



UNIVERSITY OF IOANNINA



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**Χημειοεκλεκτικός Εμπλουτισμός και Ταυτοποίηση ενδογενώς**

**S-νιτροζυλιωμένων Πρωτεϊνών στον καρδιακό μυ.**

*Διδρυματικό Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Μοριακής και  
Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας*

Συμεωνίδου Μαρία, Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής:

Πασγάλης-Θωμάς Δούλια, PhD, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννινα 2024

## Ευχαριστίες

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του διδρυματικού-διατμηματικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών “Μοριακή και Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία” στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας Πασχάλη Θωμά Δούλια.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα Περιφερειακής Αριστείας BIOMED-20 “Ανάπτυξη νέων υποδομών που οικοδομούν «ικανότητα» στη βιοϊατρική έρευνα”.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, Πασχάλη-Θωμά Δούλια για όλη την υποστήριξη και καθοδήγηση που πρόσφερε προκειμένου να εξελιχθώ περισσότερο ως επιστήμονας. Είναι ένας εξαιρετος άνθρωπος που δίχως τη συνδρομή του δεν θα μπορούσα να ανταπεξέλθω στη δυσκολότερη, έως τώρα, χρονιά της ζωής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους φίλους μου και τον Ορέστη για την καθημερινή τους στήριξη και αγάπη.

Αφιερωμένο στη μνήμη της μητέρας μου,

Χρυσάνθης

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	2
Συντμήσεις .....	4
Περίληψη .....	6
Abstract.....	7
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....</b>	<b>8</b>
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του μονοξειδίου του αζώτου (*NO) .....	8
1.2 Βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου.....	9
1.3 Σηματοδοτική Δράση του μονοξειδίου του αζώτου .....	11
1.4 Σχηματισμός S-Νιτροζοθειολών (RSNO) σε βιολογικά συστήματα.....	14
1.5 Διανιτροζυλίωση.....	16
1.6 Απονιτροζυλίωση.....	17
1.7 Σημασία της σηματοδότησης του NO για την καρδιαγγειακή και μεταβολική λειτουργία.....	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση της S-νιτροζυλίωσης.....</b>	<b>21</b>
2.1 Προετοιμασία του δείγματος για τον χημικό εμπλουτισμό .....	22
2.2 Αλκυλίωση ανηγμένων κυστεϊνών (blocking of reduced thiols) .....	23
2.3 Μέθοδοι χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών .....	23
<b>Σκοπός της Μελέτης.....</b>	<b>29</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>30</b>
3.1 Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.....	30
3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε Gel πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE) .....	32
3.3 Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών κατά Western .....	36
3.4 Ανίχνευση S-νιτροζυλιωμένων Πρωτεϊνών.....	39
3.5 Ανάλυση δεδομένων (LC-MS/MS) μετά τον χημικό εμπλουτισμό .....	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>47</b>
4.1 Έλεγχος της εκλεκτικότητας του χημικού εμπλουτισμού έναντι τροποποιήσεων της κυστεΐνης.....	47
4.2 Έλεγχος της εκλεκτικότητας του χημικού εμπλουτισμού .....	49
4.3 Εξάρτηση της S-Νιτροζυλίωσης στην καρδιά από τις συνθήκες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).....	50
4.4 Ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης με φασματομετρία μάζας .....	52

4.5 Το μονοπάτι της β-Οξειδωσης αποτελεί στόχο της S-νιτροζυλίωσης <i>in vivo</i> .....	53
Βιβλιογραφία .....	59

## Συντμήσεις

APS	Ammonium Persulfate
AuNPs	Gold Nanoparticles
BCA	Bicinchoninic acid assay
BH4	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovine Serum Albumin
CPT1	Carnitine palmitoyl transferase 1
cGMP	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate
CysNO	S-Nitrosocysteine
DTPA	Diethylenetriaminepentaacetic acid
DTT	Dithiothreitol
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EDRF	Endothelial-derived relaxing factor
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FMN	Flavin mononucleotide
GSH	Glutathione
GSNO	S-Nitrosoglutathione
GSNOR	S-nitrosoglutathione Reductase
HRP	Horse Radish Peroxidase
HPDP-Biotin	Pyridyldithiol-biotin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase

IAM	Iodoacetamide
LMW	Low Molecular Weight
MMTS	Methyl Methanethiosulfonate
mPEGb	Polyethylene-glycol biotin
MRC	Mercury Resin Capture
NEM	N-Ethylmaleimide
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NOHA	N( $\omega$ )-hydroxy-l-arginine
PKM2	Pyruvate Kinase M2
PTM	Post-translational modification
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RSNO	S-nitrosothiol
SDS	Sodium dodecyl-sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide gel
sGC	Soluble Guanylate Cyclase
SNO-CoA	S-Nitroso-CoA
SNO-CoAR	S-nitroso-Coenzyme A Reductase
TEMED	Tetramethylethylenediamine
tNOS <sup>-/-</sup>	Triple Nitric Oxide Synthases Knockout
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reductase
WT	Wild Type

## Περίληψη

Το Βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας ή Ιατρικής για το έτος 1998 απονεμήθηκε για την ανακάλυψη του μονοξειδίου του αζώτου (NO) ως μορίου σηματοδότησης στο καρδιαγγειακό σύστημα. Η σηματοδοτική δράση του NO επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης που προκαλείται από το cGMP που παράγει η sGC ή/και της S-νιτροζυλίωσης. Η παρούσα μελέτη έχει δύο στόχους. Ο πρώτος στόχος είναι η αξιολόγηση της εκλεκτικότητας, ευαισθησίας και επαναληψιμότητας μιας μεθόδου χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Ο εμπλουτισμός επιτυγχάνεται με την αντίδραση οργανικού υδραργύρου με S-νιτροκυστεΐνη σε pH=6.0. Ο υδράργυρος ακινητοποιείται σε σφαιρίδια αγαρόζης σχηματίζοντας ρητίνη που τοποθετείται σε κολώνες χρωματογραφίας διευκολύνοντας το χειρισμό του δείγματος. Με συνδυαστική χρήση καθαρής πρωτεΐνης και βιολογικών δειγμάτων αποδείχθηκε ότι η χημική αντίδραση του οργανικού υδραργύρου είναι επιλεκτική για την S-νιτροκυστεΐνη καθώς δεν διαπιστώθηκε αντίδραση με άλλες οξειδωτικές τροποποιήσεις της κυστεΐνης. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας χημικά και βιολογικά θετικά και αρνητικά δείγματα δείχθηκε ότι η αντίδραση του οργανικού υδραργύρου με την S-νιτροκυστεΐνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη επιτρέποντας τον χημικό εμπλουτισμό ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης.

Ο δεύτερος στόχος της μελέτης ήταν η χρήση του χημειοεκλεκτικού εμπλουτισμού για την ταυτοποίηση θέσεων ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης στο καρδιακό μυ με χρήση φασματομετρίας μάζας. Χρησιμοποιώντας δείγματα από ποντίκια άγριου τύπου, nNOS<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> και tNOS<sup>-/-</sup> παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των θέσεων S-νιτροζυλίωσης στην καρδιά των ποντικών tNOS<sup>-/-</sup> αποδεικνύοντας την εξάρτηση της S-νιτροζυλίωσης από το NO που παράγεται ενζυμικά. Επιπλέον, συνδυάζοντας τον χημειοεκλεκτικό εμπλουτισμό με την ανοσοαποτύπωση κατά Western εξετάστηκε η ενδογενής S-νιτροζυλίωσης των ενζύμων του μονοπατιού της β-οξειδωσης και η εξάρτηση της από τις συνθήκες του NO. Δείχθηκε ότι η ενδογενής S-νιτροζυλίωση των ενζύμων CPT2, VLCAD και TFP-b εξαρτάται από NO που παράγεται από την eNOS.

Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι ο χημικός εμπλουτισμός S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων με τη χρήση φαινυλοϋδραργύρου είναι χημειοεκλεκτικός και παρέχει την απαιτούμενη ευαισθησία για την ανίχνευση

ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης. Ο συνδυασμός του με υψηλής ευκρίνειας φασματομετρία μάζας ή αναλυτικές τεχνικές επιτρέπει την διερεύνηση του ρόλου της S-νιτροζυλίωσης σε βιολογικά συστήματα.

## **Abstract**

The discovery of nitric oxide (NO) as a signaling molecule in the cardiovascular system was awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1998. Signaling functions of NO are achieved through sGC-cGMP-dependent phosphorylation as well as through the selective and reversible modification of protein cysteine residues, namely S-nitrosylation.

The current study has two objectives. The first is to assess the selectivity, sensitivity, and reproducibility of a strategy chemically enriching S-nitrosylated proteins and peptides. This enrichment is achieved through the reaction of organic mercury with S-nitrosocysteine at pH 6.0. The mercury is immobilized on agarose beads forming a resin that is placed in chromatography columns to facilitate sample handling. Using pure protein and biological samples we demonstrated that the organic mercury's chemical reaction is selective for S-nitrosocysteine, as it does not react with other oxidative modifications of cysteine. Additionally, using both positive and negative chemical and biological samples, it was demonstrated that the reaction with S-nitrosocysteine is highly sensitive, enabling the chemical enrichment of endogenous S-nitrosylation.

The second objective is to employ this chemo-selective enrichment for identifying sites of endogenous S-nitrosylation in cardiac muscle via mass spectrometry. Mass-spectrometry-based identification of S-nitrosylation sites in wild-type, nNOS<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup>, and tNOS<sup>-/-</sup> mice revealed a notable decrease in S-nitrosylation sites in the hearts of tNOS<sup>-/-</sup> mice, indicating the reliance of endogenous S-nitrosylation on enzyme-derived NO. Moreover, we employed chemical enrichment and Western blot analysis to investigate the S-nitrosylation of enzymes participating in  $\beta$ -oxidation pathway as well as the dependency of modification from NOS. It was documented that CPT2, VLCAD, and TFP-b are endogenously S-nitrosylated in the heart through mechanisms that require eNOS-derived NO.

In summary, this study documents that the chemical enrichment of S-nitrosylated proteins and peptides using phenylmercury is selective and sensitive

enough for detecting endogenous S-nitrosylation. In conjunction with high-resolution mass spectrometry or other analytical techniques it enables the exploration of the role of S-nitrosylation in biological systems.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.**

#### **1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του μονοξειδίου του αζώτου ( $\bullet$ NO)**

Το μονοξείδιο του αζώτου ( $\bullet$ NO) είναι ένα χημικό μόριο, αποτελούμενο από ένα μόριο οξυγόνου και ένα μόριο αζώτου συνδεδεμένα με έναν τριπλό δεσμό. Η συστηματική έρευνα σχετικά με τις θεραπευτικές ιδιότητες του  $\bullet$ NO ξεκινά πριν από πολλές δεκαετίες. Τα πρώιμα χρόνια, ήταν αναγνωρισμένο ως ένας επιβλαβής ρίπος για την ατμόσφαιρα. Ωστόσο, με τις πολυάριθμες έρευνες που ακολούθησαν, η σημασία του για την φυσιολογία αποκαλύφθηκε. Πρόκειται για ένα αέριο μόριο, που όντας λιπόφιλο, διασχίζει τις μεμβράνες και επιδρά στη ρύθμιση της σηματοδότησης όχι μόνο του κυττάρου στο οποίο βρίσκεται αλλά και των γειτονικών σε αυτό [1]. Μεταξύ των ρόλων του στα βιολογικά συστήματα είναι η ρύθμιση της ροής του αίματος, η αγγειοδιαστολή, η αναστολή της συσώρευσης των λευκοκυττάρων στα αγγεία του αίματος ενώ συνδράμει στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος ενός οργανισμού κυρίως σε συνθήκες φλεγμονής.

Οι πρώτες αναφορές για το  $\bullet$ NO καταγράφηκαν το 1772 όταν ο Joseph Priestley το περιέγραψε ως ξεχωριστή οντότητα, θέτοντας έτσι τις βάσεις για την έναρξη ενός νέου επιστημονικού πεδίου. Αργότερα, το 1867 ο T.L Brunton παρατήρησε τις αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες του νιτρώδους αμυλίου ενώ την ίδια χρονική περίοδο, ο Sobrero σύνθεσε τη νιτρογλυκερίνη, μία χημική ένωση που ενώ στην αρχή λογιζόταν ως εκρηκτικό, αργότερα χρησιμοποιήθηκε και για την θεραπεία της στηθάγχης [2]. Αρκετά χρόνια μετά, οι θεραπευτικές ιδιότητες των φαρμακευτικών αυτών σκευασμάτων αποδόθηκαν στην δράση του  $\bullet$ NO.

Η έρευνα για το χημικό αυτό μόριο συνεχίστηκε και τον επόμενο αιώνα. Τα πειραματικά αποτελέσματα, φανέρωσαν ότι το ανθρώπινο σώμα μπορεί, όχι μόνο να παράγει  $\bullet$ NO καθώς και να το αξιοποιεί κυρίως σε 3 διαφορετικά οργανικά συστήματα, του ανοσοποιητικού, του καρδιαγγειακού και του νευρικού [1]. Η μεγαλύτερη στιγμή ανάδειξης της αξίας του  $\bullet$ NO για τα βιολογικά συστήματα, ήρθε το έτος 1998 όταν το



βραβείο Nobel φυσιολογίας και ιατρικής δόθηκε στους Robert F. Furchgott, , και Ferid Murad “για τις ανακαλύψεις τους σχετικά με την σηματοδοτική δράση του •NO στο καρδιαγγειακό σύστημα” [3].

