

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ &
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
SLC25A46 ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ



ΠΠΟΚΡΑΤΗΣ Γ. ΛΥΓΙΖΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ &
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
SLC25A46 ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ



ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ Γ. ΛΥΓΙΖΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ &
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
SLC25A46 ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ Γ. ΛΥΓΙΖΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Ελένη Ντούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων)
- Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας (Μέλος)
- Βασιλική Κουμάντου, Λέκτορας Γ.Π.Α., Τμήμα Βιοτεχνολογίας (Μέλος)

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη, εκπονήθηκε στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Δρ Ελένης Ντούνη, και αποτέλεσε το επιστέγασμα στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου σταδιοδρομίας. Κλείνοντας λοιπόν αυτόν τον κύκλο σπουδών, θεωρώ σκόπιμο να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Ντούνη Ελένη αφενός μεν, για την αμέριστη στήριξη και εμπιστοσύνη που επέδειξε από την πρώτη στιγμή στο πρόσωπό μου αφετέρου δε για την αδιάκοπη καθοδήγησή της με την παροχή χρήσιμων συμβουλών καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής και Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κύριο Ηλία Ηλιόπουλο και την Λέκτορα κυρία Βασιλική Κουμάντου, για την αξιολόγηση της διατριβής μου και τις συμβουλές τους που ήταν πάντοτε χρήσιμες. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τόσο την Δρ Μαρτίνα Σαμιωτάκη όσο και τον Δρ Γιώργο Παναγιώτου της Μονάδας Πρωτομικής του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» για την σημαντική συνεισφορά τους στην πρωτομική ανάλυση. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω, Διδάκτορα Ρηνώτα Βαγγέλη, όσο και την υποψήφια Διδάκτορα Βιολιτζί Φωτεινή για την υπομονή τους, τις εποικοδομητικές τους συμβουλές καθώς και την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχαν από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριο. Ακόμα, δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, ανεξαιρέτως, για τη βοήθειά τους και για το κλίμα συναδελφικότητας που επικρατεί στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την τεράστια υπομονή και την πολύπλευρη ηθική και ψυχολογική στήριξη που μου έδινε σε κάθε βήμα αυτής της μακροχρόνιας διάρκειας των σπουδών μου. Χωρίς την συμπαράστασή τους, θα ήταν δύσκολη η πραγματοποίηση αυτής της πτυχιακής μελέτης.

*Στην οικογένειά μου ως ελάχιστη ένδειξη
ευγνωμοσύνης για όσα μου έχουν προσφέρει όλα
αυτά τα χρόνια*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ	11
1.1.1 Προέλευση μιτοχονδρίων	11
1.1.2 Δομή μιτοχονδρίων.....	13
1.1.3 Λειτουργία μιτοχονδρίων	15
1.1.4 Μιτοχονδριακή δυναμική, Σύντηξη και Σχάση.....	16
1.1.4.1 Μιτοχονδριακή σύντηξη	17
1.1.4.2 Μιτοχονδριακή σχάση	20
1.1.5 Παραγωγή ενέργειας και αερόβια αναπνοή	22
1.1.6 Σύμπλοκο MICOS	29
1.1.7 Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μεταφορείς.....	32
1.1.8 Οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25.....	33
1.1.8.1 Δομή των μελών της SLC25 οικογένειας.....	34
1.1.8.2 Λειτουργικά χαρακτηριστικά των μελών της SLC25 οικογένειας	36
1.1.8.3 Εξελικτική πορεία της οικογένειας SLC25.....	39
1.1.8.4 Ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακούς μεταφορείς της οικογένειας SLC25	40
1.2 Το γονίδιο Slc25a46.....	42
1.3 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης SLC25A46.....	42
1.4 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και η πρωτεΐνη SLC25A46	43

1.5 SLC25A46 επαγόμενες παθολογίες στον άνθρωπο	43
1.6 Ανακάλυψη μιας νέας μετάλλαξης στο <i>Slc25a46</i> γονίδιο που προκαλεί αταξία στο ποντίκι μέσω Πρόσθιας Γενετικής	44
1.7 Εύρεση της μετάλλαξης στο γονίδιο <i>Slc25a46</i> και γενετική επιβεβαίωση.....	46
1.8 Πρωτεομική ανάλυση.....	48
1.8.1 Διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label Free Quantification, LFQ).....	50
1.8.2 Πρωτεομική ανάλυση ως εργαλείο για τη μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών	51
1.9 Σκοπός της παρούσας διατριβής	54
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
2.1 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ	55
2.1.1 Παραλαβή ιστών από ποντίκια για την απομόνωση γενωμικού DNA.....	55
2.1.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών	55
2.1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	57
2.1.4 Αντίδραση PCR για γονοτύπηση TgSLC25A46 διαγονιδιακών ποντικών	58
2.1.5 Αντίδραση PCR για γονοτύπηση SLC25A46 ^{atc/atc} ποντικών.....	60
2.1.6 Πέψη προϊόντων PCR με ενδονουκλεάση περιορισμού για γονοτύπηση SLC25A46 ^{atc/atc} ποντικών	62
2.1.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	63
2.1.8 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2% (w/v)	64
2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	66
2.2.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης	66
2.2.2 Υποκυτταρική κλασμάτωση (subcellular fractionation)	67
2.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford .	68
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου.....	69

2.2.5 Μεταφορά (transfer) και Ανοσοαποτύπωμα Western	73
2.3 Διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label free quantification, LFQ).....	77
2.4 Ανάλυση DAVID και λογισμικό Enrichr.....	80
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
3.1 Γονοτυπική ανάλυση αταξικών ποντικών.....	81
3.2 Γονοτυπική ανάλυση TgSLC25A46 διαγονιδιακών ποντικών.....	85
3.3 Πρωτεομική ανάλυση στο <i>Slc25a46^{atc/atc}</i> μοντέλο.....	86
3.3.1 Πρωτεομική ανάλυση σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών	87
3.3.2 Επίδραση της SLC25A46 στο πρωτεϊνικό προφίλ συμπλόκων οργάνωσης των μιτοχονδρίων	90
3.3.3 Επίδραση της SLC25A46 στα ενζυμικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας	94
3.3.4 Συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης DAVID	100
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	104
4.1 Ο ρόλος της πρωτεΐνης SLC25A46 στη μιτοχονδριακή δυναμική.....	105
4.1.1 SLC25A46 και μιτοχονδριακή σύντηξη	105
4.1.2 SLC25A46, μιτοχονδριακή σχάση και αλληλεπίδραση με το ενδοπλασματικό δίκτυο.....	107
4.3 Ο ρόλος της πρωτεΐνης SLC25A46 στην μιτοχονδριακή λειτουργία και κυτταρική αναπνοή	110
4.4 Μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών.....	113
4.5 Μελλοντικοί στόχοι.....	114
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια ένα πλήθος επιστημονικών μελετών έχουν αναδείξει το γονίδιο *SLC25A46* ως ένα νέο παθογενετικό στόχο σε ετερογενείς γενετικές ασθένειες του ανθρώπου που προσβάλλουν το νευρικό σύστημα και περιλαμβάνουν επικρατή οπτική ατροφία, αξονική περιφερική νευροπάθεια, σύνδρομο Leigh, προοδευτική μυοκλωνική αταξία, οπτική ατροφία και νευροπάθεια, και θνησιγόνο συγγενή γεφυροπαρεγκεφαλιδική υποπλασία. Η σοβαρότητα των παραπάνω ασθενειών εξαρτάται από την μερική ή πλήρη απώλεια της λειτουργικότητας της *SLC25A46* πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη *SLC25A46* εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται σε καίριες κυτταρικές διεργασίες, όπως στη διατήρηση της δομής και δυναμικής των μιτοχονδρίων, στην μιτοχονδριακή ενεργότητα, στον μεταβολισμό του κυττάρου, και τη βιοσύνθεση/μεταφορά φωσφολιπιδίων μέσω αλληλεπίδρασης του ενδοπλασματικού δικτύου με τα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, ο παθοφυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης *SLC25A46* παραμένει ασαφής δυσχεραίνοντας την κατανόηση των εμπλεκόμενων παθογενετικών μηχανισμών. Η ερευνητική μας ομάδα δημιούργησε πρόσφατα, μέσω της προσέγγισης της Πρόσθιας Γενετικής χρησιμοποιώντας τυχαία χημική μεταλλαξιγένεση στο ποντίκι, ένα γενετικό μοντέλο *SLC25A46*-σχετιζόμενης αταξίας, που συνεισφέρει στην κατανόηση του παθοφυσιολογικού ρόλου της *SLC25A46* πρωτεΐνης και των μοριακών μηχανισμών που επάγονται κατά την απουσία της.

Προκειμένου να κατανοήσουμε ποιες κυτταρικές διεργασίες απορρυθμίζονται από την απουσία της *SLC25A46* πρωτεΐνης *in vivo*, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήσαμε συγκριτική πρωτεομική ανάλυση σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών, καθώς ο εν λόγω ιστός έχειδειχθεί ότι επηρεάζεται δραματικά από την απουσία της *SLC25A46* πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως η απουσία της *SLC25A46* πρωτεΐνης αυξάνει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις διαδικασίες της μιτοχονδριακής σύντηξης, ενώ παράλληλα μειώνει αρκετά μέλη των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, υποδηλώνοντας ανεπάρκεια στην κυτταρική αναπνοή και στην παραγωγή ενέργειας. Η περαιτέρω μελέτη των διεργασιών αυτών στο αταξικό μοντέλο δύναται μελλοντικά να

συμβάλλει στην κατανόηση των πολύπλοκων μοριακών παθογενετικών μηχανισμών που αποτελούν τη βάση των SLC25A46-σχετιζόμενων νευρολογικών ασθενειών και συνεπώς στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Λέξεις κλειδιά: Γονίδιο *SLC25A46*, νευρικό σύστημα, οπτική ατροφία, αταξία, πρωτεΐνη SLC25A46, πρωτεομική ανάλυση

ABSTRACT

In recent years, a number of studies have demonstrated the *SLC25A46* gene as a new pathogenic target in heterogeneous human diseases of the nervous system, including dominant optic atrophy, peripheral neuropathy, Leigh syndrome, progressive myoclonic ataxia, optic atrophy and neuropathy, and lethal congenital pontocerebellar hypoplasia. The severity of the above diseases depends on the partial or complete loss of the functionality of the SLC25A46 protein. The SLC25A46 protein is located in the outer mitochondrial membrane and there is evidence that it is involved in fundamental cellular processes, such as mitochondrial dynamics and activity, cell metabolism, and biosynthesis/transfer of phospholipids through the interaction of the endoplasmic reticulum with the mitochondria. However, the pathophysiological role of the SLC25A46 protein remains unclear, making it difficult to understand the pathogenetic mechanisms involved. Our research group has recently generated, following a Forward Genetics approach using random chemical mutagenesis in the mouse, a genetic model of SLC25A46-related ataxia, that contributes to the understanding of the pathophysiological role of the SLC25A46 protein and the molecular mechanisms induced in its absence.

In order to better understand which cellular processes are deregulated upon the absence of the SLC25A46 protein *in vivo*, in the present study we performed a comparative proteomic analysis on total protein extracts from cerebellum between wild-type and ataxic mice, as this tissue is dramatically affected upon SLC25A46 loss. Our results showed that the absence of the SLC25A46 protein significantly increases mitochondrial protein levels involved in mitochondrial fusion, while it decreases the levels of several members involved in the respiratory chain complexes, suggesting a deficiency in cellular respiration and energy production. Further studies of these processes in the ataxic model may contribute to the understanding of the complex molecular pathogenetic mechanisms that constitute the basis of the SLC25A46-related neuropathologies and consequently to the development of innovative therapeutic approaches.

Keywords: *SLC25A46* gene, nervous system, optic atrophy, ataxia, SLC25A46 protein, proteomic analysis

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

1.1.1 Προέλευση μιτοχονδρίων

Όπως είναι γνωστό η πλειοψηφία των γονιδίων ενός ευκαρυωτικού κυττάρου απαντώνται στον πυρήνα και ένα μικρό ποσοστό μόνο εντοπίζεται σε άλλα κυτταρικά οργανίδια όπως ο χλωροπλάστης και το μιτοχόνδριο. Η πιθανότητα ορισμένα γονίδια να εντοπίζονται εκτός του πυρήνα – εξωχρωμοσωμικά γονίδια (extrachromosomal genes) όπως αρχικά ονομάστηκαν – πρωτοδιατυπώθηκε τη δεκαετία του 1950, ως ένα μέσο για την ερμηνεία ασυνήθιστων προτύπων κληρονομικότητας ορισμένων γονιδίων του μύκητα *Neurospora crassa*, της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και του φωτοσυνθετικού φύκου *Chlamydomonas reinhardtii*. Περίπου την ίδια περίοδο, η εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και οι βιοχημικές μελέτες προσέφεραν ενδείξεις ότι μόρια DNA θα μπορούσαν να βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Τελικά στις αρχές της δεκαετίας του 1960, αυτές οι ποικίλες πηγές ενδείξεων συνδυάστηκαν και η ύπαρξη μιτοχονδριακών και χλωροπλαστικών γονιδιωμάτων, ανεξάρτητων και διακριτών από το ευκαρυωτικό πυρηνικό γονιδίωμα, έγινε αποδεκτή (Schwartz, 2007).

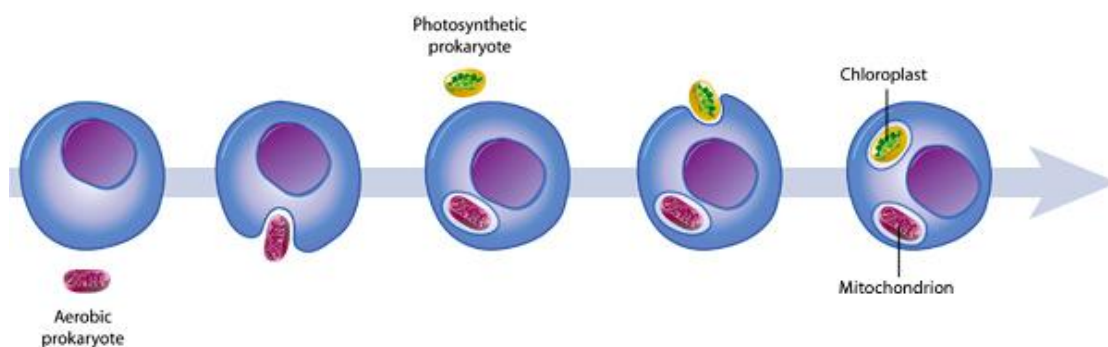
Σήμερα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν τη θεωρία ότι το ευκαρυωτικό κύτταρο εξελίχθηκε σταδιακά μέσω της μόνιμης ενσωμάτωσης χημειοοργανοτροφικών και φωτοτροφικών συμβιοτών από το «χώρο» των βακτηρίων. Η θεωρία αυτή της ευκαρυωτικής εξέλιξης που ονομάζεται **ενδοσυμβιωτική θεωρία** υποστηρίζει ότι ένα αερόβιο βακτήριο παγίωσε τη θέση του στο κυτταρόπλασμα κάποιου πρωτόγονου ευκαρυώτη και τον προμήθευε με ενέργεια, διασφαλίζοντας ως αντάλλαγμα ένα προστατευμένο περιβάλλον και την απρόσκοπτη παροχή θρεπτικών συστατικών (Εικόνα 1.1). Αυτός ο συμβιώτης ήταν ο πρόδρομος του σημερινού μιτοχονδρίου.

Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι πολλές διεργασίες έκφρασης γονιδίων που συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες διεργασίες των βακτηρίων. Επιπλέον, στα πλαίσια μιας συγκριτικής ανάλυσης διαπιστώθηκε πως σε επίπεδο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, τα γονίδια των μιτοχονδρίων, μοιάζουν περισσότερο με τα γονίδια των βακτηρίων παρά με τα γονίδια του ευκαρυωτικού

πυρήνα. Το γεγονός αυτό οδήγησε πολλούς επιστήμονες να διαμορφώσουν την αντίληψη ότι τα ομοιάζοντα γονίδια μεταφέρθηκαν στον πυρήνα από βακτηριακούς συμβιώτες κατά τη διαδικασία εξέλιξης των σύγχρονων οργανιδίων (Gray, 2015).

Συνοπτικά, η προκαρυωτική-βακτηριακή προέλευση των μιτοχονδρίων που υποστηρίζεται από τη ανωτέρω θεωρία, βασίζεται στα ακόλουθα αδιάσειστα στοιχεία:

- Τόσο οι χλωροπλάστες όσο και τα μιτοχόνδρια περιέχουν ριβοσώματα και μάλιστα προκαρυωτικής φύσεως, μεγέθους 70S. Ακόμη ορισμένα ριβοσώματα αυτών των οργανιδίων διαθέτουν αλληλουχίες RNA που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα βακτήρια και η λειτουργία τους παρεμποδίζεται από τα ίδια αντιβιοτικά που επιδρούν στα ριβοσώματα αυτόνομων βακτηρίων (π.χ στρεπτομυκίνη).
- Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες περιέχουν επιπλέον, μικρές ποσότητες κυκλικού DNA, χαρακτηριστικού των προκαρυωτών.
- Φυλογενετικές μελέτες που έγιναν με τη χρήση μεθόδων συγκριτικής ανάλυσης της αλληλουχίας των βάσεων του ριβοσωμικού RNA έδειξαν με πειστικό τρόπο ότι τόσο οι χλωροπλάστες όσο και τα μιτοχόνδρια συγγενεύουν στενά με τα βακτήρια. Αυτές οι μέθοδοι υποδεικνύουν σαφώς ότι το σύγχρονο ευκαρυωτικό κύτταρο προέκυψε από το συνδυασμό δυο οργανισμών, μέσω της διαδικασίας της ενδοσυμβίωσης.



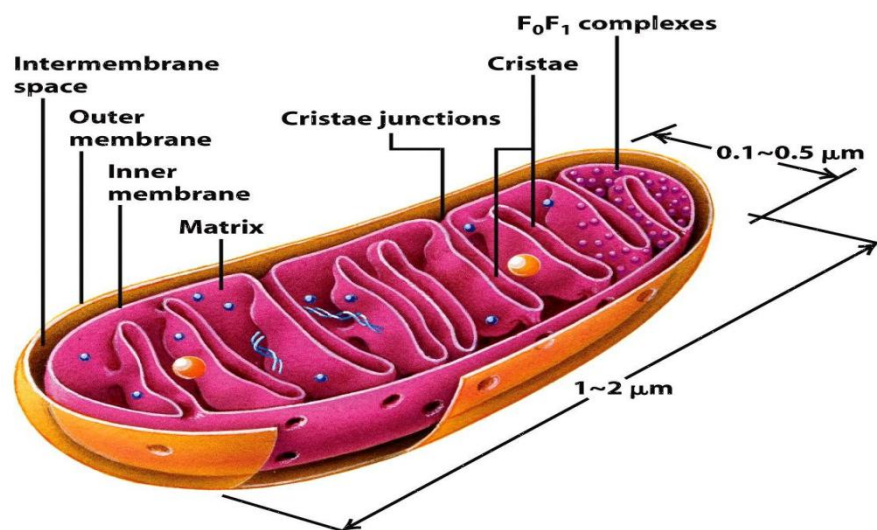
Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της θεωρίας της ενδοσυμβίωσης. (Πηγή: <https://explorebiochemistryworld.wordpress.com/2013/02/03/the-endosymbiotic-theory/>)

1.1.2 Δομή μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια έχουν μέγεθος προκαρυωτικού μικροοργανισμού και σχήμα ράβδου ή περίπου σφαιρικό. Ένα τυπικό ζωικό κύτταρο μπορεί να περιέχει πάνω από 1000 μιτοχόνδρια αλλά ο αριθμός τους ανά κύτταρο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το είδος και το μέγεθος του κυττάρου. Μάλιστα, ο αριθμός των μιτοχονδρίων έχει βρεθεί ότι ποικίλλει εντυπωσιακά σε κύτταρα διαφορετικού είδους και δύναται να αλλάξει ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου (Frey, Renken, & Perkins, 2002). Για παράδειγμα, στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα ο αριθμός των μιτοχονδρίων μπορεί να αυξηθεί κατά 5-10 φορές λόγω της αύξησης και διαίρεσης των μιτοχονδρίων που συμβαίνει αν ο μυς διεγερθεί επαναληπτικά σε συστολή (Kühlbrandt, 2015).

Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική (outer) και την εσωτερική (inner) που χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση και διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες του (Szymański et al., 2017; Aversa, Petrescu, Apicella, & Petrescu, 2016). Η εξωτερική και η εσωτερική μεμβράνη ορίζουν δύο μιτοχονδριακά διαμερίσματα: ένα μεγάλο εσωτερικό χώρο γνωστό ως μήτρα (matrix) και ένα πολύ στενότερο, που καλείται διαμεμβρανικό χώρος (intermembrane space) (Εικόνα 1.2). Επίσης, αμφότερες οι δύο μεμβράνες έχουν δομή παραπλήσια με τη αυτή άλλων στοιχειωδών μεμβρανών: μια διπλοστιβάδα λιπιδίων με ενσωματωμένες πρωτεΐνες.

Αναλυτικότερα, η εξωτερική μεμβράνη (outer membrane) αποτελείται κατά 30-40% από λιπίδια και κατά 60-70% από πρωτεΐνες, με σχετικά λίγες ενζυμικές και μεταφορικές πρωτεΐνες. Είναι πλούσια στη διαμεμβρανική πρωτεΐνη πορίνη (ή VDAC-κανάλι ανιόντων εξαρτώμενο από τη διαφορά δυναμικού), η οποία απαρτίζεται από β-πτυχωτές δομές που σχηματίζουν ένα κανάλι, μέσω του οποίου επιτρέπεται η διέλευση μορίων έως 10 kDa. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη χημική εξίσωση του διαμεμβρανικού χώρου με το κυτταρόπλασμα, όσον αφορά τα μόρια που περιέχει. Επίσης, η μονοαμινοξειδάση και η υδροξυλάση κυνουρενίνης, ένζυμα ιδιαίτερης σημασίας, για την απομάκρυνση των νευροδιαβιβαστών στο νευρικό ιστό, εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης (Kühlbrandt, 2015).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου. Είναι εμφανείς τόσο η εξωτερική (outer) όσο και η εσωτερική (inner) μιτοχονδριακή μεμβράνη καθώς και οι εγκολπώσεις αυτής (cristae junctions). Επίσης, παρουσιάζεται και η μήτρα του μιτοχονδρίου (matrix) καθώς και οι διαστάσεις του. (Πηγή: <https://biochemist01.wordpress.com/category/etc/>)

Από την άλλη πλευρά, η εσωτερική μεμβράνη, αποτελείται κατά 80% από πρωτεΐνες και είναι πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ περιέχει καρδιολιπίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ακόμα, η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη υποδιαιρείται σε δυο περιοχές: την εσωτερική οριακή μεμβράνη (IBM - inner boundary membrane) που βρίσκεται σε πολύ κοντική απόσταση με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και τις αναδιπλώσεις (cristae) που προβάλλουν προς την μήτρα του μιτοχονδρίου και περιλαμβάνουν τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Rabl et al., 2009). Επιπρόσθετα, η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από ιόντα και τα περισσότερα μικρά μόρια σε όλη την έκταση της, εκτός από περιοχές όπου εδράζονται κατάλληλοι διάυλοι που σχηματίζονται από τις μεταφορικές πρωτεΐνες της μεμβράνης. Επομένως, η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει αποκλειστικά μόρια που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Για το λόγο αυτό το περιεχόμενο του μιτοχονδρίου χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση (Kühlbrandt, 2015).

Τα ενζυμικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη όπως και

ποικίλες αφυδρογονάσεις, καθώς και συστήματα μεταφοράς που εμπλέκονται στη μεταφορά υποστρωμάτων, ενδιάμεσων και μεταβολιτών και νουκλεοτιδίων ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τη μήτρα. Στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη λαμβάνει χώρα η μεταφορά των ηλεκτρονίων και η άντληση των πρωτονίων, ενώ παράλληλα εκεί εντοπίζεται η συνθήση του ATP. Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σχηματίζει μια σειρά πτυχωμένων εσωτερικών μεμβρανών, τα cristae, που προβάλλουν στην μιτοχονδριακή μήτρα και αυξάνουν πολύ σημαντικά τη συνολική επιφάνεια της μεμβράνης. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η διαθέσιμη επιφάνεια επί της οποίας δύναται να πραγματοποιηθεί η παραγωγή ATP. Μάλιστα αυξημένες ανάγκες σε ATP συνδυάζονται πολύ συχνά με αυξημένο αριθμό cristae στα αντίστοιχα μιτοχόνδρια (Kühlbrandt, 2015).

Στη μήτρα εμπεριέχεται ένας πολύ μεγάλος αριθμός ενζύμων στα οποία περιλαμβάνονται τα ένζυμα που απαιτούνται για την οξείδωση του πυροσταφυλικού και των λιπαρών οξέων καθώς και τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος, με εξαίρεση την ηλεκτρική αφυδρογονάση που είναι δεσμευμένη στην εσωτερική μεμβράνη. Επιπλέον, στη μήτρα εντοπίζονται το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), ριβοσώματα και πρωτεΐνες απαραίτητες για τη μεταγραφή του mtDNA και τη μετάφραση του mRNA.

1.1.3 Λειτουργία μιτοχονδρίων

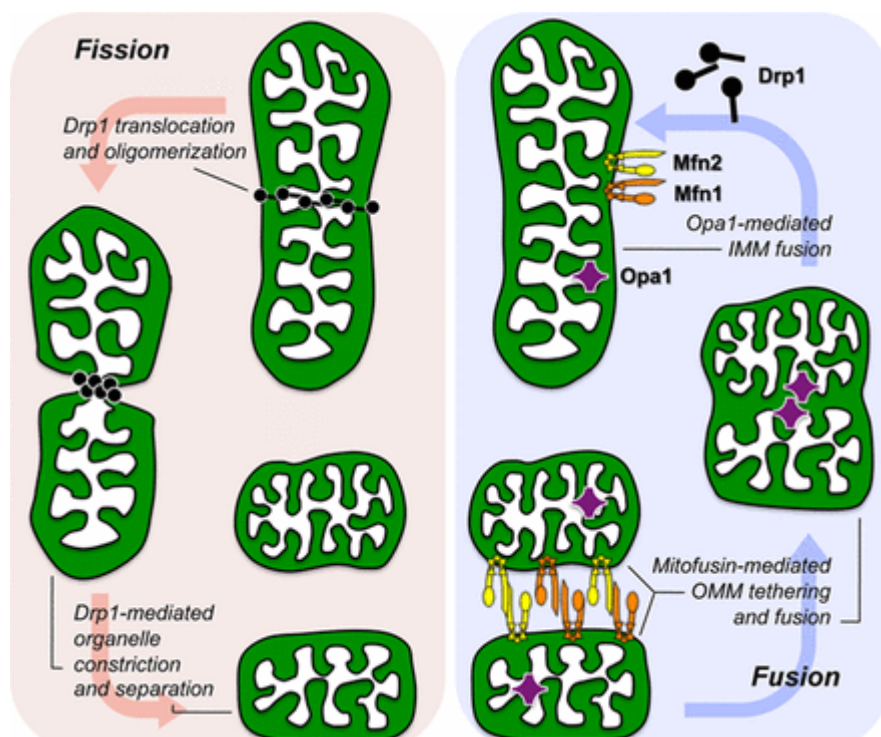
Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν σε πληθώρα εξαιρετικά σημαντικών διεργασιών για την εύρυθμη και ομαλή λειτουργία του κυττάρου ενώ αποτελούν πρωτίστως εργοστάσια παραγωγής χημικής ενέργειας για την κάλυψη των αναγκών του κυττάρου. Συγκεκριμένα, αξιοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται από την οξείδωση μορίων της τροφής, όπως σάκχαρα, προκειμένου να παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που αποτελεί το βασικό χημικό καύσιμο για τη διεξαγωγή των κυτταρικών διεργασιών (π.χ κυτταρική διαίρεση, αντιγραφή DNA, σύνθεση, αναδίπλωση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών, διατήρηση μεμβρανικού δυναμικού κ.α). Επειδή κατά τη διάρκεια της σχετικής δραστηριότητας το μιτοχόνδριο καταναλώνει οξυγόνο και απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα, όλη η διεργασία αποκαλείται κυτταρική αναπνοή (cellular respiration) κατ'αναλογία με την αναπνοή.

Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια εκτός από την εξαιρετική τους συνεισφορά μέσω της

παραγωγής ενέργειας συμμετέχουν παράλληλα και σε άλλες διαδικασίες, όπως η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), η σύνθεση λιπιδίων, αίμης, θειοσιδηροπρωτεϊνών, λιπαρών οξέων, χοληστερόλης, στεροειδών ορμονών και άλλων μορίων, ενώ παράλληλα συμμετέχουν στην αποικοδόμηση βιομορίων μέσω διεργασιών, όπως η οξείδωση λιπαρών οξέων, και ο κύκλος του Krebs. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην θερμογένεση, την ομοιόσταση ασβεστίου, στην έμφυτη ανοσία και στην απόπτωση. Επίσης, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα μιτοχόνδρια χαρακτηρίζονται ως κύριοι ρυθμιστές σηματοδότησης κινδύνου καθώς έχουν τη δυνατότητα να εκπέμπουν σήματα που λειτουργούν προειδοποιητικά για το κύτταρο ή και ολόκληρο τον οργανισμό, έναντι διαταραχών της ομοιόστασης, προωθώντας έτσι την επαγωγή ενδογενών κυτταρικών ή συστημικών προσαρμοστικών αποκρίσεων (Galluzzi, Kepp, & Kroemer, 2012). Καταληκτικά λοιπόν, όλα τα ανωτέρω καταδεικνύουν την εξαιρετική σημασία των μιτοχονδρίων, σε όλες σχεδόν τις πτυχές του ευκαρυωτικού κυττάρου.

1.1.4 Μιτοχονδριακή δυναμική, Σύντηξη και Σχάση

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν εξαιρετικά δυναμικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων, έχοντας την ικανότητα να αλλάζουν το μέγεθος, το σχήμα και τη θέση τους ριζικώς ή μερικώς σε πολύ σύντομα χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου και τα ερεθίσματα που δέχονται. Πολλές από αυτές τις αλλαγές είναι στενά συσχετιζόμενες με την ικανότητά τους να υφίστανται είτε συντονισμένη σχάση (fission) δηλαδή τη διαίρεση ενός μιτοχονδρίου σε δύο ή περισσότερα) είτε σύντηξη (fusion) όπου ενοποιούνται δύο ή περισσότερα μιτοχόνδρια σε ένα. Αυτές οι διαδικασίες είναι συμπληρωματικές και δύναται να συμβαίνουν ταυτόχρονα και αδιάκοπα σε πληθώρα κυτταρικών τύπων, και η μεταξύ τους ισορροπία καθορίζει τη συνολική μορφολογία των μιτοχονδρίων κάθε κυττάρου. Τόσο η σχάση όσο και η σύντηξη, ως ενεργητικές διεργασίες απαιτούν πολλές εξειδικευμένες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων που εκ φύσεως μεταβάλλουν τις μιτοχονδριακές μεμβράνες καθώς και πρωτεϊνών (πρωτεΐνες προσαρμογείς) που ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση αυτών των πρωτεϊνών με διάφορα οργανίδια (Εικόνα 1.3). Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητό, οι μεταβολές στη μιτοχονδριακή μορφολογία φαίνονται να εμπλέκονται σε διάφορες δραστηριότητες που είναι κρίσιμες για την λειτουργία των κυττάρων.



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού της μιτοχονδριακής σύντηξης (fusion) και σχάσης (fission) (Dorn & Kitsis, 2015).

1.1.4.1 Μιτοχονδριακή σύντηξη

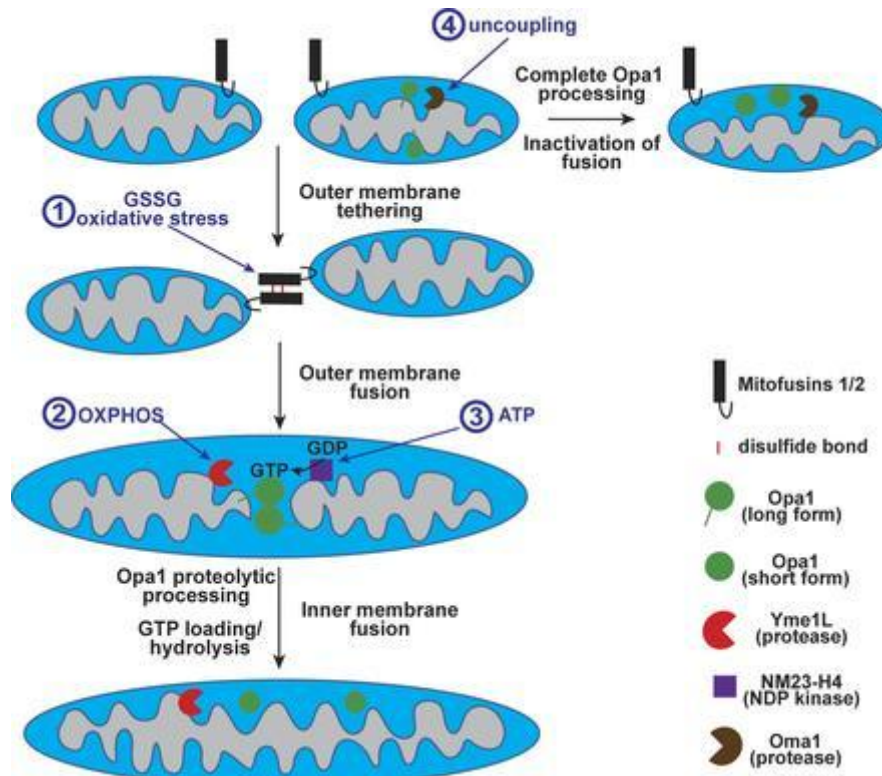
Είναι μια συντηρημένη εξελικτικά διαδικασία, που στα θηλαστικά πραγματοποιείται μέσω τριών μεγάλων GTPασών της υπεροικογένειας των δυναμινών (dynamin superfamily): Mitofusin 1 (MFN1), Mitofusin 2 (MFN2) και Optic Atrophy 1 (OPA1) (Chan et al., 2012; Labbi et al., 2014). Επειδή τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από δύο μεμβράνες, η διαδικασία της σύντηξης πραγματοποιείται σε δύο στάδια, καθώς απαιτείται αρχικά η σύντηξη των εξωτερικών μεμβρανών και εν συνεχεία η σύντηξη των εσωτερικών (Εικόνα 1.4). Ο ρυθμός και η συχνότητα με την οποία πραγματοποιείται η διαδικασία της μιτοχονδριακής σύντηξης ενδέχεται να διαφέρει σημαντικά καθώς εξαρτάται από πληθώρα ετερόκλιτων παραμέτρων, όπως το είδος του ιστού κ.α. Επίσης, επειδή η ισορροπία σύντηξης-σχάσης ελέγχει και καθορίζει τη μορφολογία των μιτοχονδρίων, γενετική διαγραφή των γονιδίων σύντηξης οδηγεί στον κατακερματισμό του μιτοχονδριακού δικτύου (Chen & Chan, 2005a; Chen & Chan, 2005; Hermann et al., 1998). Στους ανθρώπους μεταλλάξεις στο γονίδιο Mfn2 προκαλούν την ασθένεια Charcot-Marie-Tooth τύπου 2A, μια περιφερικού τύπου νευροπάθεια που επηρεάζει τους κινητικούς και αισθητικούς

νευρώνες (Züchner et al., 2004). Μεταλλάξεις στο γονίδιο *Opa1* προκαλούν κυρίαρχη οπτική ατροφία, μια μορφή τύφλωσης που προκαλείται από εκφυλισμό των γαγγλιοκυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Olichon et al., 2007). Οι πρωτεΐνες MFN1 και MFN2 είναι συντηρημένες GTPάσες εντοπισμένες στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Baselga et al., 2002; Chen, et al., 2003; Santel et al., 2001). Ο ιδιαίτερα σημαντικός τους ρόλος έχειδειχθεί μέσω πειραμάτων στοχευμένων μεταλλαγών σε ποντίκια (Chen et al., 2003). Σε κύτταρα, στα οποία υπάρχει απώλεια μιας εκ των δύο πρωτεϊνών, παρατηρείται μειωμένη μιτοχονδριακή σύντηξη. Μάλιστα, στα μεταλλαγμένα κύτταρα η ανισορροπία σύντηξης-σχάσης δημιουργεί κατακερματισμένα μιτοχόνδρια. Απουσία τόσο της πρωτεΐνης MFN1 όσο και της πρωτεΐνης MFN2 προκαλεί πλήρη αδυναμία σύντηξης των μιτοχονδρίων και κατ'επέκταση λειτουργικές ανωμαλίες σε αυτά (Chen & Chan, 2005b). Λειτουργικά, τόσο η MFN1 όσο και η MFN2, διαδραματίζουν παρόμοιους ρόλους στη διαδικασία της μιτοχονδριακής σύντηξης, όντας ταυτόχρονα αμφοτέρως απαραίτητες για την επιτυχή έκβασή της (Chen & Chan, 2005b). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν παραπλήσιες βιοχημικές ιδιότητες. Αυτό το συμπέρασμα στηρίζεται στο γεγονός ότι απώλεια έκφρασης της MFN1 μπορεί να ισοσταθμιστεί σε λειτουργικό επίπεδο από υπερέκφραση της MFN2 και το αντίστροφο. Ωστόσο, παρά τις αναμφίβολα πολλές ομοιότητες υπάρχουν και ορισμένες διαφορές μεταξύ τους.

