. (1990) Transfer RNAs of potato (*Solanum tuberosum*) mitochondria have different genetic origins. *Nucleic Acids Res*, **18**, 3689-3696.
- Marechal-Drouard, L., Weil, J.H. and Guillemaut, P. (1988) Import of several tRNAs from the cytoplasm into the mitochondria in bean *Phaseolus vulgaris*. *Nucleic Acids Res*, **16**, 4777-4788.
- Martin, F., Michel, F., Zenklusen, D., Muller, B. and Schumperli, D. (2000) Positive and negative mutant selection in the human histone hairpin-binding protein using the yeast three-hybrid system. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1594-1603.
- Martin, R., Schneller, J.M., Stahl, A. and Dirheimer, G. (1979) Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry*, **18**, 4600-4605.
- Martin, R.P. and Dirheimer, G. (1983) [Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in the study of yeast mitochondrial transfer RNA]. *Mol Biol (Mosk)*, **17**, 1117-1125.
- Martin, R.P., Schneller, J.M., Stahl, A.J. and Dirheimer, G. (1977) Study of yeast mitochondrial tRNAs by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: characterization of isoaccepting species and search for imported cytoplasmic tRNAs. *Nucleic Acids Res*, **4**, 3497-3510.
- Martin, R.P., Sibler, A.P., Gehrke, C.W., Kuo, K., Edmonds, C.G., McCloskey, J.A. and Dirheimer, G. (1990) 5-[[[(carboxymethyl)amino]methyl]uridine is found in the anticodon of yeast mitochondrial tRNAs recognizing two-codon families ending in a purine. *Biochemistry*, **29**, 956-959.
- McAlister, L. and Holland, M.J. (1982) Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J Biol Chem*, **257**, 7181-7188.

- Mireau, H., Cosset, A., Marechal-Drouard, L., Fox, T.D., Small, I.D. and Dietrich, A. (2000) Expression of Arabidopsis thaliana mitochondrial alanyl-tRNA synthetase is not sufficient to trigger mitochondrial import of tRNA^{Ala} in yeast. *J Biol Chem*, **275**, 13291-13296.
- Modig, T., Liden, G. and Taherzadeh, M.J. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J*, **363**, 769-776.
- Neumann, S., Petfalski, E., Brugger, B., Grosshans, H., Wieland, F., Tollervey, D. and Hurt, E. (2003) Formation and nuclear export of tRNA, rRNA and mRNA is regulated by the ubiquitin ligase Rsp5p. *EMBO Rep*, **4**, 1156-1162.
- Ohlmeier, S., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K. and Bergmann, U. (2004) The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem*, **279**, 3956-3979.
- Pfanner, N., Douglas, M.G., Endo, T., Hoogenraad, N.J., Jensen, R.E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U.K. and Shore, G.C. (1996) Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem Sci*, **21**, 51-52.
- Pfanner, N. and Geissler, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 339-349.
- Phizicky, E.M. and Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, **59**, 94-123.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pickart, C.M. (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell*, **116**, 181-190.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., Hixson, K.K., Mottaz, H.M., Zischka, H., Ueffing, M., Herman, Z.S., Davis, R.W., Meitinger, T., Oefner, P.J., Smith, R.D. and Steinmetz, L.M. (2004) Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol*, **2**, e160.
- Puranam, R.S. and Attardi, G. (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol Cell Biol*, **21**, 548-561.
- Rabilloud, T., Heller, M., Rigobello, M.P., Bindoli, A., Aebersold, R. and Lunardi, J. (2001) The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress. *Proteomics*, **1**, 1105-1110.
- Rapaport, D., Taylor, R.D., Kaser, M., Langer, T., Neupert, W. and Nargang, F.E. (2001) Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria. *Mol Biol Cell*, **12**, 1189-1198.
- Rapaport, S., Dubiel, W. and Muller, M. (1985) Proteolysis of mitochondria in reticulocytes during maturation is ubiquitin-dependent and is accompanied by a high rate of ATP hydrolysis. *FEBS Lett*, **180**, 249-252.
- Reed, G.H., Poyner, R.R., Larsen, T.M., Wedekind, J.E. and Rayment, I. (1996) Structural and mechanistic studies of enolase. *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 736-743.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegge, C. and Jentsch, S. (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, **120**, 73-84.
- Rinaldi, T., Pick, E., Gambadoro, A., Zilli, S., Maytal-Kivity, V., Frontali, L. and Glickman, M.H. (2004) Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem J*, **381**, 275-285.

- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D. and Soll, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev*, **19**, 583-592.
- Rodriguez, M.S., Gwizdek, C., Haguenaer-Tsapis, R. and Dargemont, C. (2003) The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*, **4**, 566-575.
- Rossmann, W. and Karwan, R.M. (1998) Characterization of human mitochondrial RNase P: novel aspects in tRNA processing. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 234-241.
- Rotin, D., Staub, O. and Haguenaer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol*, **176**, 1-17.
- Salinas, T., Schaeffer, C., Marechal-Drouard, L. and Duchene, A.M. (2005) Sequence dependence of tRNA(Gly) import into tobacco mitochondria. *Biochimie*.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schagger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*, **217**, 220-230.
- Schneider, A. and Marechal-Drouard, L. (2000) Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol*, **10**, 509-513.
- Schneider, A., Martin, J. and Agabian, N. (1994) A nuclear encoded tRNA of *Trypanosoma brucei* is imported into mitochondria. *Mol Cell Biol*, **14**, 2317-2322.
- Schnell, J.D. and Hicke, L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem*, **278**, 35857-35860.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. and Wickens, M. (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8496-8501.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Small, I., Marechal-Drouard, L., Masson, J., Pelletier, G., Cosset, A., Weil, J.H. and Dietrich, A. (1992) In vivo import of a normal or mutagenized heterologous transfer RNA into the mitochondria of transgenic plants: towards novel ways of influencing mitochondrial gene expression? *Embo J*, **11**, 1291-1296.
- Smith, C.J., Ley, A.N., D'Obrenan, P. and Mitra, S.K. (1971) The structure and coding specificity of a lysine transfer ribonucleic acid from the haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* alpha S288C. *J Biol Chem*, **246**, 7817-7819.
- Sobel, S.G. and Wolin, S.L. (1999) Two yeast La motif-containing proteins are RNA-binding proteins that associate with polyribosomes. *Mol Biol Cell*, **10**, 3849-3862.
- Soidla, T.R. (1983) [Possible role of tRNA^{Lys} in the splicing of mitochondrial transcripts in yeasts]. *Mol Biol (Mosk)*, **17**, 1154-1161.
- Soidla, T.R. (1986) [Possible enzymatic role of imported tRNA^{Lys} during splicing of mitochondrial transcripts in yeasts]. *Mol Biol (Mosk)*, **20**, 1034-1038.
- Springael, J.Y. and Andre, B. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **9**, 1253-1263.

- Steinhilb, M.L., Turner, R.S. and Gaut, J.R. (2001) The protease inhibitor, MG132, blocks maturation of the amyloid precursor protein Swedish mutant preventing cleavage by beta-Secretase. *J Biol Chem*, **276**, 4476-4484.
- Suyama, Y. and Eyer, J. (1967) Leucyl tRNA and leucyl tRNA synthetase in mitochondria of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**, 746-751.
- Sweetlove, L.J., Heazlewood, J.L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D.A., Leaver, C.J. and Millar, A.H. (2002) The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *Plant J*, **32**, 891-904.
- Tan, T.H., Bochud-Allemann, N., Horn, E.K. and Schneider, A. (2002) Eukaryotic-type elongator tRNA^{Met} of *Trypanosoma brucei* becomes formylated after import into mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1152-1157.
- Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R.P. (1995a) An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J Mol Biol*, **245**, 315-323.
- Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R.P. (1995b) Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *Embo J*, **14**, 3461-3471.
- Tarassov, I.A. and Entelis, N.S. (1992) Mitochondrially-imported cytoplasmic tRNA(Lys)(CUU) of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo and in vitro targeting systems. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1277-1281.
- Varshavsky, A. (2005) Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*, **30**, 283-286.
- Varshavsky, A., Bachmair, A. and Finley, D. (1987) The N-end rule of selective protein turnover: mechanistic aspects and functional implications. *Biochem Soc Trans*, **15**, 815-816.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J. and Deshaies, R.J. (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell*, **11**, 3425-3439.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1065-1075.
- Wedekind, J.E., Poyner, R.R., Reed, G.H. and Rayment, I. (1994) Chelation of serine 39 to Mg²⁺ latches a gate at the active site of enolase: structure of the bis(Mg²⁺) complex of yeast enolase and the intermediate analog phosphonoacetohydroxamate at 2.1-Å resolution. *Biochemistry*, **33**, 9333-9342.
- Wu, R. and Racker, E. (1959) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. III. Limiting factors in glycolysis of ascites tumor cells. *J Biol Chem*, **234**, 1029-1035.
- Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K. and Watanabe, K. (1994) Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria. *FEBS Lett*, **338**, 137-142.
- Zhaung, Z.P. and McCauley, R. (1989) Ubiquitin is involved in the in vitro insertion of monoamine oxidase B into mitochondrial outer membranes. *J Biol Chem*, **264**, 14594-14596.
- Zhuang, Z.P., Marks, B. and McCauley, R.B. (1992) The insertion of monoamine oxidase A into the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, **267**, 591-596.
- Zischka, H., Weber, G., Weber, P.J., Posch, A., Braun, R.J., Buhringer, D., Schneider, U., Nissum, M., Meitinger, T., Ueffing, M. and Eckerskorn, C. (2003) Improved proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis. *Proteomics*, **3**, 906-916.

- Zoladek, T., Tobiasz, A., Vaduva, G., Boguta, M., Martin, N.C. and Hopper, A.K. (1997) MDP1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in mitochondrial/cytoplasmic protein distribution, is identical to the ubiquitin-protein ligase gene RSP5. *Genetics*, **145**, 595-603.
- Zoladek, T., Vaduva, G., Hunter, L.A., Boguta, M., Go, B.D., Martin, N.C. and Hopper, A.K. (1995) Mutations altering the mitochondrial-cytoplasmic distribution of Mod5p implicate the actin cytoskeleton and mRNA 3' ends and/or protein synthesis in mitochondrial delivery. *Mol Cell Biol*, **15**, 6884-6894.