Κύριος άξονας της μελέτης του Robert Furchgott, ήταν η επίδραση των διαφόρων φαρμάκων στα αγγεία του αίματος. Σε πείραμα του, χρησιμοποίησε την ακετυλοχολίνη ως γνωστό αγγειοδιασταλτικό και παρατήρησε ότι η δράση της αυτή φανερωνόταν μόνο όταν τα αγγεία του αίματος βρίσκονταν σε επαφή με τα ενδοθηλιακά. Αργότερα συμπέρανε πως ένα μόριο, προερχόμενο από το ενδοθήλιο, ευθύνεται για την χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων [4]. Χαρακτήρισε το μόριο αυτό ως endothelial-derived relaxing factor (EDRF) [5]. Ο Louis J. Ignarro, απέδειξε ότι ο παράγοντας EDRF είναι το •NO καθώς οι ιδιότητές τους είναι ίδιες [6]. Τέλος, ο Ferid Murad, μελέτησε τον μηχανισμό δράσης της νιτρογλυκερίνης και άλλων αγγειοδιασταλτικών μορίων και αποκάλυψε ότι το •NO ευθύνεται για την χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του ενζύμου της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης και του σχηματισμού του μορίου cGMP (cyclic guanosine monophosphate) [7-10].

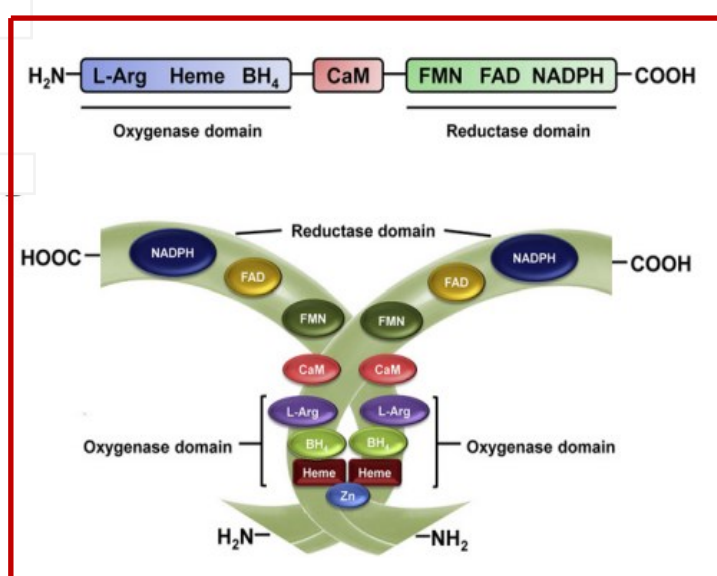
## **1.2 Βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου**

### **1.2.1 Συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthase, NOS)**

Ο βασικός μηχανισμός βιοσύνθεσης του •NO στα θηλαστικά είναι η ενζυμική του παραγωγή από τις συνθάσες του •NO (NOS) έχοντας ως υπόστρωμα την L-αργινίνη. Συνολικά, οι συνθάσες που έχουν αναγνωριστεί, κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί έως τώρα είναι η νευρική συνθάση (NOS1 ή nNOS), η επαγόμενη συνθάση (NOS2 ή iNOS) και η ενδοθηλιακή συνθάση (NOS3 ή eNOS). Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια τα οποία ανήκουν και σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι συνθάσες nNOS και eNOS εκφράζονται συνεχώς ενώ η iNOS επάγεται αποκλειστικά σε φλεγμονώδεις καταστάσεις [11]. Το •NO που παράγεται από τις συνθάσες eNOS και nNOS δρα σηματοδοτικά, ενεργοποιώντας την διαλυτή γουανυλική κυκλάση (sGC) στο καρδιαγγειακό και νευρικό σύστημα, αντιστοίχως. Αντίθετα, το •NO που παράγεται από την iNOS διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο και δρα ως κυτταροτοξικός παράγοντας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών [11].

Η λειτουργική μορφή των συνθασών είναι τα ομοδιμερή (εικόνα 1). Κάθε μονομερές αποτελείται από 2 κύριες περιοχές, την N-τελική περιοχή με δράση

οξυγενάσης και την C-τελική περιοχή με δράση ρεδοκτάσης. Το N-τελικό μέρος αποτελείται από θέσεις σύνδεσης για την αίμη, την τετραυδροβιοπερίνη (BH<sub>4</sub>) και την L-αργινίνη ενώ το C-τελικό μέρος από θέσεις σύνδεσης για τους αναγωγικούς παράγοντες FMN, FAD, NADPH. Τα δύο τους μέρη συνδέονται με την αλληλουχία σύνδεσης για την καλμοδουλίνη. Οι nNOS και η eNOS ρυθμίζονται από τη σύνδεση της καλμοδουλίνης (CaM) και έχει εξάρτηση από τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, ενώ η iNOS έχει μόνιμα συνδεδεμένη την καλμοδουλίνη, με αποτέλεσμα να μην εξαρτάται η δραστηριότητα του ενζύμου από αυτήν αλλά αντιθέτως να ρυθμίζεται μόνο από μεταγραφικό έλεγχο. Τα ηλεκτρόνια διοχετεύονται από το NADPH και ρέουν μέσω της περιοχής της αναγωγάσης στην περιοχή της οξυγενάσης με την συνδρομή των συμπαραγόντων FAD, FMN και ύστερα από σύνδεση της καλμοδουλίνης στο ένζυμο. Στην οξυγενάση ρέουν με σκοπό την αναγωγή του σιδήρου της αίμης προκειμένου να καθίσταται δυνατή η σύνδεση του μοριακού οξυγόνου σε αυτόν. Το οξυγόνο χρησιμοποιείται κατόπιν για οξείδωση της L-αργινίνης και βιοσύνθεση του •NO. Στην διαδικασία αυτή, σημαντική είναι και η συνεισφορά της BH<sub>4</sub> ως δότη ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο αίμης και οξυγόνου [10-12].



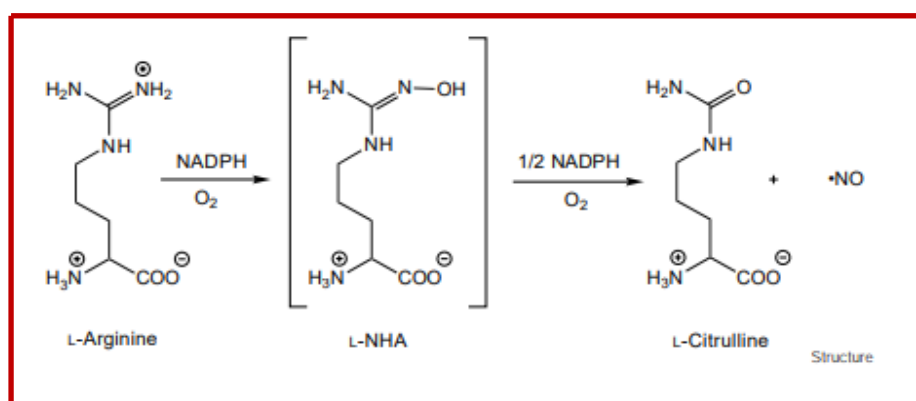
**Εικόνα 1:** Δομή της ενδοθηλιακής συνθάσης eNOS [12]

Οι συνθάσες καταλύουν την παρακάτω αντίδραση με στόχο την παραγωγή του •NO:



Αρχικά, η L-αργινίνη υδροξυλιώνεται υπό την παρουσία ενός μορίου οξυγόνου και ενός μορίου NADPH, σχηματίζοντας τη N-υδροξυ-αργινίνη (NOHA). Στη συνέχεια,

η N-υδροξυ-αργινίνη οξειδώνεται ώστε να σχηματιστεί η L-κιτρουλίνη και το •NO (εικόνα 2) [13].



**Εικόνα 2:** Αντίδραση σύνθεσης του •NO από τις συνθάσες του •NO (NOS) [13].

Στην μονομερή τους μορφή, οι συνθάσες αλλάζουν λειτουργία και αντί να παράγουν •NO, συνθέτουν ανιόντα σουπεροξειδίου. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται uncoupling της NOS και προκαλείται όταν υπάρχει έλλειψη της τετραυδροβιοπτερίνης (BH<sub>4</sub>) ή της L-αργινίνης ή ανασταλτικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η γλουταθειονυλίωση στο μόριο της συνθάσης [10].

### 1.2.2 Βιοσύνθεση μονοξειδίου του αζώτου από νιτρικά-νιτρώδη

Μία δεύτερη πηγή •NO στα θηλαστικά, αποτελούν τα νιτρικά που προσλαμβάνονται μέσω διατροφής. Τα βακτήρια του στόματος, διαθέτουν το ένζυμο της νιτρικής ρεδουκτάσης και ανάγουν τις ενώσεις αυτές σε νιτρώδη που μετέπειτα καταλήγουν στο στομάχι. Οι όξινες συνθήκες που επικρατούν εκεί μετατρέπουν τα νιτρώδη σε •NO και άλλα δραστικά οξείδια του αζώτου [14]. Το εναλλακτικό αυτό μονοπάτι βιοσύνθεσης του •NO διασφαλίζει τα θηλαστικά σε συνθήκες όπου είτε το οξυγόνο είναι ελλιπές είτε το pH χαμηλό είτε οι συνθάσες του •NO δυσλειτουργικές [14].

## 1.3 Σηματοδοτική Δράση του μονοξειδίου του αζώτου

Το •NO είναι ένα μικρό, αέριο και λιπόφιλο μόριο το οποίο δρα σηματοδοτικά στο κύτταρο που παράγεται (αυτοκρινής σηματοδότηση) είτε διαπερνώντας, λόγω της φύσης του, τις μεμβράνες να έρθει σε επαφή με μόρια-στόχους του σε γειτονικά κύτταρα (παρακρινής σηματοδότηση). Οι κυριότεροι μηχανισμοί σηματοδότησης από το •NO παρουσιάζονται περιληπτικά στις επόμενες ενότητες.

### 1.3.1 Σηματοδότηση μέσω cGMP (Canonical Signaling Pathway)

Ο πιο καλά μελετημένος στόχος του •NO στα κύτταρα είναι το ένζυμο της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης περιλαμβάνει τη σύνδεση του •NO στον σίδηρο της αίμης ( $\text{Fe}^{2+}$ ) του ενζύμου και αυτό οδηγεί τελικά σε διάσπαση του δεσμού μεταξύ σιδήρου και της εγγύς ιστιδίνης προκειμένου να αλλάξει η διαμόρφωση του ενζύμου. Η αλλαγή αυτή αυξάνει την δραστηριότητα της κυκλάσης του ενζύμου και κινητοποιεί την μετατροπή μορίων GTP (Guanosine-5'-triphosphate) σε cGMP (cyclic guanosine monophosphate). Τα κυκλικά αυτά μόρια ενεργοποιούν καθοδικά μόρια κινασών. Οι πιο καλά χαρακτηριζόμενοι στόχοι είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες G. Αυτά τα ένζυμα φωσφορυλιώνουν με την σειρά τους καθοδικά πρωτεϊνικά μόρια. Η ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού διαμεσολαβείται από φωσφοδιεστεράσες (PDE) και συγκεκριμένα τις PDE 5,6,9 οι οποίες έχουν την μεγαλύτερη συγγένεια προς το cGMP και διαμεσολαβούν την διάσπασή του [15].

Οι πρώτοι που περιέγραψαν το μονοπάτι αυτό για πρώτη φορά και αφορούσε τη δράση του •NO στο καρδιαγγειακό σύστημα ήταν οι ερευνητές Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, and Ferid Murad στους οποίους απονεμήθηκε το βραβείο Nobel φυσιολογίας και Ιατρικής το 1998 για την ανακάλυψη αυτή [2, 16]. Συγκεκριμένα πρότειναν ότι το παραγόμενο από την ενδοθηλιακή συνθάση (eNOS) •NO, ενεργοποιεί όπως περιγράφηκε και παραπάνω, την διαλυτή γουανυλική κυκλάση στα λεία μυϊκά κύτταρα ώστε να συντεθεί το cGMP. Ακολουθεί μία σειρά φωσφορυλιώσεων με τελικό αποτέλεσμα την αγγειοχάλαρωση και την ρύθμιση της ροής του αίματος [16].

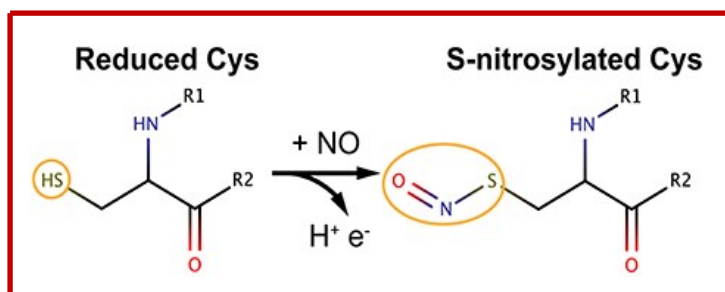
Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι κέρδισε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς έγιναν αντιληπτές οι πολυάριθμες θεραπευτικές του ιδιότητες. Αργότερα, κυκλοφόρησαν στην αγορά και φάρμακα που είτε απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες •NO είτε αναστέλλουν την δράση των φωσφοδιεστερασών με στόχο την ενίσχυση του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού. Παραδείγματα φαρμάκων αποτελούν τα οργανικά νιτρικά που ενισχύουν την αγγειοδιαστολή και χρησιμοποιούνται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και η στηθάγχη ή οι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 5 για την αντιμετώπιση της στυτικής δυσλειτουργίας [10,16].