Η τοπολογία τους τις καθιστά ιδανικές για την εμπλοκή τους στη σύντηξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, τόσο τα αμινο-τελικό όσο και τα καρβοξυ-τελικό άκρα των εν λόγω πρωτεϊνών, προβάλλουν στο κυτταρόπλασμα (Baselga et al., 2002). Έτσι η διαμεμβρανική τους περιοχή διαμορφώνεται σε σχήμα U. Το αμινο-τελικό άκρο και των δύο πρωτεϊνών περιέχει μια επικράτεια GTPάσης ακολουθούμενη από μια υδρόφοβη επαναλαμβανόμενη περιοχή γνωστή ως HR1 (hydrophobic heptad repeat region). Το καρβοξυ-τελικό άκρο και των δύο πρωτεϊνών περιέχει μια υδρόφοβη επαναλαμβανόμενη περιοχή γνωστή ως HR2. Αμφοτέρως οι περιοχές HR1 και HR2 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της σύντηξης μιτοχονδρίων. Σχετικά με το άλλο μέλος της υπεροικογένειας των δυναμινών, την πρωτεΐνη OPA1, η υποκυτταρική της τοποθέτηση εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Gripic et al., 2004; Herlan et al., 2003; Olichon et al., 2002, 2007). Το γονίδιο *Opa1* κωδικοποιεί πολλές διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης, λόγω εκτεταμένων επιλογών εναλλακτικού ματίσματος, που

χαρακτηρίζουν το mRNA του. Συνολικά, έχουν βρεθεί οκτώ ισομορφές (Delettre et al., 2001), οι οποίες μπορούν να προκύψουν ακόμα και έπειτα από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη OPA1 είναι απαραίτητη για την σύντηξη των εσωτερικών μεμβρανών μιτοχονδρίων. Αποσιώπηση του γονιδίου *Opa1* μέσω του μηχανισμού του παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference - RNAi), οδηγεί σε κατακερματισμό των μιτοχονδρίων λόγω ανισορροπίας μεταξύ των διεργασιών της μιτοχονδριακής σύντηξης και σχάσης (Chen & Chan, 2005; Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004). Εκτός από την αδυναμία σύντηξης των μιτοχονδρίων, η απενεργοποίηση του γονιδίου *Opa1*, οδηγεί σε εμφανείς αλλοιώσεις στη δομή των cristae (Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2002). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως η πλήρης κατανόηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης OPA1 αποτελεί περίπλοκη υπόθεση, καθώς υπερέκφρασή της δύναται να οδηγήσει είτε σε κατακερματισμό είτε σε επιμήκυνση των μιτοχονδρίων, ανάλογα με το εκάστοτε πειραματικό σύστημα (Chen & Chan, 2005b; Cipolat et al., 2004; Olichon et al., 2002). Επιπρόσθετα, γενετικές και βιοχημικές μελέτες στο ζυμομύκητα έχουν καταδείξει πως απαραίτητη προϋπόθεση για την λειτουργικότητα της OPA1 είναι η κατάλληλη μετα-μεταφραστική τροποποίησή της.

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, οι πρωτεΐνες MFN1 και MFN2, απαιτούνται προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύντηξη μεταξύ εξωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών (Εικόνα 1.4). Συγκεκριμένα, οι εν λόγω πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για να αλληλεπιδράσουν και να πλησιάσουν δυο μιτοχόνδρια μεταξύ τους προκειμένου να ενεργοποιηθεί η διεργασία της σύντηξης (Koshiba et al., 2004). Μάλιστα, στη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση συμμετέχουν τόσο ομοδιμερή σύμπλοκα MFN1-MFN1 και MFN2-MFN2 όσο και ετεροδιμερή MFN1-MFN2 (Hsiuchen Chen & Chan, 2005b). Είναι επίσης πιθανόν, οι MFN1 και MFN2 πρωτεΐνες να σχηματίζουν trans σύμπλοκα ανάμεσα σε γειτονικά μιτοχόνδρια. Στο πλαίσιο αυτό, βιοχημικές μελέτες υποστηρίζουν ότι το καρβόξυ-τελικό άκρο της MFN1 πρωτεΐνης, που περιέχει την υδροφοβική περιοχή HR2, μπορεί να ολιγομερίζεται με τον εαυτό του, καθώς και με την ανάλογη περιοχή της πρωτεΐνης MFN2, σχηματίζοντας ανάλογα σύμπλοκα (Koshiba et al., 2004). Προκειμένου, ωστόσο, να επιτευχθεί η βέλτιστη προσέγγιση μεταξύ δύο μιτοχονδρίων, συμμετέχουν συμπληρωματικά και άλλες πρωτεΐνες ενώ πραγματοποιούνται και αλλαγές στην διαμόρφωση της επικράτειας GTPάσης των πρωτεϊνών MFN1 και MFN2.



Εικόνα 1.4: Μεταβολική ρύθμιση της μιτοχονδριακής σύντηξης (Mishra & Chan, 2016).

Τέλος, είναι επιστημονικά αποδεκτό πως τόσο η σύντηξη μεταξύ εξωτερικών μεμβρανών όσο και η σύντηξη μεταξύ των εσωτερικών μεμβρανών είναι στενά συνδεδεμένες και αρμονικά συντονισμένες προκειμένου να ολοκληρωθούν επιτυχώς (Εικόνα 1.4). Σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό δράσης της πρωτεΐνης OPA1 κατά τη σύντηξη των εσωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών λίγα πράγματα είναι γνωστά, και υποδεικνύουν ότι η εν λόγω πρωτεΐνη πιθανόν να σχετίζεται με δομικές αλλαγές και αλλαγές στη διαμόρφωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης καθ' όλη τη διαδικασία.

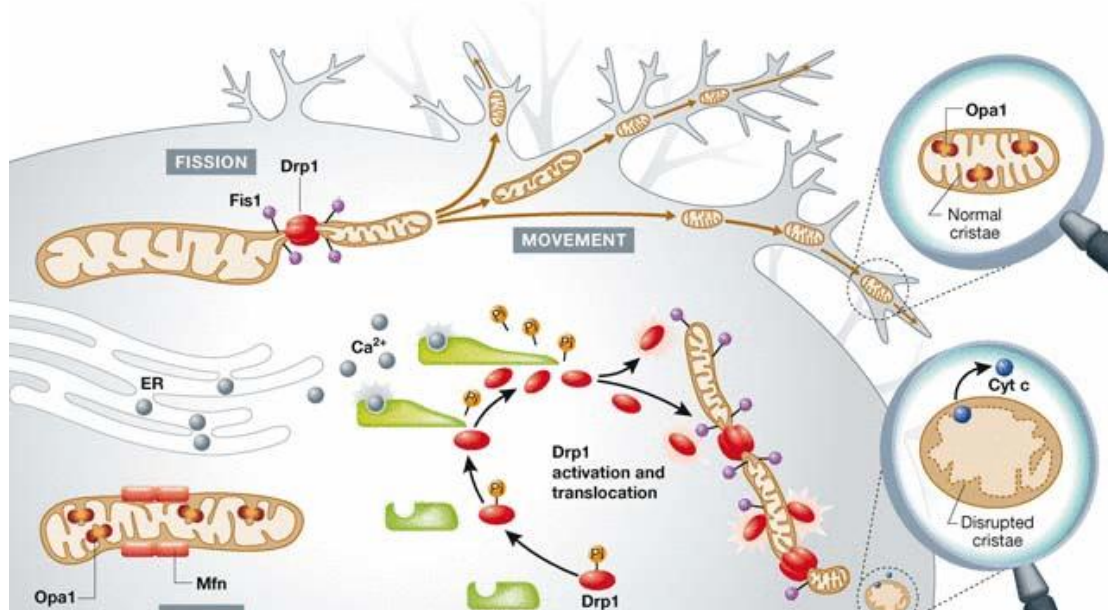
1.1.4.2 Μιτοχονδριακή σχάση

Ως μια διαδικασία συμπληρωματική της σύντηξης, η σχάση των μιτοχονδρίων είναι εξίσου σημαντική για την φυσιολογία τόσο του κυττάρου όσο και του οργανισμού γενικότερα (Cribbs & Strack, 2007a; Labbé, Murley, & Nunnari, 2014). Η σχάση των μιτοχονδρίων πραγματοποιείται μέσω της δράσης της πρωτεΐνης DRP1 (Dynamin-related Protein 1). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί μια GTPάση που

εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και κάτω από κατάλληλες συνθήκες μεταβαίνει στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αλληλεπιδρά με ένα πλήθος διαφορετικών πρωτεϊνών-υποδοχέων όπως οι MFF, FIS1, MiD49 και MiD50, στα πλαίσια της μιτοχονδριακής σχάσης.

Αναλυτικότερα, στα πρώτα στάδια της διαδικασίας μόρια της DRP1 συνδέονται σε κατάλληλες θέσης επί της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου που καλούνται θέσεις διάσπασης (scission sites), δημιουργώντας μεγάλα ομοπολυμερή σύμπλοκα που περικλείουν σταδιακά το μιτοχόνδριο σε σπειροειδή διάταξη δημιουργώντας ένα υποτυπώδη δακτύλιο σύσφιξης. Ακολούθως, πραγματοποιείται ενεργειο-εξαρτώμενη συστολή του διαμορφωθέντος δακτυλίου σύσφιξης έως ότου ολοκληρωθεί η σχάση του μιτοχονδρίου. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης DRP1 στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη λαμβάνει χώρα ύστερα από την αλληλεπίδραση και την αναγνώρισή της από κατάλληλες μεμβρανικές πρωτεΐνες όπως οι προαναφερθείσες. Το καρβόξυ-τελικό άκρο αυτών των πρωτεϊνών τοποθετείται εντός της εξωτερικής μεμβράνης και το υπόλοιπο αντικρίζει το κυτταρόπλασμα.

Ο πλέον γνωστός ρυθμιστικός μηχανισμός της μιτοχονδριακής σχάσης αφορά την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης DRP1 (Εικόνα 1.5). Η πρωτεΐνη DRP1 διαθέτει πολλές περιοχές δεκτικές στη φωσφορυλίωση ενώ παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί κινάσες ικανές να φωσφορυλιώνουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Έτσι, ανάλογα με τη θέση φωσφορυλίωσης η πρωτεΐνη DRP1 ενεργοποιείται ή απενεργοποιείται. Ενδεικτικά, φωσφορυλίωση της DRP1 στη σερίνη 637 από την πρωτεϊνική κινάση A (Protein kinase A-PKA), προκαλεί την απενεργοποίησή της, ενώ αποφωσφορυλίωση της σερίνης 637, μέσω μιας ασβεστοεξαρτώμενης φωσφατάσης της καλσινευρίνης, προκαλεί την ενεργοποίηση της DRP1 και πρόσδεσή της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Cereghetti, 2008; Cribbs & Strack, 2007; Mishra & Chan, 2016). Τέλος, μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη DRP1 παρεμποδίζουν τη μιτοχονδριακή σχάση και προκαλούν ανισορροπία μεταξύ σχάσης και σύντηξης, δημιουργώντας δίκτυα διασυνδεδεμένων μιτοχονδρίων (Mishra & Chan, 2016).



Εικόνα 1.5: Ο ρόλος της πρωτεΐνης DRP1 στη μιτοχονδριακή σχάση σε νευρικό κύτταρο. Πάνω αριστερά: Η φυσιολογική σχάση επιτρέπει τον διαχωρισμό των μικρότερων μιτοχονδρίων προς τις απολήξεις των νευρικών κυττάρων, όπου ενεργοποιούν την ανάπτυξη των νευριτών, τη συναπτογένεση και βοηθούν στη νευροδιαβίβαση. Κάτω αριστερά: Κανονική σύντηξη των εξωτερικών και εσωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών, με τη βοήθεια των πρωτεϊνών MFN και OPA1, αντίστοιχα. Κέντρο: Η ενεργοποιημένη με Ca^{2+} καλσινευρίνη απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα (Pi) από την πρωτεΐνη DRP1, η οποία με τη σειρά της μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια και προάγει τη μιτοχονδριακή σχάση. Η αποδιάταξη των cristae (cristae disruption) σχετίζεται με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (cyt c) και την απόπτωση. ER: ενδοπλασματικό δίκτυο. Fis1: μιτοχονδριακός υποδοχέας για DRP1. (Oliveira and Lightowlers, 2010).

1.1.5 Παραγωγή ενέργειας και αερόβια αναπνοή

Η αερόβια αναπνοή (aerobic respiration), αποτελεί την βιολογική διεργασία με την οποία κινητοποιούνται οι ανηγμένες οργανικές ενώσεις και εν συνεχεία οξειδώνονται με ελεγχόμενο τρόπο. Στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών, οι διαδικασίες που αποτελούν την αναπνοή αποσκοπούν στην ανάκτηση της ενέργειας που είναι αποθηκευμένη στα διάφορα οργανικά υποστρώματα και στην απόκτηση ανθρακικών σκελετών, οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη και συντήρηση των κυττάρων. Στα πλαίσια της αναπνοής ελευθερώνεται ενέργεια η οποία αποθηκεύεται παροδικά σε μία χημική ένωση, την τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP), η οποία ανά πάσα στιγμή μπορεί να χρησιμοποιηθεί

ποικιλοτρόπως από το κύτταρο για την συντήρηση και την ανάπτυξή του. Η γλυκόζη αναφέρεται, συχνά, ως το βασικό υπόστρωμα της αναπνοής. Ωστόσο σε ένα ζωντανό κύτταρο ο ανηγμένος άνθρακας μπορεί να προέρχεται και από άλλες πηγές, όπως άλλα σάκχαρα, καθώς επίσης διάφορα λιπίδια, οργανικά οξέα και σε ορισμένες περιπτώσεις πρωτεΐνες.

Από χημική άποψη η κυτταρική αναπνοή μπορεί να εκφρασθεί ως η πλήρης οξείδωση ενός μορίου γλυκόζης σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, με την ταυτόχρονη παραγωγή συνολικά 36 μορίων ATP. Η κυτταρική αναπνοή μπορεί να διαχωριστεί σε τρία διακριτά στάδια:

- **Γλυκόλυση**

Η αρχική φάση στον αερόβιο ή αναερόβιο καταβολισμό των υδατανθράκων θεωρείται η γλυκόλυση, δηλαδή μια καθολική βιοχημική διαδικασία μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό. Η γλυκόλυση πραγματοποιείται στα φυτά, στα ζώα και σε πολλά είδη βακτηρίων είτε αυτά διαβιούν σε αερόβιες είτε σε αναερόβιες συνθήκες και αποτελεί βασική διαδικασία παραγωγής ενέργειας για τους οργανισμούς. Μέσω της εν λόγω διαδικασίας αποδίδεται μια μικρή ποσότητα ενέργειας ως ATP, καθώς και αναγωγική δύναμη με τη μορφή ενός ανηγμένου νικοτιναμιδο-νουκλεοτιδίου, του NADH.

- **Κύκλος του κιτρικού οξέος**

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι επίσης γνωστός και ως κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων ή κύκλος του Krebs, λόγω της σημαντικότητας των τρικαρβοξυλικών οξέων, κιτρικό και ισοκιτρικό, ως αρχικών ενδιάμεσων προϊόντων. Αυτός ο κύκλος αποτελεί το δεύτερο στάδιο της κυτταρικής αναπνοής, όπου οξειδώνονται όλα τα υποστρώματα και διεξάγεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Κατά τη λειτουργία του απαιτείται μεταφορά του πυροσταφυλικού, το οποίο παράγεται στο κυτταρόπλασμα κατά τη γλυκόλυση, μέσω της μη διαπερατής εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με τη μεσολάβηση ενός ειδικού πρωτεϊνικού μεταφορέα. Συνοπτικά, από τη σταδιακή οξείδωση ενός μορίου πυροσταφυλικού, στο μιτοχόνδριο παράγονται τρία μόρια CO₂, και το μεγαλύτερο μέρος της ελεύθερης ενέργειας που ελευθερώνεται στα πλαίσια αυτών των οξειδώσεων διατηρείται στη

μορφή τεσσάρων μορίων NADH και ενός FADH₂. Επίσης παράγεται 1 μόριο ATP από τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος.

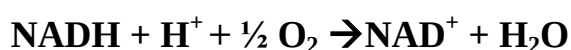
- **Οξειδωτική Φωσφορυλίωση (oxidative phosphorylation) και αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων**

Στα πλαίσια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται κατά μήκος μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που αποτελείται από έναν αριθμό πρωτεϊνών-μεταφορέων ηλεκτρονίων, οι οποίες βρίσκονται στα cristae της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Μέσω αυτού του συστήματος μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το NADH και άλλα σχετικά μόρια, που παράγονται κατά τη γλυκόλυση και τον κύκλο του κιτρικού οξέος, στο οξυγόνο. Αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίων απελευθερώνει ένα μεγάλο ποσό ελεύθερης ενέργειας, μεγάλο μέρος της οποίας διατηρείται μέσω της σύνθεσης ATP από ADP και P_i με τη δράση του ενζύμου ATP συνθάση. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και η σύνθεση του ATP ονομάζονται συνολικά οξειδωτική φωσφορυλίωση και πραγματοποιείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουλεοτίδιο (NAD⁺/NADH) είναι ένας οργανικός συμπαράγοντας (συνένζυμο) που συνδέεται με πολλά ένζυμα τα οποία με τη σειρά τους καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Το NAD⁺ αποτελεί την οξειδωμένη μορφή του συμπαράγοντα που συμμετέχει σε μία αντιστρεπτή αντίδραση με δύο ηλεκτρόνια από την οποία παράγεται NADH. Το τυπικό αναγωγικό δυναμικό αυτής της αντίδρασης για το οξειδοαναγωγικό αυτό ζεύγος είναι περίπου -320mV, τιμή που το καθιστά έναν αρκετά ισχυρό αναγωγικό (δηλαδή δότη ηλεκτρονίων). Για το λόγο αυτό το NADH είναι ένα μόριο κατάλληλο για τη διατήρηση της ελεύθερης ενέργειας των ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται κατά τις σταδιακές οξειδώσεις της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων καταλύει τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το NADH (ή το FADH₂) προς το οξυγόνο, τον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Για την οξείδωση του NADH, η αντίδραση μπορεί να πάρει την ακόλουθη μορφή:



Ο ρόλος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι να οξειδώσει το NADH (και το FADH₂) και κατά τη διεργασία να χρησιμοποιήσει ένα μέρος της ελεύθερης ενέργειας που απελευθερώνεται για να δημιουργήσει μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων, μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με απώτερο σκοπό τη σύνθεση ATP. Αναλυτικότερα, κατά τη διάρκεια αφαίρεσης των ηλεκτρονίων από τα συνένζυμα, αντλούνται πρωτόνια από το εσωτερικό του μιτοχονδρίου στο χώρο της εσωτερικής μεμβράνης, σχηματίζοντας μια ηλεκτροχημική κλίση κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης, διαδικασία που προμηθεύει ενέργεια για το σχηματισμό του ATP.

Οι φορείς μιτοχονδριακών ηλεκτρονίων ωστόσο δεν οργανώνονται σε γραμμική διάταξη, αλλά συγκροτούνται σε πέντε μεγάλα συμπλέγματα σύμπλοκα (I-V) που καταλύουν διάφορες επιμέρους αντιδράσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Εικόνα 1.6).

Σύμπλοκο I (NADH Αφυδρογονάση) – Complex I (NADH Dehydrogenase) : Το σύμπλοκο I, το πιο σύνθετο στα θηλαστικά, αποτελείται από τουλάχιστον 40 διαφορετικά πολυπεπτίδια με συνολική μάζα κατά προσέγγιση 1 MDa. Το σύμπλοκο I, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH στην ουβικινόνη (συνένζυμο Q). Οι φορείς ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο I περιλαμβάνουν έναν στενά προσδεδεμένο συμπάραγοντα (φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο, flavin mononucleotide ή FMN), καθώς και μερικά κέντρα σιδήρου-θείου. Το NADH το οποίο παράγεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων κατά τον κύκλο του κιτρικού οξέως, οξειδώνεται από το σύμπλοκο I. Συγκεκριμένα, η οξείδωση του NADH ξεκινά με τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων και δυο πρωτονίων από το $\text{NADH} + \text{H}^+$ στο FMN (φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο), το οποίο περιέχει ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B₂), ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μια υπομονάδα του.

Τα ηλεκτρόνια κατόπιν μεταφέρονται, ένα κάθε φορά, στην ουβικινόνη μέσω μιας ακολουθίας κέντρων σιδήρου-θείου (2Fe₂S και 4Fe₄S). Έτσι το FMN είναι ο αποδέκτης δύο ηλεκτρονίων από το NADH και δότης ενός ηλεκτρονίου, κάθε φορά, στα κέντρα σιδήρου-θείου. Η ουβικινόνη είναι επίσης ένας αποδέκτης ενός ή δυο ηλεκτρονίων γιατί σχηματίζει μια σταθερή ημικινόνη. Η ουβικινόνη (ubiquinone) είναι ένας μικρός λιποδιαλυτός φορέας ηλεκτρονίων και πρωτονίων και εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη. Διαθέτει υδρόφιλο δακτύλιο καθώς και μία υδρόφοβη

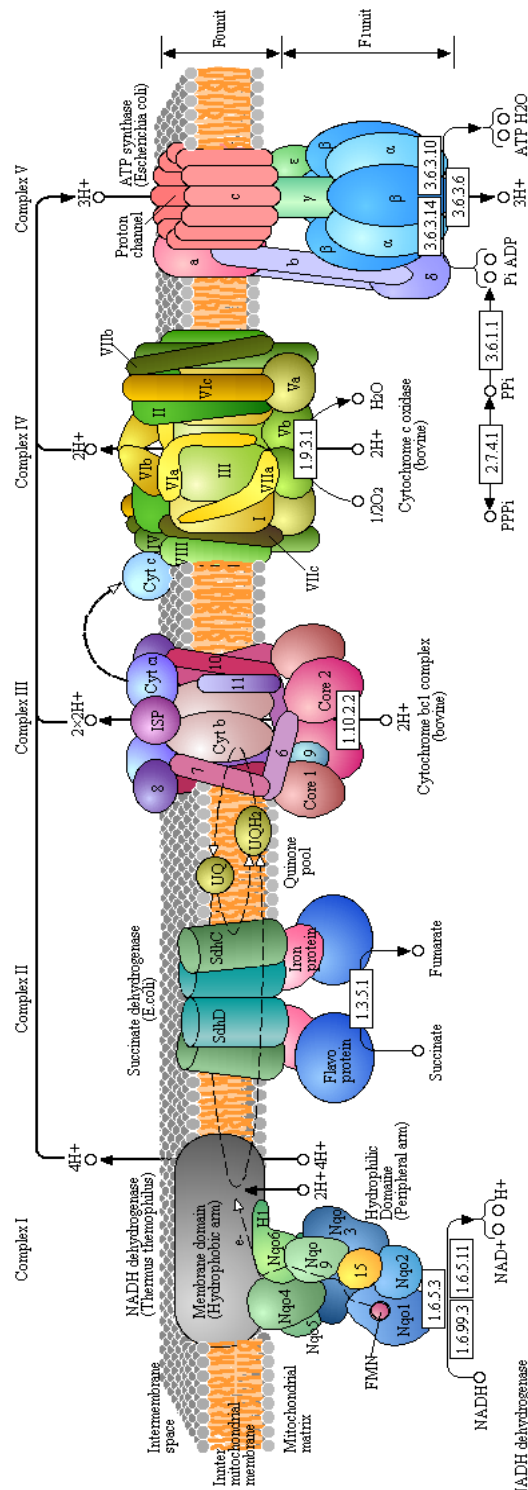
πλευρική αλυσίδα που αποτελείται από 10 μονάδες ισοπρενίου και είναι βυθισμένη στην λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης. Επίσης, τόσο η ουβικινόνη όσο και η ουβικινόλη διαχέονται ελεύθερα στη μεμβράνη και μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από τα σύμπλοκα I και II στο σύμπλοκο III. Για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων που διαπερνά το σύμπλοκο I αντλούνται τέσσερα πρωτόνια από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο. Η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων συντηρείται από αυτή τη μεταφορά πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης.

Σύμπλοκο II (Ηλεκτρική Αφυδρογονάση) – Complex II (succinate dehydrogenase): Το σύμπλεγμα II, πιο γνωστό ως ηλεκτρική αφυδρογονάση, αποτελείται από μια υπομονάδα των 70 kDa που περιέχει FAD ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα κατάλοιπο ιστιδίνης, μια υπομονάδα των 30 kDa που περιέχει τρία κέντρα σιδήρου-θείου και δύο μικρές υδρόφοβες πρωτεΐνες. Κατά την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό, δυο ηλεκτρόνια και δυο πρωτόνια μεταφέρονται στο FAD. Το FADH₂ μεταφέρει ηλεκτρόνια στην ουβικινόνη μέσω των κέντρων FeS του συμπλέγματος II. Το σύμπλοκο II δεν αντλεί πρωτόνια, γεγονός που το διαφοροποιεί σημαντικά από τα σύμπλοκα I, III και IV.

Σύμπλοκο III (Σύμπλοκο κυτοχρώματος bc₁) - Complex III (cytochrome bc₁ complex) : Στα θηλαστικά το εν λόγω σύμπλοκο αποτελείται από 11 υπομονάδες, τρεις από τις οποίες διαθέτουν προσθετικές ομάδες που λειτουργούν σαν οξειδοαναγωγικά κέντρα. Το σύμπλοκο III οξειδώνει την ανηγμένη ουβικινόνη και μεταφέρει τα ηλεκτρόνια μέσω ενός κέντρου σιδήρου-θείου, δύο κυτοχρωμάτων τύπου – b (b₅₆₅ και b₅₆₀) και ενός προσδεδεμένου στη μεμβράνη κυτοχρώματος c₁ προς κυτόχρωμα c. Με το σύμπλοκο III αντλούνται από τη μήτρα των μιτοχονδρίων τέσσερα πρωτόνια ανά ζεύγος ηλεκτρονίων με τη χρήση ενός μηχανισμού ο οποίος ονομάζεται κύκλος Q (Q-cycle).

Το κυτόχρωμα c (cytochrome c) είναι μια μικρή πρωτεΐνη χαλαρά προσδεδεμένη στην εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης και χρησιμεύει ως κινητός φορέας για την μεταφορά των ηλεκτρονίων μεταξύ του συμπλόκου III και του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας.

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION



F-type ATPase (Bacteria)					
	alpha	beta	gamma	delta	epsilon
	a	b	c		

F-type ATPase (Eukaryotes)					
	alpha	beta	gamma	delta	epsilon
OSCP	a		b	c	d
f	g		66/6h	i	k
					e
					8

V/A-type ATPase (Bacteria, Archaeas)						
A	B	C	D	E	F	G/H
I	K					

V-type ATPase (Eukaryotes)									
A	B	C	D	E	F	G	H		
a	c	d	e	SI					

00190 6/16/15
(c) Kanehisa La

Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Φαίνονται τα μέλη κάθε συμπλόκου.
(Πηγή: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00190&show_description=show)

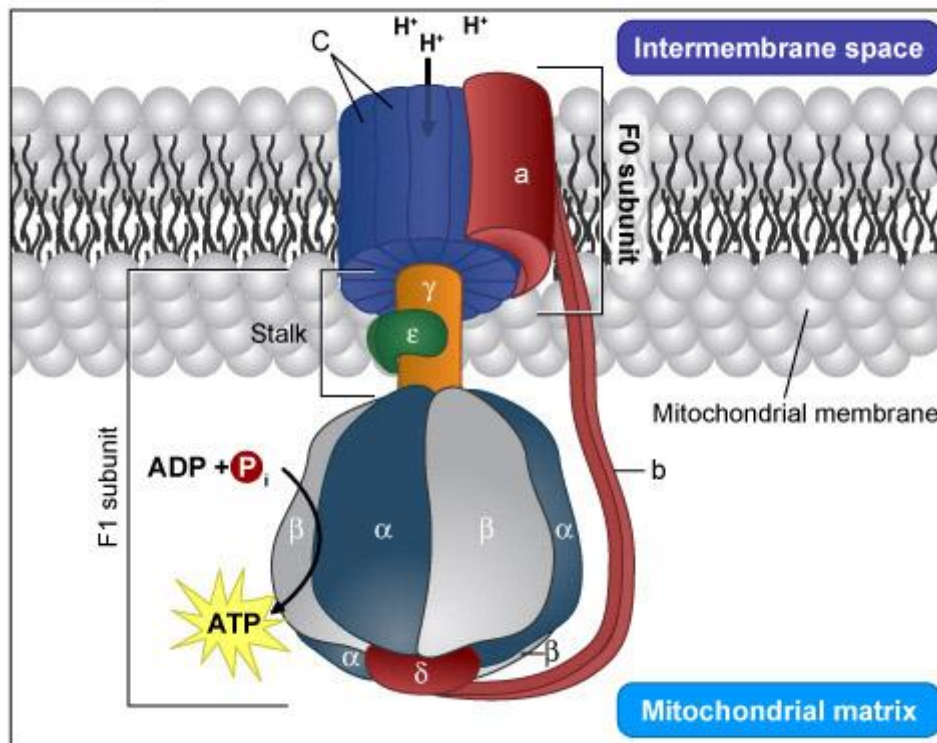
Σύμπλοκο IV (Κυτοχρωμική οξειδάση c) – Complex IV (cytochrome c oxidase):

Το σύμπλεγμα IV μεταφέρει ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c στο O_2 , τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, προς σχηματισμό ύδατος και ταυτόχρονη μεταφορά πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης. Δύο πρωτόνια αντλούνται από τη μήτρα για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων. Το σύμπλοκο στα θηλαστικά αποτελείται από 13 υπομονάδες με συνολική μάζα 200kDa και περιέχει δύο κυτοχρώματα, α και α_3 και δύο κέντρα χαλκού (Cu_A και Cu_B)

Σύμπλοκο V ή F_0F_1 -ATP συνθάση – Complex V or F_0F_1 ATP synthase :

Η ATP συνθάση ή σύμπλοκο V της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη των θηλαστικών, των ζυμομυκήτων και των μυκήτων, και καταλύει τη αδιάκοπη σύνθεση του ATP, χρησιμοποιώντας την ενέργεια της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης. Η συνθάση του ATP αποτελεί ένα πολυσύνθετο σύμπλοκο μεγέθους 480-500 kDa, απαρτιζόμενο από δύο περιοχές, την F_1 και την F_0 (Εικόνα 1.7). Η F_0 αποτελεί ένα ενσωματωμένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που απαρτίζεται από τουλάχιστον τρία διαφορετικά πολυπεπτίδια και σχηματίζει τον διάυλο μέσω του οποίου τα πρωτόνια διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη. Η F_1 είναι ένα περιφερειακό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τουλάχιστον πέντε διαφορετικές υπομονάδες και περιέχει τη θέση κατάλυσης για την μετατροπή των ADP και P_i σε ATP. Αυτό το σύμπλοκο είναι προσδεσμένο στο F_0 από την πλευρά της μήτρας. Αποκόλληση της F_1 περιοχής από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αφήνει μια άθικτη αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ικανή να μεταφέρει ηλεκτρόνια χωρίς σχηματισμό βαθμίδωσης πρωτονίων, μιας και τα πρωτόνια που αντλούνται κατά μήκος της μεμβράνης κατά τη διαδικασία της μεταφοράς ηλεκτρονίων, επιστρέφουν στη μήτρα μέσω της F_0 περιοχής. Η βαθμίδωση των πρωτονίων αποκαθίσταται μέσα από την επανασύνδεση της F_1 περιοχής στις απογυμνωμένες μεμβράνες, καθώς η F_1 επανασυζεύγνυται με την F_0 περιοχή, γεγονός που αποτρέπει την διαρροή των πρωτονίων μέσω της F_0 . Επιπρόσθετα, η ενεργότητα της συνθάσης του ATP επανακτάται.

ATP Synthase



Dept. Biol. Penn State ©2004

Εικόνα 1.7: Οι υπομονάδες της ATP συνθάσης. Η συνθάση ATP αποτελείται από δύο υπομονάδες: F0 και F1. Κάθε μία από αυτές τις υπομονάδες αποτελείται από πολλαπλές πρωτεΐνες. Η υπομονάδα F0 αποτελείται από ενσωματωμένες στην μεμβράνη πρωτεΐνες: 1 αντίγραφο πρωτεΐνης a, 2 αντίγραφα της πρωτεΐνης b και 12-14 αντίγραφα της πρωτεΐνης c, η οποία σχηματίζει το κανάλι για πρωτόνια να ρέουν κατά μήκος της μεμβράνης. Η υπομονάδα F1 αποτελείται από πέντε διακριτές πρωτεΐνες: 3 αντίγραφα άλφα, 3 αντίγραφα βήτα, 1 αντίγραφο από κάθε γ, καθώς και τις συνδεδεμένες υπομονάδες δέλτα (δ) και έψιλον (ε). Καθώς τα πρωτόνια ρέουν διαμέσου της μεμβράνης, οι υπομονάδες c και οι συνδεδεμένες υπομονάδες δέλτα και έψιλον περιστρέφονται. Το υπόλοιπο των υπομονάδων είναι ακίνητο. Αυτή η περιστροφή προκαλεί αλλαγές διαμόρφωσης στις υπομονάδες βήτα, που καταλύουν τη σύνθεση του ATP (Πηγή: <https://wikispaces.psu.edu/display/230/Oxidative+Phosphorylation>).

1.1.6 Σύμπλοκο MICOS

Αρκετές επιστημονικές μελέτες κατέδειξαν την ύπαρξη ενός μεγάλου πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, ιδιαίτερος σημαντικού για τη διαμόρφωση και διατήρηση της αρχιτεκτονικής της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το σύμπλοκο έλαβε διάφορες ονομασίες όπως MINOS (Mitochondrial INner membrane Organizing System) (von der Malsburg et al. 2011), MitOS (Mitochondrial

Organizing Structure) (Hoppins et al. 2011) και MICOS (Mitochondrial COntact Site) (Harner et al. 2011), με την τελευταία κατά σειρά να αποδεικνύεται η επικρατέστερη.

Οι υπομονάδες του εν λόγω συμπλόκου ονομάζονται με τα αρχικά γράμματα “Mic” ακολουθούμενα από έναν αριθμό που υποδηλώνει το μοριακό τους βάρος. Στη ζύμη έχουν βρεθεί συνολικά έξι υπομονάδες του συμπλόκου MICOS –Mic10, Mic12, Mic19, Mic26, Mic27 και Mic60 (Pfanner et al. 2014). Στα θηλαστικά, ο αριθμός των υπομονάδων είναι αρκετά μεγαλύτερος και μέχρι πρότινος είχαν περιγραφεί 9 υπομονάδες, ενώ είναι πιθανόν ακόμα περισσότερες να προκύψουν (Πίνακας 1.1) (Alkhaja et al., 2012.; An et al., 2012; Darshi et al., 2011; Guarani et al., 2015; Ioakeimidis et al., 2014; Ott, Dorsch, Fraunholz, Straub, & Kozjak-Pavlovic, 2015).

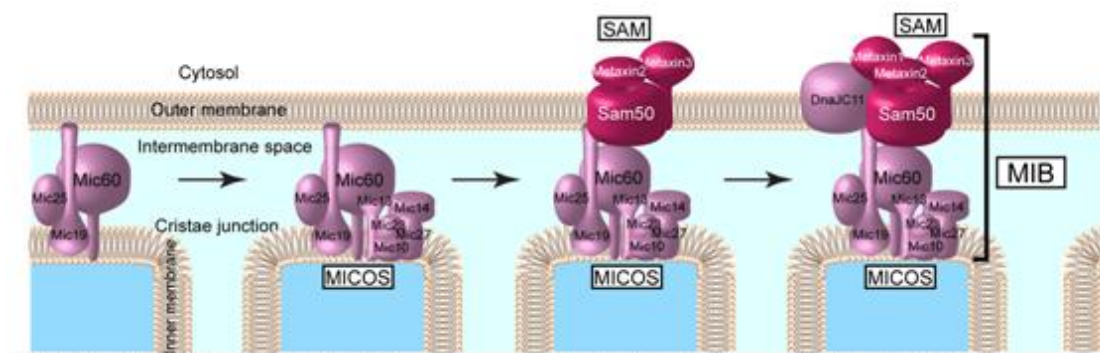
Στη ζύμη, όλες πρωτεΐνες που απαρτίζουν τις υπομονάδες του συμπλόκου MICOS βρίσκονται αγκυροβολημένες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη εκθέτοντας το μεγαλύτερο τμήμα τους στον διαμεμβρανικό χώρο, με εξαίρεση την πρωτεΐνη Mic19 που δεν είναι αγκυροβολημένη αλλά διαλυτή. Απενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών στη ζύμη επηρεάζει σημαντικά και αρνητικά το σχηματισμό των cristae, με την δραματικότερη επιρροή να παρατηρείται κατά την απενεργοποίηση της μιτοφιλίνης-Mic60 και της Mic10 (MINOS1 στα θηλαστικά). Για το λόγο αυτό τόσο η μιτοφιλίνη όσο και η Mic10 (MINOS1 στα θηλαστικά), θεωρούνται τα βασικά συστατικά του συμπλόκου MICOS.