### 1.3.2 S-Νιτροζυλίωση

S-νιτροζυλίωση είναι η ομοιοπολική προσθήκη ενός κατιόντος του μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^+$ ) σε μία θειολική ομάδα (-SH) και εισήχθη ως όρος στο πεδίο από τον

Dr. Jonathan Stamler το 1992 (εικόνα 3) [10,17]. S-νιτροζυλίωση συμβαίνει σε πρωτεΐνες αλλά και σε μικρού μοριακού βάρους (LMW) θειόλες όπως για παράδειγμα η γλουταθειόνη (GSH) και το συνένζυμο Α (CoA) προκειμένου να σχηματίσει την S-νιτροζογλουταθειόνη (GSNO) και το S-νιτροζο-συνένζυμο Α (SNO-CoA), αντίστοιχα [18]. Οι χαμηλού μοριακού βάρους S-νιτροζοθειόλες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην σηματοδοτική δράση του NO, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις μεταφοράς και απομάκρυνσης του NO από πρωτεΐνες. Η S-νιτροζυλίωση ανήκει στην ομάδα των αντιστρεπτών τροποποιήσεων που συμβαίνουν στις κυστεΐνες και με τον τρόπο αυτό ρυθμίζει την λειτουργία, τον ενδοκυτταρικό πρωτεϊνικό εντοπισμό και την σταθερότητα μίας πρωτεΐνης [18,19]. Ο μηχανισμός/οι που οδηγούν σε S-νιτροζυλίωση δεν είναι ξεκάθαρος/οι ακόμα. Το  $\cdot\text{NO}$  δεν είναι χημικά δραστικό ώστε να τροποποιήσει μία κυστεΐνη αλλά χρειάζεται να μετατραπεί πρώτα σε νιτροποιητικό παράγοντα. Σε αντίθεση με την φωσφορυλίωση, που διαθέτει ένα συγκεκριμένο ζευγάρι κινασών-φωσφατάσων, για την S-νιτροζυλίωση δεν έχει ανακαλυφθεί έως τώρα κάποιο ζευγάρι νιτροζυλασών - απονιτροζυλασών. Έχουν περιγραφεί διάφορα μοντέλα σχηματισμού των S-νιτροζοθειολών που ρυθμίζονται από την διαμερισματοποίηση, την διαθεσιμότητα των μορίων του  $\cdot\text{NO}$ , την τάση οξυγόνου ή το τοπικό pH. Παρόλο που έχουν προταθεί κάποιες απονιτροζυλάσες, φαίνεται πως η δράση τους είναι γενική και όχι τόσο στοχευμένη όπως οι φωσφατάσες [20].

Είναι πλέον γνωστό ότι το  $\cdot\text{NO}$  εκτελεί το μεγαλύτερο μέρος της βιολογικής του δράσης μέσω S-νιτροζυλίωσης ρυθμίζοντας έτσι ένα πλήθος κυτταρικών διεργασιών σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις [18]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η απορρύθμιση της S-νιτροζυλίωσης (aberrant S-nitrosylation) συμβαίνει σε ασθένειες όπως η καρδιακή ανεπάρκεια, το άσθμα, το Πάρκινσον κ.ά. [21].



**Εικόνα 3:** Αντίδραση σχηματισμού S-νιτροζοθειόλης

### 1.3.3 Νίτρωση (Nitration)

Νίτρωση είναι η προσθήκη μίας νιτρο-ομάδας σε μία οργανική ένωση. Η νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης μπορεί να καθορίσει την λειτουργία των πρωτεϊνών και αρχικά θεωρούνταν αποκλειστικά ως μία επιβλαβής τροποποίηση. Έρευνες, ωστόσο, υποστηρίζουν ότι η νίτρωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων ή των νουκλεοτιδίων μπορεί να σχηματίσει νέα σηματοδοτικά μόρια [10].

## 1.4 Σχηματισμός S-Νιτροζοθειολών (RSNO) σε βιολογικά συστήματα

Όπως προαναφέρθηκε, ο σχηματισμός των S-νιτροζοθειολών σε βιολογικά συστήματα δεν είναι ξεκάθαρος. Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται οι επικρατέστεροι μηχανισμοί που διαμεσολαβούν τη δημιουργία S-νιτροζοθειολών.

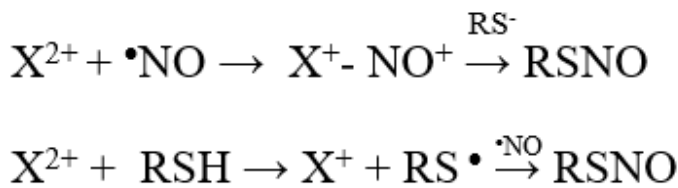
### 1.4.1 Κατάλυση από μεταλλοπρωτεΐνες

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι ο σχηματισμός των S-νιτροζοθειολών (RSNO) διαμεσολαβείται από μεταλλοπρωτεΐνες. Ο προτεινόμενος μηχανισμός περιλαμβάνει δύο κύρια μονοπάτια που εμπλέκουν την δράση μετάλλων μετάπτωσης.

Στο πρώτο μονοπάτι, το αρχικό στάδιο περιλαμβάνει την οξείδωση του μονοξειδίου του αζώτου  $\bullet\text{NO}$  από ένα δισθενές μέταλλο μετάπτωσης, οδηγώντας στον σχηματισμό μέταλλο-νιτροζυλ-συμπλόκων. Αυτά τα σύμπλοκα έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν ισοδύναμα του κατιόντος του μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^+$ ) σε θειολικές ομάδες που βρίσκονται είτε μέσα στο ίδιο το σύμπλοκο είτε σε άλλα βιομόρια, μία διαδικασία που χαρακτηρίζεται ως διανιτροζυλίωση (εικόνα 4, αντίδραση 1).

Εναλλακτικά, το αρχικό στάδιο περιλαμβάνει οξείδωση της θειολικής ομάδας (RSH) από μεταβατικό μέταλλο προς σχηματισμό θειλικής ρίζας ( $\text{RS}^\bullet$ ). Η θειλική ρίζα, στη συνέχεια, αντιδρά με ένα μόριο μονοξειδίου του αζώτου, σχηματίζοντας μία S-νιτροζοθειόλη (RSNO) (εικόνα 4, αντίδραση 2).

Πρωτεΐνες όπως το κυτόχρωμα C, η αιμογλοβίνη και η σερουλοπλασμίνη, που περιέχουν μεταβατικά μέταλλα στα ενεργά τους κέντρα, έχουν προταθεί ως συμμετέχουσες σε αυτούς τους μηχανισμούς, καθώς μπορούν να εμπλακούν στις παραπάνω οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις [20].



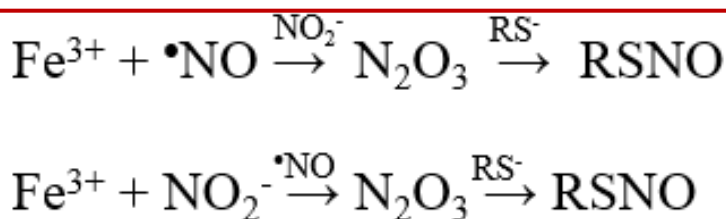
**Εικόνα 4:** Καταλύμενος από μεταλλοπρωτεΐνες σχηματισμός S-νιτροζοθειολών [16]

#### 1.4.2 Νιτροζυλίωση που διαμεσολαβείται από νιτρώδη

Τα νιτρώδη που προσλαμβάνονται από την διατροφή, συμμετέχουν σε μία σειρά χημικών αντιδράσεων που καταλήγουν στον σχηματισμό S-νιτροζοθειολών. Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο οι επικρατέστεροι μηχανισμοί είναι δύο.

- Το μονοξείδιο του αζώτου, αντιδρά με τρισθενές σίδηρο αίμης, σχηματίζοντας ένα νιτροζυλ-σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό, αντιδρά στη συνέχεια με ένα νιτρώδες ιον ( $\text{NO}_2^-$ ) οδηγώντας στον σχηματισμό του τριοξειδίου του διαζώτου,  $\text{N}_2\text{O}_3$ , ενός ισχυρού νιτροζυλιωτικού παράγοντα (εικόνα 5 αντίδραση 1).
- Εναλλακτικά, το νιτροζυλ-σύμπλοκο αντιδρά με  $\bullet\text{NO}$ , σχηματίζοντας έτσι το  $\text{N}_2\text{O}_3$  (εικόνα 5, αντίδραση 2).

Το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας, περιλαμβάνει την αντίδραση του τριοξειδίου του διαζώτου ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) με μια αποπρωτονιωμένη κυστεΐνη. Το  $\text{N}_2\text{O}_3$ , μεταφέρει μια νιτροζο-ομάδα στη θειολική ομάδα της κυστεΐνης, οδηγώντας τελικά στον σχηματισμό S-νιτροζοθειόλης (εικόνα 5) [20].

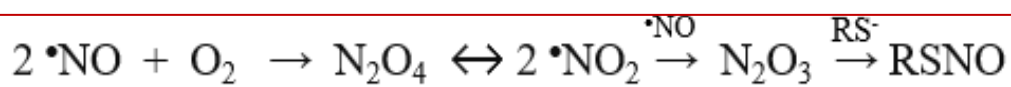


**Εικόνα 5:** Μηχανισμοί που αφορούν την νιτροζυλίωση που διαμεσολαβείται από νιτρώδη [20]

#### 1.4.3 S-νιτροζυλίωση που προκαλείται από ανώτερα οξείδια του $\bullet\text{NO}$

Ένας άλλος τρόπος σχηματισμού του νιτροποιητικού παράγοντα  $\text{N}_2\text{O}_3$  είναι η αυτοοξειδωση του  $\bullet\text{NO}$ . Παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου, το  $\bullet\text{NO}$  υφίσταται οξείδωση και μετατρέπεται σε τετροξείδιο του διαζώτου ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) το οποίο βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με το διοξείδιο του αζώτου,  $\bullet\text{NO}_2$ . Το  $\bullet\text{NO}_2$  αντιδρά με την σειρά

του με ένα δεύτερο μόριο  $\bullet\text{NO}$ , σχηματίζοντας το τριοξείδιο του διαζώτου,  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Ο νιτροποιητικός αυτός παράγοντας, αντιδρά με ελεύθερες θειόλες, καταλήγοντας στον σχηματισμό S-νιτροζοθειολών (εικόνα 6). Η αντίδραση ακολουθεί κινητική 2<sup>ης</sup> τάξης, κάτι που σημαίνει ότι έχει χαμηλή ταχύτητα όταν οι συγκεντρώσεις του διαθέσιμου  $\bullet\text{NO}$  είναι χαμηλές αλλά αυξάνεται σε περιοχές υδροφοβικότητας όπως οι μεμβράνες, όπου η συγκέντρωση του  $\bullet\text{NO}$  αυξάνεται. Επομένως, οι θειόλες που βρίσκονται κοντά σε αυτές τις περιοχές είναι κατά βάση πιο επιρρεπείς σε S-νιτροζυλίωση, αλλά αυτό καθορίζεται και από άλλες παραμέτρους όπως το τοπικό pH και το pK A της θειόλης [20].



**Εικόνα 6:** Μηχανισμός οξειδωτικής S-νιτροζυλίωσης από ανώτερα οξείδια του  $\bullet\text{NO}$  [20]

## 1.5 Διανιτροζυλίωση

Διανιτροζυλίωση ονομάζεται η μεταφορά μιας νιτροζο ( $\bullet\text{NO}$ ) ομάδας από μία θειόλη δότη σε μία θειόλη δέκτη που βρίσκεται εντός του ίδιου μορίου ή σε άλλο μόριο. Η αντίδραση περιλαμβάνει πυρηνόφιλη προσβολή του θειολικού ανιόντος στην S-νιτροζυλομάδα ενός άλλου μορίου. Η γενική αντίδραση είναι η εξής.



Μέσω της διανιτροζυλίωσης, το  $\bullet\text{NO}$  δυνάται να εκτελέσει την δράση του σε περιοχές που είναι μακριά από το σημείο σύνθεσής του, όπως ο πυρήνας και τα μιτοχόνδρια, που σε αντίθετη περίπτωση θα ήταν αδύνατο λόγω του μικρού χρόνου ζωής του [23]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μεταφορά του  $\bullet\text{NO}$  στον πυρήνα του κυττάρου μέσω του ενζύμου της γλυκόλυσης γλυκεραλδεύδη-3-φωσφορική αφυδρογονάση (GAPDH). Πιο αναλυτικά, η GAPDH έχει παρατηρηθεί ότι S-νιτροζυλιώνεται στην κυστεΐνη 150 που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η τροποποίηση αυτή προάγει την αλληλεπίδραση του ενζύμου με την E3 λιγάση ουβικιτίνης, Siah1, οδηγώντας στην μετατόπισή της GAPDH στον πυρήνα. Εκεί, η S-νιτροζυλιωμένη GAPDH συμμετέχει σε αντιδράσεις διανιτροζυλίωσης με πυρηνικές πρωτεΐνες [24,25].

Ένα εξίσου ενδιαφέρον παράδειγμα διανιτροζυλίωσης αποτελεί και η αιμοσφαιρίνη. Στην οξυγονωμένη της μορφή, η αιμοσφαιρίνη αυτό-νιτροζυλιώνεται,



με μεταφορά του •NO από τον σίδηρο της αίμης στην κυστεΐνη 93 της β' υπομονάδας της. Η αποξυγονωμένη μορφή της αιμοσφαιρίνης, συμμετέχει σε αντιδράσεις διανιτροζυλίωσης, επιτρέποντας την μεταφορά του •NO σε άλλα μόρια-στόχους. Έχει επίσης προταθεί ότι η νιτροζυλίωση της αιμοσφαιρίνης διευκολύνει την απόδοση του οξυγόνου [26].

Τέλος, οι μικρού μοριακού βάρους S-νιτροζοθειόλες (GSNO, CysNO) αλλά και η θειορεδοξίνη (Trx) διαμεσολαβούν την σηματοδοτική δράση του NO μέσω της διανιτροζυλίωσης. Η κυστεΐνη 73 της Trx έχει αναγνωριστεί ως κρίσιμο κατάλοιπο για την πραγματοποίηση αντιδράσεων διανιτροζυλίωσης από την Trx στις πρωτεΐνες στόχους όπως για παράδειγμα η κασπάση 3 [27].

Η διανιτροζυλίωση είναι ένας εκλεκτικός μηχανισμός μεταφοράς του NO. Η εκλεκτικότητα καθορίζεται από το πόσο προσβάσιμη ή εκτεθειμένη είναι η θειόλη δέκτης, από την σταθερά διάστασής της, το pK<sub>A</sub>, την συγκέντρωση και των δύο αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνών καθώς και την απόσταση μεταξύ τους [18,20,21,26].

## 1.6 Απονιτροζυλίωση

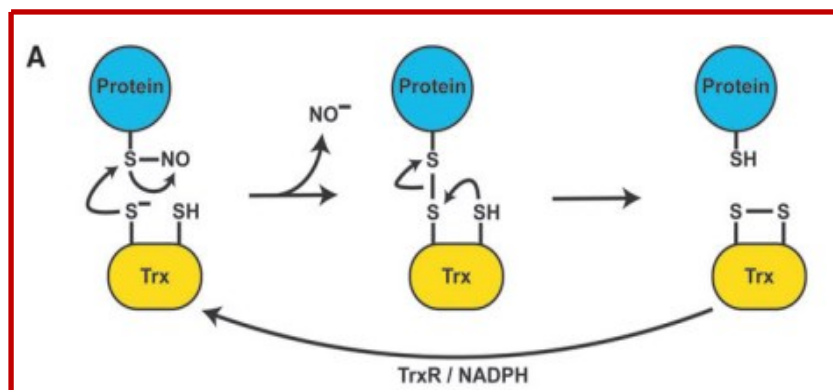
Υπάρχουν δύο κύριες ομάδες ενζυματικών απονιτροζυλιωσών: οι μεγάλοι μοριακού βάρους, που αποτελούνται από το σύστημα της θειορεδοξίνης και οι μικρού μοριακού βάρους, τις οποίες αποτελούν το σύστημα της αναγωγάσης του GSNO (GSNO-Reductase, GSNOR) και το σύστημα της αναγωγάσης του νιτροζυλιωμένου συνενζύμου A (SNO-CoA-Reductase).

### 1.6.1 Σύστημα της θειορεδοξίνης (Trx System)

Το σύστημα της Trx αποτελείται από την θειορεδοξίνη 1/2 (Trx 1/2), την αναγωγάση θειορεδοξίνης (TrxR) και το NADPH. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της θειορεδοξίνης ως απονιτροζυλίωση περιγράφεται παρακάτω.

Η Trx1 είναι μια πρωτεΐνη που διαθέτει δύο κατάλοιπα κυστεΐνης στις θέσεις 32 και 35. Όταν η Trx1 έρχεται σε επαφή με μία S-νιτροζοθειόλη (RSNO), η θειολική ομάδα της κυστεΐνης 32 (Cys32) δρα ως πυρηνόφιλο και προσβάλλει το άτομο θείου της RSNO οδηγώντας στην δημιουργία ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ τους. Την ίδια στιγμή, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) απελευθερώνεται ως ανιόν νιτροζυλίου (NO<sup>-</sup>). Στη συνέχεια, η θειολική ομάδα της κυστεΐνης 35 (Cys35) της Trx1, ενεργεί επίσης ως πυρηνόφιλο και προσβάλλει τη δισουλφιδική γέφυρα που σχηματίστηκε μεταξύ της Cys32 και της RSNO. Η δράση της Cys35 προκαλεί την διάσπαση της δισουλφιδικής γέφυρας και την δημιουργία ενός νέου δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ

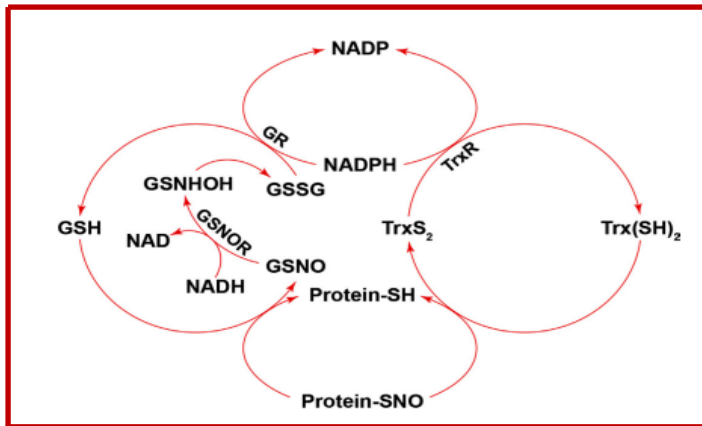
των δύο κυστεϊνών της Trx1 (Cys32-Cys35). Σε μεταγενέστερο στάδιο, ο δισουλφιδικός δεσμός διασπάται από την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR), αποκαθιστώντας την Trx1 στην αναγωγική της μορφή. Ο μηχανισμός αυτός απεικονίζεται στην εικόνα 7 καθώς και πιο συνοπτικά στην εικόνα 8 [18,27].



**Εικόνα 7:** Μηχανισμός της ενζυματικής απονιτροζυλίωσης από την θειορεδοξίνη (Trx) [18]

### 1.6.2 Απονιτροζυλάσες μικρού μοριακού βάρους (LMW-SNO Denitrosylases)

Από τις πιο άφθονες μικρού μοριακού βάρους (LMW) κυτταρικές θειόλες είναι η γλουταθειόνη (GSH) και το συνένζυμο A (CoA). Και οι δύο μπορούν και απονιτροζυλιώνουν πρωτεΐνες στόχους παράγοντας GSNO και SNO-CoA, αντίστοιχα (εικόνα 8). Τα παραγόμενα μόρια αποικοδομούνται στη συνέχεια από τις αντίστοιχες απονιτροζυλάσες, την αναγωγή της νιτροζυλάσης της γλουταθειόνης (GSNOR) και την ρεδοκτάση της νιτροζυλάσης του συνενζύμου A (SNO-CoAR) [18,29]. Η σημασία των ενζύμων GSNOR και SNO-CoAR στη φυσιολογία, τεκμηριώθηκε από μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν εκφράζουν τα παραπάνω ένζυμα. Οι μελέτες αυτές ανέδειξαν τον ρόλο των GSNOR και SNO-CoAR στη ρύθμιση της αγγειοδιαστολής, της λειτουργίας του καρδιακού μυός και του μεταβολισμού [18,29]. Φαινοτυπικά, τα ποντίκια που δεν διαθέτουν την GSNOR (GSNOR-KO), εμφανίζουν μειωμένη συστηματική αγγειακή αντίσταση και υπόταση. Επιπλέον, η έλλειψη του ενζύμου επηρεάζει τα επίπεδα S-νιτροζυλίωσης και τη λειτουργία πρωτεϊνών όπως η φωσφολαμπάνη και η καρδιακή τροπονίνη C, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ομαλή συστολή και χαλάρωση του καρδιακού μύ [18,29]. Αντίστοιχα, η αναγωγή SNO-CoAR φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αλλαγή του μεταβολικού προφίλ. Μέσω της ρύθμισης της S-νιτροζυλίωσης της πυρουβικής κινάσης M2 (PKM2), προάγει την προτίμηση για εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια. [23].



Εικόνα 8: Μηχανισμοί Απονιτροζύλιωσης [22].

### 1.7 Σημασία της σηματοδότησης του NO για την καρδιαγγειακή και μεταβολική λειτουργία.

Το καρδιαγγειακό σύστημα αποτελεί το σύστημα που αναδείχθηκε ο βιολογικός ρόλος του •NO. Το •NO που παράγεται από την ενδοθηλιακή συνθάση (eNOS) συμβάλλει στην διατήρηση της υγείας των αγγείων. Ενισχύει την αγγειοδιαστολή όποτε χρειάζεται, ρυθμίζει την ροή του αίματος και εμποδίζει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο καθώς και την δημιουργία θρόμβων [30]. Πέρα όμως από το καρδιαγγειακό σύστημα υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι το •NO που παράγεται από την eNOS καθορίζει και την μεταβολική ομοιοστασία [2, 31].

Η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του •NO που παράγεται από την eNOS έχει σχετιστεί με διαταραχές της καρδιαγγειακής [31] και μεταβολικής ομοιοστασίας [2]. Στον άνθρωπο, πολυμορφισμοί του γονιδίου της eNOS προκαλούν υπέρταση και συνδέονται με μεταβολικές διαταραχές όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης ενώ συχνά συνοδεύονται από υπερλιπιδιμία που αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό του μεταβολικού συνδρόμου (πίνακας 1) [12]. Αρκετές είναι και οι κλινικές δοκιμές που στοχεύουν την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και την ενίσχυση της σηματοδότησής του σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, υπέρταση και μεταβολικό σύνδρομο (NCT02836899, NCT04588740, NCT03511248).

Disease	Genetic marker	Findings	Reference
Obesity and associated disorders	g.-786T>C	CC genotype associated with metabolic syndrome in children and adolescents	(Miranda et al., 2013)
	4b/4a VNTR	4a4a genotype associated with obesity in children and adolescents	(Souza-Costa et al., 2011)
	Glu298Asp	Asp allele associated a larger mean body mass index, waist circumference and sum of skinfolds	(Podolsky et al., 2007)
	Haplotypes	CTGC haplotype, including the NOS3 tagSNPs rs3918226, rs3918188, rs743506 and rs7830 associated with obesity in children and adolescents	(de Miranda et al., 2015)
Diabetes mellitus and its complications	g.-786T>C	C-4b-Glu haplotype including the g.-786T>C, 4b/4a VNTR and Glu298Asp polymorphisms affect the susceptibility to metabolic syndrome and hypertension in obese children and adolescents	(Souza-Costa et al., 2011; Miranda et al., 2013)
	g.-786T>C	C allele associated with diabetic nephropathy in Egyptians	(Shoukry et al., 2012)
	4b/4a VNTR	CC genotype associated with diabetic retinopathy in Caucasians	(Taverna et al., 2005)
	Glu298Asp	4a allele associated with higher risk of diabetes mellitus in different populations	(Mehrab-Mohseni et al., 2011; Jia et al., 2013; Galanakis et al., 2008)
	Haplotypes	Lack of association with diabetic retinopathy in different populations	(Ma et al., 2014)
		Asp allele associated with higher risk of diabetes mellitus in different populations	(Monti et al., 2003; Jia et al., 2013)
		Asp allele associated with diabetic nephropathy in different populations	(Shoukry et al., 2012; Kuricova et al., 2013)
		Haplotypes including the g.-786T>C, 4b/4a VNTR and Glu298Asp polymorphisms are not associated with diabetic retinopathy but the C-4b-Glu haplotype protects against type 2 diabetes mellitus	(de Syllos et al., 2006)

**Πίνακας 1:** Επιπτώσεις της έκφρασης πολυμορφισμών του γονιδίου της eNOS [12].

Η γενετική απαλοιφή της ενδοθηλιακής συνθάσης του •NO σε ποντίκια (eNOS -/-) βοήθησε την κατανόηση του ρόλου που παίζει το NO στην ρύθμιση της καρδιαγγειακής και μεταβολικής λειτουργίας σε επίπεδο μορίων και μηχανισμών. Φαινοτυπικά, τα αρσενικά ποντίκια αναπτύσσουν προοδευτική καρδιακή δυσλειτουργία που οδηγεί σε μικρότερο προσδόκιμο ζωής [32]. Επιπλέον, τα ποντίκια έχουν υπέρταση, παρουσιάζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερλιπιδαιμία καθώς και μειωμένη ικανότητα οξειδωσης των λιπαρών οξέων στην καρδιά, ήπαρ και σκελετικούς μύες. Παρουσιάζουν χαμηλό μεταβολικό ρυθμό σε ηρεμία και μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών και της καρδιάς [33-35]. Τα παραπάνω συνηγορούν ότι το NO που προέρχεται από την eNOS εμπλέκεται στην ενεργειακή ομοιόσταση. Σε άλλες μελέτες, χορηγήθηκε φαρμακολογικά σε ποντίκια που δεν εκφράζουν την eNOS, βιοδραστικό •NO υπό την μορφή αλάτων νιτρώδους και νιτρικών. Τα αποτελέσματα μιας εκ των μελετών αυτών έδειξαν πως η χρόνια χορήγηση νιτρικών μείωσε την συσσώρευση του λίπους και των τριγλυκεριδίων σε ιστούς και στην κυκλοφορία και βελτίωσε την ομοιόσταση της γλυκόζης [36]. Σε μια αντίστοιχη μελέτη, παρατηρήθηκε μείωση της υπέρτασης, αύξηση του ρυθμού οξειδωσης των λιπαρών οξέων και απουσία διαταραχών του μεταβολισμού που προκαλούνται λόγω της χρόνιας έλλειψης βιοδραστικού •NO σε eNOS<sup>-/-</sup> ποντίκια [35].