Επιπρόσθετα, στη ζύμη το σύμπλοκο MICOS αλληλεπιδρά μέσω των επιμέρους πρωτεϊνικών υπομονάδων του με πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και συγκεκριμένα τις UGO1, VDAC (Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011) καθώς και τα σύμπλοκα TOM (Malsburg et al., 2011) και SAM (Harner et al., 2011).

Πίνακας 1.1: Τα μέλη του συμπλόκου MICOS (Kozjak-Pavlovic, 2017).

Name	Alternative name(s)	Localization	Molecular weight
MIB			
MICOS			
Mic60	Mitofilin, IMMT	Inner membrane	88 kDa, 90 kDa
Mic10	MINOS1, C1orf151	Inner membrane	8.8 kDa
Mic19	CHCHD3	Inner membrane	26.2 kDa
Mic25	CHCHD6, CHCM1	Inner membrane, associated	26.5 kDa
Mic23	Mic26, ApoO	Inner membrane	22.3 kDa
Mic27	ApoOL, FAM121A	Inner membrane	29.2 kDa
Mic13	Qil1, C19orf70	Inner membrane	13 kDa
Mic14	CHCHD10, C22orf16	Inner membrane, associated	14.1 kDa
MICOS and SAM interacting proteins			
DnaJC11	–	Outer/inner membrane	63.3 kDa 57.2 kDa 35 kDa
SAM			
Sam50	Samm50, CGI-51	Outer membrane	51.8 kDa
Metaxin 1	–	Outer membrane	35.8 kDa
Metaxin 2	–	Outer membrane, associated	30 kDa
Metaxin 3	–	Outer membrane	35 kDa

Από την άλλη, στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια η μιτοφιλίνη αλληλεπιδρά με ποικίλες πρωτεΐνες όπως η Mic19/CHCHD3 (Darshi et al. 2011), η Mic25/CHCHD6 (An et al. 2012), η Mic13/Qil1 (Guarani et al. 2015), η DnaJC11 (Ioakeimidis et al., 2014), η SAM50 καθώς και οι metaxin1 και metaxin 2 (Darshi et al. 2011; Ott et al. 2012, 2015). Συμπληρωματικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων του συμπλόκου MICOS και των υπομονάδων του συμπλόκου SAM, οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγαλύτερου μοριακού βάρους συμπλόκου που χαρακτηρίζεται από υψηλή οργάνωση και ιεραρχία και ονομάζεται σύμπλοκο MIB (Kozjak-Pavlovic, 2016). Το μοριακό μέγεθος του συμπλόκου MICOS κυμαίνεται περί τα 700 kDa, ενώ του συμπλόκου MIB περί τα 2200-2800 kDa (Εικόνα 1.8).



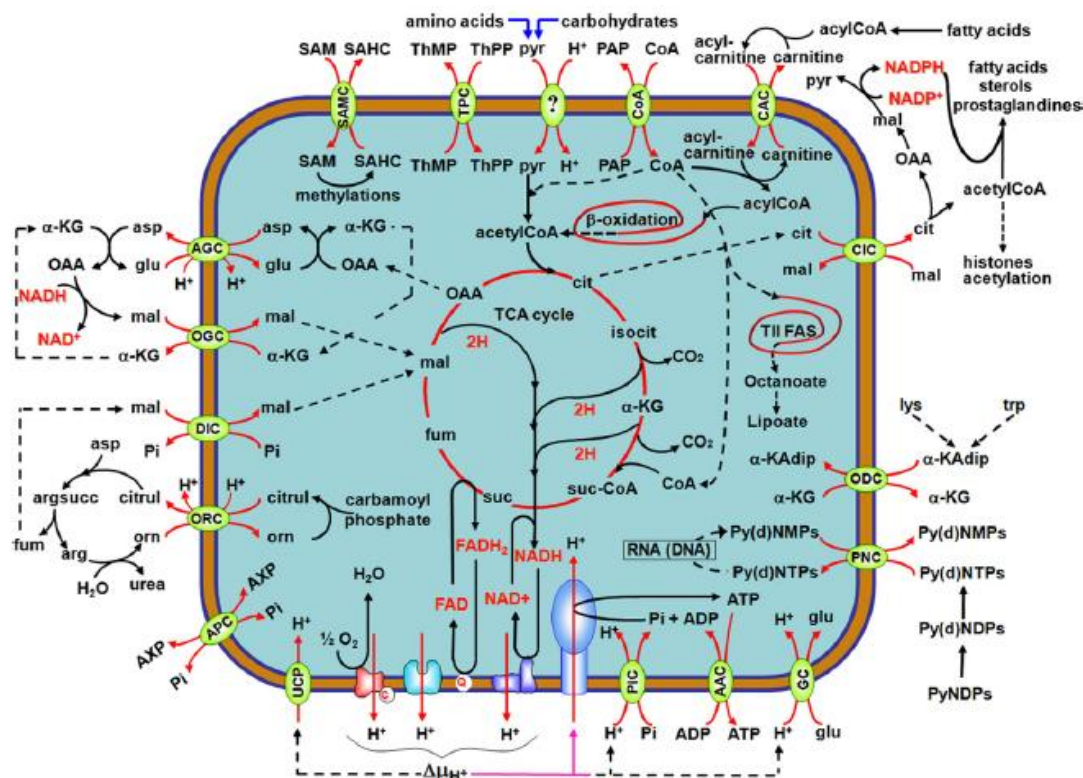
Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της συναρμολόγησης των συμπλόκων MICOS και MIB (Kozjak-Pavlovic, 2016).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατης ερευνητικής μελέτης οι υπομονάδες Mic60 και Mic19 της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και η υπομονάδα SAM50 της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, αποδεικνύονται εξαιρετικά σημαντικές για την οργάνωση των cristae και την εν γένει σταθερότητα του συμπλόκου MIB συγκρατώντας τις 2 μιτοχονδριακές μεμβράνες σε κοντική απόσταση (Ott et al. 2015).

1.1.7 Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μεταφορείς

Τα μιτοχόνδρια συνεργάζονται στενά με το κυτταρόπλασμα σε πληθώρα μεταβολικών κυτταρικών διεργασιών και για το λόγο αυτό απαιτείται συνεχής και ιδιαίτερα διαφοροποιημένη ροή μεταβολιτών, νουκλεοτιδίων και διαφόρων επιμέρους συμπαραγόντων τόσο μέσα όσο και έξω από αυτά. Η μεταφορά διαλυτών στοιχείων διαμέσω της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης καταλύεται από μια οικογένεια πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται με τη σειρά τους από πυρηνικά γονίδια και ονομάζονται μιτοχονδριακοί μεταφορείς. Οι εν λόγω μεταφορείς παρέχουν στο μιτοχόνδριο χημικές ενώσεις που εμπλέκονται σε διαδικασίες, όπως ο κύκλος του Krebs, η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η ρύθμιση της συγκέντρωσης ριβονουκλεοτιδίων και δεοξυριβονουκλεοτιδίων στη μήτρα του μιτοχονδρίου, στη σύνθεση και αποικοδόμηση μιτοχονδριακού DNA, RNA και πρωτεϊνών, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, στη γλυκονεογένεση, στη λιπογένεση, στη μεταφορά αναγωγικών ισοδυνάμων, στη σύνθεση της ουρίας, στην αποικοδόμηση των

αμινοξέων, καθώς και άλλων διεργασιών που μοιράζονται το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια (Εικόνα 1.9) (Palmieri, 2014).



Εικόνα 1.9: Οι μεταβολικοί ρόλοι των μιτοχονδριακών μεταφορέων. Παρουσιάζονται 16 μεταφορείς που πραγματοποιούν μεταφορές μεταβολιτών κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Οι συγκεκριμένοι μεταφορείς συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (AAC, PiC, UCP), στο μονοπάτι της οξειδοαναγωγής (AGC, OGC, DIC, CIC, CAC, PyC), στην ομοιοστάση της ενδομιτοχονδριακής συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων αδενίνης (APC), στη μεθυλίωση του μιτοχονδριακού DNA, RNA και μερικών ενδομιτοχονδριακών πρωτεϊνών (SAMC), στην εισαγωγή του απαραίτητου συνενζύμου της πυροφωσφατιδικής θιαμίνης (ThPP) που είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα των συμπλόκων του πυροσταφυλικού και της οξογλουταρικής δεϋδρογενάσης (TPC), στον μεταβολισμό των αμινοξέων (AGC, ORC, GC, ODC) (Palmieri, 2014).

1.1.8 Οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25

Η SLC25 (solute carrier family 25) οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων, είναι η μεγαλύτερη οικογένεια μεταφορέων διαλυτών ουσιών, και στον άνθρωπο περιλαμβάνει 53 γονίδια που είναι κατανεμημένα σε όλα σχεδόν τα χρωμοσώματα

αλλά διαφέρουν σημαντικά στην οργάνωση και το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα, μπορεί να περιέχουν 1 – 18 εξόνια και το μέγεθός τους να κυμαίνεται από 1184 έως 65.456 bp. Τα γονίδια της SLC25 οικογένειας είναι διαδεδομένα σε διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (από πρώτιστα έως μετάζωα). Επίσης, απαντώνται και σε ορισμένους ιούς και βακτήρια όπως τα *Mimiviridae mimivirus*, *Legionella* και *Neorickettsia spp*, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από ένα ευκαρυωτικό ξενιστή σε ένα παθογόνο. Επιπρόσθετα, η SLC25 οικογένεια μεταφορέων δεν περιορίζεται μόνο στα μιτοχόνδρια καθώς ορισμένα μέλη της απαντώνται και σε άλλα υποκυτταρικά οργανίδια όπως σε υπεροξυσώματα (Agrimi et al., 2012). Επίσης, απαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες στις μεμβράνες οργανιδίων. Τα επίπεδα έκφρασης των εν λόγω μεταφορέων εμφανίζουν χαρακτηριστική ποικιλομορφία, καθώς ορισμένοι απαντώνται σε όλους ή σχεδόν όλους τους ιστούς ενώ άλλοι είναι ιστοειδικοί και χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερως υψηλή εξειδίκευση (Palmieri, 2014).

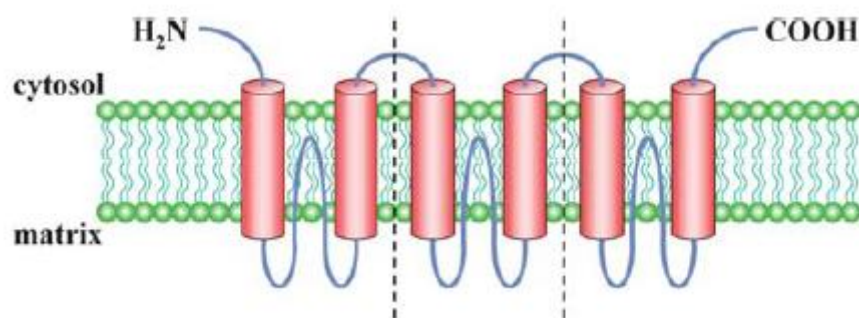
Οι SLC25 μεταφορείς αποτελούν το σύνδεσμο ανάμεσα στις μεταβολικές διεργασίες που συμβαίνουν σε δύο διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως το κυτταρόπλασμα και τη μιτοχονδριακή μήτρα, επιτρέποντας την εκλεκτική μεταφορά πολυάριθμων διαλυτών ουσιών διαμέσω της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επίσης, επειδή τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα συνεργάζονται σε μεγάλο αριθμό μεταβολικών διεργασιών και δεδομένης της διαμερισματοποίησης των ενζύμων που απαιτούνται, μια συνεχής και ιδιαίτερα διαφοροποιημένη ροή διαλυτών ουσιών μέσα και έξω από τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητη και λαμβάνει χώρα κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης, προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιτυχής αλληλεπίδραση μεταξύ των υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Η διαφοροποιημένη ροή εξασφαλίζεται μέσα από τη λειτουργία των SLC25 μεταφορέων. Πράγματι, οι εν λόγω μεταφορείς εμπλέκονται σε πολλές σημαντικές μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου, όπως προαναφέρθηκε (Εικόνα 1.9) (Palmieri, 2014) .

1.1.8.1 Δομή των μελών της SLC25 οικογένειας

Οι περισσότερες πρωτεΐνες-μιτοχονδριακοί μεταφορείς χαρακτηρίζονται από την τριπλή επανάληψη μιας δομικής αλληλουχίας, καθώς περιέχουν τρεις διαδοχικά επαναλαμβανόμενες ομόλογες επικράτειες μήκους περίπου 100 αμινοξέων. Κάθε μια επικράτεια με τη σειρά της περιέχει δύο υδρόφοβες περιοχές οι οποίες κατανέμονται

στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης με τη μορφή α-ελίκων και μεταξύ τους παρεμβάλλεται μια υδρόφιλη περιοχή. Επίσης, οι εν λόγω πρωτεΐνες περιέχουν το ακόλουθο μοτίβο : P-h-D/E-X-h-K/R-X-R/K- (20–30 κατάλοιπα)-D/E-G-(4 κατάλοιπα)-a-K/R-G, όπου το h αντιπροσωπεύει ένα υδρόφοβο και το a ένα αρωματικό κατάλοιπο. Ωστόσο μεταξύ των μεταφορέων ενδέχεται να υπάρχουν και σχετικές αποκλίσεις (Palmieri, 2004).

Ένα αποδεκτό δισδιάστατο μοντέλο των μιτοχονδριακών μεταφορέων, με βάση και τα χαρακτηριστικά του υδρόφοβου προφίλ της αμινοξικής αλληλουχίας που αναφέρθηκε προηγουμένα, υποστηρίζει ότι κάθε μια από τις τρεις επαναλήψεις, περιέχει δύο α-έλικες που διασχίζουν την μεμβράνη σχηματίζοντας μια δομή με ένα σύνολο από έξι α-έλικες (Εικόνα 1.10). Οι α-έλικες συνδέονται μεταξύ του με υδρόφιλες θηλιές-βρόγχους (loops). Τα αμινο-τελικά και καρβοξυ-τελικά άκρα εκτίθενται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, οι βρόγχοι που συνδέουν τις δυο α-έλικες της κάθε επανάληψης βρίσκονται στην πλευρά της μήτρας ενώ τα δύο μικρότερα τμήματα που συνδέουν τις τρεις επαναλήψεις βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά (Palmieri, 2004).



Εικόνα 1.10: Προτεινόμενο δισδιάστατο μοντέλο δομικής και τοπολογικής απεικόνισης των μελών της SLC25 οικογένειας (Palmieri, 2004).

Τέλος, μελέτες διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking), στοιχειομετρίας δέσμησης αναστολέα ανά μονομερές καθώς και μελέτες προσδιορισμού του μοριακού βάρους με υδροδυναμικές μετρήσεις (hydrodynamic measurements) και ηλεκτροφόρηση (blue native gel electrophoresis), σε απομονωμένες πρωτεΐνες μιτοχονδριακών μεταφορέων, έδειξαν ότι στην πλειοψηφία τους σχηματίζουν ομοδιμερή με πιθανό ρόλο στο μηχανισμό μεταφοράς μέσω του σχηματισμού

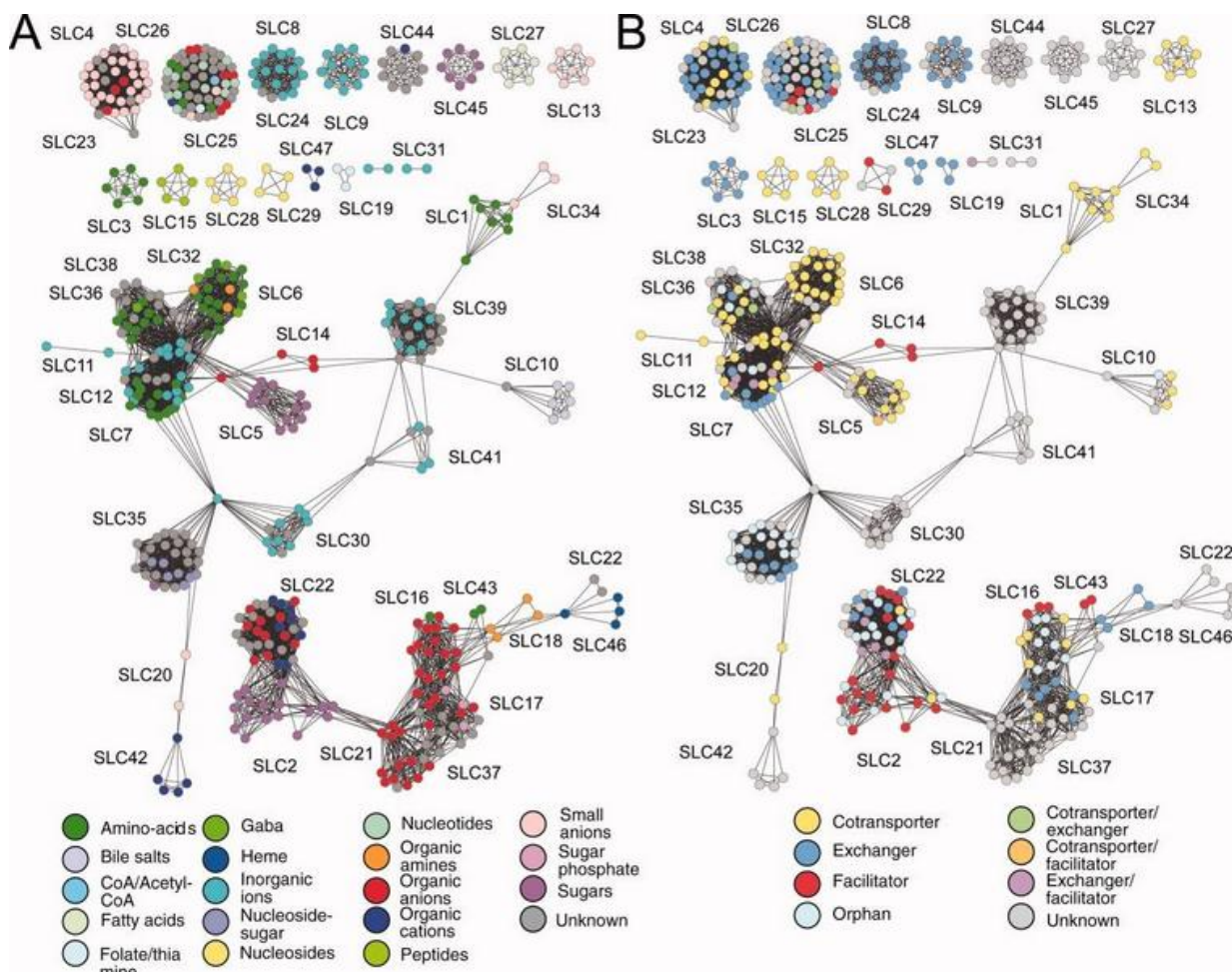
καναλιών (Palmieri, 2004). Αν ωστόσο πράγματι οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς λειτουργούν ως διμερή, η δομή τους θα πρέπει να αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα, όπως συμβαίνει στην πλειοψηφία των πρωτεϊνών μεταφορέων (Palmieri, 2004).

1.1.8.2 Λειτουργικά χαρακτηριστικά των μελών της SLC25 οικογένειας

Το μεγαλύτερο μέρος των πληροφοριών σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες των SLC25 μιτοχονδριακών μεταφορέων, προέρχεται από επιστημονικές μελέτες με ανασυσταθέντα λιποσώματα είτε με φυσικούς μεταφορείς των μιτοχονδρίων είτε πιο συχνά με μεταφορείς που εκφράζονται ετερόλογα (Palmieri, 2004, 2008, 2014). Η εντυπωσιακότερη ίσως ιδιότητα ανάμεσα στα μέλη της SLC25 οικογένειας είναι η ποικιλία των διαλυτών ουσιών που μεταφέρουν. Τα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας SLC25, μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα διαλυτών ουσιών (H^+ , NAD^+ , συνένζυμο CoA) που εμφανίζουν ετερογένεια ως προς τη δομή και το μέγεθός τους. Τα περισσότερα από τα μεταφερόμενα υποστρώματα είναι αρνητικά φορτισμένα, ωστόσο μερικά είναι θετικά φορτισμένα ή αμφολυτικά σε φυσιολογικές τιμές pH.

Σύμφωνα με την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμά τους οι SLC25 μεταφορείς μπορούν να διαχωριστούν σε φορείς για καρβοξυλικά, κετο-οξέα, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, δινουκλεοτίδια και άλλα υποστρώματα (Palmieri, Pierri, De Grassi, Nunes-Nesi, & Fernie, 2011). Κάθε ομάδα διαιρείται περαιτέρω σε επιμέρους υπο-οικογένειες (Εικόνα 1.11). Μέχρι τώρα, έχουν αποκαλυφθεί και χαρακτηριστεί 24 υπο-οικογένειες μιτοχονδριακών μεταφορέων με βάση την εξειδίκευσή τους προς το υπόστρωμα και τις κινητικές ιδιότητες. Οι εν λόγω υπο-οικογένειες απαντώνται συνήθως σε όλα τα ευκαρυωτικά συστήματα και περιλαμβάνουν ως υποστρώματα τα ακόλουθα: ADP και ATP, CoA και 3',5'- διφωσφορική αδενοσίνη (PAP), ATP-Mg και φωσφορικά (Pi), πυροφωσφορική θειαμίνη, νουλεοτίδια της πυριμιδίνης, νουκλεοτίδια αδενίνης (σε υπεροξυσώματα), FAD και φυλλικό οξύ, NAD^+ , GTP και GDP, δικαρβοξυλικά, οξογλουταρικό, δι- και τρι-καρβοξυλικά, ηλεκτρικό και φουμαρικό, κιτρικό, οξυδικαρβοξυλικά, οξαλοξικό και θεικό, γλουταμικό, ασπαρτικό και γλουταμικό, ορνιθίνη και άλλα θετικά φορτισμένα αμινοξέα, καρνιτίνη και ακυλοκαρνιτίνες, SAM, Pi και H^+ (μεταφορείς UCPs) (Palmieri et al., 2011), καθώς και CoA / FAD / NAD^+ στα υπεροξυσώματα (Agrimi et al., 2012). Κάθε μία από αυτές τις υπο-οικογένειες χαρακτηρίζεται όχι μόνο από την εξειδίκευση του

υποστρώματος αλλά και από χαρακτηριστικά μοτίβα-πρότυπα σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας (Palmieri et al., 2011).

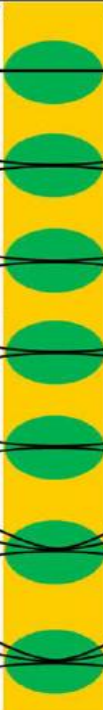


Εικόνα 1.11: Ομαδοποίηση των διαφόρων οικογενειών μεταφορέων με τη χρήση βιολογικών δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, με βάση **A)** τον τύπο του υποστρώματος και **B)** τον τύπο της μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες αναπαρίστανται ως κόμβοι και οι μεταξύ τους σχέσεις με ακμές. Κάθε οικογένεια αντιπροσωπεύεται με διαφορετικό χρώμα. (Schlessinger et al., 2013).

Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι το καλύτερο μεταφερόμενο υπόστρωμα στα ανασυσταθέντα λιποσώματα μπορεί να μην είναι πάντοτε το πραγματικό υπόστρωμα που μεταφέρεται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ένας λόγος είναι ότι μπορεί να υπάρχουν περισσότερα από ένα μεταφερόμενα υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα και / ή στη μήτρα του μιτοχondρίου, ενώ είναι πιθανόν οι αναλογίες των συγκεντρώσεών τους να διαφοροποιούνται από κύτταρο σε κύτταρο ή ακόμα και εντός του ίδιου κυττάρου.

Οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς διαφέρουν ως προς τον τρόπο μεταφοράς στον οποίο εμπλέκονται (Εικόνα 1.12). Στην πλειονότητά τους εμπλέκονται στην ανταλλαγή υποστρωμάτων εκατέρωθεν της μεμβράνης (antiport), ενώ άλλοι δρουν ως συμμεταφορείς πρωτονίων και υποστρωμάτων από την μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Ακόμη, μερικοί μεταφορείς καταλύουν την μονόδρομη μεταφορά υποστρωμάτων (uniport).

Οι τρόποι μεταφοράς μπορεί να είναι ηλεκτροφορητικοί (ηλεκτρογενείς) όταν μετατοπίζεται ένα καθαρό ηλεκτρικό φορτίο στην αντίδραση μεταφοράς ή ηλεκτρικά ουδέτεροι. Η ηλεκτρική ουδετερότητα επιτυγχάνεται γενικά με την ισόποση ανταλλαγή φορτίων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί πως, η κινητήριος δύναμη των μιτοχονδριακών μεταφορέων σχετίζεται με (i) τη συγκέντρωση των μεταφερόμενων ουσιών και (ii) το ηλεκτροχημικό δυναμικό κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Εικόνα 1.12).

Transport mode		Driving force	Mitochondrial carrier
	cytosol  matrix		
uniport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_c]}{[S_m]} \right)$	carnitine / acylcarnitine
symport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_c^-]}{[S_m^-]} \right) + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	glutamate, phosphate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_m^+]}{[S_c^+]} \right) + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	ornithine / H ⁺ (in yeast)
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_{1c}^{2-}][S_{2m}^{2-}]}{[S_{1m}^{2-}][S_{2c}^{2-}]} \right)$	oxoglutarate / malate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^{3-}][S_{2m}^{4-}]}{[S_{1m}^{3-}][S_{2c}^{4-}]} \right) \right] + \Delta \Psi$	ADP / ATP
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^-][S_{2m}^-]}{[S_{1m}^-][S_{2c}^-]} \right) \right] + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH + \Delta \Psi$	aspartate / glutamate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^{4-}][S_{2m}^{3-}]}{[S_{1m}^{4-}][S_{2c}^{3-}]} \right) \right] + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	GTP / GDP

Εικόνα 1.12: Συνοπτική περιγραφή των τρόπων μεταφοράς στους μιτοχονδριακούς μεταφορείς (Palmieri et al., 2011).

Τέλος, πρόσφατες μελέτες υποστήριξαν την έμμεση εμπλοκή των μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25A, μέσω ενός νέου μηχανισμού, στην διαμόρφωση της μορφολογίας των cristae και του μιτοχονδρίου γενικότερα (Patten et

al., 2014). Συγκεκριμένα, μεταβολές στη διαθεσιμότητα ενεργειακών υποστρωμάτων ανιχνεύονται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς SLC25A46, οι οποίοι με τη σειρά τους ρυθμίζουν τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης OPA1, που όπως είναι γνωστό εμπλέκεται στη διαμόρφωση των cristae και στην συναρμολόγηση της συνθάσης του ATP, με τρόπο ανεξάρτητο της μιτοχονδριακής σύντηξης (Patten et al., 2014).

1.1.8.3 Εξελικτική πορεία της οικογένειας SLC25

Η θεωρία της εξέλιξης υποστηρίζει ότι δύο πρωτεΐνες μπορεί να παρουσιάζουν παρόμοια δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, χωρίς ωστόσο να έχουν παρόμοιες αλληλουχίες. Τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να προκύψουν τόσο στα πλαίσια της αποκλίνουσας εξέλιξης (divergent evolution) όσο και στα πλαίσια της συγκλίνουσας εξέλιξης (convergent evolution). Μια τέτοια χαρακτηριστική περίπτωση είναι αυτής των SLC25 μιτοχονδριακών μεταφορέων.

Η οικογένεια αυτή εμφανίζει τη μεγαλύτερη λειτουργική παραλλακτικότητα συγκριτικά με άλλες οικογένειες μεταφορέων και αυτό δικαιολογείται μερικώς από το γεγονός ότι αποτελεί μια αρχαία οικογένεια που απαντάται τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα διάφορα μέλη της οικογένειας μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους καθώς έχουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, όπως αμινοξέα, νουκλεοτίδια, συνένζυμο A, οργανικά και ανόργανα ιόντα. Η πλειοψηφία των μελών της SLC25 οικογένειας απαντώνται σε οργανισμούς που αντιπροσωπεύουν όλο το βασίλειο των ευκαρυωτών και συνήθως απαντώνται σε όλους σχεδόν τους ιστούς χωρίς να χαρακτηρίζονται από υψηλή ιστοεξειδίκευση, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την καθολική ανάγκη όλων των κυττάρων ανεξαρτήτων ιστού, για μιτοχονδριακές ενεργειακές διεργασίες (Schlessinger et al., 2010). Η παρέκκλιση της οικογένειας SLC25 από άλλες οικογένειες μεταφορέων, αποτυπώνεται μέσα σε επιμέρους αλλαγές που πιθανόν περιλαμβάνουν την απόκτηση βραχέων μοτίβων υπεύθυνων για τη λειτουργική διαφοροποίηση των διαφόρων μελών της οικογένειας. Επίσης, ένα ακόμα ενδιαφέρον στοιχείο είναι το γεγονός ότι οι αλληλουχίες των μελών της SLC25 οικογένειας εμφανίζονται ιδιαιτέρως συντηρημένες, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή ύπαρξη περιορισμών στην εξέλιξή τους παρά τις ποικίλες ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους (Schlessinger et al., 2010).

1.1.8.4 Ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακούς μεταφορείς της οικογένειας SLC25

Τα τελευταία χρόνια, η ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος του ανθρώπου σε συνδυασμό με την ταχεία πρόοδο στην αναγνώριση και ταυτοποίηση της λειτουργίας των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους μιτοχονδριακούς μεταφορείς γενικότερα, επέτρεψαν την ανακάλυψη ενός αξιοσημείωτου αριθμού ασθενειών που σχετίζονται με δυσλειτουργίες των μιτοχονδριακών μεταφορέων (Palmieri, 2013). Συγκεκριμένα για την οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 έχουν ανιχνευθεί αρκετές μεταλλάξεις που προκαλούν δυσλειτουργίες και τελικώς ασθένειες (Πίνακας 1.1).

Επιπρόσθετα, οι ασθένειες αυτές, σχετίζονται με μεταβολικά προβλήματα, και η συμπτωματολογία της εκάστοτε ασθένειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το συγκεκριμένο μεταβολισμό που επηρεάζεται. Μέχρι σήμερα, δεκαεπτά ασθένειες που σχετίζονται με δυσλειτουργίες μιτοχονδριακών μεταφορέων της οικογένειας SLC25, έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί επαρκώς (Πίνακας 1.2). Οι ασθένειες αυτές ακολουθούν την Μενδελιανή κληρονομικότητα και συγκεκριμένα κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, με εξαίρεση την προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (adPEO) που κληρονομείται με αυτοσωμικά επικρατή τρόπο (Palmieri, 2013). Ενδεικτικά, μεταλλάξεις στο γονίδιο *Slc25a13* που κωδικοποιεί για την ισομορφή 2 του μεταφορέα ασπαρτικού/γλουταμινικού (Aspartate/glutamate carrier 2, AGC2), οδηγούν στην εμφάνιση κιτρουλλιναιμίας τύπου II (OMIM 215700), υποπρωτεϊναιμίας και υπεραμμωναιμίας με αποτέλεσμα την εγκεφαλοπάθεια και τα νευροψυχιατρικά συμπτώματα. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *Slc25a15*, το οποίο κωδικοποιεί το μεταφορέα ορνιθίνης 1 (Ornithine carrier 1, ORC1), που καταλύει στα πλαίσια του κύκλου της ουρίας την ανταλλαγή μεταξύ κυτοσολικής ορνιθίνης και μιτοχονδριακής κιτρουλλίνης, οδηγούν στο σύνδρομο HHH (hyperornithine-hyperammone-homocitrulline-mia) (OMIM 238970), που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση υπερορνιθιναιμίας, υπεραμμωναιμίας και ομοκιτρουλουρίας. Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο *Slc25a20*, που κωδικοποιεί για το μεταφορέα καρνιτίνης/ακυλοκαρνιτίνης, οδηγούν στο σύνδρομο Stanley (OMIM 212138). Επιπλέον, η ασθένεια της εκ γενετούς μικροκεφαλίας Amish (OMIM 607196), σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *Slc25a19*, που κωδικοποιεί για το μεταφορέα της πυροφωσφορικής θειαμίνης (Thiamine pyrophosphate carrier, TPC)

(Palmieri, 2013). Τέλος, ιδιαίτερη αναφορά χρήζει η περίπτωση του γονιδίου *Slc25a46*. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με πρόσφατες επιστημονικές μελέτες μεταλλάξεις στο εν λόγω γονίδιο φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με πλήθος ασθενειών νευρολογικής φύσεως (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2: Ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν μιτοχονδριακούς μεταφορείς της οικογένειας SLC25A.

Ασθένεια	Γονίδιο	Μεταφορέας	Υπόστρωμα
Ανεπάρκεια CAC	SLC25A20	CAC	Καρνιτίνη/ακυλοκαρνιτίνη
Σύνδρομο HHH	SLC25A15	ORC1	Ορνιθίνη/κυτρουλίνη
Ανεπάρκεια AGC2 (CTLN2/NICCD)	SLC25A13	AGC2	Ασπαρτικό/γλουταμινικό
Αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
Εκ γενετής μικροκεφαλία Amish	SLC25A19	TPC	Πυροφωσφορική θειαμίνη
Πρόωρη επιληπτική εγκεφαλοπάθεια	SLC25A22	GC1	Γλουταμινικό
Ανεπάρκεια AAC1	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
Ανεπάρκεια PiC (isoform A)	SLC25A3	PiC	Φωσφορικό
Ανεπάρκεια AGC1	SLC25A12	AGC1	Ασπαρτικό/γλουταμινικό
Νευροπάθεια με αμφίπλευρη νέκρωση του ραβδωτού σώματος	SLC25A19	TPC	Πυροφωσφορική θειαμίνη
Συγγενής σιδηροβλαστική αναιμία	SLC25A38	–	?
Επικρατής οπτική ατροφία/ Αξονική περιφερική νευροπάθεια (Abrahams et al, 2015)	SLC25A46	–	?
Σύνδρομο Leigh (Janer et al, 2016)	SLC25A46	–	?
Προοδευτική μυοκλωνική αταξία, οπτική ατροφία, νευροπάθεια (Charlesworth et al, 2016)	SLC25A46	–	?
Θνησιγόνος συγγενής γεφυροπαρεγκεφαλδική υποπλασία (Wan et al, 2016)	SLC25A46	–	?
Αταξικό μοντέλο (Terzenidou et al, 2017)	SLC25A46	–	?
Αταξικό μοντέλο (Duchesne et al, 2017)	SLC25A46	–	?
Αταξικό μοντέλο (Li et al, 2017)	SLC25A46	–	?

1.2 Το γονίδιο Slc25a46

Το γονίδιο *Slc25a46* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 (5q22.1) στο ανθρώπινο γονιδίωμα (*Homo sapiens*) και έχει μέγεθος 27.021 βάσεις (110.738.136 - 110.765.161 bp), ενώ το αντίστοιχο του ποντικού εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 (*Mus musculus*) και έχει μέγεθος 29.735 βάσεις (31.739.822 – 31.769.556 bp). Το γονίδιο *Slc25a46*, εμφανίζει υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης καθώς ορθόλογα του έχουν εντοπιστεί σε διαφόρους οργανισμούς όπως: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, αλλά και σε πληθώρα άλλων οργανισμών όπως τα πτηνά, τα ερπετά και τα θηλαστικά. Συνολικά, έχουν μέχρι σήμερα βρεθεί 227 ορθόλογα γονίδια του *Slc25a46*. Επιπλέον, το γονίδιο *Slc25a46* του ανθρώπου, έχει 9 εξόνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μεγέθους 418 αμινοξέων.

1.3 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης SLC25A46

Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο *Slc25a46* κωδικοποιεί την SLC25A46 πρωτεΐνη. Η SLC25A46 έχει μέγεθος 418 αμινοξέα τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι με ομολογία αμινοξικών αλληλουχιών της τάξης του 89%. Από δομικής απόψεως η πρωτεΐνη SLC25A46 περιέχει τρεις διαδοχικά επαναλαμβανόμενες ομόλογες επικράτειες (μήκους περίπου 100 αμινοξέων έκαστη), κάθε μία από τις οποίες περιέχει δύο υδρόφοβες περιοχές οι οποίες κατανέμονται στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης με τη μορφή α-ελίκων. Συνολικά λοιπόν, η SLC25A46 αποτελείται από έξι α-έλικες με πιθανή διαμόρφωση αυτή που προαναφέρθηκε για τα μέλη της SLC25 οικογένειας (Εικόνα 1.10) (Palmieri, 2004).

Ενδεδειγμένη τοπολογική ανάλυση σε ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) στο ποντίκι, καθώς και σε κυτταρικές σειρές/ινοβλάστες θηλαστικών, έδειξε ότι η πρωτεΐνη SLC25A46 εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Janer et al., 2016, Terzenidou et al., 2017), σε αντίθεση με την πλειοψηφία των μελών της οικογένειας SLC25 που εντοπίζονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

1.4 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και η πρωτεΐνη SLC25A46

Ολοένα και μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον αποκτούν οι μελέτες που πραγματεύονται τις δυνητικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης SLC25A46 με άλλα μόρια πρωτεϊνικής κυρίως φύσεως, που διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η πρωτεΐνη SLC25A46 αλληλεπιδρά με συστατικά του μηχανισμού της μιτοχονδριακής σύντηξης/σχάσης, όπως οι πρωτεΐνες OPA1, MFN1, MFN2, καθώς και με μέλη του συμπλόκου MICOS, όπως οι πρωτεΐνες MIC60 και MIC19. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν για ακόμη μια φορά ότι η SLC25A46, αποτελεί μέλος ενός ευρύτερου πρωτεϊνικού δικτύου αλληλεπιδράσεων (interactome), που περιλαμβάνει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη οργάνωση και διατήρηση των cristae, καθώς και πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης που συμμετέχουν στη δυναμική των μιτοχονδρίων (Janer et al., 2016). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη SLC25A46 σύμφωνα με την ίδια επιστημονική μελέτη αλληλεπιδρά με συστατικά του συμπλόκου EMC (Endoplasmic reticulum membrane protein complex), και πιθανώς εμπλέκεται με τον τρόπο αυτό στην μεταφορά λιπιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο στα μιτοχόνδρια. Μάλιστα, απώλεια της SLC25A46, επηρεάζει αρνητικά τη φωσφολιπιδική σύσταση των μιτοχονδρίων καθώς και την μορφολογία του ενδοπλασματικού δικτύου (Janer et al., 2016). Τέλος, η απώλεια της SLC25A46, επηρεάζει αρνητικά το μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (και ιδιαίτερα το σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας), ενώ παράλληλα προάγει την πρόωρη γήρανση και εμποδίζει τη μετανάστευση των κυττάρων (Janer et al., 2016).

1.5 SLC25A46 επαγόμενες παθολογίες στον άνθρωπο

Τα τελευταία χρόνια πλήθος επιστημονικών μελετών έχουν καταδείξει την πιθανή συσχέτιση μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γονίδιο *Slc25a46*, με την εμφάνιση ετερογενών κλινικών συμπτωμάτων νευροπαθολογικής φύσεως (Πίνακας 1.3). Οι κυριότερες περιπτώσεις είναι οι ακόλουθες: Επικρατής οπτική ατροφία και αξονική περιφερική νευροπάθεια (Abrams et al., 2015), Σύνδρομο Leigh (Janer et al., 2016), προοδευτική μυοκλωνική αταξία, οπτική ατροφία και νευροπάθεια (Charlesworth et

al., 2016), και θνησιγόνος συγγενής γεφυροπαρεγκεφαλιδική υποπλασία (Wan et al., 2016).

Πίνακας 1.3: SLC25A46 επαγόμενες παθολογίες στον άνθρωπο

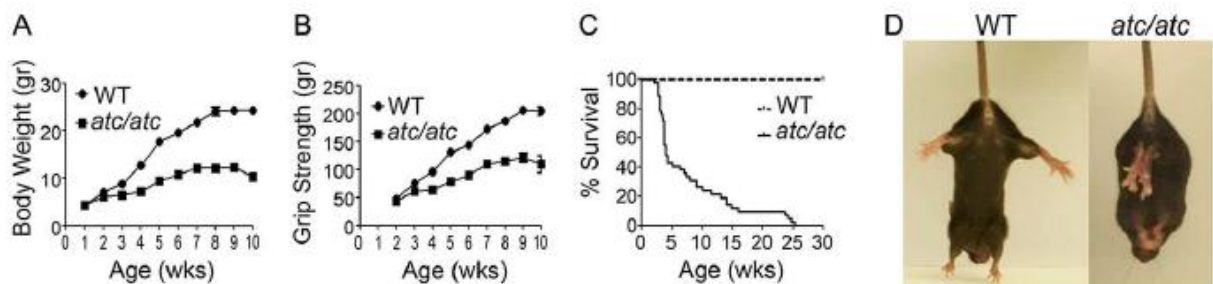
Φαινότυπος	Συμπτώματα
Επικρατής οπτική ατροφία/ Αξονική περιφερική νευροπάθεια (Abrahams et al., 2015)	Οπτική ατροφία, Περιφερική νευροπάθεια, Μυϊκή ατροφία, Παρεγκεφαλιδική ατροφία, Αταξία, Επιληπτικές κρίσεις, Σπασμοί, Πρώιμη θνησιμότητα
Διαταραχή φάσματος οπτικής ατροφίας (Nguyen et al., 2016)	Οπτική ατροφία, Παρεγκεφαλιδική ατροφία, Επιληπτικές κρίσεις, Σπασμοί, Πρώιμη θνησιμότητα
Σύνδρομο Leigh (Janer et al., 2016)	Οπτική ατροφία, Περιφερική νευροπάθεια, Μυϊκή ατροφία, Παρεγκεφαλιδική ατροφία, Επιληπτικές κρίσεις, Σπασμοί, Πρώιμη θνησιμότητα
Προοδευτική μυοκλωνική αταξία, οπτική ατροφία, νευροπάθεια (Charlesworth et al., 2016)	Οπτική ατροφία, Περιφερική νευροπάθεια, Μυϊκή ατροφία, Παρεγκεφαλιδική ατροφία, Αταξία, Επιληπτικές κρίσεις, Σπασμοί, Πρώιμη θνησιμότητα
Θνησιγόνος συγγενής γεφυροπαρεγκεφαλιδική υποπλασία (Wan et al., 2016)	Οπτική ατροφία, Περιφερική νευροπάθεια, Μυϊκή ατροφία, Παρεγκεφαλιδική ατροφία, Πρώιμη θνησιμότητα

1.6 Ανακάλυψη μιας νέας μετάλλαξης στο *Slc25a46* γονίδιο που προκαλεί αταξία στο ποντίκι μέσω Πρόσθιας Γενετικής

Στο παρελθόν πραγματοποιήθηκε, από την Δρ Ελένη Ντούνη, τυχαία χημική μεταλλαξιγένεση στο ποντίκι, χρησιμοποιώντας την μεταλλαξογόνο ένωση αιθυλνιτροζουρία (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU), για τη δημιουργία και επιλογή φαινοτύπων που σχετίζονται με το νευρομυϊκό σύστημα με σκοπό τη δημιουργία νέων ζωικών μοντέλων και την εύρεση των υπεύθυνων παθογενετικών μεταλλάξεων. Η αιθυλνιτροζουρία χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε αρσενικά ποντίκια και στη συνέχεια ακολουθώντας ένα σχήμα διασταυρώσεων κατάλληλων για την αναγνώριση υπολειπόμενων μεταλλάξεων, αναγνωρίστηκε ένας νέος φαινότυπος αυτοσωμικής

υπολειπόμενης νευρολογικής νόσου (Douni et al., 2012).

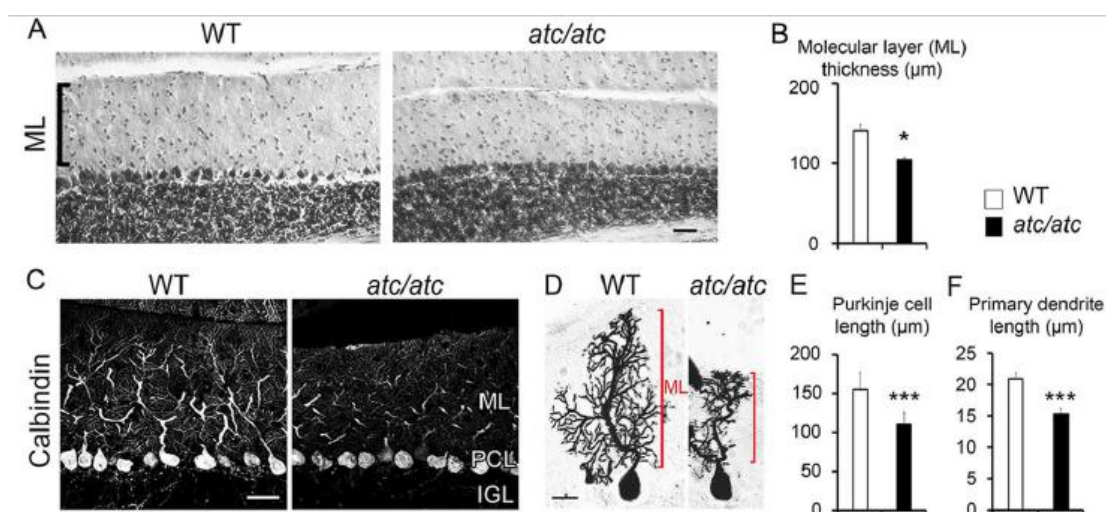
Ο εν λόγω φαινότυπος χαρακτηρίζεται από αταξία, αστάθεια κίνησης, τονικοκλωνικούς σπασμούς, ένωση των άκρων (limb-clasping) κατά την αιώρησή του από την ουρά, μειωμένη μυϊκή δύναμη και επιβραδύνουσα ανάπτυξη με πρόωρη θνησιμότητα έως την ηλικία των τριών μηνών. Λόγω των νευρολογικών συμπτωμάτων ο εν λόγω φαινότυπος ονομάστηκε αταξικός (ataxic) και η μετάλλαξη *atc*. Τα πρώτα συμπτώματα εκδηλώνονται κατά τη δεύτερη εβδομάδα μετά τη γέννηση, με πλήρη διείσδυση και στα δύο φύλα. Από την τρίτη εβδομάδα, σταματάει η αύξηση του βάρους στα αταξικά ποντίκια, η μυϊκή τους δύναμη εξασθενεί, ενώ κατά την πέμπτη εβδομάδα ανάπτυξης η πλειοψηφία των ποντικών πεθαίνει (Εικόνα 1.13) (Terzenidou et al., 2017). Τα ετερόζυγα ποντίκια δεν διαφέρουν φαινοτυπικά από τα αγρίου τύπου αδέρφια τους, καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους. Επιπρόσθετα, εκτός από το νευρολογικό φαινότυπο, τα αταξικά ποντίκια εμφάνισαν σοβαρή υποπλασία του θύμου και του σπλήνα με στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των T και B λεμφοκυττάρων, καθώς και των κυττάρων της μυελικής σειράς (Terzenidou et al., 2017).



Εικόνα 1.13: Κλινικός χαρακτηρισμός του αταξικού φαινοτύπου. Α) Καμπύλη μεταβολής σωματικού βάρους, που υποδηλώνει το μειωμένο σωματικό βάρος των αταξικών (*atc/atc*) ποντικών έναντι των υγιών αδερφών τους (WT), **Β)** Γραφική απεικόνιση μέτρησης μυϊκής δύναμης, που υποδηλώνει τη μειωμένη μυϊκή δύναμη των αρσενικών αταξικών (*atc/atc*) ποντικών έναντι των υγιών αδερφών τους (WT), **Γ)** Πρόωρη θνησιμότητα των αταξικών (*atc/atc*) ποντικών έναντι των υγιών αδερφών τους (WT), **Δ)** Αδυναμία έκτασης των οπίσθιων άκρων κατά την αιώρηση από την ουρά, αταξικών (*atc/atc*) ποντικών έναντι των υγιών αδερφών τους (WT) (Terzenidou et al., 2017).

Ιστολογική ανάλυση στην παρεγκεφαλίδα των αταξικών ποντικών αποκάλυψε υποπλασία στην μοριακή στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας, εκφυλισμό των δενδριτικών διακλαδώσεων των κυττάρων Purkinje (Εικόνα 1.14) καθώς και αλλοιώσεις στη

συνδεσιμότητα των νευρικών συνάψεων τους (Terzenidou et al., 2017). Ακόμη παρατηρήθηκαν κυτταρικές αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και στο οπτικό νεύρο (Terzenidou et al., 2017).



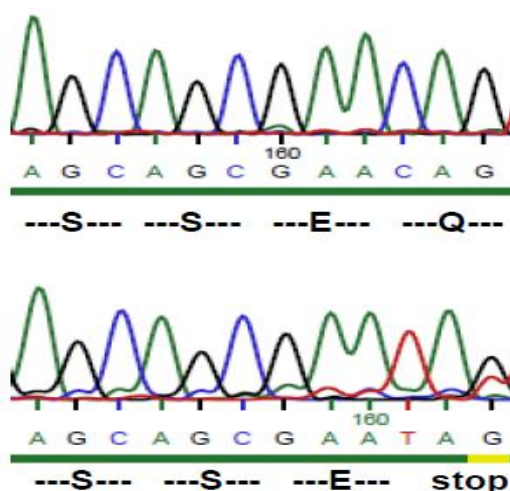
Εικόνα 1.14: Ιστολογικές αλλοιώσεις στην παρεγκεφαλίδα αγρίου τύπου και αταξικών ποντικών. A-B) Υποπλασία στην μοριακή στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών, **C-F)** Εκφυλισμός των δενδριτικών διακλαδώσεων των κυττάρων Purkinje στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών (Terzenidou et al., 2017).

1.7 Εύρεση της μετάλλαξης στο γονίδιο *Slc25a46* και γενετική επιβεβαίωση

Για την χαρτογράφηση της αιτιώδους μετάλλαξης για τον αταξικό φαινότυπο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση γενετικής σύνδεσης (genetic linkage analysis) και η υπεύθυνη για τον αταξικό φαινότυπο μετάλλαξη ανιχνεύτηκε στο χρωμόσωμα 18 και συγκεκριμένα στο γονίδιο *Slc25a46* (Terzenidou et al., 2017). Πρόκειται για μία σημειακή μετάλλαξη που προκαλεί αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου κυτοσίνης (C) σε θυμίνη (T) στην κωδική περιοχή του γονιδίου, οδηγώντας στην εμφάνιση ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης. Ως αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μετάλλαξης, η παραγόμενη πρωτεΐνη που έχει μέγεθος 95 αμινοξέα έναντι της αγρίου τύπου που είχε μέγεθος 418 αμινοξέα (Εικόνα 1.15). Η θέση της μεταλλαγής αντιστοιχεί ακριβώς στο εναρκτήριο αμινοξύ της πρώτης από τις έξι α-έλικες που εισχωρούν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Έτσι, η μεταλλαγμένη πλέον πρωτεΐνη φέρει μόνο το αμινοτελικό άκρο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης. Η δραματική αυτή δομική αλλαγή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης SLC25A46 οδηγεί στην ολοκληρωτική

απώλεια της λειτουργικότητας της και στην αδυναμία ενσωμάτωσής της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Terzenidou et al., 2017).

Περαιτέρω ανάλυση του προφίλ έκφρασης της πρωτεΐνης SLC25A46 έδειξε εξέχουσα έκφραση στο εγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα και το νωτιαίο μυελό στα ποντίκια αγρίου τύπου. Ολοκληρωτική απώλεια της πλήρους μήκους 46kDa πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στα μιτοχόνδρια αταξικών (*Slc25a46^{atc/atc}*) ποντικών (Terzenidou et al., 2017).



Εικόνα 1.15 : Εντοπισμός της σημειακής μετάλλαξης στο *Slc25a46* γονίδιο στα αταξικά ποντίκια. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδίου *Slc25a46*, όπου είναι εμφανής η αντικατάσταση της κυτοσίνης (C) από τη θυμίνη (T) (με κόκκινο χρώμα) με αποτέλεσμα την εισαγωγή ενός κωδικονίου λήξης (TAG, stop) στο 96^ο αμινοξύ (Terzenidou et al., 2017).

Υπερέκφραση του διαγονιδίου που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη πρωτεΐνη SLC25A46 (*TghuSLC25A46*), σε αταξικά ποντίκια (*Slc25a46^{atc/atc}*) οδήγησε σε πλήρη διάσωση του φαινοτύπου. Αυτό το γεγονός αποτέλεσε τη γενετική επιβεβαίωση πως η σημειακή μετάλλαξη που προαναφέρθηκε στο γονίδιο *Slc25a46*, ήταν αποκλειστικά υπεύθυνη για τον αταξικό φαινότυπο (Terzenidou et al., 2017).

Με πρωτομική ανάλυση στην παρεγκεφαλίδα αγρίου τύπου και αταξικών ποντικών διερευνήθηκε κατά πόσο *in vivo* απώλεια της πρωτεΐνης SLC25A46, επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης άλλων πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν δυνητικά μαζί της (Terzenidou et al., 2017). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πρωτομικής ανάλυσης έδειξαν ότι η απώλεια της πρωτεΐνης SLC25A46 επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων μιτοχονδριακών

πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην σύντηξη και σχάση των μιτοχονδρίων, όπως είναι οι OPA1, MFN2 και MFF (Terzenidou et al., 2017).

1.8 Πρωτεομική ανάλυση

Οι πρωτεΐνες έχουν δομικό ή λειτουργικό ρόλο που καθορίζεται από την ακολουθία των αμινοξέων, το μοριακό μέγεθος και το ηλεκτρικό φορτίο. Οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζει άμεσα τη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης. Η γνώση μόνο της αμινοξικής αλληλουχίας δεν παρέχει και τη γνώση της τρισδιάστατης δομής, της λειτουργίας και της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Η Πρωτεομική (Proteomics), πραγματεύεται την ανάλυση του συνόλου των παραγόμενων πρωτεϊνών και πεπτιδίων που κωδικοποιούνται και παράγονται από το γονιδίωμα ενός κυττάρου, του αποκαλούμενο πρωτεώματος.

Οι εφαρμογές της πρωτεομικής ανάλυσης είναι οι ακόλουθες:

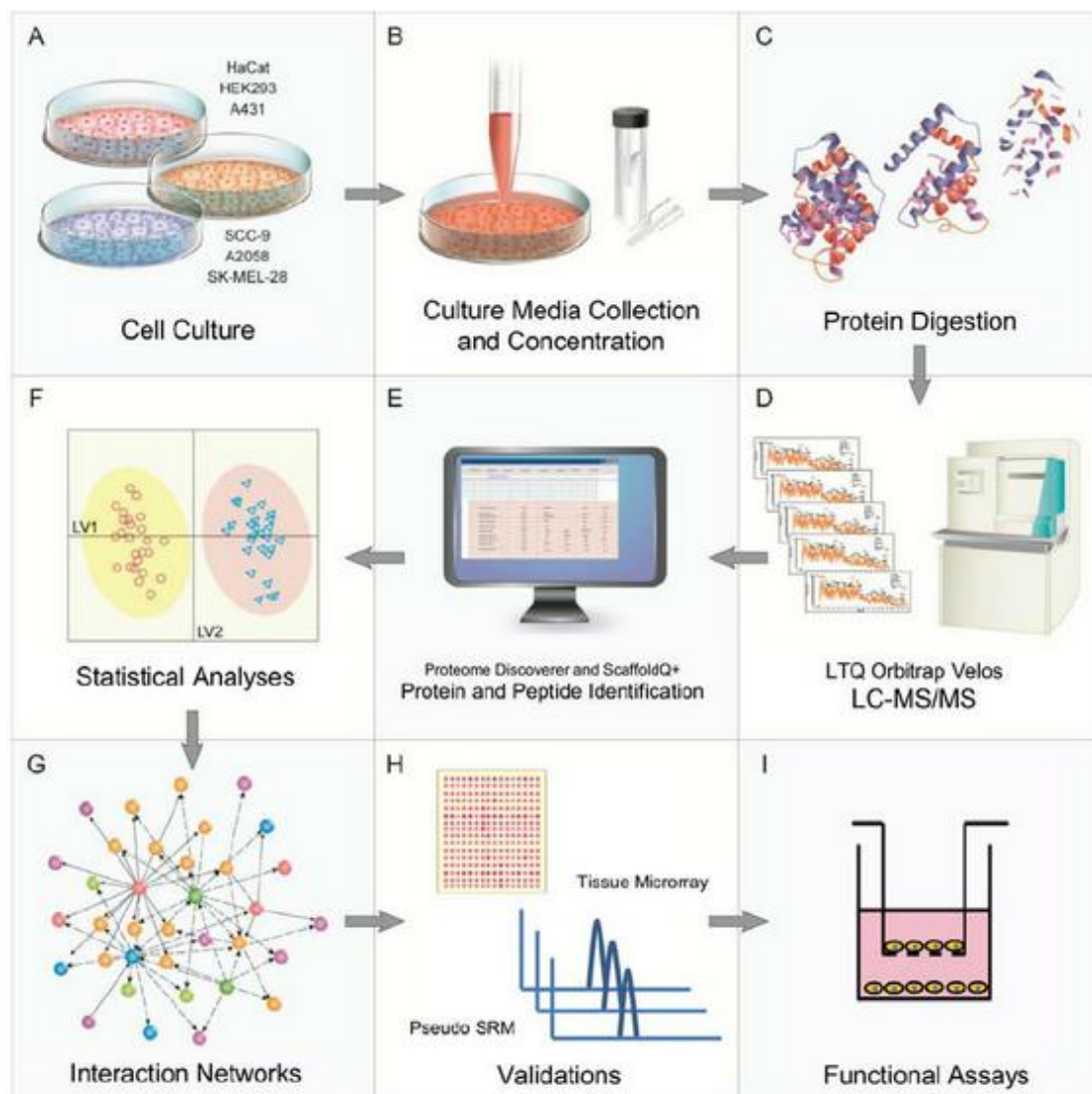
- Ανίχνευση, διαχωρισμός και χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών σε κύτταρα, ιστούς και όργανα σε οποιουδήποτε αναπτυξιακό στάδιο τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.
- Μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και των συμπλόκων που δημιουργούνται.
- Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών ενός πρωτεώματος, ακριβής ποσοτικοποίησή τους και συσχέτισή τους με τις κυτταρικές λειτουργίες.
- Μελέτη μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων.
- Συστηματική ανάλυση βιοχημικού δικτύου, με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων ή άλλων εργαλείων στα πλαίσια της βιολογίας συστημάτων.
- Ανάπτυξη βιοδεικτών και κατανόηση παθογενετικών μηχανισμών.

Στα πλαίσια της υλοποίησης όλων των ανωτέρω στόχων κατά την πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιείται πληθώρα τεχνικών, όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής (διαχωρισμός), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (διαχωρισμός) και η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (διαχωρισμός και ποσοτικοποίηση), η φασματομετρία μάζας σε σειρά (αλληλούχιση), η φασματοσκοπία NMR (αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών), και η κρυσταλλογραφία (μελέτη τρισδιάστατης

δομής).

Αναλυτικότερα, μια τυπική πρωτεομική ανάλυση χαρακτηρίζεται από μια καθορισμένη ροή εργασιών (Εικόνα 1.16). Αρχικά, κύτταρα από κυτταροκαλλιέργειες ή από άλλο δείγμα υπόκεινται σε κατάλληλη κατεργασία προς απομόνωση των πρωτεϊνών. Οι απομονωμένες πρωτεΐνες υφίστανται πέψη με πρωτεολυτικό ένζυμο, με σκοπό τη διάσπασή τους σε πεπτίδια. Τα πεπτίδια στη συνέχεια αναλύονται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), όπου επιτυγχάνεται σε διαφορετικά στάδια διαχωρισμός, ταυτοποίηση, αλληλούχηση και ποσοτικοποίηση των πεπτιδίων. Έπειτα, μέσω κατάλληλων λογισμικών πραγματοποιείται πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τέλος, με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής ανάλυσης δημιουργούνται βιολογικά δίκτυα αλληλεπίδρασης, που παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την περαιτέρω διενέργεια πειραμάτων επιβεβαιωτικού κυρίως χαρακτήρα, με απώτερο σκοπό την κατανόηση της βιολογικής λειτουργίας του συστήματος.

Αν και το πρωτόμα χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και παραλλακτικότητα συγκριτικά με το γονιδίωμα, η πρωτεομική ανάλυση αντιπροσωπεύει το πιο δυναμικό τμήμα των ολιστικών αναλυτικών τεχνολογιών καθώς προσφέρει εξαιρετικά σημαντικές και μοναδικές πληροφορίες τόσο για τη γονιδιακή έκφραση όσο και για την κατανόηση βιοχημικών μηχανισμών, γεγονός απαραίτητο για την μελέτη του μοριακού υποβάθρου διαφόρων ασθενειών και την ανάπτυξη καινοτόμων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η εκτεταμένη χρήση της πρωτεομικής ανάλυσης στην προσπάθεια κατανόησης των μοριακών μηχανισμών παθογένειας διαφόρων νευροεκφυλιστικών διαταραχών και της ανάπτυξης καινοτόμων αποτελεσματικών θεραπειών (Θεοδωρίδης, 2015).



Εικόνα 1.16: Τυπικό παράδειγμα ροής εργασιών στα πλαίσια μιας πρωτεωμικής ανάλυσης (Kawahara et al., 2015).

1.8.1 Διαφορική ανάλυση πρωτεωμικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label Free Quantification, LFQ)

Η φασματομετρία μάζας αναμφίβολα κατέχει εξέχουσα θέση στον ευρύτερο τομέα της πρωτεωμικής ανάλυσης, η οποία με τη σειρά της και σε συνδυασμό με τη ραγδαία τεχνολογική πρόοδο στη σύγχρονη εποχή, έχει καταστεί ένα εξαιρετικά ισχυρό και πολύτιμο εργαλείο, στην προσπάθεια εξεύρεσης απαντήσεων σε μια σειρά πολυπαραγοντικών επιστημονικών ερωτημάτων στους τομείς της ιατρικής, της βιολογίας και της βιοχημείας. Αυτή η ραγδαία διεύρυνση των εφαρμογών της πρωτεωμικής ανάλυσης καθιστά αναγκαία τη διαμόρφωση τεχνικών και μεθόδων

εξειδικευμένων ως προς το εκάστοτε επιστημονικό ερώτημα που επιχειρείται να απαντηθεί, τη φύση του πρωτεώματος που διερευνάται (π.χ ύπαρξη διαλυτών ή μεμβρανικών πρωτεϊνών, ύπαρξη πρωτεϊνών που φέρουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, ύπαρξη πρωτεϊνικών ισομορφών), καθώς και το είδος των δειγμάτων που αναλύονται (π.χ ιστός, καλλιεργούμενα κύτταρα, σωματικά υγρά, φυτά, βακτήρια). Προκειμένου λοιπόν, να εκπληρωθούν όλες οι παραπάνω απαιτήσεις τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα ανταγωνιστικών πειραματικών τεχνικών για την απομόνωση, το διαχωρισμό, την πέψη, τον εμπλουτισμό, τη μείωση καθώς και την ποσοτικοποίηση (σχετική και απόλυτη) των πρωτεϊνών, ενώ συνεχίζουν να αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερες νέες μεθοδολογίες προς αυτή την κατεύθυνση.

Μια νέα και αντιπροσωπευτική των ανωτέρω τεχνική είναι η διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label Free Quantification, LFQ). Η εν λόγω μέθοδος χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα αυξημένη αξιοπιστία στην ακριβή ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μεταξύ διαφορετικών βιολογικών δειγμάτων και για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στην βιοϊατρική έρευνα. Συγκεκριμένα, δεν χρησιμοποιεί ισότοπα, τα οποία περιέχονται σε ενώσεις και σημαίνουν τις πρωτεΐνες, αλλά βασίζεται στην καταμέτρηση των φασματικών κορυφών. Αναλυτικότερα, περιλαμβάνει την ανίχνευση των πεπτιδίων, την αντιστοίχισή τους με πεπτίδια από πολλαπλά δεδομένα LC/MS και την επιλογή των πεπτιδίων που ξεχωρίζουν. Έτσι καταμετρώνται οι φασματικές κορυφές, που εντοπίζονται για ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα και στη συνέχεια ενσωματώνονται τα αποτελέσματα για όλα τα πεπτίδια των πρωτεϊνών που ποσοτικοποιούνται.

1.8.2 Πρωτεομική ανάλυση ως εργαλείο για τη μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών

Στις μέρες μας, η πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιείται ευρέως και συστηματικά για την ανάπτυξη νέων βιοδεικτών, που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία συγκεκριμένων νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Για το σκοπό αυτό επιχειρείται τακτικά η μελέτη του πρωτεώματος σε επίπεδο εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Cerebrospinal Fluid - CSF) (Chaurand et al., 2004). Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι μια εξαιρετική πηγή για τον

εντοπισμό βιολογικών δεικτών για νευρολογικές παθήσεις, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της βιολογίας των νευροεκφυλιστικών ασθενειών σε ασθενείς και έχει χρησιμοποιηθεί ως μείζον διαγνωστικό εργαλείο για ένα ευρύ φάσμα συνθηκών που επηρεάζουν τόσο το κεντρικό όσο και περιφερικό νευρικό σύστημα (Björhall et al., 2005). Η συγκριτική πρωτεομική ανάλυση του CSF μεταξύ υγιών και ασθενών ατόμων δύναται να συμβάλλει σημαντικά στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για διάφορες ασθένειες του νευρικού συστήματος. Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται ως αντικειμενικοί και αντιπροσωπευτικοί δείκτες φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθογόνων διεργασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση (Wagner, Williams, & Webster, 2007). Ως εκ τούτου, αποτελούν αναμφίβολα ισχυρά εργαλεία για την αξιολόγηση της εξέλιξης διαφόρων νευροεκφυλιστικών διαταραχών καθώς και για τη διαχείριση των θεραπευτικών προσεγγίσεων (Kawle et al., 2015).

Η πρωτεομική ανάλυση εκτός από την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, χρησιμοποιείται και για τη διερεύνηση του οξειδωτικού στρες στον εγκέφαλο ασθενών με νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Συγκεκριμένα, η οξείδωση των πρωτεϊνών, η υπεροξείδωση των λιπιδίων, καθώς και η οξείδωση των DNA και RNA, αποτελούν τις βασικές πηγές οξειδωτικού στρες στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer (Reed et al., 2009). Μάλιστα, η Castegna και οι συνεργάτες της πραγματοποίησαν πρωτεομική ανάλυση προκειμένου να προσδιορίσουν την οξείδωση των πρωτεϊνών στον εγκέφαλο ατόμων που έπασχαν από τη νόσο Alzheimer. Συγκεκριμένα, πραγματοποίησαν ανοσοχημικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων συνδυάζοντας δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου και φασματομετρία μάζας (Castegna et al., 2003). Ακόμα, η Reed με τους συνεργάτες της, χρησιμοποίησαν συνδυαστικά δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση και φασματομετρία μάζας, στα πλαίσια μιας πρωτεομικής ανάλυσης, προκειμένου να εξετάσουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων στον εγκέφαλο ατόμων που έπασχαν Alzheimer πρώιμης έναρξης ή ευρύτερα γνωστό ως νεανικό Alzheimer (Reed et al., 2009).

Συνοψίζοντας, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες αποτελούν αναμφίβολα, πολύπλοκες και σχετιζόμενες με την ηλικία διαταραχές, επηρεάζοντας ένα ιδιαίτερα μεγάλο αριθμό ανθρώπων στην σύγχρονη εποχή. Σήμερα, μάλιστα, περισσότερο από ποτέ η εύρεση νέων αποτελεσματικών θεραπειών έναντι των νευροεκφυλιστικών

διαταραχών αποτελεί αδιαμφισβήτητη αδήριτη ανάγκη. Στη κατεύθυνση αυτή έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικά βήματα προόδου από την επιστημονική κοινότητα, που αφορούν στην κατανόηση της μοριακής βάσης των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών θεραπειών και στρατηγικών με απώτερο σκοπό το όφελος των ασθενών. Πολύτιμο εργαλείο στην επίτευξη των ανωτέρω στόχων αναμένεται να διαδραματίσει η τεχνολογία της πρωτεομικής ανάλυσης.

1.9 Σκοπός της παρούσας διατριβής

Πρόσφατες μελέτες, έχουν αναδείξει το γονίδιο SLC25A46 ως ένα νέο παθογενετικό στόχο σε γενετικές ασθένειες του νευρικού συστήματος με κύρια χαρακτηριστικά την αταξία και την οπτική ατροφία. Η ερευνητική μας ομάδα δημιούργησε πρόσφατα ένα γενετικό μοντέλο SLC25A46-σχετιζόμενης αταξίας, που συνεισφέρει στην κατανόηση του παθοφυσιολογικού ρόλου της SLC25A46 πρωτεΐνης και των μοριακών μηχανισμών που επάγονται κατά την απουσία της.

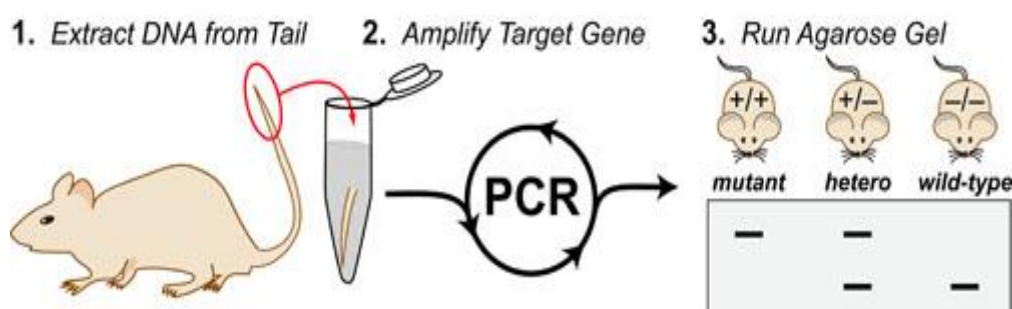
Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής διενεργήθηκε συγκριτική πρωτεομική ανάλυση σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών και στη συνέχεια έγινε έλεγχος επιλεγμένων πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα Western. Η αποκάλυψη αλλαγών στο πρωτέωμα της παρεγκεφαλίδας πιθανώς να αποκαλύψει παθογενετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εκδήλωση του αταξικού φαινοτύπου, δεδομένου ότι η δομή της παρεγκεφαλίδας έχει επηρεαστεί σημαντικά από την έλλειψη της SLC25A46 πρωτεΐνης και σχετίζεται άμεσα με τον αταξικό φαινότυπο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ

2.1.1 Παραλαβή ιστών από ποντίκια για την απομόνωση γενωμικού DNA

Τα νεαρά ποντίκια ηλικίας 8-10 ημερών σημαίνονται με ενδεδειγμένο τρόπο (κόψιμο τμήματος δακτύλων ή και αυτιού) και αφού αποκτήσουν έναν αντιπροσωπευτικό αύξοντα αριθμό καταχωρούνται σε ειδικό βιβλίο αρχειοθέτησης (Tail Book). Στα πλαίσια αυτής της διαδικασίας αποκόπτεται τμήμα μεγέθους 3-5 mm από την ουρά κάθε ποντικίου που χρησιμοποιείται στη συνέχεια για απομόνωση γενωμικού DNA και γονοτύπηση με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 : Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας γονοτύπησης που περιλαμβάνει: 1) Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών, 2) Αντίδραση PCR και 3) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Πηγή: <https://www.practicalscience.com/category/bio/animals/>).

2.1.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

Διαδικασία

- Το τμήμα της ουράς του ζώου που αποκόπτεται τοποθετείται σε σωληνάριο eppendorf 1,5mL.
- Προστίθενται 200μL «διάλυμα για ουρές» (tail buffer) και 1μL πρωτεϊνάσης K συγκέντρωσης 10mg/mL.
- Τα eppendorfs τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 55°C όλη τη νύκτα (overnight, O/N) προκειμένου να γίνει η επώαση.

- Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται έντονη ανάμιξη προκειμένου να διαλυθεί πλήρως η ουρά σε κάθε eppendorf και να μην υπάρχουν τυχόν υπολείμματα.
- Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης (200μL) και 55μL 6M NaCl (συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη απομόνωση του DNA).
- Ακολουθεί έντονη ανάμιξη για 5min.
- Φυγοκέντρηση 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Σχηματίζονται δύο φάσεις.
- Η υδατινή φάση (πάνω μέρος) μεταφέρεται σε νέο eppendorf και προστίθενται 0,7 όγκοι (~140μL) ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του DNA.
- Πραγματοποιείται ελαφριά ανάμιξη και εν συνεχεία φυγοκέντρηση σε 13.000 rpm, για συνολική διάρκεια 10min.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη (EtOH) (~100μL).
- Σύντομη φυγοκέντρηση για 2min στα 13.000 rpm.
- Απομάκρυνση της αιθανόλης.
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 10min προκειμένου να φύγει η περίσσεια αιθανόλης.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ddH₂O (~100μL).
- Αποθήκευση στους 4°C ή στους -20 °C.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- ✓ Διάλυμα για ουρές (tail buffer) σε τελικό όγκο 500 mL:

0.5M (25mL Tris 1M pH 8.0)

0.1M (100mL EDTA 0.5M)

0.1M (1mL NaCl 5M)

1% (50mL SDS 10%)

- ✓ Πρωτεΐνάση K: Διάλυμα stock 10mg/mL σε 50 mM Tris/HCl pH 8.0
- ✓ 70% EtOH

- ✓ Ισοπροπανόλη
- ✓ Φαινόλη
- ✓ 6M NaCl : 17.53gr NaCl σε τελικό όγκο 50mL με ddH₂O

ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ:

- ✓ Αποστειρωμένα eppendorfs 1.5mL
- ✓ Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

- ✓ Υδατόλουτρο
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Αναδευτήρας

2.1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση PCR αποτελεί μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής ενζυμικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού κ.α.

Απαραίτητο συστατικό για την εν λόγω αντίδραση είναι η χρήση εκκινητών, δηλαδή ολιγονουκλεοτιδίων που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR. Έτσι λοιπόν, μετά την πλήρη αποσαφήνιση της αλληλουχίας-στόχου που πρόκειται να ενισχυθεί μέσω PCR καθώς και του επιθυμητού προϊόντος που αναμένεται, πραγματοποιείται ο σχεδιασμός των εκκινητών. Βασική προϋπόθεση είναι οι εκκινητές να σχηματίζουν, με όσο το δυνατόν μικρότερη πιθανότητα, δευτεροταγείς δομές όπως *cis/trans* διμερή και φουρκέτες. Συγκεκριμένα, οι δευτεροταγείς δομές, καθορίζονται από την ύπαρξη ενδομοριακών ή/και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (*intramolecular or intermolecular interactions*) και μπορεί να προκαλέσουν μειωμένη ή και μηδενική παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Επίσης, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την πρόσδεση των εκκινητών στην μήτρα DNA καθώς και να μειώσουν σημαντικά τη διαθεσιμότητά τους στην αντίδραση.