Μελέτες της ερευνητικής ομάδας μας παρείχαν πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό δράσης του NO σε ότι αφορά τη ρύθμιση του μεταβολισμού.

Χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας ταυτοποιήθηκαν θέσεις ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης και η εξάρτησή της από την έκφραση της eNOS σε διαφορετικά όργανα ποντικού [37]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών είναι κοινές σε πολλά όργανα, υποδηλώνοντας πιθανότατα κοινό μηχανισμό δράσης ρύθμισης των συγκεκριμένων βιολογικών μονοπατιών μέσω της S-νιτροζυλίωσης. Επίσης, ο αριθμός των θέσεων S-νιτροζυλίωσης που ταυτοποιήθηκαν ήταν μεγαλύτερος από τον αριθμό των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών φανερώνοντας την ύπαρξη πολύ-S-νιτροζυλίωσης σε αντιστοιχία με άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [38,39]. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας γονιδίων (gene ontology) και λειτουργική ταξινόμηση των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών σε βιολογικά μονοπάτια. Παρατηρήθηκε ότι μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε βασικά μεταβολικά μονοπάτια είναι ενδογενώς S-νιτροζυλιωμένες. Αξιοπρόσεκτο είναι το γεγονός ότι σχεδόν όλα τα ένζυμα και οι μεταφορείς του μονοπατιού της β-οξειδωσης είναι ενδογενώς S-νιτροζυλιωμένα [37].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση της S-νιτροζυλίωσης**

Η S-Νιτροζυλίωση θεωρείται ένας από τους μηχανισμούς ρύθμισης κυτταρικής σηματοδότησης σε παθοφυσιολογικές [40-42]. Η μελέτη αυτής της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης ωστόσο, όσο αναφορά την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό του βιολογικού της ρόλου, ενέχει δυσκολίες.

Η κυστεΐνη αποτελεί μόλις το 2% του συνόλου των αμινοξέων στα θηλαστικά και μόνο λίγες από αυτές υφίστανται S-νιτροζυλίωση. Ο δεσμός μεταξύ θειόλης και μονοξειδίου του αζώτου είναι σχετικά ασταθής σε σύγκριση με άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs), καθώς η ενέργεια διάσπασης του δεσμού είναι 29 kcal/mol ενώ για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας απαιτούνται 100 kcal/mol. Επιπλέον, αυτός ο δεσμός διασπάται εύκολα παρουσία αναγωγικών παραγόντων όπως η γλουταθειόνη (GSH) και το ασκορβικό οξύ, καθώς και με την επίδραση αναγωγικών μετάλλων όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Η S-νιτροζυλίωση επομένως, αποτελεί μία δύσκολη στον χειρισμό τροποποίηση, λόγω της ασταθούς φύσης της και της χαμηλής της αφθονίας στο συνολικό πρωτόμα.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν μέθοδοι χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων οι οποίες συνδυαζόμενες με αναλυτικές μεθόδους ή φασματομετρία μάζας επιτρέπουν την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση

πρωτεϊνών και θέσεων S-νιτροζυλίωσης σε βιολογικά δείγματα. Οι μέθοδοι αυτοί αποτελούνται από τέσσερα βασικά βήματα. 1. Την προετοιμασία του βιολογικού δείγματος, 2. Την αλκυλίωση (blocking) των ανηγμένων κυστεϊνών, 3. Τον χημικό εμπλουτισμό, 4. Την έκλουση πρωτεϊνών ή πεπτιδίων.

Το κεφάλαιο αυτό παρουσιάζει περιληπτικά τα βήματα που προηγούνται του χημικού εμπλουτισμού, τις κυριότερες τεχνικές χημικού εμπλουτισμού, με ιδιαίτερη αναφορά στον χημειοεκλεκτικό εμπλουτισμό με χρήση οργανικού υδραργύρου που αποτελεί το κεντρικό θέμα της παρούσας εργασίας.

## **2.1 Προετοιμασία του δείγματος για τον χημικό εμπλουτισμό**

Στην ενότητα αυτή περιγράφονται τα βασικά σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον χειρισμό και την προετοιμασία του δείγματος πριν τον χημικό εμπλουτισμό.

Βιολογική σταθερότητα της S-νιτροζυλίωσης. Ο ομοιοπολικός δεσμός S-N είναι ευαίσθητος σε παράγοντες όπως θερμοκρασία, ακτινοβολία UV, πηγές ενέργειας (υπέρηχοι), αναγωγικά μέσα. Συνίσταται η επεξεργασία των δειγμάτων να γίνεται στο σκοτάδι και να αποφεύγεται η θέρμανση [43-47]

Δεσμευτές μετάλλων. Η χρήση αντιδραστηρίων χυλοποίησης μετάλλων όπως το διεθυλεντριαμινπενταϊκό οξύ (DTPA) ή και η νεοκουπρεΐνη παρεμποδίζουν τη διάσπαση του δεσμού θειόλης-NO ο οποίος είναι ευαίσθητος παρουσία ιόντων σιδήρου και χαλκού [43-47]. Οι δεσμευτές μετάλλων προστίθενται σε όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τον χημικό εμπλουτισμό των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών.

Αλκυλίωση κυστεϊνών κατά την λήψη του βιολογικού υλικού και την προετοιμασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της κυστεΐνης κατά την διάρκεια της απομόνωσης των πρωτεϊνών αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις στην μελέτη της S-νιτροζυλίωσης. Ενδογενώς, το 80-90% των κυστεϊνών βρίσκονται στην ανηγμένη μορφή τους. Η κυστεΐνη είναι ευαίσθητη σε οξείδωση από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας κατά την διάρκεια της επεξεργασίας του δείγματος [46,47]. Για να αποφευχθεί αυτό, προστίθενται στο διάλυμα λύσης των κυττάρων ή στο διάλυμα ομογενοποίησης του ιστού αλκυλιωτικοί παράγοντες όπως τα N-αιθυλμαλεϊμίδιο (NEM) και ιοδοακεταμίδιο (IAM) σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα αντιδραστήρια αυτά, σχηματίζουν μη αντιστρεπτό ομοιοπολικό δεσμό με τις ανηγμένες θειόλες, αποτρέποντας την αντίδραση τους με το οξυγόνο. Η παραπάνω διαδικασία δεν είναι υποχρεωτική, αφορά κυρίως τις προσεγγίσεις χημικού εμπλουτισμού που

απαιτούν την αναγωγή του δεσμού S-NO πριν την αντίδραση με το υπόστρωμα εμπλουτισμού.

Δημιουργία αρνητικών βιολογικών δειγμάτων (negative positive controls). Για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων συνίσταται η συμπερίληψη αρνητικών controls [43,47]. Εν συντομία, η S-νιτροζυλίωση εξαλείφεται από το βιολογικό δείγμα με χρήση αναγωγικών παραγόντων ή μετά από σύντομη έκθεση του δείγματος σε ακτινοβολία UV και στη συνέχεια το δείγμα αυτό υφίσταται χημικό εμπλουτισμό.

## **2.2 Αλκυλίωση ανηγμένων κυστεϊνών (blocking of reduced thiols)**

Στο στάδιο αυτό οι ανηγμένες κυστεϊνες αλκυλιώνονται με την προσθήκη στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα υδρόφυλων (NEM και IAA), ή υδρόφοβων (MMTS, Methyl methanethiosulfonate) αλκυλιωτικών παραγόντων σε υψηλή συγκέντρωση (50-100mM), παρουσία SDS και θέρμανσης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο γιατί αποτρέπει την αντίδραση των ανηγμένων θειολών με τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον χημικό εμπλουτισμό και με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η εκλεκτικότητα του χημικού εμπλουτισμού για S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες.

## **2.3 Μέθοδοι χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών**

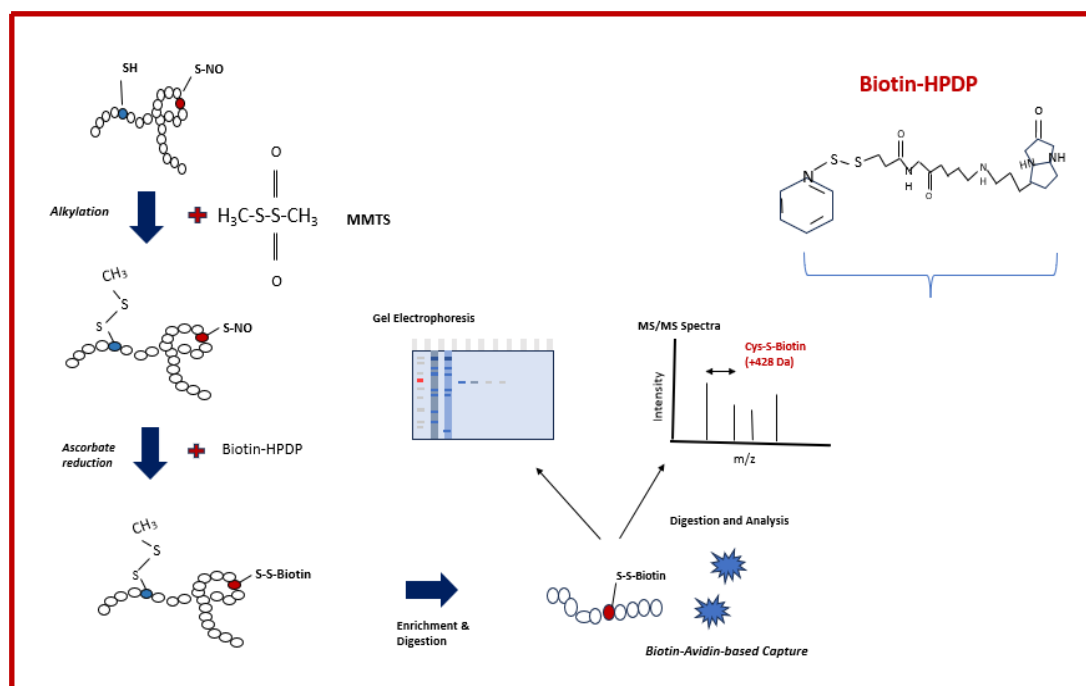
### **2.3.1 Biotin Switch**

Η πρώτη μέθοδος χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών, αναπτύχθηκε από τον Jaffrey και τους συνεργάτες του και είναι γνωστή ως biotin switch [48]. Οι μετέπειτα παραλλαγές της μεθόδου, επέτρεψαν ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης καθώς και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων S-νιτροζυλίωσης σε συγκεκριμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα. Για τον χημικό εμπλουτισμό απαιτούνται δύο στάδια:

1. Αρχικά, ανάγονται οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεϊνες με ασκορβικό οξύ και στη συνέχεια οι ανηγμένες θειόλες που σχηματίζονται αντιδρούν με biotin-HPDP ((N-[6-(βιοτιναμιδο)εξυλ]-3'-(2'-πυριδυλθειο)-προπιοναμίδιο).
2. Ακολουθεί η απομόνωση των τροποποιημένων πρωτεϊνών με χρήση αβιδίνης ή στρεπταβιδίνης (εικόνα 9).

Ο χημικός εμπλουτισμός μπορεί να συνδυαστεί με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, και την χρήση αντισωμάτων προκειμένου να επιβεβαιωθεί αν συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι S-νιτροζυλιωμένες. Εναλλακτικά, ο χημικός εμπλουτισμός συνδυάζεται με

φασματομετρία μάζας για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών και θέσεων S-νιτροζυλίωσης (εικόνα 9) [49].