Συνοπτικά, λοιπόν, οι βασικοί κανόνες που διέπουν τη σχεδίαση των εκκινητών είναι οι ακόλουθοι:

- Το ιδανικό μήκος κάθε εκκινητή κυμαίνεται από 18-32 ζεύγη βάσεων.
- Το ποσοστό GC% του εκκινητή να κυμαίνεται από 40-60%
- Το Tm του εκκινητή να είναι μεταξύ 50 και 65 °C και ιδανικά 57 έως 62 °C.
- Στα πρώτα και στα τελευταία 5 νουκλεοτίδια να υπάρχουν 2-3 βάσεις G ή C.
- Τα Tms του ζεύγους να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά.
- Οι εκκινητές ελέγχονται ώστε να αποφεύγονται όσο είναι δυνατό cis-διμερή, trans-διμερή και φουρκέτες.
- Το Tm του κάθε εκκινητή υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_m = 69.3 + 0.42 \cdot (\text{GC} \%) - 650/L, \text{ όπου } L = \text{μήκος εκκινητή}$$

2.1.4 Αντίδραση PCR για γονοτύπηση TgSLC25A46 διαγονιδιακών ποντικών

Στα πλαίσια της γονοτυπικής ανάλυσης των TgSLC25A46 διαγονιδιακών ποντικών πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με συστατικά και συνθήκες που περιγράφονται στη συνέχεια.

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
DNA μήτρα	1.0
TaqDNA πολυμεράση, 10U/μL	0.3
10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR (TaqBuffer)	2.0
dNTPs, 2.5mM	1.5
MgCl ₂ , 25Mm	1.6
Εκκινητής Forward και Reverse (human SLC25A46), 10pmol/μL	Καθένας 1.0
Εκκινητής Forward και Reverse (RANKL), 4pmol/μL	Καθένας 0.3
ddH ₂ O	11.0
Τελικός όγκος αντίδρασης	20.0

Σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι και αντιπροσωπευτικοί εκκινητές τόσο για το διαγονίδιο humanSLC25A46 όσο και για το ενδογενές γονίδιο RANKL που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο της επιτυχούς διεξαγωγής της αντίδρασης. Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος PCR
RANKL F	5'–AGG AGC TCC AGG TAA CTA TG–3'	317 bp
RANKL R	5'–GGC AAG GTA GGG TTC AAC TG–3'	
human SLC25A46 F	5'–AAT CAC GTG CTC CGA AGA CT–3'	484 bp
human SLC25A46 R	5'–TAA CCC CTC ATC CCT GTG TC–3'	

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- 1μLDNA από κάθε δείγμα μεταφέρεται σε σωληνάρια όγκου 200μL
- Μετά από τους κατάλληλους υπολογισμούς με βάση τις ποσότητες που ενδείκνυνται για κάθε συστατικό της αντίδρασης προετοιμάζεται ένα μητρικό διάλυμα αντίδρασης για τα δείγματα.
- 19μL από το μητρικό διάλυμα μεταφέρονται σε σωληνάρια που ήδη περιέχουν 1μLDNA από κάθε δείγμα και έτσι ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανέρχεται σε 20μL για όλα τα δείγματα.
- Για την επιτυχή έκβαση της PCR απαιτείται κατάλληλος συνδυασμός θερμοκρασίας-χρόνου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από ορθό προγραμματισμό του θερμικού κυκλοποιητή ως εξής:

Κύκλοι	Στάδιο	Θερμοκρασία/χρόνος
1x	Αποδιάταξη	Στους 94°C για 4 λεπτά
30x	Αποδιάταξη	Στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα
	Υβριδισμός εκκινητών	Στους 57°C για 30 δευτερόλεπτα
	Επιμήκυνση	Στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
1x	Επιμήκυνση	Στους 72°C για 10 λεπτά
1x	Διατήρηση	Στους 16°C για 30 δευτερόλεπτα

- Ακολούθως, 5μL διαλύματος OrangeG προστίθενται σε κάθε σωληνάριο που περιέχει το προϊόν της αντίδρασης PCR.
- Ανάλυση των προϊόντων της PCR μέσω ηλεκτροφόρησης σε 2% πήκτωμα αγαρόζης.

2.1.5 Αντίδραση PCR για γονοτύπηση SLC25A46^{atc/atc} ποντικών

Η αντίδραση PCR για την ενίσχυση του τμήματος DNA (ευρισκόμενου εσωτερικά του γονιδίου SLC25A46 του ποντικού) που θα οδηγηθεί σε πέψη με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού προκειμένου να διαπιστωθεί η ενδεχόμενη ύπαρξη της σημειακής μετάλλαξης και συνεπώς ο γονότυπος των αταξικών ποντικών (ομοζυγωτών, ετεροζυγωτών) πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
DNA μήτρα	1.0
TaqDNA πολυμεράση, 10U/μL	0.3
10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR (TaqBuffer)	2.0
dNTPs, 2.5mM	1.5
MgCl ₂ , 25mM	1.5
Εκκινητής Forward και Reverse (mSlc25a46), 10pmol/μL	Καθένας 1.0
ddH ₂ O	11.7
Τελικός όγκος αντίδρασης	20.0

Εκκινητής	Αλληλουχία
mSlc25a46 F	5'-TGG AAC TTG CCA TGT GCT CA-3'
mSlc25a46 R	5'-ACT GCC AGG TTT AGG GAG-3'

Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι 60°C και το παραγόμενο προϊόν της PCR έχει μέγεθος 504bp.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- ✓ TaqBuffer 10x: 500mMKCL, 100mMTris-HCLpH 9, 1% Triton-X
- ✓ Διάλυμα Orange G σε τελικό όγκο 100mL : 40% Sucrose (Sigma, #S0389), 0.2% Orange G (AppliChem, #A1404)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

- ✓ Θερμικός κυκλοποιητής (BIO-RAD C1000 thermal cycler)

ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ:

- ✓ Αποστειρωμένα eppendorfs 0.2 και 1.5mL
- ✓ Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

2.1.6 Πέψη προϊόντων PCR με ενδονουκλεάση περιορισμού για γονοτύπηση SLC25A46^{atc/atc} ποντικών

Πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού HpyCH4III της αλληλουχίας DNA που ενισχύθηκε μέσω της αντίδρασης PCR (για κάθε δείγμα), προκειμένου να διαπιστωθεί η ενδεχόμενη ύπαρξη της σημειακής μετάλλαξης και συνεπώς ο γονότυπος των αταξικών ποντικών (ομοζυγωτών, ετεροζυγωτών).

Ονομασία Ενζύμου	Αλληλουχία αναγνώρισης
HpyCH4III	5'... ACN [↓] GT ...3' 3'... TG [↓] NCA ...5'

Η πέψη πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος (μL)
DNA μήτρα	15
Ενδονουκλεάση περιορισμού HpyCH4III, 10U/μL	0.5
1X ρυθμιστικό διάλυμα CutSmart® Buffer	2
ddH ₂ O	2.5
Τελικός όγκος αντίδρασης	20

- Στα αποστειρωμένα eppendorfs, όπου μετά την αντίδραση PCR φέρουν 15μL από το προϊόν της αντίδρασης (δεδομένης της αφαίρεσης των 5μL που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση), προστέθηκαν τα συστατικά της αντίδρασης πέψης όπως αυτά αναφέρονται στον ανωτέρω πίνακα, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μL.
- Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 37°C για 3 ώρες, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του ενζύμου.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης σε κάθε eppendorf, προστέθηκαν 5μL διαλύματος OrangeG, με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση του τελικού όγκου στα 25μL.

- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 2% πήκτωμα αγαρόζης.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- ✓ 1X CutSmart® Buffer της NEB: 50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 100 µg/ml BSA (pH 7.9 @ 25°C)
- ✓ Ενδονουκλεάση περιορισμού HpyCH4III της NEB
- ✓ Διάλυμα Orange G σετελικόόγκο 100mL : 40% Sucrose (Sigma, #S0389), 0.2% Orange G (AppliChem, #A1404)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

- ✓ Υδατόλουτρο

ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ:

- ✓ Αποστειρωμένα eppendorfs 0.2
- ✓ Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

2.1.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα, τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα εξαιτίας της φωσφορικής τους ομάδας με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν στον θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθός τους. Τα μικρά μόρια DNA μετακινούνται ταχύτερα ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος σε σχέση με τα μεγαλύτερα.

Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο που έχει την ιδιότητα να ενσωματώνεται ανάμεσα στις βάσεις των νουκλεϊκών οξέων και να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Με το βρωμιούχο αιθίδιο ανιχνεύονται τμήματα DNA σε ζώνες που περιέχουν τουλάχιστον 10 ng (Sambrook and Russell 2001).

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 500 bp έως 25 kb. Ως τεχνική χρησιμοποιείται ευρύτατα στις βιολογικές επιστήμες, σε τομείς όπως η μοριακή βιολογία, η ιατροδικαστική και η έρευνα. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και RNA.

Τέλος, η αγαρόζη έχει την ιδιότητα, όταν κρυνώνει να δημιουργεί ένα πήκτωμα, καθώς οι δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αγαρόζης.

Η κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης καθορίζεται από τα ακόλουθα: 1) το μέγεθος του μορίου DNA, 2) τη συγκέντρωση αγαρόζης, 3) τη διαμόρφωση του DNA, 4) το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και 5) την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Μετά το διαχωρισμό, τα μόρια DNA μπορούν να παρατηρηθούν ύστερα από τοποθέτησή τους σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

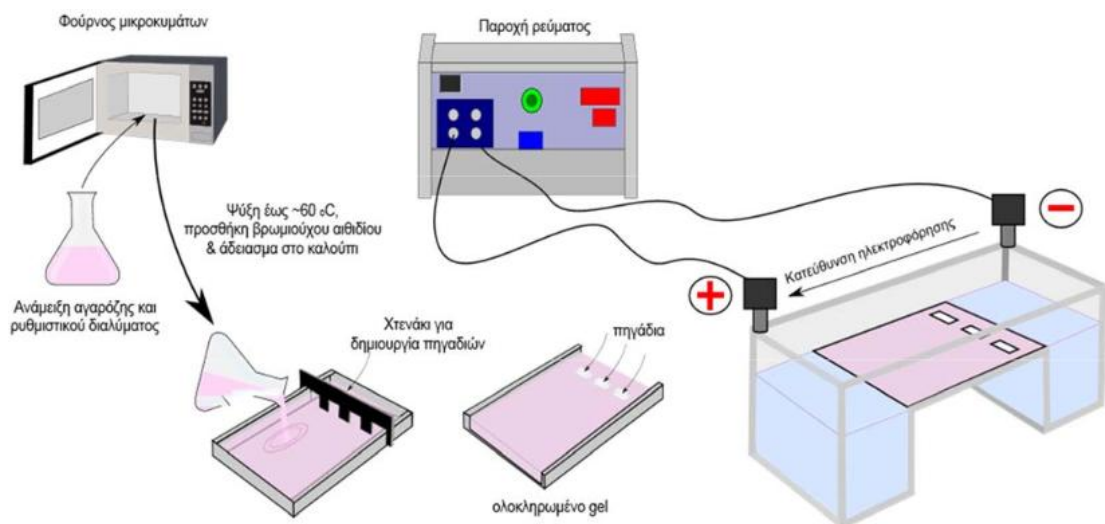
ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

- ✓ Τροφοδοτικό (BIO-RAD)
- ✓ Συσκευή ηλεκτροφόρησης (OWL)
- ✓ Σύστημα φωτογράφισης με UV

2.1.8 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2% (w/v)

- 100mL 10X TBE διαλύματος αραιώνονται σε τελικό όγκο 1000mL (1X TBE).
- 5g αγαρόζης προστίθενται σε κωνική φιάλη που περιέχει 250mL του διαλύματος 1X TBE (Εικόνα 2.2).
- Η κωνική φιάλη τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5 min, προκειμένου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- Η κωνική φιάλη ψύχεται γρήγορα με διαρκή ανάδευση κάτω από τρεχούμενο νερό.
- Έπειτα προστίθενται 20μL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (1% w/v) και ακολουθεί ελαφριά ανάμιξη.

- Το διάλυμα εν συνεχεία, τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο και προσθήκη εξαρτημάτων που ομοιάζουν με χτένες για περίπου 15 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα και να δημιουργηθούν τα μικρά βοθρία υποδοχής του δείγματος.
- Μετά την προσθήκη του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (1X TBE) στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται και το εκμαγείο που φέρει το πήκτωμα αгарόζης.
- 15 μ L από το μίγμα του προϊόντος της αντίδρασης PCR και του διαλύματος καταβύθισης τοποθετούνται στο «πηγαδάκι». Η χρωστική επιτρέπει στο δείγμα να καθιζάνει μέσα στα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί από την χτένα στο πήκτωμα, λόγω της παρουσίας σακχαρόζης.
- Εφαρμογή σταθερής ηλεκτρικής τάσης 120V για το βέλτιστο χρόνο που απαιτείται για το διαχωρισμό των μορίων του DNA.
- Λήψη φωτογραφίας μέσω ειδικών συστημάτων ύστερα από τοποθέτηση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (λάμπα UV) και αποθήκευση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή του αρχείου εικόνας σε κατάλληλη μορφή.



Εικόνα 2.2: Προετοιμασία ενός πηκτώματος αгарόζης για ηλεκτροφόρηση DNA Πηγή: https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4140/1/02_chapter_11.pdf

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- ✓ TBE 10x: 323.4g Tris, 165g Βορικό οξύ, 27.9g EDTA
Σε τελικό όγκο 3L με ddH₂O και το διάλυμα έχει αυτόματα pH=8.
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο : 1g/100 mL ddH₂O
- ✓ Αγαρόζη (Sigma)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

- ✓ Φούρνος μικροκυμάτων
- ✓ Ζυγαριά ακριβείας

2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2.2.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης

- Λήψη ιστών από το ποντίκι. Γρήγορη πλύση σε 1X PBS προκειμένου να απομακρυνθεί το αίμα. Κάθε δείγμα τοποθετείται σε σημειωμένο eppendorf και άμεσα σε υγρό άζωτο
- Προσθήκη 200-500μL κρύου διαλύματος λύσης (lysis buffer) με αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors) σε σωληνάρια eppendorf στον πάγο
- Μεταφορά των ιστών σε σωληνάριο eppendorf που περιέχει διάλυμα λύσης και ομογενοποίηση με μηχανικό γουδοχέρι
- Επώαση στους 4°C για 30min υπό συνεχή ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/ λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf
- Αποθήκευση στους -20°C
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- ✓ Διάλυμα λύσης (Lysis buffer): 50mM Tris HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton
- ✓ Protease inhibitors: 10μL PI cocktail σε 1mL διαλύματος λύσης

2.2.2 Υποκυτταρική κλασμάτωση (subcellular fractionation)

Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε αυτές που ανήκουν στο μιτοχονδριακό κλάσμα και σε αυτές που ανήκουν στο κυτταροπλασματικό κλάσμα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- Θανάτωση ποντικών και λήψη ιστών (50-100mg) ανά ποντίκι. Γρήγορη πλύση σε 1X PBS προκειμένου να απομακρυνθεί το αίμα. Γρήγορο στέγνωμα σε απορροφητικό χαρτί και μεταφορά σε σημειωμένο erpendorf. Άμεση μεταφορά του erpendorf σε υγρό άζωτο.
- Ομογενοποίηση ιστού σε 300μL διαλύματος απομόνωσης (MSHEB) που περιέχει αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors) για κάθε 100mg ιστού, με μηχανικό γουδοχέρι .
- Μεταφορά του ομογενοποιημένου υλικού σε νέο erpendorf και τοποθέτηση στον πάγο.
- Φυγοκέντρωση σε 1000g για 5 λεπτά στους 4 °C.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf και φυγοκέντρωση στα 12000g για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και φυγοκεντρείται ξανά 12000g για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Το νέο υπερκείμενο απορρίπτεται και πλέον διατηρούνται μόνο τα δυο erpendorfs με τα ιζήματα.
- Προσθήκη 100μL διαλύματος απομόνωσης (MSHEB) που περιέχει αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors) στο erpendorf που βρίσκεται το ίζημα της πρώτης φυγοκέντρωσης.
- Επαναδιάλυση του pellet και μεταφορά όλης της ποσότητας στο erpendorf που φέρει το δεύτερο ίζημα.
- Επαναδιάλυση και του δεύτερου pellet.
- Φυγοκέντρωση στα 12000g για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Επαναδιάλυση του pellet σε 40-50μL διαλύματος απομόνωσης (MSHEB) που περιέχει αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors).
- Αποθήκευση στους -20 °C.

- Υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- ✓ Διάλυμα MSHEB: 210mM mannitol, 70mM sucrose, 5mM HEPES, 1mM EGTA, 0.5% BSA pH 7.2. Ρύθμιση του pH με προσθήκη NaOH 0.1N και αποστείρωση του διαλύματος με διήθηση μέσω φίλτρου 0.2μm. Αποθήκευση στους 4 °C. Πριν την χρήση εμπλουτίζεται με 10μL/mL από κοκτέιλ με αναστολείς πρωτεασών (Roche, #04693116001).

ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ:

- ✓ Αποστειρωμένα eppendorfs 1.5mL
- ✓ Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

- ✓ Φυγόκεντρος

2.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης που περιέχεται σε ένα διάλυμα, η οποία βασίζεται στη χρήση χρωστικής η οποία σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν είναι προσδεσμένη σε πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595 nm.

Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Biorad Protein Assay (Biorad), το οποίο αλλάζει χρώμα ανάλογα με τις πρωτεΐνες που υπάρχουν σε κάθε δείγμα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πιάτο 96 πηγαδιών (Sarstedt). Το αντιδραστήριο αραιώνεται σε αναλογία 1:5 σε dH₂O και από το αραιωμένο διάλυμα που προκύπτει μοιράζονται 300μL σε κάθε πηγάδι. Προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς προστίθεται

κατάλληλη ποσότητα διαλύματος αλβουμίνης ορού μόσχου (Bovine serum albumin, BSA SIGMA, #A7906) 0.5 mg/mL στα αντίστοιχα πηγάδια του πιάτου. Συγκεκριμένα για την πρότυπη καμπύλη προστίθενται 1,2,4,6,8,10,12 μL σε 300 μL αντιδραστηρίου εις διπλούν για την αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια προστίθενται τα υπό προσδιορισμό δείγματα (2 μL / 300 μL αντιδραστηρίου), πάλι εις διπλούν. Ακολουθεί επώαση του πιάτου σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Εν συνεχεία, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 595nm με κατάλληλη συσκευή (Molecular Devices, Optimax microplate reader). Τέλος, δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη $y=a+bx$, όπου $y=\mu\text{g}$ και $x=\text{OD}$ και διαμέσου αυτής υπολογίζονται τα μg συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Τα πηκτώματα που χρησιμοποιούνται ευρύτατα σήμερα για το διαχωρισμό πρωτεϊνών είναι τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, μιας και παρέχουν καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με την αγαρόζη.

Το πήκτωμα σχηματίζεται με πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου, που οδηγεί στο σχηματισμό μακρών αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια $\text{N,N}'$ - μεθυλενο-δισ ακρυλαμίδης (bis). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια δυο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED ($\text{N,N,N}',\text{N}'$ - τετραμέθυλο – 2- διαμιναιθάνιο), το οποίο καταλύει τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το APS. Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου έχουν μεγαλύτερους πόρους και χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μακρομορίων μεγάλου μοριακού βάρους. Πηκτώματα με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 12%, έχουν μικρούς πόρους και χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό πρωτεϊνών μικρού σχετικά μοριακού βάρους.

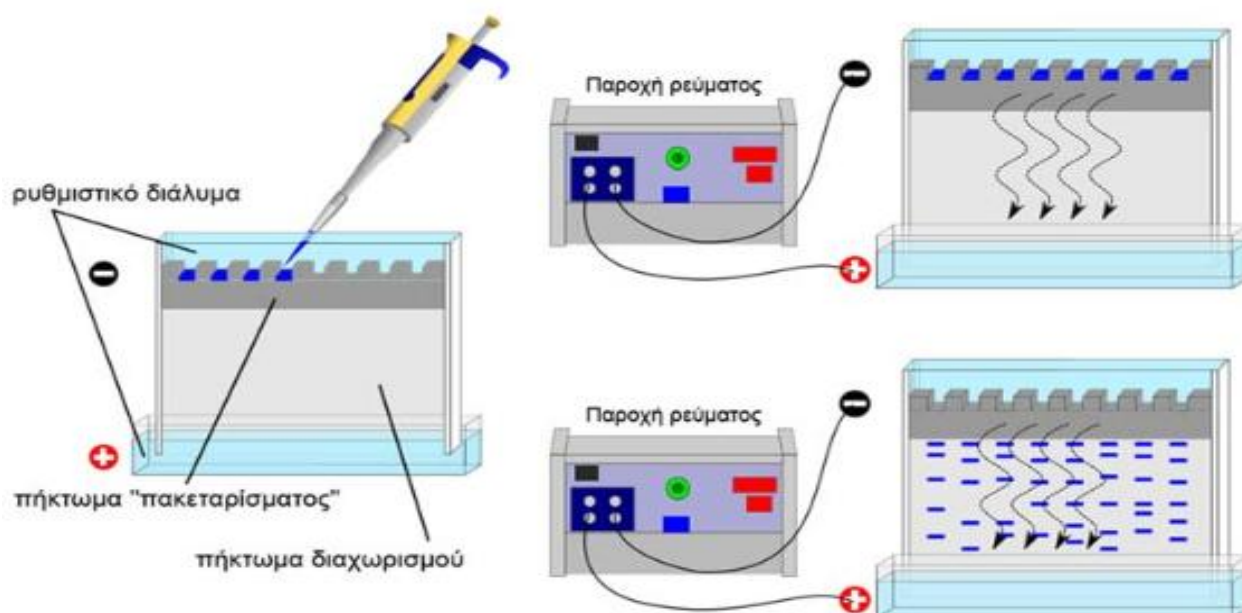
Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Πολύ συχνά, τα μακρομόρια αποδιατάσσονται πριν την ηλεκτροφόρηση, με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων αποδιατακτικών παραγόντων. Τέτοιοι αποδιατακτικοί παράγοντες είναι για τις πρωτεΐνες: το δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που

αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες ξεδιπλώνοντας πλήρως κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο πολυπεπτιδικής αλυσίδας-SDS που είναι φορτισμένο αρνητικά. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση και προσθήκη μερκαπτοαιθανόλης ή διθειοθρεϊτόλης, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες $-SH$ κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο. Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Πρωτεΐνες που αποτελούνται από περισσότερες από μια πολυπεπτιδικές αλυσίδες διαχωρίζονται με το SDS στις υπομονάδες τους και με την ηλεκτροφόρηση μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος κάθε μίας.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών «φορτώνονται» στα πηγάδια που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με τη βοήθεια ειδικής χτένας που τοποθετείται όσο το πήκτωμα δεν έχει ακόμα στερεοποιηθεί πλήρως. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου, θερμοκρασίας κ.λπ., και έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση ζωνών μεταξύ τους.

Μια παραλλαγή αυτού του τύπου ηλεκτροφόρησης είναι η ασυνεχής ηλεκτροφόρηση, όπου το πήκτωμα αποτελείται από δύο μέρη που διαφέρουν ως προς το μέγεθος των πόρων, έχουν ρυθμιστεί σε διαφορετικά pH και όπου διαφέρουν τα ρυθμιστικά διαλύματα του πηκτώματος και των ηλεκτροδίων (Εικόνα 2.3). Το μίγμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετακινείται από ένα πήκτωμα με μεγάλους πόρους (πήκτωμα «πακεταρίσματος») σε ένα πήκτωμα με μικρότερους πόρους που ακολουθεί (πήκτωμα διαχωρισμού). Το πήκτωμα πακεταρίσματος δεν διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσα στους πόρους του πηκτώματος διαχωρισμού σε απόσταση αντιστρόφως ανάλογη με τη μάζα τους. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής, οι πρωτεΐνες

στο πήκτωμα εμφανίζονται με χρώση κυανού του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue), χρώση αργύρου ή άλλες ειδικές χρώσεις. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν με ραδιενεργή σήμανση και εμφάνισή τους σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η SDS-ηλεκτροφόρηση είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική (αναλυτική) ικανότητα. Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε SDS-PAGE χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους και της σχετικής ποσότητας πρωτεϊνικών μορίων σε ένα δείγμα, αλλά και για τον καθαρισμό της κατανομής πρωτεϊνών σε διάφορα βιοχημικά εκχυλίσματα ιστών και κυττάρων. Είναι επίσης βήμα για άλλες τεχνικές, όπως το ανοσοαποτύπωμα Western, και η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 2.3: Επίπεδη ασυνεχής SDS- ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Παρουσιάζεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων και η κατεύθυνση μετακίνησης των πρωτεϊνών. Πηγή: https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4140/1/02_chapter_11.pdf.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Συναρμολογείται η συσκευή και τα τζαμάκια αφού τοποθετηθούν στο κατάλληλο πλαίσιο ελέγχονται για τυχόν διαρροές με την προσθήκη νερού.
- Αφού βεβαιώνεται ότι δεν υπάρχει διαρροή απομακρύνεται το νερό.
- Προετοιμάζεται το διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (Resolving gel) και προστίθεται στο καλούπι μεταξύ των γυάλινων τζαμιών. Η ευθυγράμμιση της

επιφάνειας γίνεται με προσθήκη μικρής ποσότητας ισοπροπανόλης. Ακολουθεί επώαση 30 min για πολυμερισμό του πηκτώματος.

- Στη συνέχεια απομακρύνεται η ισοπροπανόλη και η περίσσεια ξεπλένεται με dH₂O.
- Αφαιρείται όλη η ποσότητα του νερού και προστίθεται το διάλυμα συσσώρευσης (Stacking gel) καθώς και η ειδική χτένα προκειμένου να πολυμεριστεί το πηκτώμα και να διαμορφωθούν τα πηγάδια στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα. Για τον πολυμερισμό πραγματοποιείται επώαση για 30 min.
- Τέλος το πλαίσιο με τα τζαμάκια και το πηκτώμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία στη συνέχεια πληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού γίνεται η προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων ως εξής: 20μg πρωτεΐνης αραιώνονται σε 5x διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και dH₂O μέχρι τελικού όγκου 20μL. Τα δείγματα θερμαίνονται σε πλάκα θέρμανσης 100°C για 5 min και μεταφέρονται αμέσως στον πάγο. Έπειτα φυγοκεντρούνται (spin down) για τουλάχιστον 1 δευτερόλεπτο σε φυγόκεντρο. Ακολούθως, τόσο τα δείγματα όσο και οι αντίστοιχοι markers γνωστού μοριακού βάρους φορτώνονται στο πηκτώμα και αναλύονται με εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 90V έως 120V για χρόνο που εξαρτάται από τη φύση των πρωτεϊνών που επιδιώκεται να παρατηρηθούν. Οι συστάσεις των πηκτωμάτων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Resolving Gel (12%)	
30% Acrylamide	4 mL
1.5M Tris pH 8.8	2.5 mL
10% SDS	0.1 mL
dH ₂ O	3.3 mL
10% APS	100 μL
TEMED	5 μL
Σύνολο	10 mL

Stacking Gel (4%)	
30% Acrylamide	6.7mL
0.5M Tris pH 6.8	12.5 mL
10% SDS	0.5mL
dH ₂ O	30.25mL
Σύνολο	50 mL
Για κάθε gel προσθέτουμε σε 2mL διαλύματος 20μL 10% APS και 3μL TEMED	

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- ✓ Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris-glycine electrophoresis buffer): 25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS (10mL από 10% SDS)
- ✓ Διάλυμα φόρτωσης 5x (loading buffer): Για παρασκευή 15mL stock αναμιγνύονται: 1.5g SDS, 3.75mL 1M Tris pH 6.8, 0.015g μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma, #114391), 7.5mL Glycerol και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 15mL με ddH₂O. Πριν τη χρήση προστίθενται 50μL β-μερκαπτοαιθανόλης (Sigma, #M7522) ανά mL buffer.
- ✓ 30% Acrylamide (Applichem, #A0951)
- ✓ SDS (Fisher Scientific, #BP 166-500)
- ✓ APS: Amonium persulfate (Applichem, #A2941, 0100) σε ddH₂O
- ✓ TEMED: N,N,N',N' tetramethylethylenediamine (Fluka, #87689)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

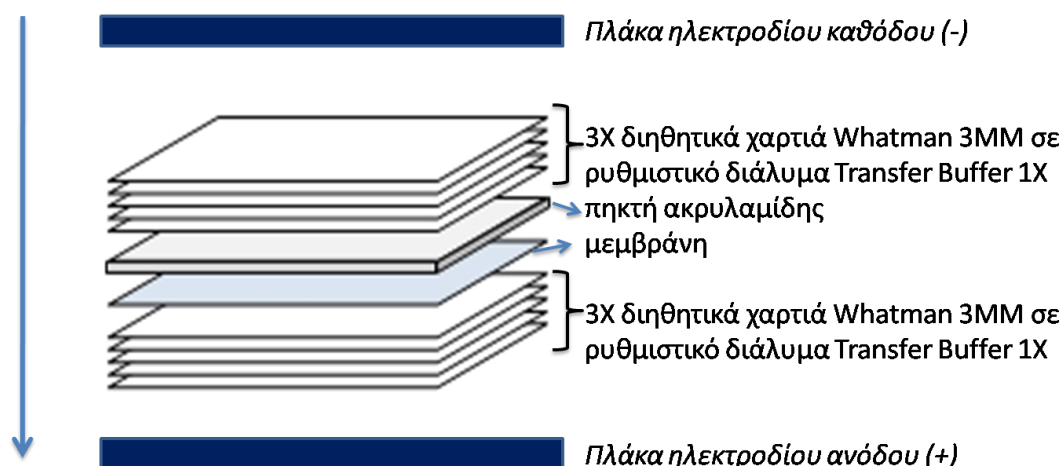
Western blot equipment

- ✓ Τροφοδοτικό συσκευής ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς (BIO-RAD)
- ✓ Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIO-RAD, Mini-Protean Tetra cell)
- ✓ Γυάλινα τζάμια-καλούπια (BIO-RAD, #1653308)

2.2.5 Μεταφορά (transfer) και Ανοσοαποτύπωμα Western

Το πηκτωμα διαχωρισμού τοποθετείται στη διάταξη μεταφοράς μεταξύ τεσσάρων διηθητικών χαρτιών Whatman και κατάλληλων σπόγγων (Εικόνα 2.4). Από την

πλευρά της ανόδου τοποθετείται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πάνω στο πήκτωμα, στις διαστάσεις του πηκτώματος (5 x 8 cm).



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής για την μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western.

- Η διάταξη τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς εμβαπτιζόμενη σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) και ακολούθως όλη η συσκευή βυθίζεται σε πάγο
- Η μεταφορά πραγματοποιείται εφαρμόζοντας ηλεκτρική τάση 110V για 60 min
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποσυναρμολόγηση της διάταξης και εμβάπτιση της μεμβράνης σε διάλυμα παρεμπόδισης (Blocking Solution) 1XTBS (5% άπαχο γάλα) είτε σε 1XPBS (5% BSA, 0.1%Tween-20), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση
- Εμβάπτιση της μεμβράνης σε διάλυμα παρεμπόδισης (Blocking Solution) που φέρει το πρωτογενές αντίσωμα και τοποθέτησή της στους 4°C όλη τη νύχτα υπό συνεχή ανάδευση
- Απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος και ξέπλυμα της μεμβράνης 3 φορές συνολικά με 1XTBS είτε με 1XPBS - 0.1%Tween-20 (ανάλογα με το διάλυμα παρεμπόδισης που χρησιμοποιήθηκε) σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η κάθε πλύση διαρκεί 10 min
- Εμβάπτιση της μεμβράνης σε κατάλληλα αραιωμένο διάλυμα παρεμπόδισης που φέρει το δευτερογενές αντίσωμα και επώασή της σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min, υπό συνεχή ανάδευση

- Απομάκρυνση του δευτερογενούς αντισώματος και ξέπλυμα της μεμβράνης 3 φορές συνολικά με 1XTBS είτε με 1XPBS - 0.1%Tween-20 (ανάλογα με το διάλυμα παρεμπόδισης που χρησιμοποιήθηκε) σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η κάθε πλύση διαρκεί 10 min
- Επώαση της μεμβράνης για 3 min στο διάλυμα εμφάνισης
- Εμφάνιση της μεμβράνης

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αντίστοιχες αραιώσεις τους φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Αντίσωμα (-anti)	Κλωνικότητα	Προμηθευτής	Αραίωση	Διαλύτης	Δεύτερο αντίσωμα (-anti)
SLC25A46	Πολυκλωνικό	Proteintech	1:5000	1x PBS	Rabbit
MFN1	Πολυκλωνικό	Santacruz	1:1000	1x PBS	Rabbit
MFN2	Πολυκλωνικό	Proteintech	1:500	1x PBS	Rabbit
DRP1	Πολυκλωνικό	Proteintech (12957-1-AP)	1:500	1x PBS	Rabbit
Mitofilin (IMMT)	Πολυκλωνικό	Proteintech (10179-1-AP)	1:500	1x TBS	Rabbit
CHCHD3	Πολυκλωνικό	Proteintech (25625-1-AP)	1:500	1x TBS	Rabbit
CHCHD6	Πολυκλωνικό	Proteintech (11663-1-AP)	1:500	1x TBS	Rabbit
TOMM40	Πολυκλωνικό	Proteintech (18409-1-AP)	1:500	1x PBS	Rabbit
GRP75	Πολυκλωνικό	Santa Cruz (sc-13967)	1:2500	1x TBS	Rabbit
COX-2	Μονοκλωνικό	Santa Cruz (sc-376861)	1:1000	1x PBS	Mouse
NDUFA10	Μονοκλωνικό	Santa Cruz (sc-376357)	1:1000	1x PBS	Mouse
NDUFA5	Μονοκλωνικό	Santa Cruz (sc-393273)	1:1000	1x PBS	Mouse

UQCRC2	Μονοκλωνικό	Santa Cruz (sc-390378)	1:1000	1x PBS	Mouse
SDHA	Μονοκλωνικό	Santa Cruz (sc-390381)	1:1000	1x PBS	Mouse
a-GAD65	Πολυκλωνικό	DSHB	1:100	1x PBS	Mouse
a-SV2	Πολυκλωνικό	DSHB	1:100	1x TBS	Mouse

Οι διαλύτες ήταν είτε 1xPBS (5% BSA, 0.1% Tween-20), είτε 1x TBS (5% άπαχο γάλα)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ :

- ✓ Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer): 3g 25mM Tris, 14.4g 192mM Glycine, 200mL methanol και συμπλήρωση με dH₂O μέχρι το 1L
- ✓ Διάλυμα παρεμπόδισης: 5% άπαχο γάλα σε 1XTBS ή 5% BSA, 0.1% Tween - 20 σε 1XPBS
- ✓ Διάλυμα 10X PBS (για την παρασκευή 1X PBS): 1.36 M NaCl (Fisher Scientific, #S/3160/65), 26.8 mM KCl (Applichem, #A3582), 81mM Na₂HPO₄ (Fisher Scientific, #7558-79-4), 14.6mM KH₂PO₄ (Fluka, #60230)
- ✓ Διάλυμα 10x TBS (για την παρασκευή 1X TBS): 1.38 M NaCl (Fisher Scientific, #S/3160/65), 27 mM KCl (Applichem, #A3582), 500mM Trizma Base (SIGMA, #T1503)

Διάλυμα εμφάνισης (ECL solution):

- ✓ Stock solutions: Luminol (Sigma, #A8511) 250mM σε DMSO (Sigma, #472301),
- ✓ Coumaric acid (Sigma, #C9008) 90mM σε 100% EtOH
- ✓ Hydrogen peroxide, 30% (Fluka, #95313)
- ✓ Tris-HCl, 2M, pH 8.5

Για κάθε εμφάνιση παρασκευάζονται φρέσκα τα κάτωθι διαλύματα Α και Β και αναμιγνύονται. Το διάλυμα που προκύπτει ονομάζεται διάλυμα εμφάνισης (ECL solution).

Διάλυμα Α		Διάλυμα Β	
Διάλυμα	Όγκος	Διάλυμα	Όγκος
dH ₂ O	2.33 mL	dH ₂ O	2.375 mL
2M Tris-HCl pH 8.5	125μL	2M Tris-HCl pH 8.5	125μL
Coumaric acid	11μL	Hydrogen Peroxide 30%	1.5μL
Luminol	25μL		
Total	2.5 mL	Total	2.5 mL

ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ

- ✓ Αποστειρωμένα σωληνάρια eppendorfs 0.2 και 1.5 mL
- ✓ Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips
- ✓ Σωληνάρια τύπου Falcon tube 15mL & 50mL

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ✓ Western blot equipment (Bio-Rad)
- ✓ Τροφοδοτικό
- ✓ Thermoblock
- ✓ Φυγόκεντρος

2.3 Διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label free quantification, LFQ)

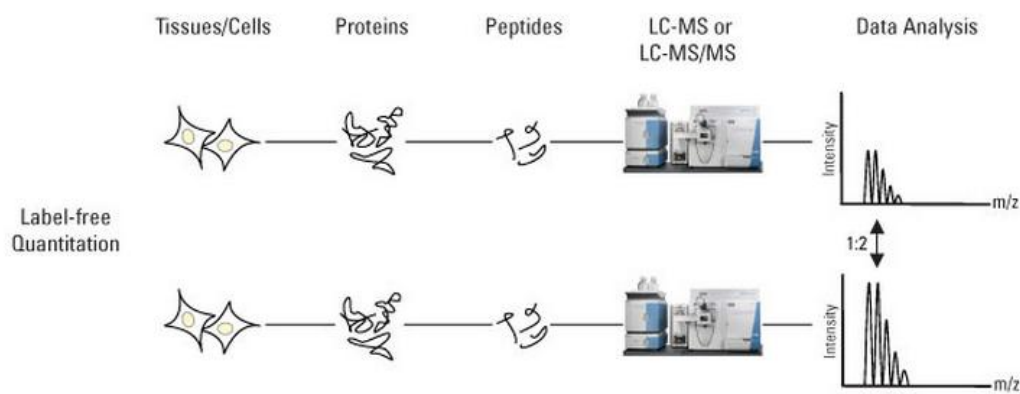
Η διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label free quantification, LFQ), είναι μια μέθοδος της πρωτεομικής που ως βασικό στόχο έχει τον προσδιορισμό της σχετικής ποσότητας των πρωτεϊνών σε δύο ή περισσότερα βιολογικά δείγματα. Η εν λόγω ανάλυση είναι μια γρήγορη και χαμηλού κόστους μέθοδος φασματομετρίας μάζας (LC/MS) και το γεγονός αυτό της προσδίδει σημαντικό συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι άλλων μεθόδων ανάλυσης.

Επιπρόσθετα, η διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση, δεν χρησιμοποιεί ισότοπα, τα οποία περιέχονται σε ενώσεις και σημαίνουν τις πρωτεΐνες, αλλά βασίζεται στην καταμέτρηση των φασματικών κορυφών.

Αναλυτικότερα, περιλαμβάνει την ανίχνευση των πεπτιδίων που προέκυψαν ύστερα από πέψη των πρωτεϊνών με τρυψίνη (Terzenidou et al., 2017), την αντιστοίχισή τους με πεπτίδια από πολλαπλά δεδομένα LC/MS και την επιλογή των πεπτιδίων που ξεχωρίζουν. Αρχικά, καταμετρώνται οι φασματικές κορυφές που εντοπίζονται για ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα και στη συνέχεια ενσωματώνονται τα αποτελέσματα για όλα τα πεπτίδια των πρωτεϊνών που ποσοτικοποιούνται.

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Μαρίας Ειρήνης Τερζενίδου με τίτλο «Μελέτη του παθογενετικού ρόλου του μιτοχονδριακού μεταφορέα SLC25A46 σε ένα γενετικό μοντέλο νευρολογικής νόσου στο ποντίκι » (Τερζενίδου Μ., 2017), χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής πίεσης (UltimateRSLC) σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στην Μονάδα Πρωτεομικής του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλ. Φλέμιγκ» από τη Δρ. Μ.Σαμιωτάκη, Ειδική Λειτουργός Επιστημονικής βαθμίδας Β. Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (whole protein extracts) από τον ιστό της παρεγκεφαλίδας, που απομονώθηκε από ποντίκια αγρίου τύπου καθώς και αταξικά (με 2 και 3 βιολογικές επαναλήψεις αντίστοιχα). Για το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ανωτέρω πρωτεομικής ανάλυσης έγινε με τα λογισμικά MaxQuant (1.6.0.16) και Perseus (έκδοση 1.5.6.0), τα οποία παρέχονται και υποστηρίζονται δωρεά από το Ινστιτούτο Βιοχημείας MaxPlanck στη Γερμανία. Το MaxQuant αναγνωρίζει τη μοριακή μάζα κάθε πεπτιδίου και τον χρόνο ανάλυσης και αντιστοιχεί τα πεπτίδια στην πρωτεΐνη που έχει προέλθει. Πέρα από την ταυτότητα των πρωτεϊνών του προς ανάλυση δείγματος, με ειδικούς λογαρίθμους το πρόγραμμα αποδίδει ποσοτική τιμή σε κάθε δείγμα και πραγματοποιεί κανονικοποίηση των δειγμάτων ώστε να είναι άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η ποσοτική τιμή για κάθε πρωτεΐνη δίνεται με τη μορφή LFQ (Label Free Quantification) και τα αποτελέσματα που παρέχονται χαρακτηρίζονται από πληρότητα, πιστότητα και ακρίβεια.



Εικόνα 2.5: Η διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label free quantification, LFQ) Πηγή: <https://www.creative-proteomics.com/services/label-free-quantification.htm>.

Τέλος, προκειμένου να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα της ανάλυσης από στατιστικής πλευράς, πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

1. Κατάλληλο φιλτράρισμα προς αφαίρεση των πρωτεϊνών που αναγνωρίζονται ως «πιθανές προσμίξεις (possible contaminants)».
2. Ομαδοποίηση όλων των επαναλήψεων ανά γονότυπο.
3. Φιλτράρισμα όλων των ομάδων πρωτεϊνών που προέκυψαν για την απόκτηση τουλάχιστον 3 έγκυρων τιμών από τις 6 και 9 αντίστοιχα συνολικές επαναλήψεις.
4. Φιλτράρισμα προκειμένου να περιέχονται τουλάχιστον δύο πεπτίδια ανά έγκυρη τιμή.
5. Αντικατάσταση των μηδενικών τιμών από μια χαμηλή τιμή, υποθέτοντας ότι η αντίστοιχη πρωτεΐνη βρίσκεται σε μικρή ποσότητα στο δείγμα, προς διευκόλυνση μεταξύ άλλων της οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων στη συνέχεια.
6. Μετασχηματισμός μέσω του λογισμικού Perseus των τιμών που παρέχονται από το λογισμικό MaxQuant (εντάσεις LFQ) σε λογαριθμικές (Log2).
7. Εφαρμογή κατάλληλου στατιστικού ελέγχου και συγκεκριμένα « Two-sided student t-test » με επίπεδο σημαντικότητας $p\text{-value} < 0.05$.

2.4 Ανάλυση DAVID και λογισμικό Enrichr

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης ανάλυσης χρησιμοποιείται η βάση δεδομένων DAVID (**D**atabase for **A**notation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery). Η εν λόγω βάση δεδομένων χρησιμοποιείται χαρακτηρισμό και οπτικοποίηση σχετικά με γονίδια ή/και πρωτεΐνες καθώς και για ολόκληρες λίστες με διαφορετικά γονίδια και πρωτεΐνες. Το συγκεκριμένο λογισμικό χρησιμοποιείται για την λειτουργική ταξινόμηση γονιδίων, την αναγνώριση του βιολογικού τους ρόλου, την εύρεση ομοιοτήτων μεταξύ γονιδίων, την εύρεση δυνητικών αλληλεπιδράσεων σε επίπεδο πρωτεϊνών καθώς και τη συσχέτιση γονιδίων με ασθένειες.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης η ανάλυση DAVID χρησιμοποιήθηκε για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των γονιδίων που σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης εμφάνιζαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους. Τέλος, το λογισμικό Enrichr χρησιμοποιήθηκε για την κατηγοριοποίηση των γονιδίων με βάση την ασθένεια, στην οποία έχουν βρεθεί πως εμπλέκονται σύμφωνα με τη βάση δεδομένων OMIM.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γονοτυπική ανάλυση αταξικών ποντικών

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, η μετατροπή μιας κυτοσίνης (C) σε θυμίνη (T) στο γονίδιο *Slc25a46* που ανιχνεύθηκε στο αταξικό (*Slc25a46^{atc/atc}*) μοντέλο, είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή του 96^{ου} αμινοξέος (γλουταμίνη) σε κωδικόνιο λήξης. Συνεπώς, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη συνίσταται από 95 αμινοξέα και φέρει μόνο το αμινοτελικό άκρο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, χωρίς τις διαμεμβρανικές περιοχές της. Προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει την ολική απώλεια της αγρίου τύπου 46kDa SLC25A46 πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια αταξικών ποντικών (Terzenidou et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη η συγκεκριμένη μετάλλαξη χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πραγματοποιηθεί η γονοτυπική ανάλυση όλων των αταξικών απογόνων (*Slc25a46^{atc/atc}*) καθώς και των ετερόζυγων ατόμων (*Slc25a46^{atc/+}*) που δεν έχουν τον αταξικό φαινότυπο. Μέχρι τώρα, η γονοτύπηση των αταξικών ποντικών γινόταν με αλληλούχηση της περιοχής που περιελάμβανε την μετάλλαξη μέσω πυροαλληλούχησης. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, δημιουργήθηκε μια εναλλακτική διαδικασία γονοτύπησης των εν λόγω ποντικών, που περιγράφεται στη συνέχεια και αποτελεί μια πιο οικονομική προσέγγιση σε σχέση με την πυροαλληλούχηση.

Γνωρίζοντας την ακριβή θέση της σημειακής μετάλλαξης στην νουκλεοτιδική ακολουθία των αταξικών ποντικών, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές που ενισχύουν μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) τμήμα του γονιδίου *Slc25a46* μεγέθους 504bp που περιλαμβάνει την περιοχή της μετάλλαξης (Εικόνα 3.1). Για την ταυτοποίηση των απογόνων που φέρουν την μετάλλαξη στον έναν αλληλόμορφο (*Slc25a46^{atc/+}*) ή και στους δύο αλληλομόρφους (*Slc25a46^{atc/atc}*) ή φέρουν μόνο αγρίου τύπου αλληλομόρφους (*Slc25a46^{+/+}*), πραγματοποιήθηκε πέψη του προϊόντος της αντίδρασης PCR με το περιοριστικό ένζυμο HpyCH4III (Εικόνα 3.1), που κόβει τη νουκλεοτιδική ακολουθία: 5'-ACNGT-3', όπου N συμβολίζει οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Η αντικατάσταση της κυτοσίνης (C) από θυμίνη (T) στην κωδική περιοχή του γονιδίου οδηγεί στην καταστροφή της θέσης κοπής από το ένζυμο HpyCH4III. Έτσι, η περιοχή που φέρει την μετάλλαξη στα αταξικά ποντίκια δεν αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού και δεν κόβεται σε αντίθεση με την αγρίου τύπου ακολουθία.

```

1  TGGAACTTGC CATGTGCTCA ACCAGAGTCA TTCACTATTT AAAGTGACTC CCGTTCCTAT ATCAGAATTT GAGGTTTAAA TGAACAGCAT GTTACTCTAA
   ACCTTGAACG GTACACGAGT TGGTCTCAGT AAGTGATAAA TTGACTGAGG GGACAGGTA TAGTCTTAAA CTCCAAATTT ACTTGTGCTA CAATGAGATT

           HpyCH4III                                     HpyCH4III
           ~~~~~~                                     ~~~~~~
101 AATCTTGGTT ATCAGAGTGA ATATAATATT GGTATGAGT AATCTTATTC CTTTATTTT AGAACAGTTG AATAGATTG CTGGATTGG TATTGGACTT
   TTAGAACCAA TAGTGTCACT TATATTATAA CCAATACTCA TTAGAATAAG GAAAATAAAA TCTTGTCAAC TTATCTAAAC GACCTAAACC ATAACGTGAA

201 GCAAGGTAAT CTTAAGATTT TTTAAATTTA TTTTGTGTTT TCCCTTAAA TATAATATTA AATGATTAAAC ATTTCTTCCT TTAGGTTTAA TTAACAGATT
   CGTTCCATTA GAATTCTAAA AAATTTAAAT AAAACTCAAA AAGGGAATTT ATATTATAAT TTACTAATTG TAAAGAAGGA AATCCAAAAT AATTGTCTAA

301 ATATACTTAC CTTGTGAAAA TTCATTATTT AGAATCTATA ACTTGATTTT AAATAGAGAG AGAAACCAGT CATTCCACTG CATAAACCTC AAAGTGATTT
   TATATGAATG GAACACTTTT AAGTAATAAA TCTTAGATAT TGAACATAAA TTTATCTCTC TCTTTGGTCA GTAAGGTGAC GTATTGGAG TTTCACTAAA

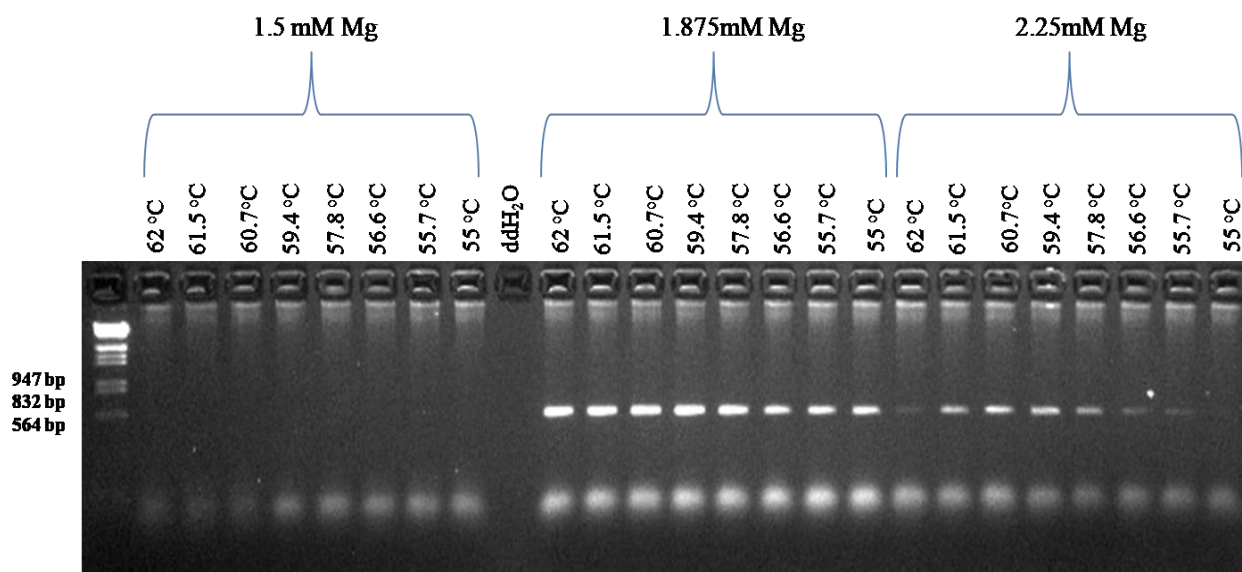
                                                                                                     HpyCH4III
                                                                                                     ~~~~~~
401 TGTAATGAAT ATAATTACTT TCATTAGTCT ATCAGAATAG AGTAGAATGT AATCCTCCTT CTCAGAGGGA TAGCATGATT AACAGTCTCC CTAACCTGG
   ACATTACTTA TATTAATGAA AGTAATCAGA TAGTCTTATC TCATCTTACA TTAGGAGGAA GAGTCTCCCT ATCGTACTAA TTGTCAGAGG GATTGGACC

501 CAGT
   GTCA

```

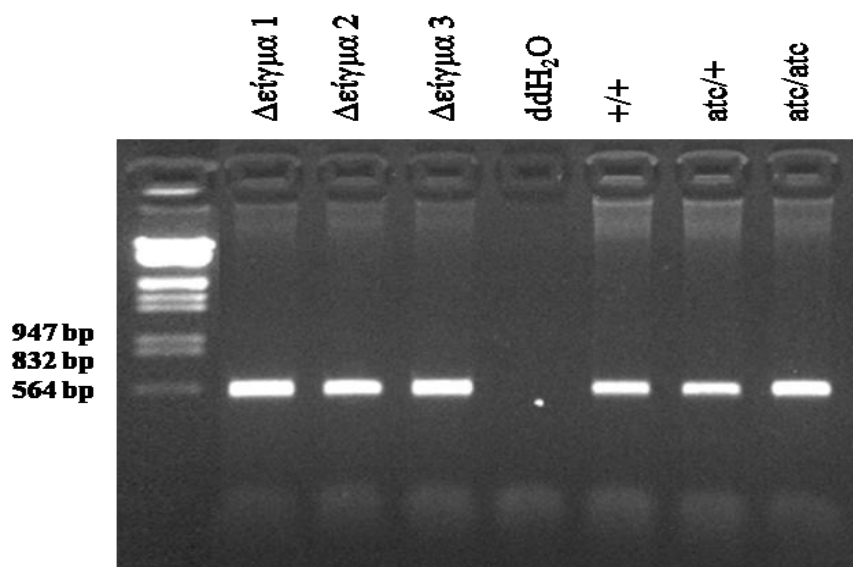
Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου *Slc25a46*, που χρησιμοποιήθηκε για την γονοτύπηση των *Slc25a46^{atc/atc}* ποντικών. Με πράσινο χρώμα φαίνεται η αλληλουχία του πρόσθιου εκκινητή και με μπλε χρώμα του ανάστροφου εκκινητή. Πάνω από την αλληλουχία φαίνονται οι τρεις θέσεις κοπής από το περιοριστικό ένζυμο HpyCH4III. Με κόκκινο χρώμα υποδεικνύεται η θέση της σημειακής μετάλλαξης στα αταξικά ποντίκια, η οποία καταστρέφει μια θέση κοπής για το HpyCH4III. Έτσι το ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει τρεις θέσεις πρόσδεσης στα αγρίου τύπου ποντίκια έναντι δύο στα αταξικά, γεγονός που καθιστά διαφορετικά τα προϊόντα της εκάστοτε πέψης και προσφέρει τη δυνατότητα γονοτύπησης των ποντικών.

Αρκετές δοκιμές έλαβαν χώρα προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την αντίδραση PCR (Εικόνα 3.2) μέσω της διαδικασίας της βαθμιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Gradient PCR). Συνολικά, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις μαγνησίου (1,5 /1,875 /2,25 mM αντίστοιχα σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL) και για κάθε μια εξετάστηκαν συνδυαστικά 8 διαφορετικές θερμοκρασίες σε εύρος από 55 °C έως 62 °C (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα αντίδρασης PCR για τους διαφόρους συνδυασμούς συγκέντρωσης Mg και θερμοκρασίας υβριδισμού για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης. Το PCR προϊόν μεγέθους 504bp αναλύθηκε σε 2% πήκτωμα αγαρόζης. Στην πρώτη θέση έχουν αναλυθεί γνωστά μοριακά βάρη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι ο βέλτιστος συνδυασμός συγκέντρωσης Mg και θερμοκρασίας υβριδισμού για την εν λόγω αντίδραση PCR είναι 1.875mM Mg και 60 °C, αντίστοιχα. Η επιτυχής έκβαση της αντίδρασης PCR επιβεβαιώθηκε έπειτα από ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2% (Εικόνα 3.3).

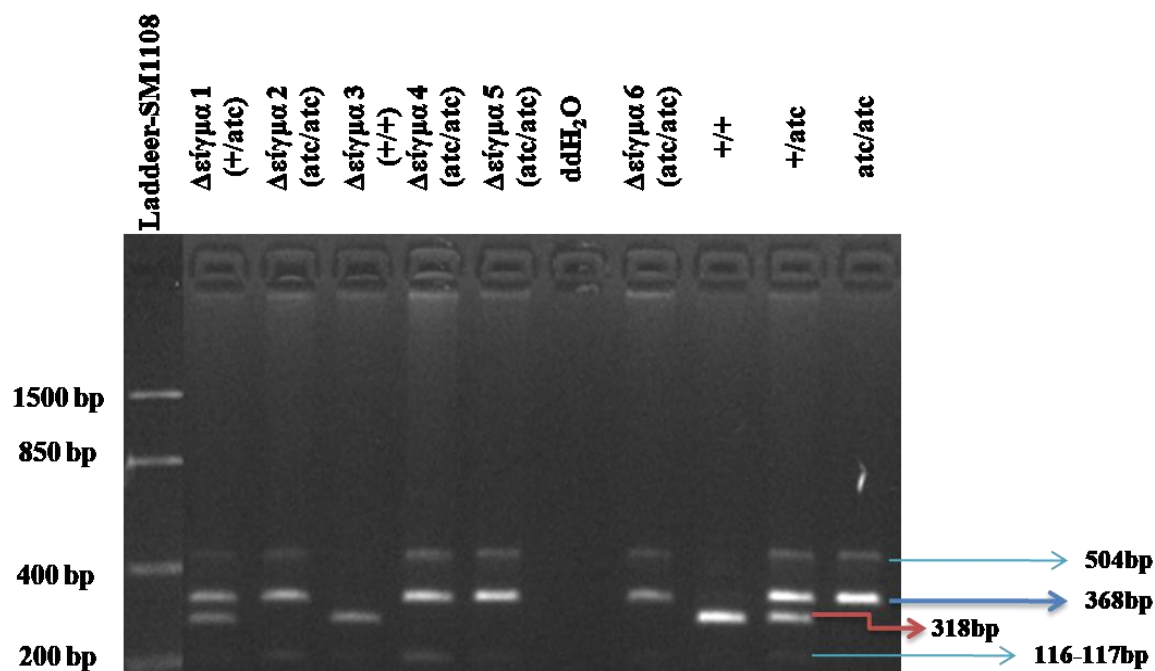


Εικόνα 3.3: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση του επιθυμητού προϊόντος της αντίδρασης PCR μεγέθους 504bp σε υπό εξέταση δείγματα και δείγματα αναφοράς. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης. Στην πρώτη θέση έχουν αναλυθεί γνωστά μοριακά βάρη, ακολουθούν τρία δείγματα, νερό (ddH₂O) για έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης στην αντίδραση και αντιπροσωπευτικοί μάρτυρες για τους τρεις γονοτύπους, όπου +/+ : αγρίου τύπου, +/atc: ετερόζυγα, atc/atc: ομόζυγα ποντίκια.

Όπως αναφέρθηκε, το περιοριστικό ένζυμο HpyCH4III αναγνωρίζει και κόβει την αγρίου τύπου αλληλουχία και όχι αυτή που περιέχει την *atc* μετάλλαξη. Φυσιολογικά, στα δείγματα αγρίου τύπου υπάρχουν τρεις θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου στο προϊόν της αντίδρασης PCR (Εικόνα 3.1), που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία τεσσάρων τμημάτων DNA με μοριακά βάρη 50bp, 117bp, 318 bp και 19bp, αντίστοιχα. Στην περίπτωση που υπάρχει η C→T μετάλλαξη, το ένζυμο αναγνωρίζει δύο μόνο περιοχές και τα τμήματα που προκύπτουν έχουν μοριακά βάρη 116bp, 368bp και 20bp. Σύμφωνα λοιπόν με όσα προαναφέρθηκαν, ύστερα από πέψη προκύπτουν τρεις πιθανές περιπτώσεις:

- **1^η περίπτωση:** Σε περίπτωση ποντικών αγρίου τύπου (*Slc25a46*^{+/+}), αναμένεται να προκύψουν τα εξής προϊόντα πέψης με τη σειρά από 5' προς 3': 50bp, 117bp, 318bp, 19bp.
- **2^η περίπτωση:** Σε περίπτωση ποντικών με αταξικό φαινότυπο, δηλαδή ομοζυγωτών ως προς τον υπολειπόμενο αλληλόμορφο (*Slc25a46*^{atc/atc}), αναμένεται να προκύψουν τα εξής προϊόντα πέψης: 116bp, 368bp, 20bp .
- **3^η περίπτωση:** Σε περίπτωση ποντικών ετεροζυγωτών ως προς την εν λόγω μετάλλαξη (*Slc25a46*^{+/atc}), αναμένεται να προκύψουν τα εξής προϊόντα πέψης: 50bp, 117bp, 318bp, 19bp, 116bp, 368bp, 20bp.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης φαίνονται στην Εικόνα 3.4, όπου τα προϊόντα της PCR αντίδρασης, υπέστησαν πέψη με HpyCH4III και στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 2% αγαρόζης. Να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκαν και τμήματα άκοπου DNA (504bp), ενώ για πρακτικούς λόγους τμήματα DNA με μέγεθος μικρότερο από 100bp δεν παρουσιάζονται.



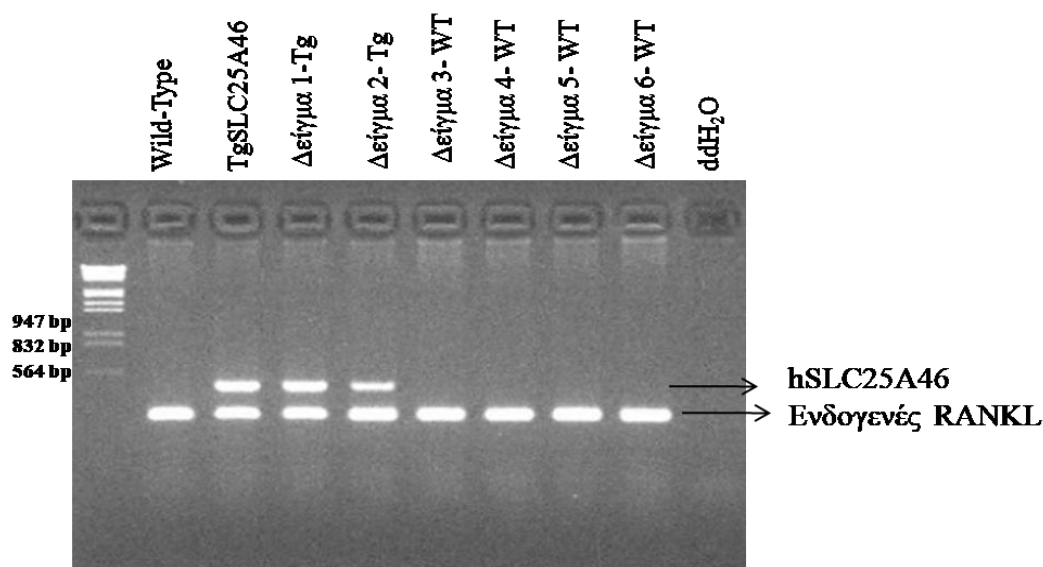
Εικόνα 3.4: Γονοτυπική ανάλυση των *Slc25a46*^{atc/atc} ποντικών και των αδελφών τους. Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης. Στην πρώτη θέση έχουν αναλυθεί γνωστά μοριακά βάρη και ακολουθούν τα υπό εξέταση δείγματα. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί αντιπροσωπευτικοί μάρτυρες για τους τρεις γονοτύπους, όπου +/+ : αγρίου τύπου, +/atc: ετερόζυγα, atc/atc: ομόζυγα ποντίκια, καθώς και νερό (ddH₂O) για έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης στην αντίδραση. Δεξιά επισημαίνονται τα μοριακά βάρη των PCR προϊόντων.

3.2 Γονοτυπική ανάλυση TgSLC25A46 διαγονιδιακών ποντικών

Τα TgSLC25A46 διαγονιδιακά ποντίκια δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της μικροένεσης (microinjection) σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων (Douni et al., 2004). Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά η διαγονιδιακή σειρά Tg1351 που φέρει 2 αντίγραφα του ανθρώπινου γονιδίου *SLC25A46* (Terzenidou et al., 2017). Τα εν λόγω ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων παρεγκεφαλίδας, ως μάρτυρες στα πλαίσια της πρωτεομικής ανάλυσης (Ενότητα 3.3).

Στα πλαίσια της γονοτυπικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Ένα ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ενδογενούς γονιδίου *Rankl* του ποντικίου και το μέγεθος του προϊόντος που προκύπτει από την αντίδραση PCR είναι 317bp. Το συγκεκριμένο προϊόν χρησιμοποιείται ως ένδειξη για

την επιτυχή πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR. Επιπρόσθετα, στην ίδια αντίδραση χρησιμοποιείται και δεύτερο ζεύγος εκκινητών για την ανίχνευση του ανθρώπινου *SLC25A46* διαγονιδίου δίνοντας ένα προϊόν 484bp. Σύμφωνα λοιπόν με τα ανωτέρω, αναμένονται δυο προϊόντα, 317 και 484bp αντίστοιχα, στην περίπτωση των διαγονιδιακών ποντικών και ένα προϊόν στην περίπτωση ποντικών αγρίου τύπου (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Γονοτυπική ανάλυση των TgSLC25A46 ποντικών. Ταυτοποίηση διαγονιδιακών ποντικών με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το ανθρώπινο διαγονίδιο *hSLC25A46* (άνω ζώνη) και για το ενδογενές γονίδιο *Rankl* (κάτω ζώνη) ως μάρτυρα. Στην πρώτη θέση έχουν αναλυθεί γνωστά μοριακά βάρη. TgSLC25A46: διαγονιδιακό ποντίκι (θετικός μάρτυρας), Wild-Type: αγρίου τύπου (αρνητικός μάρτυρας), ddH₂O: νερό (αρνητικός μάρτυρας).

3.3 Πρωτεομική ανάλυση στο *Slc25a46^{atc/atc}* μοντέλο

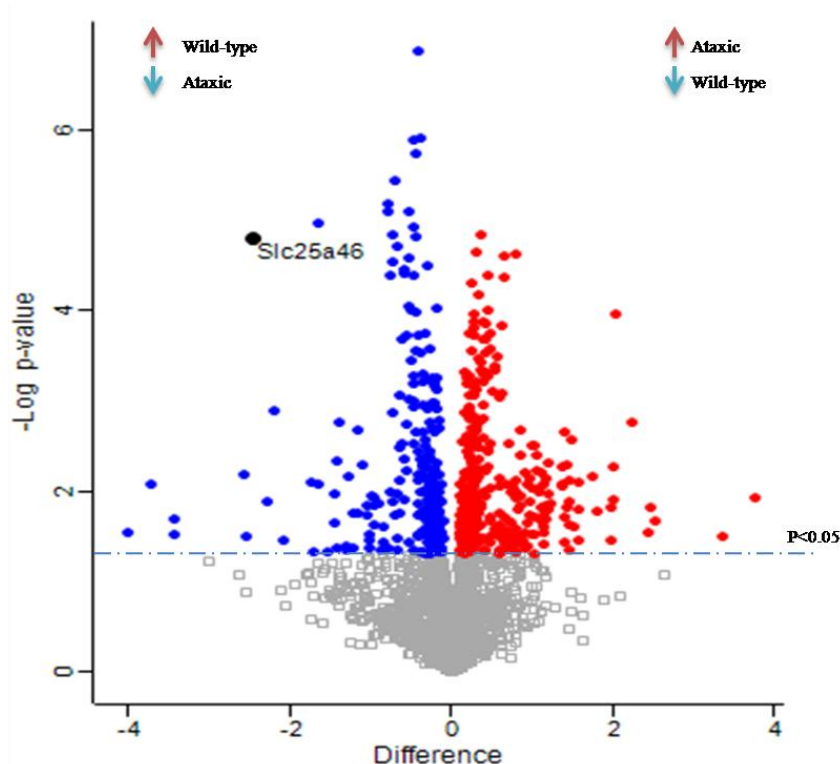
Στο παρελθόν, χρησιμοποιήθηκε από το εργαστήριό μας η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής πίεσης (Ultimate RSLC) σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), όπου παρατηρήθηκαν μεταβολές σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα πρωτεϊνών από παρεγκεφαλίδα μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών (Τερζενίδου M., 2017). Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εξετάσαμε εάν παρατηρούνται μεταβολές στο πρωτέωμα μεταξύ των δύο γονοτυπικών ομάδων όταν η απομόνωση αφορούσε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (whole protein extracts) χωρίς κλασμάτωση. Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τον ιστό της παρεγκεφαλίδας,

που απομονώθηκε από ποντίκια αγρίου τύπου καθώς και αταξικά (με 2 και 3 βιολογικές επαναλήψεις, αντίστοιχα και τρεις τεχνικές επαναλήψεις για κάθε δείγμα). Η απομόνωση των δειγμάτων και η φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) έγινε σε προγενέστερο στάδιο της παρούσας μελέτης. Τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης έχουν προκύψει μέσω της μεθόδου διαφορικής ανάλυσης πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label Free Quantification, LFQ).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής έγινε με το λογισμικό MaxQuant και η περαιτέρω επεξεργασία τους με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής ανάλυσης Perseus. Η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικού γονοτύπου απεικονίστηκε με τη δημιουργία διαγραμμάτων Volcano, όπου ο άξονας χ δείχνει τη ποσοτική μεταβολή της έκφρασης (difference) ενώ ο άξονας ψ τον αρνητικό λογάριθμο της στατιστικής σημαντικότητας, p (Εικόνα 3.6). Αριστερά του 0 στον άξονα χ αποτυπώνονται οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν μείωση στα αταξικά δείγματα, ενώ δεξιά εμφανίζονται οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν αύξηση σε αυτά σε σχέση με τα δείγματα αγρίου τύπου. Έχοντας λοιπόν ολοκληρώσει τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν περαιτέρω με το λογισμικό DAVID για την ομαδοποίηση των πρωτεϊνών σε κυτταρικές διεργασίες και λειτουργίες.

3.3.1 Πρωτεομική ανάλυση σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών

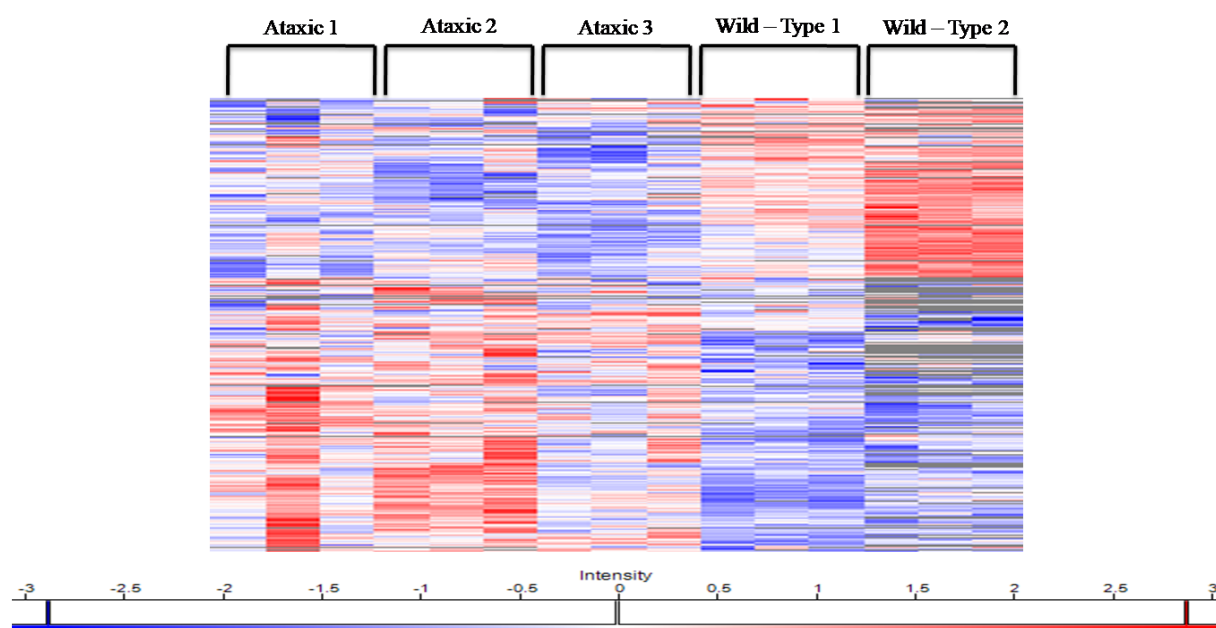
Κατά την πρωτεομική ανάλυση σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας από ποντίκια αγρίου τύπου καθώς και αταξικών πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση συνολικά 2971 πρωτεϊνών από τις οποίες οι 614 είναι μιτοχονδρικές. Η SLC25A46 πρωτεΐνη δεν ανιχνεύθηκε στην παρεγκεφαλίδα των αταξικών ποντικών (Εικόνα 3.6) παρά μόνο στην παρεγκεφαλίδα ποντικών αγρίου τύπου, σε συμφωνία με παράλληλα πειράματά μας με ανοσοαποτύπωμα Western (Εικόνα 3.9). Αυτό επιβεβαιώνει ότι η μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε στο *Slc25a46^{atc/atc}* μοντέλο οδηγεί σε μη παραγωγή της αγρίου τύπου SLC25A46 πρωτεΐνης *in vivo*.



Εικόνα 3.6: Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση σε παρεγκεφαλίδα μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών. Διάγραμμα Volcano σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας ποντικών αγρίου τύπου (Wild-type) και αταξικών (Ataxic). Η μαύρη κουκίδα πάνω αριστερά αντιστοιχεί στην SLC25A46 πρωτεΐνη. Με κόκκινο επισημαίνονται οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στα αταξικά ποντίκια ενώ με μπλε οι πρωτεΐνες που υπο-εκφράζονται στα ίδια δείγματα. Με γκρι επισημαίνονται οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν κάτω από το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας, που παριστάνεται με διακεκομμένη γραμμή ($p \leq 0.05$). Σημείωση: Η SLC25A46 πρωτεΐνη δεν ανιχνεύτηκε στα αταξικά δείγματα, ωστόσο η μηδενική της τιμή αντικαταστάθηκε από μια βασική χαμηλή τιμή (imputation) χάριν του διαγράμματος.