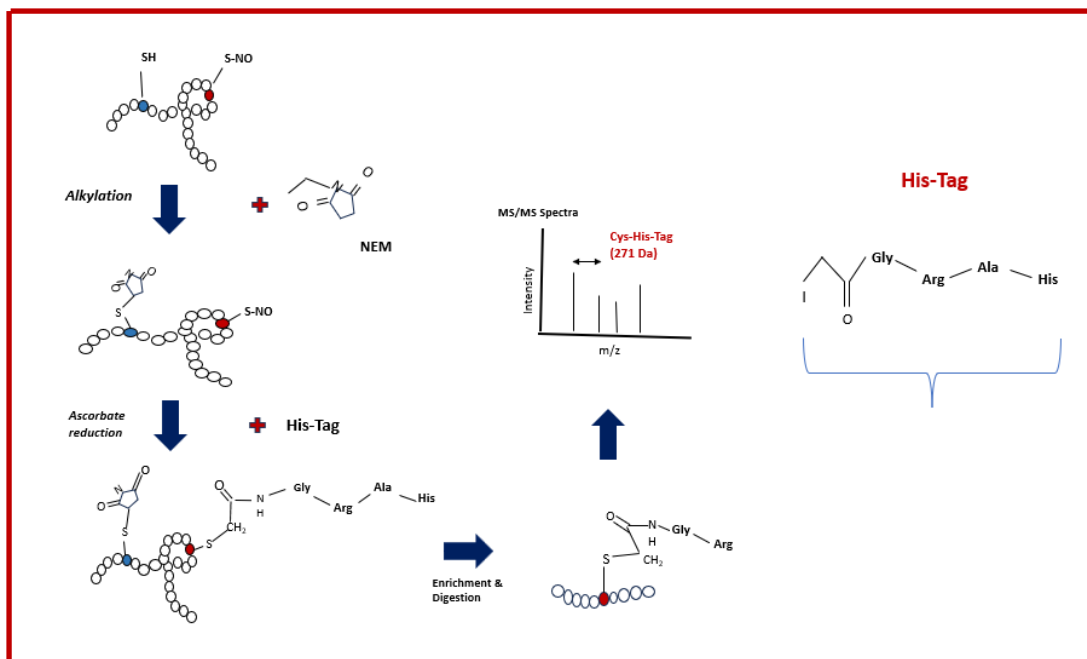


**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση του χημικού εμπλουτισμού με χρήση βιοτίνης

### 2.3.2 His-Tag Switch

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί παραλλαγή της Biotin Switch. Αναπτύχθηκε από την Camerini και τους συνεργάτες της το 2007 [50]. Μετά την απομάκρυνση της S-νιτροζυλίωσης με ασκορβικό οξύ, οι ανηγμένες κυστεΐνες που προκύπτουν αντιδρούν με μόρια ιοδοακετοξικού που είναι συζευγμένα με πεπτίδιο που στο άλλο άκρο του φέρει tag ιστιδίνης (Εικόνα 10). Οι σημασμένες με ιστιδίνη πρωτεΐνες διαχωρίζονται από τις υπόλοιπες με χρωματογραφία νικελίου και στη συνέχεια ακολουθεί πέψη των πρωτεϊνών με θρυψίνη. Εκτός των πρωτεϊνών, η θρυψίνη υδρολύει και το πεπτίδιο που συνδέει τον αλκυλιωτικό παράγοντα με την ιστιδίνη διότι το πεπτίδιο αυτό περιέχει ένα κατάλοιπο αργινίνης (His-tag στην Εικόνα 10). Αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση της μάζας των πεπτιδίων που συνδέονται με τον αλκυλιωτικό παράγοντα κατά 271.12Da. Η μεταβολή της μάζας αποτελεί διαγνωστικό δείκτη για την ταυτοποίηση των τροποποιημένων πεπτιδίων και τον καθορισμό της ακριβούς θέσης της S-νιτροζυλίωσης. Οι θέσεις S-νιτροζυλίωσης ταυτοποιούνται με γρήγη χρωματογραφία συζευγμένης με φασματογράφο μάζας (LC-MS/MS) (εικόνα 10) [50].





**Εικόνα 10:** Σχηματική απεικόνιση του χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση μορίων Ιστιδίνης.

### 2.3.3 SNO – RAC (Resin Assisted Capture)

Η συγκεκριμένη μέθοδος διαφοροποιείται από την Biotin Switch, στο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών. Σε αυτήν την προσέγγιση, τα ανηγμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα αντιδρούν με την θειοπροπυλική ομάδα σεφαρόζης και σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ της ανηγμένης κυστεΐνης και του υποστρώματος εμπλουτισμού [51]. Έπειτα, οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλύονται και ταυτοποιούνται με ανοσοαποτύπωση (Western Blotting) ή με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες υφίστανται πέψη όσο είναι συνδεδεμένες με τη ρητίνη και τα πεπτίδια που εκλύονται ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας. Με τον τρόπο αυτόν, παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τις θέσεις της S-νιτροζυλίωσης. Βασικό πλεονέκτημα της SNO-RAC έναντι της Biotin Switch είναι ότι εμπλουτίζει πρωτεΐνες με μέγεθος >100 kDa [51].

### 2.3.4 Εμπλουτισμός S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών με νανοσωματίδια χρυσού (gold nanoparticles)

Ο χημικός εμπλουτισμός απαιτεί αρχικά την αλκυλίωση των ανηγμένων θειολών ακολουθούμενη από πέψη των πρωτεϊνών [52]. Τα πεπτίδια που δημιουργούνται, εκτίθενται, σε νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), τα οποία αντιδρούν,

με τα S-νιτροζυλιωμένα κυστεϊνικά κατάλοιπα. Η αντίδραση οδηγεί σε απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου (\*NO) και σε σχηματισμό δεσμού μεταξύ της αντίστοιχης κυστεΐνης και του νανοσωματιδίου. Για την έκλυση των πεπτιδίων από τα νανοσωματίδια χρησιμοποιείται η διθειοθρεϊτόλη (DTT). Τα πεπτίδια ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας [52]. Παρόλου που αρχικά η προσέγγιση αυτή θεωρήθηκε ελπιδοφόρα, σύντομα διαπιστώθηκε ότι έχει σημαντικά μειονεκτήματα. Τα νανοσωματίδια χρυσού δεν είναι εκλεκτικά έναντι της S-νιτροζυλίωσης αλλά αντιδρούν και με άλλες κυστεϊνικές τροποποιήσεις οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ο εμπλουτισμός δεν είναι αποτελεσματικός σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα παρά μόνο με απομονωμένες πρωτεΐνες. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με το αυξημένο κόστος για την σύνθεση των νανοσωματιδίων περιόρισαν σημαντικά τη χρήση της συγκεκριμένης προσέγγισης.

### **2.3.5 Εμπλουτισμός S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση ενώσεων φωσφίνης (SNOTRAP)**

Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τον Seneviratne και τους συνεργάτες του στο MIT της Βοστώνης [53,54]. Όπως και με όλες τις μέχρι στιγμής αναφερόμενες προσεγγίσεις, απαραίτητο βήμα είναι η αλκυλίωση των ανηγμένων κυστεϊνών. Στη συνέχεια, οι αλκυλιωμένες πρωτεΐνες αντιδρούν με θειοεστέρα της φαινυλ-φωσφίνης συνδεδεμένη με βιοτίνη. Με μια σειρά αντιδράσεων πυρινόφιλης προσβολής και αναδιατάξεων του μορίου της φαινυλ-φωσφίνης σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ του probe και της S-νιτροζυλιωμένης κυστεΐνης. Στη συνέχεια, η αβιδίνη χρησιμοποιείται για την απομόνωση των σημασμένων με βιοτίνη πρωτεϊνών. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες υφίστανται πέψη πριν την αντίδραση με τη βιοτίνη οπότε απομονώνονται τα πεπτίδια που περιέχουν τις θέσεις νιτροζυλίωσης. Η ταυτοποίηση πρωτεϊνών και θέσεων S-νιτροζυλίωσης πραγματοποιείται με φασματομετρία μάζας [53,54].

Η συγκεκριμένη μέθοδος εμπλουτισμού πλεονεκτεί έναντι των προαναφερόμενων για τους εξής λόγους. Η φωσφίνη αντιδρά απευθείας με τις S-νιτροζυλιωμένες θειόλες, επομένως, αποφεύγεται η χρήση ασκορβικού που επηρεάζει την εκλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα του χημικού εμπλουτισμού. Το άζωτο του NO συμμετέχει στα αρχικά βήματα του μηχανισμού που αναδιατάσσει το μόριο της φαινυλ-φωσφίνης προκειμένου αυτό να λάβει την τελική διαμόρφωση του που οδηγεί στο σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού. Η προϋπόθεση αυτή εξασφαλίζει την εκλεκτικότητα του εμπλουτισμού [53].

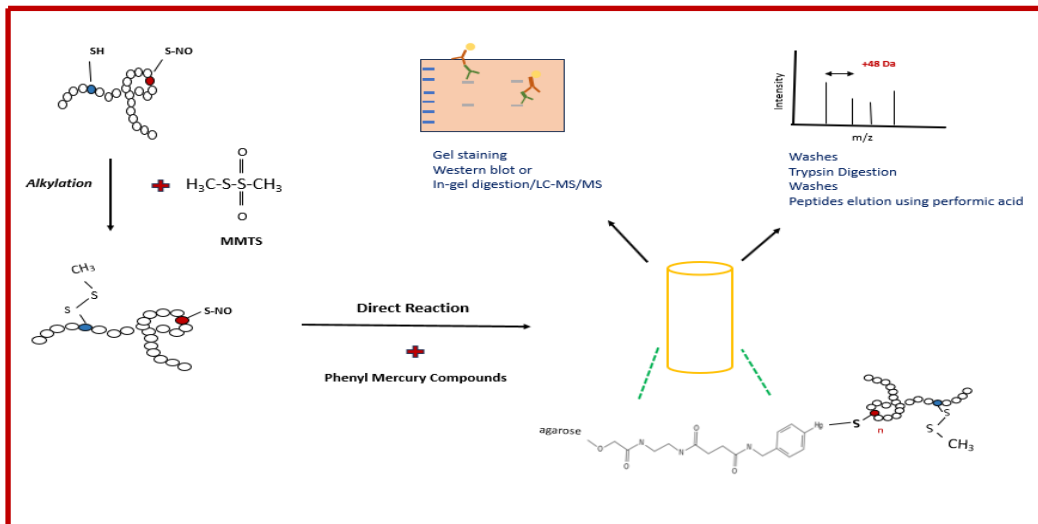
### 2.3.6 Εμπλουτισμός με χρήση οργανικού υδραργύρου

Ο χημειοεκλεκτικός εμπλουτισμός με χρήση οργανικού υδραργύρου βασίζεται στην αντίδραση Saville η οποία αφορά την απευθείας και εκλεκτική αντίδραση του οργανικού υδραργύρου με τις S-νιτροζοθειόλες [55].

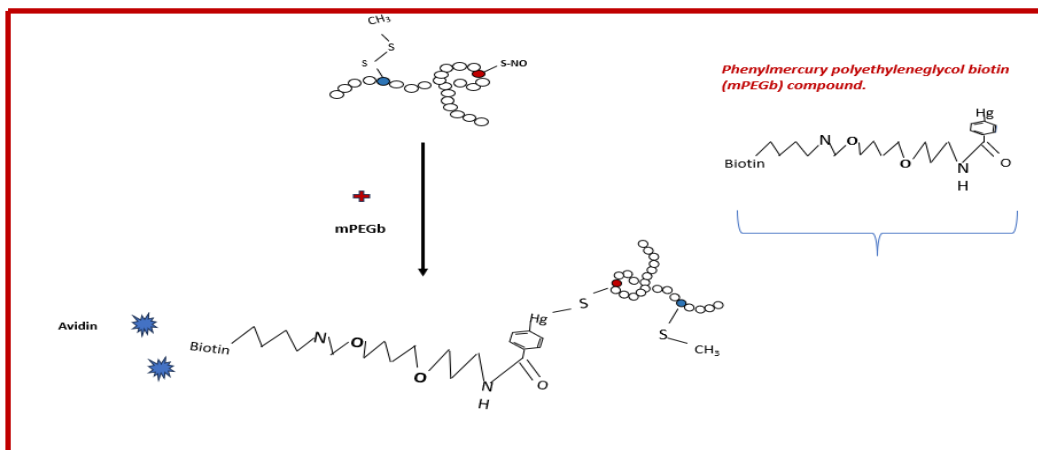
Αρχικά, ο χημικός εμπλουτισμός βασίστηκε στην χρήση φενυλ-υδραργύρου ακινητοποιημένου σε σφαιρίδια αγαρόζης (ρητίνη οργανικού υδραργύρου) (εικόνα 11), ή συνδεδεμένου σε πολυαιθυλενική γλυκολ-βιοτίνη (mPEGb) (εικόνα 12). Η παράλληλη χρήση των ενώσεων αυτών έδειξε ότι υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ τους σε ότι αφορά τον εμπλουτισμό σε νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες και πεπτίδια όταν η αρχική ποσότητα του βιολογικού δείγματος είναι περιορισμένη [56]. Σύντομα, η χρήση του Hg-mPEG εγκαταλείφθηκε για λόγους που σχετίζονται με την μείωση του όγκου των αποβλήτων υδραργύρου, το υψηλό κόστος σύνθεσης του και την αδυναμία επαναχρησιμοποίησής του. Σε αντίθεση με το Hg-mPEG, η ρητίνη υδραργύρου αναγεννάται και επαναχρησιμοποιείται. Προκειμένου όμως να εξασφαλίζεται επαρκής κάλυψη του S-νιτροζοπρωτεώματος με χρήση μόνο της ρητίνης υδραργύρου, απαιτείται μεγαλύτερη αρχική ποσότητα πρωτεΐνης για τον χημικό εμπλουτισμό καθώς και μεγαλύτερος αριθμός βιολογικών δειγμάτων (biological replicates) [37,47,56].