Περαιτέρω οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Perseus, μέσω της χρήσης θερμικού χάρτη (heat map). Στην εικόνα 3.7 παρουσιάζονται συνολικά οι πρωτεΐνες με στατιστική σημαντική διαφορική έκφραση μεταξύ των αταξικών και αγρίου τύπου ποντικών. Οι πρωτεΐνες που εμφάνισαν αυξορρύθμιση στα αταξικά σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ η μειορρύθμιση παριστάνεται με μπλε χρώμα. Κάθε στήλη αναπαριστά μία τεχνική επανάληψη (technical replicas) ενός βιολογικού δείγματος (τρεις επαναλήψεις ανά δείγμα). Συνολικά,

ταυτοποιήθηκαν 638 πρωτεΐνες που διέφεραν μεταξύ των ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Θερμικός χάρτης (heatmap) που απεικονίζει τις πρωτεΐνες που εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην παρεγκεφαλίδα μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών. Ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν είναι 638 και είναι ομαδοποιημένες σε δύο κατηγορίες. Οι πρωτεΐνες που εμφάνισαν αυξορρύθμιση στα αταξικά επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, εκείνες που εμφάνισαν μειορρύθμιση με μπλε χρώμα, ενώ με λευκό χρώμα εκείνες χωρίς καμία ουσιαστική μεταβολή. Τέλος, με γκρι χρώμα επισημαίνονται οι πρωτεΐνες που δεν ανιχνεύτηκαν στο εν λόγω δείγμα. Συνολικά, αναπαρίστανται 3 δείγματα από αταξικά (Ataxic) και 2 δείγματα αγρίου τύπου (Wild-Type). Για κάθε ένα από τα πέντε δείγματα πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις (technical replicas). Κάθε στήλη αναπαριστά μια τεχνική επανάληψη για κάθε δείγμα, ενώ κάθε γραμμή αναπαριστά μια πρωτεΐνη.

Παλαιότερες επιστημονικές μελέτες, έδειξαν ότι η SLC25A46 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη δομή, τη λειτουργία και την οργάνωση των μιτοχονδρίων. Τέτοιες πρωτεΐνες ενδεικτικά είναι α) οι MFN1, MFN2, και OPA1, που συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή σύντηξη/σχάση, β) μέλη του συμπλόκου MICOS, όπως Mitofilin (IMMT ή Mic60), και CHCHD3 (Mic 19), γ) άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο MICOS, όπως η SAMM50 και τέλος δ) πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης όπως οι πορίνες (VDACs). Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι είτε ποσοτική σε επίπεδο έκφρασης είτε ποιοτική (π.χ ρύθμιση ολιγομερισμού) (Janer et al., 2016, Steffen et al.,

2016, Terzenidou et al., 2017, Duchesne et al., 2017, Li et al., 2017). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη SLC25A46, μπορεί δυνητικά να επηρεάζει είτε τα επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών (αύξηση ή μείωση) είτε να επηρεάζει τον de novo ολιγομερισμό τους, όπως στην περίπτωση των MFN1/2 (Janer et al., 2016, Steffen et al., 2016, Terzenidou et al., 2017, Duchesne et al., 2017, Li et al., 2017). Επιπρόσθετα, σύμφωνα με μία από τις πλέον πρόσφατες επιστημονικές μελέτες διατυπώθηκε η άποψη ότι η απουσία της πρωτεΐνης SLC25A46 δύναται να επηρεάσει την επιμέρους ενεργότητα και λειτουργία εν γένει των ενζυμικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας (Li et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη, λοιπόν, με τη χρήση του προγράμματος πρωτεομικής ανάλυσης Perseus, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών, καθώς και άλλων πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση στην παρεγκεφαλίδα μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών.

3.3.2 Επίδραση της SLC25A46 στο πρωτεϊνικό προφίλ συμπλόκων οργάνωσης των μιτοχονδρίων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης, τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών με καίριο ρόλο στη δομική οργάνωση των μιτοχονδρίων, όπως οι MNF1, MFN2, OPA1 και MFF, αλλά και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μεταφορά των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα όπως οι TOMM22 και TIMM44, παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική μεταβολή στην παρεγκεφαλίδα των αταξικών ποντικών συγκριτικά με τα αγρίου τύπου αδέλφια τους (Πίνακας 3.1). Αντίθετα, οι πρωτεΐνες DRP1, IMMT, CHCHD3, CHCHD6, TOMM40, TOMM70a, SAM50, ATP5A1 καθώς και οι πορίνες VDAC1/VDAC2 σημειώνουν μικρή αλλά μη στατιστικά σημαντική μεταβολή, μεταξύ αταξικών και αγρίου τύπου δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η έλλειψη της SLC25A46 επηρεάζει την δομική οργάνωση των μιτοχονδρίων και τη δυναμική τους.

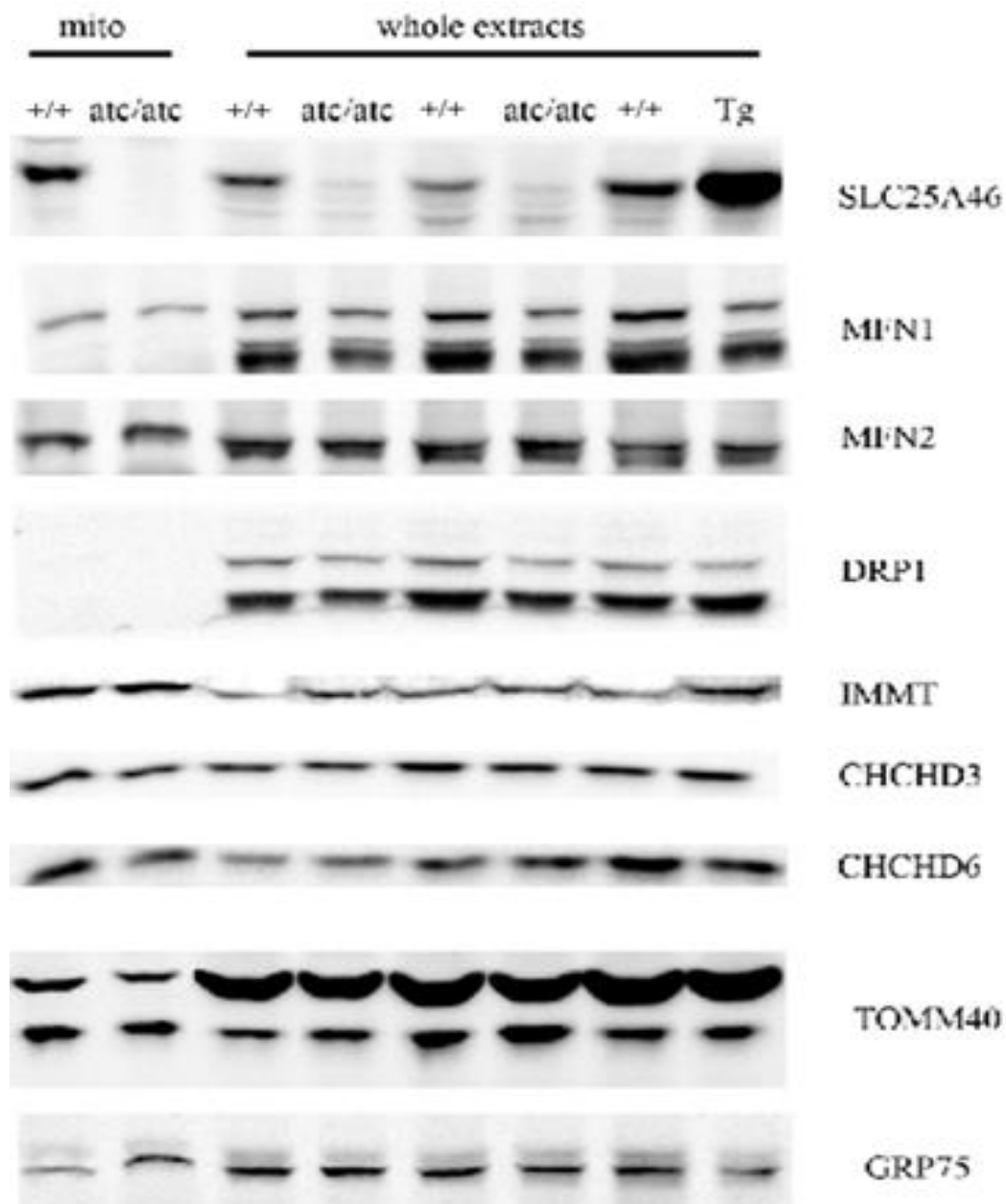
Περαιτέρω επιλεκτική επιβεβαίωση των ανωτέρω αποτελεσμάτων επιχειρήθηκε με ανοσοαποτύπωμα Western τόσο σε μιτοχονδριακά όσο και σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας για την έκφραση των εξής πρωτεϊνών: MFN1, MFN2, DRP1, IMMT, CHCHD3, CHCHD6, TOMM40 (Εικόνα 3.8). Η απομόνωση έγινε από ποντίκια αγρίου τύπου, αταξικά και διαγονιδιακά για το

SLC25A45 γονίδιο (TgSLC25A46). Όπως και στην πρωτεομική ανάλυση, το Western έδειξε απουσία της πρωτεΐνης SLC25A46 στα αταξικά δείγματα, ενώ υπήρχε έκφραση στα ποντίκια αγρίου τύπου και υπερέκφραση στα TgSLC25A46. Επίσης, η πρωτεΐνη DRP1 δεν εντοπίζεται στα μιτοχονδριακά δείγματα, όπως αναμενόταν, καθώς εκ φύσεως βρίσκεται εκτός του μιτοχονδρίου. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στις ελεγχθείσες πρωτεΐνες μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών προσεγγίσεων (πρωτεομική ανάλυση και ανοσοαποτύπωμα Western) εμφάνισαν στην πλειοψηφία τους πλήρη ταύτιση. Αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν όπως στην περίπτωση των πρωτεϊνών MFN1 και MFN2, πιθανόν οφείλονται στο γεγονός ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ δειγμάτων αγρίου τύπου και αταξικών είναι τόσο μικρή που καθίσταται δυσδιάκριτη με τη μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος Western. Μάλιστα, πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν καταδείξει πως σύγχρονες μέθοδοι πρωτεομικής ανάλυσης που έχουν ως βάση την τεχνική της φασματομετρίας μάζας (MS), τείνουν να καταστούν πιο αξιόπιστες στα πλαίσια μια ποσοτικής ανάλυσης συγκριτικά μέθοδο ανοσοαποτυπώματος Western (Aebersold et al., 2013).

Πίνακας 3.1: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης με το λογισμικό Perseus. Αποτυπώνεται η διαφορά στην έκφραση (εκφρασμένη ως Log2 φορές διαφορά) των αναφερόμενων πρωτεϊνών στα δείγματα της παρεγκεφαλίδας μεταξύ αγρίου τύπου και αταξικών ποντικών. Η αυξημένη έκφραση στα αταξικά δείγματα έχει θετικό πρόσημο, ενώ η μειωμένη αρνητικό. ^ω: η διαφορά είναι άπειρη διότι η SLC25A46 πρωτεΐνη δεν ανιχνεύτηκε στα αταξικά δείγματα. Με * υποδεικνύεται η στατιστικά σημαντική διαφορά στην τιμή p (*p<0.05 **p<0.01 και *** p<0.001).

Παρεγκεφαλίδα			
Πρωτεΐνη	Διαφορά	Έκφραση	P-value
SLC25A46	^ω (μόνο στα WT)		Δεν ανιχνεύτηκε
Σύντηξη/Σχάση			
MFN1	2.45615	↑	0.01499*
MFN2	0.613107	↑	0.00015***
DRP1	-0.041127	↓	0.57907
OPA1	0.17446	↑	0.01308*
MFF	0.213447	↑	0.03698*
Σύνπλοκο MICOS			
IMMT	-0.0615798	↓	0.34151
CHCHD3	0.0459541	↑	0.58529
CHCHD6	0.158917	↑	0.36499
Μεταθετάσεις			
TOMM22	0.150403	↑	0.03510*
TOMM40	0.0749548	↑	0.33657
TIMM44	0.368135	↑	0.00045***
TOMM70a	0.0737788	↑	0.30054
SAM			
SAM50	0.0396324	↑	0.55154
ATP			
ATP5A1	-0.0205247	↓	0.52824
Πορίνες			
VDAC1	-0.0250542	↓	0.67690
VDAC2	0.00434293	↑	0.93489



Εικόνα 3.8: Ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western τόσο σε μιτοχονδρικά (mito extracts) όσο και σε ολικά πρωτεϊνικά δείγματα (whole extracts) που προήλθαν από παρεγκεφαλίδα ποντικών αγρίου τύπου (+/+, n=3), αταξικών (atc/atc, n=2) καθώς και διαγονιδιακών TgSLC25A46 (Tg, n=1). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SLC25A46, MFN1, MFN2, DRP1, IMMT, CHCHD3, CHCHD6 και TOMM40. Ως θετικός μάρτυρας φορτώματος χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GRP75. Συνολικά, για κάθε δείγμα φορτώθηκαν 30μg πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές.

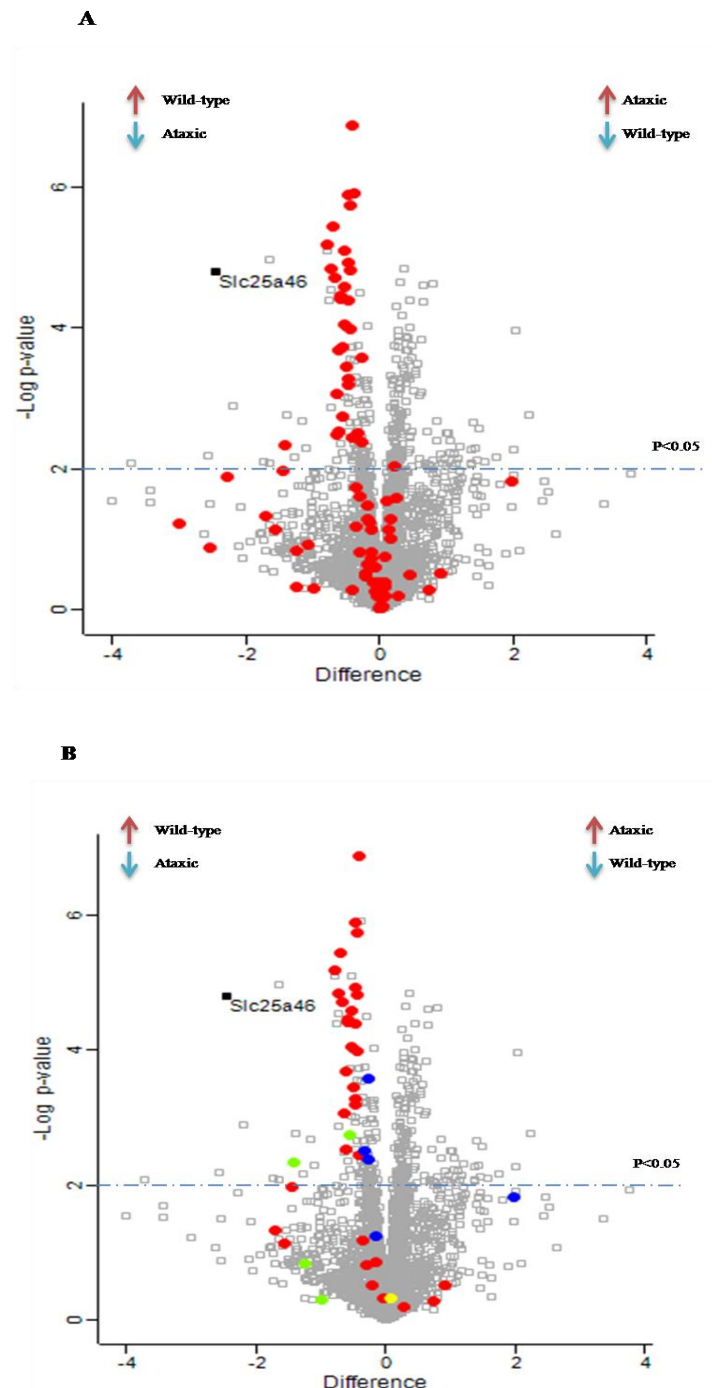
3.3.3 Επίδραση της SLC25A46 στα ενζυμικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας

Στα πλαίσια της πρωτεομικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης εμφάνισε μεταβολή μεταξύ των αταξικών και των αγρίου τύπου ποντικών (Εικόνα 3.9A). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα έκφρασης της πλειοψηφίας των πρωτεϊνών με καίριο ρόλο στη δομική οργάνωση των ενζυμικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, μεταβάλλονται στατιστικώς σημαντικά στην παρεγκεφαλίδα των αταξικών ποντικών συγκριτικά με τα αγρίου τύπου αδέλφια τους (Εικόνα 3.9B και Πίνακες 3.2, 3.3). Η σημαντικότερη ωστόσο μεταβολή παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι εμφανές πως τόσο οι δομικές πρωτεΐνες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, όσο και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην εξαιρετικά σημαντική βιολογική διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στην πλειοψηφία τους εμφανίζουν μειορρύθμιση στα αταξικά ποντίκια έναντι των ποντικών αγρίου τύπου. Μάλιστα, από τα αποτελέσματα της ανάλυσης ειδικά για τις δομικές πρωτεΐνες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, εξάγονται δύο ιδιαίτερες σημαντικές παρατηρήσεις. Συγκεκριμένα, από τις 67 συνολικά δομικές πρωτεΐνες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας που μελετήθηκαν, στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων έκφρασής τους εμφάνισαν οι 37. Από τις 37 αυτές πρωτεΐνες οι 26 ανήκουν στο σύμπλοκο I ενώ μόλις 11 μοιράζονται στα υπόλοιπα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας. Ακόμα, από τις 37 πρωτεΐνες μόλις μία εμφανίζει αυξημένη έκφραση, ενώ 36 εμφανίζουν σημαντική μείωση των επιπέδων τους.

Περαιτέρω επιλεκτική επιβεβαίωση των ανωτέρω αποτελεσμάτων επιχειρήθηκε με ανοσοαποτύπωμα Western για την έκφραση των εξής πρωτεϊνών: NDUFA5 και NDUFA10 για το σύμπλοκο I, SDHA για το σύμπλοκο II, UQCRC2 για το σύμπλοκο III και τέλος COX-2 για το σύμπλοκο IV (Εικόνα 3.10). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες COX-2, SDHA, NDUFA5 δεν παρουσίασαν μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης, ωστόσο οι COX-2 και NDUFA5, παρουσίασαν στατιστικώς

σημαντική μεταβολή στην πρωτεομική ανάλυση. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες NDUFA10, UQCRC2 παρουσίασαν μείωση στα αταξικά δείγματα έναντι των αγρίου τύπου, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης.



Εικόνα 3.9: Διάγραμμα Volcano σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας ποντικών αγρίου τύπου και αταξικών με εστίαση στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και στην δομική

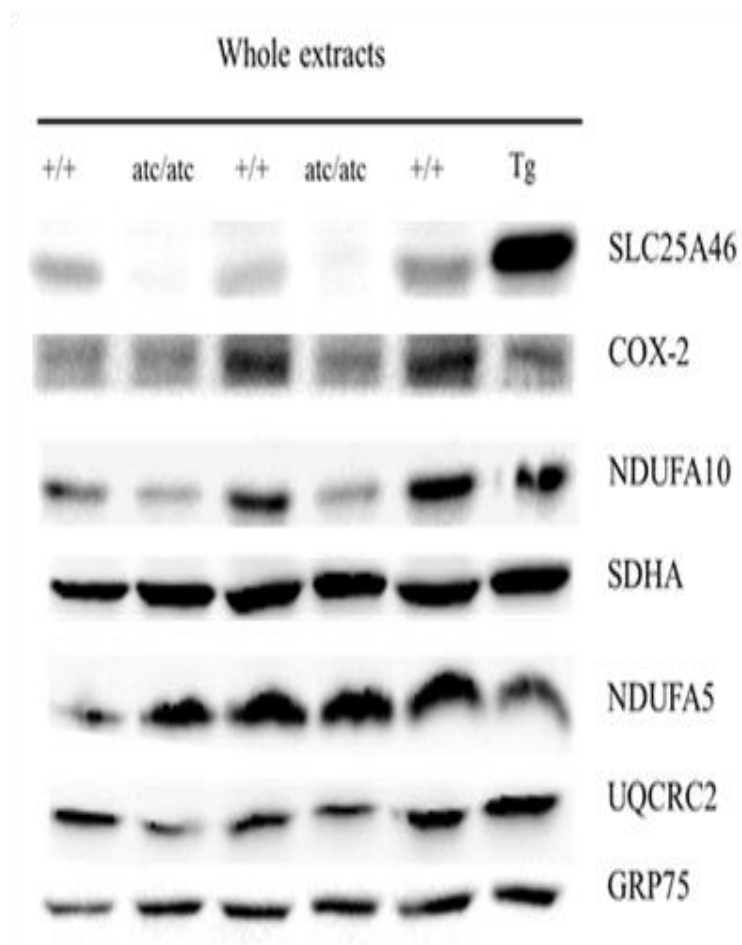
οργάνωση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. **A)** Με κόκκινο επισημαίνονται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών όλων των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. **B)** Ενδεικτικά, με κόκκινο επισημαίνονται βασικές δομικές πρωτεΐνες του συμπλόκου I, με κίτρινο του συμπλόκου II, με μπλε του συμπλόκου III και τέλος με πράσινο του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας.

Πίνακας 3.2: Μείωση (εκφρασμένη ως Log_2 διαφορά) στην έκφραση των πρωτεϊνών του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας στη παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών. Αποτελέσματα όπως παρέχονται από το διάγραμμα Volcano και την ανάλυση με το λογισμικό Perseus.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Με κόκκινο βέλος υποδηλώνεται η αυξημένη έκφραση.

Παρεγκεφαλίδα			
Πρωτεΐνη Σύνπλοκο I	Διαφορά	Έκφραση	P-value
ND4	-1,697	▼	0.04791*
ND6	-2,2845	▼	0.01311*
NDUFA2	0,89488	▲	0.31457
NDUFA4	-1,2527	▼	0.14442
NDUFA5	-0,731	▼	0.000014***
NDUFA6	-1,5612	▼	0.074122
NDUFA7	0,72245	▲	0.53467
NDUFA8	-0,6876	▼	0.000019***
NDUFA9	-0,7854	▼	0.000006***
NDUFA10	-0,5259	▼	0.000025***
NDUFA11	-0,7111	▼	0.000003***
NDUFA12	-0,4403	▼	0.000001***
NDUFA13	-0,4878	▼	0.000645***
NDUFAB1	-0,206	▼	0.30136
NDUFAF3	-0,0826	▼	0.79036
NDUFAF4	-0,1799	▼	0,678109
NDUFB4	-0,6536	▼	0.00085***
NDUFB5	-0,6242	▼	0.00297**
NDUFB6	-0,2956	▼	0.15513
NDUFB7	-0,433	▼	0.000015***
NDUFB8	-0,4195	▼	0.00365**
NDUFB9	-0,4399	▼	0.000106***
NDUFB10	-0,5811	▼	0.000034***
NDUFB11	-0,0496	▼	0,47603
NDUFC2	-0,3647	▼	0.06783
NDUFS1	-0,4266	▼	0.0000001***
NDUFS2	-0,4811	▼	0.000013***
NDUFS3	-0,5312	▼	0.000091***
NDUFS4	-0,4884	▼	0.00035***
NDUFS5	-0,315	▼	0.02544*
NDUFS6	-0,6263	▼	0.00020***
NDUFS7	-0,4757	▼	0.000401***
NDUFS8	-0,5755	▼	0.00003***
NDUFV1	-0,4613	▼	0.00001***
NDUFV2	-0,4623	▼	0.00052***
NDUFV3	-1,4567	▼	0.01081*

Πίνακας 3.3: Μείωση (εκφρασμένη ως Log_2 διαφορά) στην έκφραση των πρωτεϊνών των συμπλόκων III, IV και V της αναπνευστικής αλυσίδας στα δείγματα της παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών. Αποτελέσματα όπως παρέχονται από το διάγραμμα Volcano και την ανάλυση με το λογισμικό Perseus. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$. Με κόκκινο βέλος υποδηλώνεται η αυξημένη έκφραση.**

Παρεγκεφαλίδα			
Πρωτεΐνη	Διαφορά	Έκφραση	P-value
Σύμπλοκο II			
SDHA	0,063667	↑	0.17586
SDHB	0,068934	↑	0.47911
SDHC	-0,20065	↓	0.34073
Σύμπλοκο III			
UQCR10	1,961646	↑	0.15537*
UQCRB	-0,15161	↓	0.057233
UQCRC1	-0,28325	↓	0.00415**
UQCRC2	-0,26911	↓	0.00026***
UQCRFS1	-0,32128	↓	0.00307**
UQCRQ	-0,10915	↓	0.4093
Σύμπλοκο IV			
COX1	-1,42977	↓	0.00458**
COX2	-0,558	↓	0.00177**
COX4	-0,39208	↓	0.0000012***
COX5a	-0,5548	↓	0.000184***
COX6a	-1,00039	↓	0.49295
COX6b	-0,5246	↓	0.0000081***
COX7a	-0,3456	↓	0.01828*
Σύμπλοκο V			
ATPB	-1,13701	↓	0.49064
ATPJ2	-0,11787	↓	0.18890
ATP5a	-0,02052	↓	0.52824
ATP5B	0,008724	↑	0.88451
ATP5C1	-0,12703	↓	0.24171
ATP5D	-2,54271	↓	0.13379
ATP5F1	-0,00721	↓	0.93417
ATP5H	-0,18172	↓	0.05086
ATP5J	0,137813	↑	0.075258
ATP5k	0,059563	↑	0.65083
ATP5L	-0,63394	↓	0.00336**
ATP5O	-0,12368	↓	0.07499
ATP6ap1	-0,06611	↓	0.54648
ATP8	-1,25346	↓	0.48785



Εικόνα 3.10: Ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western των επιπέδων αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνών των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας σε ολικά πρωτεϊνικά δείγματα (whole extracts) που προήλθαν από παρεγκεφαλίδα ποντικών αγρίου τύπου (+/+, n=2), αταξικών (atc/atc, n=2) καθώς και διαγονιδιακών (Tg, n=1). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SLC25A46, NDUFA5, NDUFA10, SDHA, UQCRC2, COX-2. Ως θετικός μάρτυρας φορτώματος χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GRP75. Το πείραμα επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών προσεγγίσεων (πρωτεομική ανάλυση και ανοσοαποτύπωμα Western) συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό. Αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης NDUFA5, που σύμφωνα με την πρωτεομική ανάλυση μειώνεται, ενώ σύμφωνα με το ανοσοαποτύπωμα Western παραμένει αμετάβλητη η έκφρασή της, πιθανόν οφείλονται στο γεγονός ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ δειγμάτων αγρίου τύπου και αταξικών είναι τόσο μικρή που καθίσταται δυσδιάκριτη με τη

μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος Western, πιθανόν και λόγω μειωμένης αποτελεσματικότητας του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε ή λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας της φασματομετρίας μάζα (MS) σε σχέση το ανοσοαποτύπωμα Western (Aebersold et al., 2013).

3.3.4 Συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης DAVID

Επιπρόσθετα της πρωτεομικής ανάλυσης που προηγήθηκε, πραγματοποιήθηκε ανάλυση DAVID. Η εν λόγω ανάλυση εφαρμόστηκε τόσο για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στα δείγματα της παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών (κόκκινο χρώμα/δεξιά του 0 στον άξονα χ, Εικόνα 3.6), όσο και για τα γονίδια που υποεκφράζονται στα ίδια δείγματα (μπλε χρώμα/ αριστερά του 0 στον άξονα χ, Εικόνα 3.6). Σύμφωνα με την παρούσα ανάλυση τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στην πρωτεομική ανάλυση, κατατάσσονται σε συγκεκριμένες κατηγορίες με γνώμονα τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν καθώς και τις λειτουργίες που επιτελούν. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ανάλυσης παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.4 και 3.5.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4 η πλειοψηφία των γονιδίων που υπερεκφράζονται στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών εμπλέκονται στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς πρωτεϊνών. Επίσης, παρατηρείται υπερέκφραση σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρώνων, πιθανώς ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός για την ρύθμιση του νευρολογικού φαινοτύπου. Από την άλλη πλευρά, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.5, η πλειοψηφία των γονιδίων που υποεκφράζονται στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών εμπλέκονται σε διεργασίες που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο και συγκεκριμένα την παραγωγή ATP και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επίσης, ένας κρίσιμος αριθμός γονιδίων που σχετίζεται με την εύρυθμη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων χαρακτηρίζεται από σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης, υποδεικνύοντας κατάρρευση της κυτταρικής αναπνοής.

Πίνακας 3.4: Λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων που υπερεκφράζονται στα δείγματα της παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών όπως παρέχονται από την ανάλυση DAVID.

Λειτουργικός χαρακτηρισμός (Functional Annotation)	Αριθμός γονιδίων	P-Value
Αμινοακετυλίωση tRNA (tRNA aminoacylation)	13	2.5E-10
Ενδοκυτταρική μεταφορά (Intracellular transport)	42	2.4E-10
Ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών (Intracellular protein transport)	28	8.7E-8
Κυτταρική τοποθέτηση πρωτεϊνών (Cellular protein localization)	28	6.6E-7
Μεταφορά πρωτεϊνών (Protein transport)	40	1.1E-6
Καταβολισμός οργανικών οξέων (Organic acid catabolic process)	14	1.2E-6
Μεταφορά κυστιδίων (Vesicle-mediated transport)	33	2.0E-6
Πρωτεϊνική στόχευση (Protein targeting)	18	7.0E-6
Επεξεργασία mRNA (mRNA processing)	22	1.1E-5
Μετάφραση (Translation)	22	1.8E-5
Ανάπτυξη νευρώνων (Neuron development)	22	2.6E-5
Διαφοροποίηση νευρώνων (Neuron differentiation)	24	1.4E-4

Πίνακας 3.5: Λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων που υποεκφράζονται στα δείγματα της παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών όπως παρέχονται από την ανάλυση DAVID.

Λειτουργικός χαρακτηρισμός (Functional Annotation)	Αριθμός γονιδίων	P-Value
Σύνθεση ATP (ATP synthesis)	25	1.9E-29
Παραγωγή πρόδρομων μεταβολιτών και ενέργειας (Generation of precursor metabolites and energy)	43	6.3E-28
Αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Respiratory electron transport chain)	25	1.0E-27
Κυτταρική αναπνοή (Cellular respiration)	28	4.9E-27
Οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative phosphorylation)	28	6.6E-27
Παραγωγή ενέργειας με οξείδωση οργανικών ενώσεων (Energy derivation by oxidation of organic compounds)	29	2.6E-23
Αντιδράσεις Οξειδοαναγωγής (Oxidation –Reduction reactions)	41	1.6E-14
Φωσφορυλίωση (Phosphorylation)	34	1.7E-7
Μεταφορά πρωτεϊνών (Protein transport)	29	1.4E-5
Οργάνωση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Protein complex assembly)	19	7.6E-4
Οργάνωση μεγαλομοριακών συμπλόκων (Macromolecular complex assembly)	22	1.3E-3
Μεταφορά ιόντων (Ion transport)	20	2.6E-2

Επιπρόσθετα, για όλα τα γονίδια τα οποία παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή στην παρεγκεφαλίδα των αταξικών ποντικών σύμφωνα με την πρωτεομική ανάλυση μέσω του λογισμικού Perseus, πραγματοποιήθηκε συμπληρωματική ανάλυση με το λογισμικό Enrichr (Chenetal., 2013; Kuleshovetal., 2016), το οποίο κατηγοριοποιεί τα γονίδια με βάση την ασθένεια στην οποία έχει βρεθεί πως εμπλέκονται σύμφωνα με τη βάση δεδομένων OMIM. Έτσι λοιπόν, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.6 τα γονίδια που μεταβάλλονται στατιστικώς σημαντικά ($p\text{-value} \leq 0.05$) στα δείγματα της παρεγκεφαλίδας των αταξικών ποντικών εμπλέκονται στις νευρολογικές ασθένειες Σύνδρομο Leigh, Εγκεφαλοπάθεια, Charcot-marie-tooth disease, αυτισμό καθώς και σε περιπτώσεις μυοσκελετικών παθήσεων όπως οι μυοπάθειες .

Πίνακας 3.6: Οι ασθένειες στις οποίες σύμφωνα με τη βάση δεδομένων OMIM εμπλέκονται γονίδια που μεταβάλλονται στατιστικώς σημαντικά στην παρεγκεφαλίδα των αταξικών ποντικών. Τιμές p-value και γονίδια που ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση Enrichr.

OMIM disease	P-value	Genes
Leigh_syndrome	0.000002330	NDUFS8;NDUFS7;NDUFS4;NDUFS3;NDUFV1;LRPPRC
Encephalopathy	0.0007632	GCSH;MECP2;ETHE1;STXBP1
Charcot-marie-tooth_disease	0.009672	YARS;MFN2;GARS;GDAP1
Myopathy	0.04933	VCP;TPM3;FHL1;CRYAB
Autism	0.02078	MECP2;CNTNAP2;GLO1
Ataxia	0.1208	ATXN2;ATCAY;KCNC3;FXN
Anemia	0.1262	GPI;RPL5;RPS17;TP11
Mental_retardation	0.8788	MECP2;DIP2B
Epilepsy	0.2766	CNTNAP2;ME2;ALDH7A1
Cardiomyopathy	0.3840	MYO6;TMPO

Καταληκτικά, τα αποτελέσματα των αναλύσεων DAVID και Enrichr, τόσο για τα γονίδια που υπερεκφράζονται όσο και για τα γονίδια που υποεκφράζονται στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών, λειτουργούν συμπληρωματικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρωτεομική ανάλυση και καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης SLC25A46 στη μιτοχονδριακή δυναμική και λειτουργία που σχετίζεται άμεσα με την παθογένεση πλήθους νευρολογικών ασθενειών.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρελθόν μέσω της προσέγγισης της Πρόσθιας Γενετικής, χρησιμοποιώντας τυχαία χημική μεταλλαξιγένεση στο ποντίκι, αναγνωρίστηκε ένας νέος φαινότυπος αυτοσωμικής υπολειπόμενης νευρολογικής νόσου, που χαρακτηρίζεται από αταξία, αστάθεια κίνησης, τονικοκλωνικούς σπασμούς, μειωμένη μυική δύναμη, και επιβραδύνουσα ανάπτυξη με πρόωρη θνησιμότητα έως την ηλικία των τριών μηνών. Λόγω των εμφανιζόμενων νευρολογικών συμπτωμάτων ο εν λόγω φαινότυπος ονομάστηκε αταξικός. Η υπεύθυνη μετάλλαξη (κυτοσίνη σε θυμίνη) εντοπίστηκε στην κωδική περιοχή του γονιδίου *Slc25a46* και προκάλεσε την εμφάνιση ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης. Ως αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μετάλλαξης, η παραγόμενη πρωτεΐνη είχε μέγεθος 95 αμινοξέα έναντι της αγρίου τύπου που είχε 418 αμινοξέα.

Η πρωτεΐνη SLC25A46, εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ ολοκληρωτική απώλεια της αγρίου τύπου 46kDa πρωτεΐνης παρατηρήθηκε στα μιτοχόνδρια αταξικών (*Slc25a46^{atc/atc}*) ποντικών (Terzenidou et al., 2017). Επιπρόσθετα, λειτουργικές σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *Slc25a46* έχουν αναφερθεί προσφάτως σε πλήθος νευρολογικών διαταραχών η σοβαρότητα των οποίων εξαρτάται από την μερική ή πλήρη απώλεια της λειτουργικότητας της SLC25A46 πρωτεΐνης (Abrams et al., 2016, Nguyen et al., 2016, Janer et al., 2016, Charlesworth et al., 2016, Wan et al., 2016, Terzenidou et al., 2017, Li et al., 2017). Αν και ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης SLC25A46 παραμένει ασαφής, εντούτοις υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται σε καίριες για το κύτταρο διεργασίες, όπως στη διατήρηση της δομής και δυναμικής των μιτοχονδρίων, στον μεταβολισμό του κυττάρου και τη βιοσύνθεση/μεταφορά φωσφολιπιδίων μέσω αλληλεπίδρασης του ενδοπλασματικού δικτύου με τα μιτοχόνδρια.

Τα αταξικά ποντίκια (*Slc25a46^{atc/atc}*) αποτελούν ένα άριστο σύστημα για την κατανόηση των εμπλεκόμενων παθογενετικών μηχανισμών στις SLC25A46-σχετιζόμενες παθολογίες.

4.1 Ο ρόλος της πρωτεΐνης SLC25A46 στη μιτοχονδριακή δυναμική

4.1.1 SLC25A46 και μιτοχονδριακή σύντηξη

Όπως είναι ευρέως γνωστό, τα μιτοχόνδρια αποτελούν εξαιρετικά δυναμικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων, έχοντας την ικανότητα να αλλάζουν το μέγεθος, το σχήμα και τη θέση τους ριζικώς ή μερικώς σε πολύ σύντομα χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, τη μεταβολική κατάσταση, καθώς και τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου. Η προσαρμοστικότητα τους αυτή πηγάζει από την ικανότητά τους να υφίστανται συντονισμένη σχάση (fission) ή σύντηξη (fusion), δυο διαδικασίες που εκ φύσεως είναι συμπληρωματικές και δύναται να συμβαίνουν ταυτόχρονα και αδιάκοπα σε πληθώρα κυτταρικών τύπων, ενώ η μεταξύ τους ισορροπία ρυθμίζει τη δυναμική των μιτοχονδρίων κάθε ευκαρυωτικού κυττάρου. Τόσο η σχάση όσο και η σύντηξη, ως ενεργητικές διεργασίες απαιτούν πολλές εξειδικευμένες πρωτεΐνες, όπως οι MFN1, MFN2, MFF, OPA1 και DRP1. Πρόσφατες μελέτες ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι η SLC25A46 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες μιτοχονδριακής σύντηξης MFN1, MFN2 και OPA1, υποδεικνύοντας την εμπλοκή της στον συγκεκριμένο μηχανισμό, που ρυθμίζει την δυναμική των μιτοχονδρίων (Janer et al., 2016). Ωστόσο, τα αποτελέσματα δίστανται όσον αφορά στην επίδραση της απώλειας της SLC25A46 στα επίπεδα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Μελέτες σε ινοβλάστες ασθενών με SLC25A46 μεταλλάξεις έδειξαν ότι η απουσία ή η υπερέκφραση της SLC25A46, δεν επηρέασε ποσοτικά τα επίπεδα της MFN2 (Janer et al., 2016). Παρομοίως, σε μία άλλη μελέτη (Duchesne et al., 2017), ύστερα από πρωτεομική ανάλυση σε μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων εγκεφάλου ποντικών με μετάλλαξη στο γονίδιο *Slc25a46*, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που ελέγχουν την μιτοχονδριακή σύντηξη και σχάση (Duchesne et al., 2017).

Αντίθετα, σε με μια πρόσφατη μελέτη (Steffen et al., 2016) υποστηρίχθηκε ότι η πρωτεΐνη SLC25A46, λειτουργεί ως ρυθμιστής του ολιγομερισμού των MFN1/MFN2, καθώς μειωμένη έκφρασή της, σε κυτταρικές σειρές οδήγησε σε αυξημένη σταθερότητα και ολιγομερισμό των πρωτεϊνών MFN1 και MFN2, προάγοντας την υπέρμετρη σύντηξη μιτοχονδρίων (mitochondrial hyperfusion). Επίσης, παρατηρήθηκε πως η απουσία της SLC25A46, δεν επηρεάζει ποσοτικά την έκφραση των MFN1/MFN2 σε επίπεδο mRNA, αλλά αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδά τους, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στη μειωμένη αποικοδόμησή τους. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μία πρόσφατη επιστημονική μελέτη του εργαστηρίου μας (Terzenidou et al., 2017), όπου πραγματοποιώντας πρωτεομική ανάλυση σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα κυττάρων παρεγκεφαλίδας αταξικών (*Slc25a46^{atc/atc}*) ποντικών, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνών MFN1, MFN2, και MFF απουσία της SLC25A46 πρωτεΐνης. Παρομοίως, τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έδειξαν την αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών MFN1, MFN2, OPA1 και MFF σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρεγκεφαλίδας, κάτι που συνηγορεί στην συμμετοχή της SLC25A46 στη ρύθμιση των βασικών πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή σύντηξη. Διαφαίνεται λοιπόν ότι η SLC25A46 πρωτεΐνη πιθανόν έχει ρυθμιστικό ρόλο στις πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής σύντηξης, ωστόσο ο ρόλος αυτός πιθανά ποικίλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Παρομοίως, τα αποτελέσματα που αφορούν στην μορφολογία των μιτοχονδρίων διαφέρουν ανάλογα με το κυτταρικό τύπο. Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η απουσία SLC25A46 οδηγεί σε επιμηκυσμένα μιτοχόνδρια, άλλες σε κατακερματισμένα και άλλες αναφέρουν ότι δεν επηρεάζεται η δομή (Duchesne et al., 2017; Janer et al., 2016; Li et al., 2017; Steffen et al., 2017; Terzenidou et al., 2017; Wan et al., 2016). Συνεπώς, περισσότερες έρευνες χρειάζονται για να διευκάνουν τον ρόλο της SLC25A46 πρωτεΐνης στη δυναμική των μιτοχονδρίων, μιας και ανάλογα με τις συνθήκες και τον τύπο των κυττάρων τα αποτελέσματα ποικίλουν.

4.1.2 SLC25A46, μιτοχονδριακή σχάση και αλληλεπίδραση με το ενδοπλασματικό δίκτυο

Δεδομένου ότι στις περισσότερες μελέτες έχει συσχετιστεί η απώλεια SLC25A46 με επιμηκυσμένα μιτοχόνδρια, έχει προταθεί ότι πιθανόν η SLC25A46 ρυθμίζει την μιτοχονδριακή σχάση. Παρόλα αυτά, η έλλειψή της SLC25A46 δεν φαίνεται να επηρεάζει ούτε τα επίπεδα της DRP1, ούτε την στρατολόγησή της στο σημείο που πρόκειται να ξεκινήσει η μιτοχονδριακή σχάση, ούτε τα επίπεδα φωσφορυλίωσής της (Janer et al., 2016). Αυτό αφήνει ανοικτό το ενδεχόμενο η SLC25A46 να ρυθμίζει την σχάση μέσω σταθεροποίησης μιας πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης που στρατολογεί την DRP1.

Εκτός των άλλων, διαπιστώθηκε ότι η απουσία της SLC25A46 αλλάζει τη λιπιδική σύσταση του ενδοπλασματικού δικτύου και παρεμποδίζεται η δημιουργία μεμβρανικών προεκβολών (membrane tabulation), που είναι κρίσιμες για την υπόδειξη του σημείου έναρξης της μιτοχονδριακής σχάσης μέσω περιέλιξης τους γύρω από αυτό. Επίσης, η ομαλή διακίνηση φωσφολιπιδίων μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίου είναι απαραίτητη για να εξασφαλίσει την ομαλότητα των μεμβρανικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά τη σχάση ή τη σύντηξη. Απώλεια αυτής της ομαλότητας οδηγεί στην εμφάνιση υπερσυντηγμένων μιτοχονδρίων ακόμα και όταν υπάρχει σε αφθονία η ευνοϊκή για τη μιτοχονδριακή σχάση μορφή της OPA1 (s-OPA1). Προτείνεται, λοιπόν, ότι η SLC25A46, διαδραματίζει καίριο ρόλο στην απευθείας μεταφορά λιπιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το μιτοχόνδριο και το αντίστροφο. Στην ίδια κατεύθυνση οι Duchesne et al. (2017), ύστερα από πρωτεομική ανάλυση σε μιτοχόνδρια εγκεφάλου, διαπίστωσαν μειορρύθμιση της πρωτεΐνης GRP78 (γνωστή και ως BiP) που είναι από τους σημαντικότερους ρυθμιστές του ενδοπλασματικού δικτύου, καταδεικνύοντας ακόμη μια φορά την ιδιαίτερος πιθανή συμμετοχή της SLC25A46 στην επικοινωνία μιτοχονδρίων – ενδοπλασματικού δικτύου. Αναλυτικότερα, πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει πως συντελείται μια διαρκής αλληλεπίδραση (crosstalk), μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων. Μάλιστα έχει φανεί πως αυτή η μεταξύ τους επικοινωνία αποτυπώνεται μέσα από πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και είναι απαραίτητη για ορισμένες εξαιρετικά σημαντικές διεργασίες, που σχετίζονται με την

επιβίωση ή/και το θάνατο του κυττάρου. Τέτοιες διεργασίες είναι η βιοσύνθεση και ανταλλαγή φωσφολιπιδίων, η μεταφορά ασβεστίου, η ρύθμιση της μιτοχονδριακής δυναμικής καθώς και η απόπτωση. Αρκετές είναι οι περιπτώσεις εκείνες όπου διαταραχή στην επικοινωνία μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και του μιτοχονδρίου, σχετίζεται με πολύ σημαντικές νευρεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Alzheimer και το Parkinson (Li et al., 2017, Lahiri et al., 2014, Janer et al., 2016).

Σχετικά με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης και ανταλλαγής φωσφολιπιδίων διαμέσου της επικοινωνίας του ενδοπλασματικού δικτύου και του μιτοχονδρίου, καθώς και της εμπλοκής της SLC25A46 σε αυτή την αλληλεπίδραση, τα πράγματα δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως έως σήμερα. Συγκεκριμένα, όπως είναι γνωστό ενώ η βιοσύνθεση των λιπιδίων λαμβάνει χώρα, σχεδόν αποκλειστικά, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, χρειάζεται για την ολοκλήρωσή της, την συμβολή ορισμένων ενζύμων που εντοπίζονται φυσιολογικά στην μεμβράνη διαφορετικών υποκυτταρικών οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια. Ένα τέτοιο αρκετά καλά μελετημένο παράδειγμα αποτελεί η βιοσύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης (PC). Η περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου που συνορεύει και αλληλεπιδρά με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αποκαλείται MAM (mitochondrial associated membrane) και χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση, καθώς και από πολύ συγκεκριμένη λιπιδική και πρωτεϊνική σύσταση. Δύο πρωτεΐνες χαρακτηριστικές της εν λόγω περιοχής είναι η συνθάση της φωσφατιδυλοσερίνης-1 (PSS1) και η συνθάση της φωσφατιδυλοσερίνης-2 (PSS2). Οι πρωτεΐνες PSS1 και PSS2 βρέθηκαν να συμμετέχουν στην σύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης στην MAM. Μετά τη σύνθεσή της η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), μεταφέρεται στο γειτονικό μιτοχόνδριο, όπου μια αποκαρβοξυλάση (Psd1) της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης τη μετατρέπει σε φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE). Η PE μεταφέρεται με τη σειρά της πίσω στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου μια μεθυλοτρανσφεράση (Cho2 ή Opi3), τη μετατρέπει σε PC (παρουσία χολίνης), που ως γνωστόν αποτελεί βασικό συστατικό των μεμβρανών. Έτσι η PC πρέπει να μεταφερθεί εκ νέου πίσω στο μιτοχόνδριο, καθώς αποτελεί βασικό συστατικό των μιτοχονδριακών μεμβρανών.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η βιοσύνθεση της PC προϋποθέτει τη βέλτιστη επικοινωνία του ενδοπλασματικού δικτύου με τα μιτοχόνδρια. Ενδεχόμενη ανωμαλία στη μεταφορά των φωσφολιπιδίων δύναται να επηρεάσει αρνητικά τη δυναμική των μιτοχονδρίων και την αρχιτεκτονική των

cristae. Στο πλαίσιο αυτό, οι Janer et al.(2016), έδειξαν επιπρόσθετα σε κύτταρα HEK293, ότι η SLC25A46 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τα μέλη του πρωτεϊνικού συμπλόκου EMC του ενδοπλασματικού δικτύου (EMC 1-9) (Janer et al., 2016), τα οποία είναι απαραίτητα για τη μεταφορά φωσφολιπιδίων στη ζύμη (Lahiri et al., 2014). Προχωρώντας ένα βήμα ακόμα την ανάλυσή τους οι Janer et al. (2016), με τη χρήση φασματομετρίας μάζας, παρατήρησαν ότι τα επίπεδα των PE, PA και PS ήταν μειωμένα απουσία της SLC25A46, ενώ παράλληλα ύστερα από κατάλληλη χρώση εντόπισαν δομικές ανωμαλίες και αποδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου, υπό την απουσία της SLC25A46. Ωστόσο, στην πρωτεομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η απουσία της πρωτεΐνης SLC25A46, δεν φαίνεται να επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα των συστατικών του συμπλόκου EMC, χωρίς αυτό το γεγονός να αποκλείει ενδεχόμενη μεταξύ τους αλληλεπίδραση καθώς πρέπει να μελετηθούν ενδελεχώς και άλλες παράμετροι του εν λόγω φαινομένου.

4.2. Ο ρόλος της πρωτεΐνης SLC25A46 στα μιτοχονδριακά cristae

Ένα εξίσου σημαντικό στοιχείο στα πλαίσια της διατήρησης της μιτοχονδρικής δυναμικής είναι η διασφάλιση της ακεραιότητας της αρχιτεκτονικής της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και συνεπώς των cristae. Μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης παρατηρήθηκε ότι η SLC25A46 αλληλεπιδρά με μέλη του συμπλόκου MICOS όπως η μιτοφιλίνη (IMMT ή MIC60) και η CHCHD3 (MIC19), που οργανώνουν τη δομή των μιτοχονδριακών cristae. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η SLC25A46, είναι πιθανότατα μέλος ενός μεγαλύτερου δικτύου αλληλεπιδρώντων μορίων που ρυθμίζουν την οργάνωση των cristae και τη διαμόρφωση της μιτοχονδριακής δυναμικής (Janer et al., 2016) χωρίς όμως να γίνεται ακόμα αντιληπτή η λειτουργία της.

Προς αυτή λοιπόν, την κατεύθυνση στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε εάν και κατά πόσο η απώλεια της SLC25A46 πρωτεΐνης, σε κύτταρα παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών επηρεάζει ποσοτικά τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών του συμπλόκου MICOS. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες του συμπλόκου MICOS όπως οι IMMT, CHCHD3, CHCHD6 δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντική μεταβολή στη παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών έναντι των αγρίου τύπου αδερφών τους. Στο ίδιο πλαίσιο, μη στατιστικώς σημαντική ήταν η μεταβολή που παρουσίασαν οι πρωτεΐνες

SAM50 του συμπλόκου SAM, καθώς και οι πορίνες VDAC1 και VDAC2, που επίσης αλληλεπιδρούν με την SLC25A46. Προηγούμενη πρωτεομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά δείγματα κυττάρων παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών (Terzenidou et al., 2017), έδειξε μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική διαφορά των ανωτέρω πρωτεϊνών. Η διαφορά αυτή των δύο αναλύσεων πιθανόν να οφείλεται μεταξύ άλλων, στο διαφορετικό βαθμό αντιπροσώπευσης (βαθμό εμπλουτισμού) των εν λόγω πρωτεϊνών μεταξύ μιτοχονδριακών και ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Δηλαδή, μικρές και στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα είναι πιθανόν να μην χαρακτηρίζονται ως στατιστικά σημαντικές σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα λόγω υποαντιπροσώπευσής τους σε αυτά, καθώς ο αριθμός των εξεταζόμενων πρωτεϊνών είναι κατά πολύ μεγαλύτερος.

4.3 Ο ρόλος της πρωτεΐνης SLC25A46 στην μιτοχονδριακή λειτουργία και κυτταρική αναπνοή

Ακόμα, η πρωτεομική ανάλυση που έλαβε χώρα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έδειξε ότι η απουσία της SLC25A46 επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν, στην πολύτιμη για το κύτταρο διαδικασία, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα έκφρασης πολλών πρωτεϊνών με καίριο ρόλο στη δομική οργάνωση και λειτουργία των ενζυμικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, μεταβάλλονται στατιστικώς σημαντικά στα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας των αταξικών ποντικών συγκριτικά με τα αγρίου τύπου αδέρφια τους. Τη σημαντικότερη μεταβολή, φάνηκε να εμφανίζουν οι πρωτεΐνες του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας με αυτές των συμπλόκων III, IV και V, να ακολουθούν. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι πρωτεΐνες του συμπλόκου II, που στο σύνολό τους κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους. Από το σύμπλοκο V, μόνο η πρωτεΐνη ATP5L εμφάνισε μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική διαφορά στα αταξικά ποντίκια (Πίνακες 3.2 και 3.3, ενότητα 3.3.3). Για επιβεβαιωτικούς λόγους πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα ανοσοαποτύπωμα Western, έναντι αντιπροσωπευτικών για κάθε σύμπλοκο πρωτεϊνών και τα αποτελέσματα που προέκυψαν εμφάνισαν μεγάλη ταύτιση με την πρωτεομική ανάλυση (Εικόνα 3.11).

Ωστόσο και εδώ όπως και προηγούμενα, μικρές διαφορές δεν αποτυπώνονται επαρκώς μέσω ανοσοαποτυπώματος Western πιθανότατα λόγω μικρότερης διακριτικής ικανότητας της μεθόδου έναντι τη φασματομετρίας μάζας που χρησιμοποιείται στην πρωτεομική ανάλυση (Gstaiger et al., 2009). Τέλος, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα των πρωτεϊνών των συμπλόκων I και IV, εμφανίζονται να επηρεάζονται περισσότερο από την απουσία της SLC25A46, γεγονός που ενδέχεται να συνδέει την ύπαρξη της SLC25A46 με την εύρυθμη λειτουργία τους. Στο πλαίσιο αυτό οι Janer et al. (2016), σε πειράματα σε ινοβλάστες παρατήρησαν ότι απουσία της SLC25A46, μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων COX2 και COXIV του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας. Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Duchesne et al. (2017), όταν ύστερα από πρωτεομική ανάλυση σε μιτοχόνδρια παρεγκεφαλιδικών κυττάρων, διαπίστωσαν μειορρύθμιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαμόρφωση των συμπλόκων I,III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων.

Ακόμα, σύμφωνα με μια τελευταία επιστημονική μελέτη (Li et al., 2017) παρατηρήθηκε ότι απουσία της SLC25A46 προκαλείται ανισορροπία των διαδικασιών της μιτοχονδριακής σύντηξης/σχάσης, γεγονός που συσχετίστηκε με μειωμένη λειτουργικότητα των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και μειωμένη παραγωγή ATP (σε ποσοστό 20%), υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο τον έμμεσο ρόλο που διαδραματίζει η SLC25A46, στην εμφάνιση ή μη μεταβολικών δυσλειτουργιών του κυττάρου. Στο παρελθόν, από προηγούμενες μελέτες έχει διαπιστωθεί πως ανωμαλίες στην μιτοχονδριακή δυναμική καθώς και στη δομική οργάνωση των cristae επιδρούν αρνητικά και ποικιλοτρόπως στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου και ειδικότερα στην μιτοχονδριακή αναπνοή. Ωστόσο, το τοπίο σχετικά με τη χρονική ροή των διαδικασιών παραμένει μέχρι και σήμερα αρκετά θολό. Μάλιστα, έχουν προταθεί αρκετές διαφορετικές θεωρίες στην προσπάθεια εξήγησης αυτής της ιδιόμορφης και περίπλοκης σύνδεσης.

Συγκεκριμένα, οι Chen et al. (2007), παρατήρησαν δυσλειτουργίες στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων σε μιτοχόνδρια νευρικών κυττάρων Purkinje, υπό συνθήκες έλλειψης της πρωτεΐνης MFN2, καθώς η ενζυμική ενεργότητα των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας εμφάνισε σημαντική μείωση. Μάλιστα ιδιαίτερη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας εμφάνισαν τα σύμπλοκα I και IV, που και στα πλαίσια της πρωτεομικής ανάλυσης της παρούσας μελέτης επηρεάστηκαν

περισσότερο από την απουσία της SLC25A46. Έτσι, οι Chen et al. (2007), διατύπωσαν την άποψη ότι η απουσία της MFN2 και γενικότερα η εμφάνιση διαταραχών στη μιτοχονδριακή δυναμική επιδρούν αρνητικά στην ενεργότητα των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Μάλιστα στην προσπάθεια διατήρησης σε ικανοποιητικά επίπεδα της ενεργότητας της αναπνευστικής αλυσίδας κινητοποιείται η υπερσύντηξη μιτοχονδρίων. Βάση αυτού προτείνεται ότι η υπερσύντηξη μιτοχονδρίων, αποτελεί μεταξύ άλλων μια ομοιοστατική απόκριση του κυττάρου προκειμένου να διατηρηθεί σε ικανοποιητικά επίπεδα η ενεργότητα των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και κατ'επέκταση η παραγωγή του ATP, αν και το αντιστάθμισμα φαίνεται να είναι παροδικό (Friedman et al., 2011). Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η επέκταση του μιτοχονδριακού δικτύου μέσω σύντηξης και επιμήκυνσης των μιτοχονδρίων, προκειμένου να επιτευχθεί αυξημένη παραγωγή ATP (Rolland et al., 2013; Rossignol et al., 2004). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι πιθανόν η μειορρύθμιση πρωτεϊνών που απαρτίζουν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας να υποδηλώνει και εν γένει δυσλειτουργία αυτής, που να επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή του ATP.

Σύμφωνα με μια άλλη εναλλακτική θεωρία (Mishra et al., 2016), πιθανή δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας προκαλεί μειωμένη παραγωγή ATP. Στην προσπάθεια αντιστάθμισης του ελλείματος σε ATP, αυξάνεται η δράση της μεταλλοπρωτεάσης Yme1L, προς βέλτιστη ενζυμική επεξεργασία της πρωτεΐνης OPA1 και μετατροπή της από την short στη long μορφή της. Έτσι η αυξημένη παρουσία της L-OPA1, προάγει την ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής σύντηξης και κατ'επέκταση την επιμήκυνση των μιτοχονδρίων και την δημιουργία υπερσυντηγμένων μιτοχονδρίων (hyperfused mitochondria) (Wai & Langer, 2016). Ωστόσο, σε αρχικά πειράματα που έγιναν στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών όμοιων με αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων ATP μεταξύ αταξικών και αγρίου τύπου ποντικών, αν και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προς αυτή την κατεύθυνση (Τερζενίδου, 2017).

4.4 Μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών

Συμπληρωματική βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού DAVID, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης κατέδειξε αλλαγές στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών συγκριτικά με τα αγρίου τύπου αδέρφια τους (Ενότητα 3.3.4). Αναλυτικότερα, γονίδια που σχετίζονται με την ενδοκυτταρική μεταφορά μορίων, κυστιδίων και πρωτεϊνών καθώς και με διεργασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η επεξεργασία του mRNA, η αμινοακετυλίωση του tRNA, καθώς και ο καταβολισμός των οργανικών οξέων εμφανίζουν υπερέκφραση στα αταξικά ποντίκια. Το γεγονός, λοιπόν, ότι τα γονίδια που εμπλέκονται σε μεταβολικές διεργασίες καθώς και στη γονιδιακή ρύθμιση, υπερκωδάζονται στα αταξικά ποντίκια, είναι πιθανόν να σχετίζεται και να υποδηλώνει μια μεταβατική για το κύτταρο κατάσταση που συνοδεύεται από αλλαγή του γενετικού του προφίλ, στο πλαίσιο πιθανότατα προσαρμογής του στις νέες συνθήκες. Ωστόσο για την άντληση ασφαλέστερων συμπερασμάτων είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση και σε επίπεδο mRNA ανάλυσης.

Από την άλλη πλευρά γονίδια που εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου και συγκεκριμένα σε διαδικασίες όπως η σύνθεση του ATP, η παραγωγή πρόδρομων μεταβολιτών και ενέργειας, η κυτταρική αναπνοή, η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η παραγωγή ενέργειας με οξείδωση οργανικών οξέων, οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και η μεταφορά ιόντων, υποεκφράζονται στα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας αταξικών ποντικών, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της πρωτομικής ανάλυσης που παρουσιάστηκε προηγούμενα.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως σύμφωνα με το λογισμικό βιοπληροφορικής ανάλυσης Enrichr, πολλά από τα γονίδια που μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά στην παρεγκεφαλίδα αταξικών ποντικών, όπως τα *Opa1* και *Mfn1/2*, έχει βρεθεί πως εμπλέκονται σε πλήθος νευρολογικών ασθενειών όπως το σύνδρομο Leigh και διάφορες εγκεφαλοπάθειες, υποδηλώνοντας έτσι την έμμεση επίδραση της απώλειας της πρωτεΐνης SLC25A46 στην εκδήλωση ασθενειών σχετιζόμενων με το νευρικό σύστημα.

Εν κατακλείδι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής φαίνεται πως η απουσία της πρωτεΐνης SLC25A46, έχει σημαντική επίδραση στα

επίπεδα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή δυναμική και την οξειδωτική φωσφορυλίωση, υποδεικνύοντας το καίριο ρόλο της στη μιτοχονδριακή δυναμική και λειτουργία που πιθανώς ευθύνονται για την εκδήλωση των SLC25A46-σχετιζόμενων νευρολογικών ασθενειών.

4.5 Μελλοντικοί στόχοι

Προκειμένου ωστόσο να κατανοηθεί καλύτερα ο πολύπλευρος ρόλος που διαδραματίζει η πρωτεΐνη SLC25A46 στην φυσιολογία του μιτοχονδρίου και του κυττάρου γενικότερα, και να διελευκανθεί ο παθογενετικός ρόλος του *Slc25a46* γονιδίου στο νευρολογικό φαινότυπο αταξίας που παρουσιάστηκε, είναι σημαντικό να τεθούν μελλοντικοί στόχοι προς περαιτέρω διερεύνηση. Ενδεικτικά ορισμένοι μελλοντικοί στόχοι είναι οι ακόλουθοι:

- ✓ Μελέτη δυνητικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης SLC25A46 με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δυναμική των μιτοχονδρίων όπως οι OPA1, MFN1/2, MFF, και EMC1-9 και ανίχνευση των περιοχών αλληλεπίδρασης.
- ✓ Μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας και της δομικής ακεραιότητας των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια νευρικών κυττάρων αταξικών ποντικών.
- ✓ Μελέτη της δομικής οργάνωσης και μορφολογίας των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου μεταξύ αταξικών και αγρίου τύπου ποντικών, προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν επίδραση της απουσίας της SLC25A46 πρωτεΐνης σε αυτά.
- ✓ Μελέτη της αλληλεπίδρασης του ενδοπλασματικού δικτύου με τα μιτοχόνδρια, και ιδιαίτερα της διακίνησης φωσφολιπιδίων μεταξύ των δύο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Τερζενίδου, Μαρία-Ειρήνη. (2017). Μελέτη του παθογενετικού ρόλου του μιτοχονδριακού μεταφορέα SLC25A46 σε ένα γενετικό μοντέλο νευρολογικής νόσου στο ποντίκι. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Abrams, A. J., Hufnagel, R. B., Rebelo, A., Zanna, C., Patel, N., Gonzalez, M. A., M.A., Campeanu, I.J., Griffin, L.B., Groenewald, S., Strickland, A.V. and Tao, F., Dallman, J. E. (2015). Mutations in SLC25A46, encoding a UGO1-like protein, cause an optic atrophy spectrum disorder. *Nature Genetics*, 47(8), 926–932.
- Agrimi, G., Russo, A., Scarcia, P., & Palmieri, F. (2012). The human gene SLC25A17 encodes a peroxisomal transporter of coenzyme A, FAD and NAD +. *Biochemical Journal*, 443(1), 241–247.
- Alkhaja, A. K., Jans, D. C., Nikolov, M., Vukotic, M., Lytovchenko, O., Ludewig, F., Schliebs, W., Riedel, D., Urlaub, H., Jakobs, S. and Deckers, M. (2012). MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Molecular Biology of the Cell*, 23(2), 247–257.
- An, F. P., Bai, J. Z., Balantekin, A. B., Band, H. R., Beavis, D., Beriguete, W., Bishai, M., Blyth, S., Boddy, K., Brown, R.L. and Cai, B., (2012). Observation of electron-antineutrino disappearance at Daya Bay. *Physical Review Letters*, 108(17), 171803.
- Aversa, R., Petrescu, R. V. V., Apicella, A., & Petrescu, F. I. T. (2016). Mitochondria are naturally micro robots - A review. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*, 9(4).
- Baselga, J., Rischin, D., Ranson, M., Calvert, H., Raymond, E., Kieback, D.G., Kaye, S.B., Gianni, L., Harris, A., Bjork, T. and Averbuch, S.D., (2002). Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *Journal of Clinical Oncology*, 20(21), 4292–4302.
- Björhall, K., Miliotis, T., & Davidsson, P. (2005). Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*, 5(1), 307–317.
- Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Lynn, B., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2003). Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 85(6), 1394–1401.
- Cereghetti, G. M., Stangherlin, A., de Brito, O. M., Chang, C. R., Blackstone, C., Bernardi, P., & Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), 15803–15808.

- Charlesworth, G., Balint, B., Mencacci, N. E., Carr, L., Wood, N. W., & Bhatia, K. P. (2016). SLC25A46 mutations underlie progressive myoclonic ataxia with optic atrophy and neuropathy. *Movement Disorders*, 31(8), 1249-1251.
- Chaurand, P., Schwartz, S. A., Billheimer, D., Xu, B. J., Crecelius, A., & Caprioli, R. M. (2004). Integrating Histology and Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(4), 1145–1155.
- Chen, H., & Chan, D. C. (2005a). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Academic.oup.com*, 14(2), 283–289.
- Chen, H., & Chan, D. C. (2005b, October 15). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human molecular genetics*, 14(suppl_2), R283-R289.
- Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26185–26192.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology*, 160(2), 189-200.
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), 15927–15932.
- Cribbs, J. T., & Strack, S. (2007a). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports*, 8(10), 939–944.
- Cribbs, J. T., & Strack, S. (2007b). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports*, 8(10), 939–944.
- Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H. and Taylor, S.S., (2010). ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining cristae integrity and mitochondrial function. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 2918–2932.
- Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P. and Hamel, C.P., (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Human Genetics*, 109(6), 584–591.
- Dorn, G. W., & Kitsis, R. N. (2015). The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circulation research*, 116(1), 167-182.
- Douni, E., Rinotas, V., Makrinou, E., Zwerina, J., Penninger, J.M., Eliopoulos, E., Schett, G. and Kollias, G., (2012). A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in

- RANKL and TNF. *Human molecular genetics*, 21(4), 784–798.
- Duchesne, A., Vaiman, A., Castille, J., Beauvallet, C., Gaignard, P., Floriot, S., Rodriguez, S., Vilotte, M., Boulanger, L., Passet, B. and Albaric, O., (2017). Bovine and murine models highlight novel roles for SLC25A46 in mitochondrial dynamics and metabolism, with implications for human and animal health. *PLoS Genetics*, 13(4), e1006597.
- Frey, T. G., Renken, C. W., & Perkins, G. A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1555(1–3), 196–203.
- Friedman, J. R. (2012). ER Tubules Mark Sites of. *Science*, 358(2011).
- Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(12), 780.
- Gray, M. W. (2015). Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10133–10138.
- Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., and van der Bliek, A. M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *Biol. Chem*, 279(18792–18798).
- Gstaiger, M., & Aebersold, R. (2009). Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nature Reviews Genetics*, 10(9), 617.
- Guarani, V., McNeill, E.M., Paulo, J.A., Huttlin, E.L., Fröhlich, F., Gygi, S.P., Van Vactor, D. and Harper, J.W., (2015). QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife*, 4.
- Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F. and Neupert, W., (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *The EMBO Journal*, 30(21), 4356–4370.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., and Reichert, A. . (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *Biol. Chem*, 278(27781–27788).
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J., & Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *Journal of Cell Biology*, 143(2), 359–373.
- Hoppins, S., Collins, S.R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., DeVay, R.M., Lackner, L.L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J.S. and Nunnari, J., (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 195(2), 323–340.

- Ioakeimidis, F., Ott, C., Kozjak-Pavlovic, V., Violitzi, F., Rinotas, V., Makrinou, E., Eliopoulos, E., Fasseas, C., Kollias, G. and Douni, E., (2014). A splicing mutation in the novel mitochondrial protein DNAJC11 causes motor neuron pathology associated with cristae disorganization, and lymphoid abnormalities in mice. *PLoS ONE*, 9(8), e104237.
- Janer, A., Prudent, J., Paupe, V., Fahiminiya, S., Majewski, J., Sgarioto, N., Des Rosiers, C., Forest, A., Lin, Z.Y., Gingras, A.C. and Mitchell, G., (2016). *SLC25A46* is required for mitochondrial lipid homeostasis and cristae maintenance and is responsible for Leigh syndrome. *EMBO Molecular Medicine*, 8(9), 1019–1038.
- Kühlbrandt, W., (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology*, 13(1), 89.
- Kawahara, R., Meirelles, G.V., Heberle, H., Domingues, R.R., Granato, D.C., Yokoo, S., Canevarolo, R.R., Winck, F.V., Ribeiro, A.C.P., Brandão, T.B. and Filgueiras, P.R., (2015). Integrative analysis to select cancer candidate biomarkers to targeted validation. *Oncotarget*, 6(41).
- Kawle, A.P., Nayak, A.R., Lande, N.H., Kabra, D.P., Chandak, N.H., Badar, S.R., Raje, D.V., Taori, G.M., Dagainawala, H.F. and Kashyap, R.S., (2015). Comparative evaluation of risk factors, outcome and biomarker levels in young and old acute ischemic stroke patients. *Ann Neurosci*, 22(2), 70–77.
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305(5685), 858–862.
- Kozjak-Pavlovic, V. (2017). The MICOS complex of human mitochondria. *Cell and tissue research*, 367(1), 83-93.
- Labbé, K., Murley, A., & Nunnari, J. (2014). Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 357–391.
- Lahiri, S., Chao, J.T., Tavassoli, S., Wong, A.K., Choudhary, V., Young, B.P., Loewen, C.J. and Prinz, W.A., (2014). A Conserved Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex (EMC) Facilitates Phospholipid Transfer from the ER to Mitochondria. *PLoS Biology*, 12(10), e1001969.
- Li, Z., Peng, Y., Hufnagel, R.B., Hu, Y.C., Zhao, C., Queme, L.F., Khuchua, Z., Driver, A.M., Dong, F., Lu, Q.R. and Lindquist, D.M., (2017). Loss of *SLC25A46* causes neurodegeneration by affecting mitochondrial dynamics and energy production in mice. *Human Molecular Genetics*, 26(19), 3776–3791.
- Malsburg, K. von der, & Müller, J. (2011). Supplemental Information Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Developmental Cell*, 21, 1–23.
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379–387.

- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P. and Ducommun, B., (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters*, 523(1–3), 171–176.
- Olichon, A., Landes, T., Arnauné-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Mils, V., Guichet, A., Delettre, C., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D. and Reynier, P., (2007). Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: Relevance to ADOA pathogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 211(2), 423–430.
- Ott, C., Dorsch, E., Fraunholz, M., Straub, S., & Kozjak-Pavlovic, V. (2015). Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS ONE*, 10(3), e0120213.
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflügers Archiv*, 447(5), 689–709.
- Palmieri, F. (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(7–8), 564–578.
- Palmieri, F. (2014). Mitochondrial transporters of the SLC25 family and associated diseases: A review. In *Journal of Inherited Metabolic Disease* (Vol. 37, pp. 565–575). Springer Netherlands.
- Palmieri, F., Pierri, C. L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., & Fernie, A. R. (2011). Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights. *Plant Journal*, 66(1), 161–181.
- Patten, D.A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R.J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J.G., Park, D.S., McBride, H.M., Trinkle-Mulcahy, L. and Harper, M.E., (2014). OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *The EMBO Journal*, 33(22), 2676–2691.
- Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Körner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W. and Cyrklaff, M., (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *Journal of Cell Biology*, 185(6), 1047–1063.
- Reed, T. T., Pierce, W. M., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2009). Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Research*, 1274, 66–76.
- Rolland, S. G., Motori, E., Memar, N., Hench, J., Frank, S., Winklhofer, K. F., & Conradt, B. (2013). Impaired complex IV activity in response to loss of LRPPRC function can be compensated by mitochondrial hyperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), E2967–E2976.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J., & Capaldi, R. A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structures and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Research*, 64, 985–993.

- Santel, A., Science, M. F.-J. of cell, & 2001, U. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of cell science*, 114(5), 867-874.
- Schlessinger, A., Yee, S. W., Sali, A., & Giacomini, K. M. (2013). SLC classification: an update. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 94(1), 19-23.
- Schwartz, W. (2007). Lynn Margulis, Origin of Eukaryotic Cells. Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth. XXII u. 349 S., 89 Abb., 49 Tab. New Haven-London 1970: Yale University. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 13(2), 186–186.
- Steffen, J., Vashisht, A. A., Wan, J., Jen, J. C., Claypool, S. M., Wohlschlegel, J. A., & Koehler, C. M. (2017). Rapid degradation of mutant SLC25A46 by the ubiquitin-proteasome system results in MFN1/2-mediated hyperfusion of mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 28(5), 600–612.
- Szymański, J., Janikiewicz, J., Michalska, B., Patalas-Krawczyk, P., Perrone, M., Ziolkowski, W., Duszyński, J., Pinton, P., Dobrzyń, A. and Więckowski, M.R., (2017). Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1576.
- Terzenidou, M.E., Segklia, A., Kano, T., Papastefanaki, F., Karakostas, A., Charalambous, M., Ioakeimidis, F., Papadaki, M., Kloukina, I., Chrysanthou-Piterou, M. and Samiotaki, M., (2017). Novel insights into SLC25A46-related pathologies in a genetic mouse model. *PLoS Genetics*, 13(4), e1006656.
- Wagner, J. A., Williams, S. A., & Webster, C. J. (2007). Biomarkers and surrogate end points for fit-for-purpose development and regulatory evaluation of new drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 81(1), 104-107.
- Wai, T., & Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2), 105–117.
- Wan, J., Steffen, J., Yourshaw, M., Mamsa, H., Brain, E. A., & 2016, U. (2016). Loss of function of SLC25A46 causes lethal congenital pontocerebellar hypoplasia. *Brain*, 139(11), 2877-2890.
- Züchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J. and Parman, Y., (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature genetics*, 36(5), 449.