Όπως και οι υπόλοιπες προσεγγίσεις που περιγράφηκαν μέχρι στιγμής, η μέθοδος χημικού εμπλουτισμού με χρήση οργανικού υδραργύρου απαιτεί την αλκυλίωση του δείγματος πριν την αντίδραση με αυτόν. Μεταξύ των διαθέσιμων αλκυλιωτικών αντιδραστηρίων αποδείχθηκε ότι το MMTS είναι αποτελεσματικό σε ποσοστό >99.95% [49]. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε χρωματογραφικές στήλες που περιέχουν την ρητίνη υδραργύρου για την πραγματοποίηση της αντίδρασης των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών με τον οργανικό υδράργυρο. Συνέπεια της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ θειόλης και υδραργύρου που οδηγεί στην ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στην ρητίνη. Οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-ρητίνης εξαλείφονται με χρήση διαλυμάτων διαφορετικής σύστασης και απορρυπαντικών. Τέλος, οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλύονται μετά από αναγωγή του δεσμού S-Hg με β-μερκαπτοαιθανόλη. Οι εκλούμενες πρωτεΐνες ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας ή σε συνδυασμό με ανοσοαποτύπωση ανιχνεύονται συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Εναλλακτικά, όταν ο στόχος είναι η ανίχνευση της θέσης τροποποίησης στις πρωτεΐνες, πραγματοποιείται πέψη με θρυψίνη στις

πρωτεΐνες που είναι ακινητοποιημένες στη ρητίνη (on column digestion) και απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων πεπτιδίων με πλύσεις. Για την έκλυση των συνδεδεμένων με τη ρητίνη πεπτιδίων, χορηγείται περφορμικό οξύ το οποίο οξειδώνει την κυστεΐνη σε κυστεϊκό οξύ. Η οξείδωση αυτή προκαλεί και ταυτόχρονη αύξηση της μάζας της κυστεΐνης κατά +48 Da, διευκολύνοντας την ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης στην πρωτεΐνη [37,47,56,57].



**Εικόνα 11:** Περιγραφή της μεθόδου εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση ρητίνης υδραργύρου.



**Εικόνα 12:** Χημική δομή φενυλ-υδράργυρο-πολυαιθυλενγλυκολ-βιοτίνης (mPEG)

## Σκοπός της Μελέτης

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος μιας ευρύτερης μελέτης που διεξάγεται σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο της Πενσυλβάνια (University of Pennsylvania) και συγκεκριμένα με το εργαστήριο του Dr. Harry Ischiropoulos. Η μελέτη διερευνά τη βιολογική σημασία της σηματοδότησης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στην καρδιά, τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας του NO. Συγκεκριμένα, διερευνάται εάν το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από το cGMP λειτουργεί ανεξάρτητα ή συνεργατικά ή επικαλύπτεται με την σηματοδότηση μέσω της S-νιτροζυλίωσης.

Με βάση το ευρύτερο πλαίσιο ορίστηκαν οι δύο κύριοι στόχοι της παρούσας εργασίας

Ο πρώτος στόχος ήταν η μεταφορά της τεχνογνωσίας στο εργαστήριό μας. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της εκλεκτικότητας, ευαισθησίας και επαναληψιμότητας του χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων με χρήση οργανικού υδραργύρου. Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένες πρωτεΐνες, πολύπλοκα βιολογικά δείγματα σε συνδυασμό με βιολογικά και χημικά controls.

Ο δεύτερος στόχος ήταν η χρήση του χημικού εμπλουτισμού σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας προκειμένου να ταυτοποιηθούν θέσεις ενδογενούς νιτροζυλίωσης στο καρδιακό μυ. Στο πλαίσιο αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ποντικών αγρίου τύπου καθώς και γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν εκφράζανε μια συνθάση του NO (nNOS<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> και eNOS<sup>-/-</sup>) ή και τις τρεις συνθάσες tNOS<sup>-/-</sup>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 3.1 Πειραματόζωα

Όπως προαναφέρθηκε η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο της Πενσυλβάνια. Τα πειραματόζωα στεγαζόντουσαν στο τροφείο πειραματόζωων του Νοσοκομείου Παίδων της Φιλαδέλφειας (CHOP Research Institute). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον Οδηγό των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας για τη φροντίδα και τη χρήση των εργαστηριακών ζώων και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Φροντίδας και Χρήσης Ζώων του Νοσοκομείου Παίδων της Φιλαδέλφειας. Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αρσενικών ποντικών αγρίου τύπου C57BL/6J (#000664), Nos1tm1Unc C57BL/6J (nNOS<sup>-/-</sup>: #002986), Nos3tm1Unc C57BL/6J (eNOS<sup>-/-</sup>: #002684) και Nos2tm1Lau C57BL/6J (iNOS<sup>-/-</sup>: #002596) τα οποία ελήφθησαν από το Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Για την απομόνωση της καρδιάς, τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας Nembutal 50mg/ kg και το αίμα απομακρύνθηκε από την καρδιά με διοχέτευση ψυχρού PBS μέσω της αριστερής κοιλίας (left ventricle perfusion). Οι καρδιές των ποντικών συλλέχθηκαν, καταψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι τη χρήση. Κατά μέσο όρο το χρονικό διάστημα μεταξύ της αναισθησίας και της κατάψυξης της καρδιάς ήταν περίπου 3 λεπτά. Σε ότι αφορά τα ποντίκια που δεν εκφράζουν τις τρεις isoμορφές της NOS (tNOS null), οι καρδιές που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το εργαστήριο του Dr. Hiroaki Shimokawa από το Tohoku University, Sendai, Japan. Η ερευνητική ομάδα στα Ιωάννινα παρέλαβε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τα οποία προτετοιμάστηκαν ως εξής.

Ο κατεψυγμένος καρδιακός ιστός (150 mg υγρού βάρους) κόπηκε σε μικρότερα κομμάτια και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο Eppendorf 5 ml με δύο μπάλες από ανοξείδωτο χάλυβα 5 mm (Retsch) και στη συνέχεια καταψύχθηκε σε υγρό άζωτο. Ο ιστός κονιοροποιήθηκε με τη χρήση σφαιρόμυλου MM400n (Retsch) για τέσσερις κύκλους στα 30 Hz για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (8M Urea, 75mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 2 μg/mL λευπεπτίνη, 10 μM απροτινίνη, 10mM φθοριούχο νάτριο, 5mM βουτυρικό νάτριο, 5mM ιωδοακεταμίδιο, 1:100 κοκτέιλ αναστολέων φωσφοροπρωτεάσης 2 και 3 (Sigma P5726, P0044), βενζονάση (Novagen 70664-3)) προστέθηκε στην κατεψυγμένη σκόνη ιστού και επεξεργάστηκε σε σφαιρόμυλο για δύο

κύκλους στα 30 Hz για 30 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 2500 x g για 4 λεπτά στους 4°C προκειμένου να μειωθεί ο αφρός και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μηχανική λύση. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 15.000 x g για 10 λεπτά στους 4°C. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του υπερκείμενου προσδιορίστηκε με τη μέθοδο BCA όπως περιγράφεται παρακάτω.

### **3.2 Προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA**

#### Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος BCA είναι μία φασματοφωτομετρική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα και περιλαμβάνει χρωματομετρική δοκιμή. Βασίζεται στην αντίδραση διουρίας, κατά την οποία συμβαίνει αναγωγή των ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$  σε  $\text{Cu}^+$ , υπό αλκαλικές συνθήκες, παρουσία αμιδικών ομάδων. Στην συνέχεια, τα ιόντα  $\text{Cu}^+$  χηλικοποιούνται με το χρωμογόνο αντιδραστήριο βικινχονινικού οξέος που προστίθεται, οδηγώντας στην δημιουργία ενός μωβ συμπλόκου που απορροφά στα 562 nm.

#### Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκε το kit “BCA Protein Assay Kit” (Novagen®) το οποίο περιλαμβάνει

BCA Solution

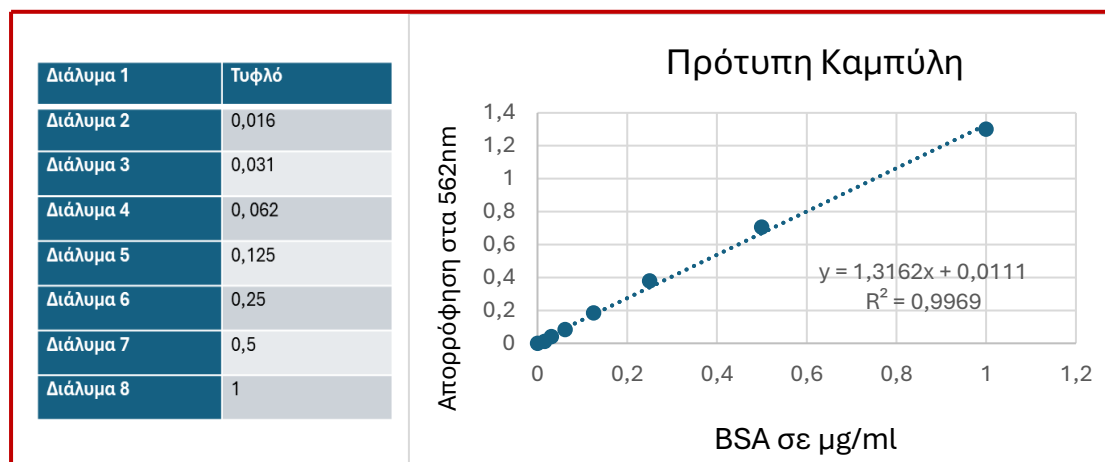
4% Cupric Sulfate

BSA Standard (2 mg/mL)

Το BCA Solution και το Cupric Sulfate αναμειγνύονται σε αναλογία 49:1.

#### Πειραματική Πορεία

Αρχικά κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις πρωτεΐνης BSA από 0.01 mg/mL μέχρι 1 mg/mL.



**Εικόνα 13:** Πρότυπη Καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Σε πλακίδιο Elisa 96 θέσεων τοποθετούνται αρχικά 25µL από κάθε πρότυπο ή άγνωστο δείγμα. Στη συνέχεια, προστίθενται 200µL διαλύματος χρώσης και το μείγμα αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Η απορρόφηση μετράται σε plate reader EPOCH 2, το οποίο είναι εφοδιασμένο με λογισμικό για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.

### 3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε Gel πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

#### Αρχή Μεθόδου

Με την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE) πραγματοποιείται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, παρουσία του μετουσιωτικού παράγοντα δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνικών μορίων και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο εξουδετερώνοντας το εγγενές φορτίο τους. Εκτός του SDS, χρησιμοποιείται και β-μερκαπτοαιθανόλη η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά μόρια καθίστανται έτσι ευθύγραμμα και φέρουν όλα αρνητικό φορτίο. Η παραπάνω επεξεργασία, επιτρέπει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών κατά μέγεθος στην ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε gel πολυακρυλαμιδίου το οποίο χρησιμεύει ως «μοριακό κόσκινο» επιτρέποντας την μετανάστευση μικρών πρωτεϊνών με υψηλότερο ρυθμό σε σχέση με τις μεγαλύτερες. Οι ζώνες των πρωτεϊνών στο gel, παρατηρούνται μετά από χρώση του με βαφή Coomassie Brilliant Blue. Η χρώση των



πρωτεϊνών εξυπηρετεί τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους τους καθώς και την σχετική τους ποσοτικοποίηση.

Το gel πολυακρυλαμιδίου παράγεται από τον συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου μέσω ενός μηχανισμού δημιουργίας ελευθέρων ριζών με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (APS) για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Παρασκευάζονται δύο διαφορετικής σύστασης gel ηλεκτροφόρησης. Το gel επιστοιβάξης το οποίο χρησιμοποιείται για την ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών και το gel διαχωρισμού στο οποίο συμβαίνει η μετανάστευση των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος.

#### Αντιδραστήρια

- 2-Μερκαπτοαιθανόλη (Sigma Aldrich)
- Ακρυλαμίδιο (Sigma Aldrich)
- Γλυκερόλη (AnalaR)
- Γλυκίνη (Sigma Aldrich)
- Κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma Aldrich)
- Μεθανόλη (Reidel-de Haën)
- Οξικό Οξύ (Fluka)
- Πρότυπα Μοριακά Βάρη (Prestained protein ladder 10-245 kDa, Thermo Scientific)
- Σουλφονυλοδωδέκυλο νάτριο (SDS, Applichem)
- Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED, Sigma Aldrich)
- Υπερθειικό αμμώνιο (APS, Sigma Aldrich)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich)
- Tris-HCl (Sigma Aldrich).

#### Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8: Προστίθενται 6.0 g Tris-HCl σε 100 mL απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται σε τιμή 6.8 χρησιμοποιώντας διάλυμα HCl 12 N. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8: Προστίθενται 18.15 g Tris-HCl σε 100 mL απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται σε τιμή 8.8 χρησιμοποιώντας διάλυμα NaOH 12 N. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

3. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10X: Το διάλυμα έχει σύσταση 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-HCl και 0,1 % w/v SDS. Για την Παρασκευή του διαλύονται 144.1 g γλυκίνης, 30.3 g Tris-HCl και 10 g SDS σε 1 L απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται σε τιμή 8.8. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1X: 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 L με νερό.
5. Διάλυμα 10% w/v SDS: Διαλύονται 10g SDS σε 100 mL νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Διάλυμα 10 % w/v υπερθειικού αμμωνίου (APS): Διαλύονται 0.1 g υπερθειικού αμμωνίου σε 1 mL νερού.
7. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (Sample Buffer) 6X. Το διάλυμα έχει σύσταση 65.8 mM Tris-HCl, 2.1 % SDS, 26.3 % v/v γλυκερόλη, 0.01 % w/v κυανό της βρωμοφαινόλης και 2% v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη. Για την Παρασκευή του διαλύονται 398.6 mg Tris-HCl, 1.05 g SDS, 5.0 mg κυανού της βρωμοφαινόλης, 13.15 mL γλυκερόλης και 1 mL 2-μερκαπτοαιθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 50mL και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 1,0mL σε πλαστικά σωληνάκια, τα οποία φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
8. Διάλυμα χρωματισμού gel (Staining Buffer): Το gel έχει σύσταση 0.1 % w/v Coomassie R-250, 40% v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Προστίθενται 0.5 g Coomassie R-250 σε 400mL μεθανόλης και 100mL οξικού οξέος. Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι το 1L. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Διάλυμα αποχρωματισμού gel (Destaining Buffer): Το διάλυμα έχει σύσταση 40 % v/v μεθανόλη και 10% v/v οξικό οξύ. Αναμιγνύονται 400mL μεθανόλης και 100mL οξικού οξέος. Ο όγκος του διαλύματος συμπληρώνεται με νερό μέχρι το 1L. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Πειραματική Διαδικασία

#### (A) Παρασκευή του gel διαχωρισμού (Resolving gel)

Σε σωληνάκι Falcon των 15mL προστίθενται τα αντιδραστήρια με την σειρά που αναφέρονται στον πίνακα. Στη συνέχεια, το μείγμα αναμειγνύεται με χρήση Vortex

και μεταφέρεται ανάμεσα στις υάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης, μέχρις ότου φτάσει στο επιθυμητό ύψος. Τέλος, καλύπτεται η επιφάνειά του με νερό και αφήνεται να πήξει.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Απαιτούμενος όγκος για πυκνότητα 12%</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,5mL
<b>Διάλυμα Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8</b>	2,5mL
<b>Ακρυλαμίδιο</b>	4mL
<b>10% SDS</b>	100μL
<b>10% Υπερθειικό Αμμώνιο (APS)</b>	100μL
<b>TEMED</b>	10μL

#### (B) Παρασκευή του gel ευθυγράμμισης (Stacking Gel)

Σε σωληνάκι Falcon των 15mL προστίθενται τα αντιδραστήρια με την σειρά που αναφέρονται στον πίνακα. Στη συνέχεια, το μείγμα αναμειγνύεται με χρήση Vortex και προστίθεται ανάμεσα στις υάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης, πάνω από το resolving gel που έχει πήξει και αφότου απομακρυνθεί το νερό που είχε προστεθεί στην επιφάνεια. Μετά την προσθήκη και αυτού του μείγματος, προστίθεται στην συσκευή το χτενάκι για την δημιουργία κελιών στο gel. Το μείγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Απαιτούμενος Όγκος</b>
<b>diH<sub>2</sub>O</b>	3mL
<b>Διάλυμα Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8</b>	1,25mL
<b>Ακρυλαμίδιο</b>	0,66mL
<b>10% SDS</b>	50μL

<b>10% Υπερθειικό Αμμώνιο (APS)</b>	50μL
<b>TEMED</b>	5μL

(Γ) Προετοιμασία των δειγμάτων και φόρτωση τους στο gel

Τα δείγματα αναμιγνύονται με κατάλληλο όγκο sample buffer 6x και ακολουθεί «βρασμός» στους 90 °C για 5 λεπτά. Εκτός των δειγμάτων, στο gel φορτώνεται μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein standards). Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα σε ηλεκτρικό πεδίο έντασης 150-200 V μέχρι το μέτωπο της βαφής να φτάσει στο τέλος του resolving gel.

(Δ) Χρώση του Gel με Coomassie Blue

Το gel μεταφέρεται σε δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα χρωματισμού (Staining solution). Το gel αναδεύεται μέχρι οι πρωτεϊνικές ζώνες να γίνουν εμφανείς.

(Ε) Αποχρωματισμός του Gel

Το διάλυμα χρωματισμού αντικαθίσταται με διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution) και παραμένει υπό ανάδευση μέχρι να παραμείνουν χρωματισμένες μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες.

### 3.4 Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών κατά Western

#### Αρχή Μεθόδου

Η ανοσοαποτύπωση είναι μία μέθοδος ταυτοποίησης, ποσοτικοποίησης και ανάλυσης πρωτεϊνών σε ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα βασιζόμενη στην ειδική πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PVDF).
2. Blocking της μεμβράνης. Η μεμβράνη αναδεύεται παρουσία διαλύματος άπαχου γάλακτος. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του βιολογικού δείγματος μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.
3. Επώαση της μεμβράνης με πρωτογενή αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.
4. Σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων με δευτερογενή αντισώματα που φέρουν horse radish peroxidase (HRP)

5. Ανίχνευση των πρωτεϊνών του ενδιαφέροντος με χρήση της χημειοφωταύγειας.

#### Αντιδραστήρια/Υλικά

Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (ECL, Merck Millipore)  
Γλυκίνη (Sigma Aldrich)  
Μεθανόλη (Riedel-de Haën)  
Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Merck Millipore)  
Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου  
Χλωριούχο νάτριο (NaCl, Thermo Scientific)  
Χρωστική Rouge Ponceau, 0.1% διαλυμένο σε 5 % οξικό οξύ (Sigma Aldrich)  
Blotting Paper (Macherey Nagel)  
Tris-HCl (Sigma Aldrich)  
Tween-20 (Sigma Aldrich)

#### Διαλύματα

1. Πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer 10x). Το διάλυμα έχει σύσταση 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-Base. Για την παρασκευή του διαλύονται 30.3 g Tris-Base και 144.1 g γλυκίνη και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι το 1L. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στην τιμή 8.3.
2. Διάλυμα εργασίας μεταφοράς (Transfer Buffer 1X): 100mL πυκνού διαλύματος αναμιγνύονται με 200mL μεθανόλης και ο όγκος ρυθμίζεται με νερό στο 1L.
3. Πυκνό διάλυμα εκπλύσεων (TBS 10X): Το διάλυμα έχει σύσταση 1.5 M NaCl και 200mM Tris-Base. Για την παρασκευή του διαλύονται σε νερό 87.7 g NaCl και 24.2 g Tris-Base σε τελικό όγκο 1L. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στην τιμή 7.6.
4. Διάλυμα έκπλυσης TBS-T: 100mL πυκνού διαλύματος αραιώνονται με νερό σε τελικό όγκο 1L. Στο τελικό διάλυμα προστίθεται 0.05 % v/v Tween-20.
5. Διάλυμα γάλακτος 5% (Blocking Buffer). Για την παρασκευή του διαλύονται 2.5 g σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος σε 50mL διαλύματος έκπλυσης TBS-T.

#### Αντισώματα

(A) Πρωτογενή αντισώματα

Rabbit monoclonal Anti CPT2 antibody (Abcam)

Rabbit polyclonal Anti VLCAD antibody (Abcam)

Rabbit polyclonal Anti HADHB antibody (Abcam)

(B) Δευτερογενές αντίσωμα

Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) (Abcam)

### Πειραματική Διαδικασία

(A) Ενεργοποίηση μεμβράνης PVDF: Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βυθίζεται σε μεθανόλη για 3-5 λεπτά.

(B) Μεταφορά Πρωτεϊνών: Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης το gel μεταφέρεται σε διάλυμα μεταφοράς και κατασκευάζεται το sandwich ως εξής. Στην κασετίνα μεταφοράς τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά σφουγγάρι, χαρτί Whatman, gel, PVDF μεμβράνη, χαρτί Whatman και σφουγγάρι. Το sandwich πλάθεται με ήρεμες κινήσεις ώστε να απομακρυνθεί ο αέρας. Η κασετίνα τοποθετείται στην συσκευή μεταφοράς με τέτοιο τρόπο ώστε το gel να τοποθετείται στον αρνητικό πόλο (μαύρο) και η μεμβράνη στον θετικό (κόκκινο). Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο έντασης 100V για 2 ώρες.

(B) Blocking και επώαση με αντισώματα

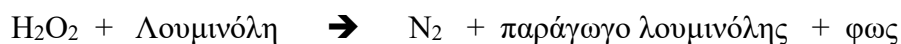
Η μεμβράνη μετά την μεταφορά, εμβαπτίζεται σε blocking buffer και αφήνεται υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το blocking buffer απορρίπτεται και στην θέση του προστίθεται TBS-T που περιέχει 1% γάλα. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα και αφήνεται για 12 ώρες επώαση. Η ποσότητα του κάθε πρωτογενούς αντισώματος που προστίθεται φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, πραγματοποιούνται εκπλύσεις με διάλυμα TBST, το οποίο αντικαθίσταται 2 φορές κάθε 5 λεπτά και στη συνέχεια 2 φορές κάθε 10 λεπτά. Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενές αντίσωμα (αραίωση 1:10.000) σε διάλυμα 1% γάλα σε TBST για 60 λεπτά. Τέλος, η μεμβράνη πλένεται όπως περιεγράφηκε προηγουμένως.

<b>Πρωτογενή Αντισώματα</b>	<b>Αραιώσεις (Συγκέντρωση αντισώματος)</b>
-----------------------------	--

<b>Rabbit monoclonal Anti CPT2 antibody</b>	1/3.000
<b>Rabbit polyclonal Anti VLCAD antibody</b>	1/3.000
<b>Rabbit polyclonal Anti HADHB antibody</b>	1/3.000

(Γ) Ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η ενισχυμένη χημειοφωταύγεια βασίζεται στην αντίδραση της οξείδωσης της λουμινόλης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), και του ενζύμου υπεροξειδάση σε αλκαλικό περιβάλλον. Κατά την αποδιέγερση του παραγώγου της λουμινόλης στην θεμελιώδη κατάσταση εκλύονται φωτόνια (φως).



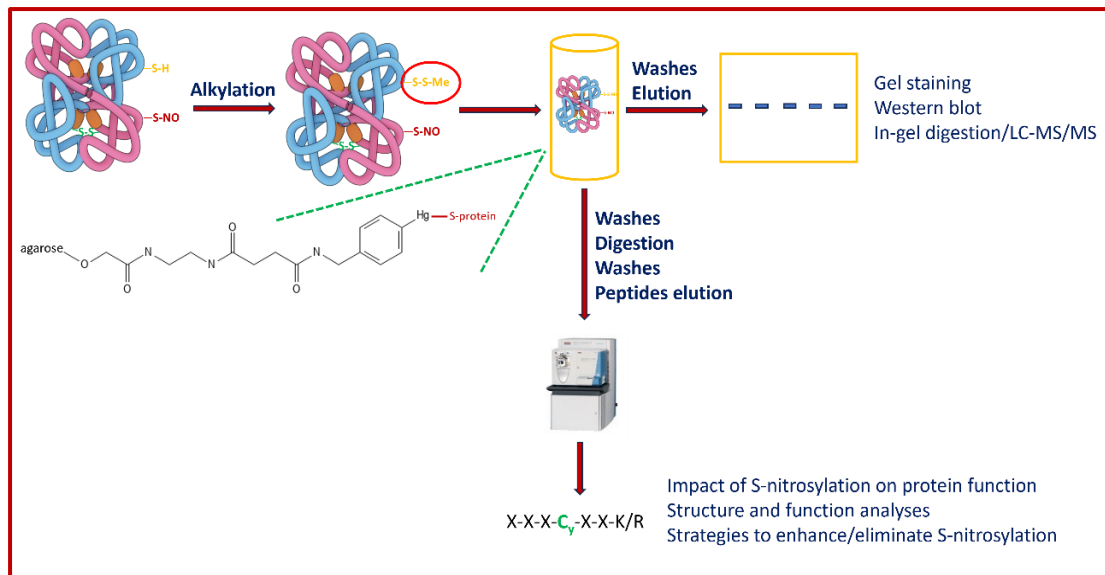
Η ένταση της ακτινοβολίας ενισχύεται από την προσθήκη χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες. Η ακτινοβολία αυτή αποτυπώνεται σε φιλμ ή φωτογραφική κάμερα.

### 3.5 Ανίχνευση S-νιτροσυλιωμένων Πρωτεϊνών

#### Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην εκλεκτική και απευθείας αντίδραση του οργανικού υδραργύρου με τις S-νιτροσοκυστεΐνες, μία αντίδραση που περιεγράφηκε αρχικά από τον Saville [55]. Συγκεκριμένα, κατά την αντίδραση, ο υδράργυρος σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με τη θειόλη, με ταυτόχρονη απομάκρυνση του NO (displacement). Η πειραματική διαδικασία συνοψίζεται στα εξής βήματα [47, 57,59].

1. Αλκυλίωση των ανηγμένων μη-τροποποιημένων θειολών
2. Αντίδραση των S-νιτροζυλιωμένων θειολών με τον οργανικό υδράργυρο ο οποίος είναι ακινητοποιημένος σε ρητίνη αγαρόζης.
3. Έκλυση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών ή πέψη τους.



**Εικόνα 14:** Διάγραμμα ροής της μεθόδου χημικού εμπλουτισμού *S*-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

#### Αντιδραστήρια/Υλικά

- Affi-gel ® 10 media (Bio-Rad)
- 4-Aminophenylmercuric acid (Sigma Aldrich)
- Beta Mercaptoethanol (Sigma Aldrich)
- Centrifugal Filter Units (Sigma Aldrich)
- Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, Sigma Aldrich)
- Dimethylformamide (DMF, Thermo Scientific)
- Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, Sigma Aldrich)
- Econo-Column® Chromatography Columns, 2.5 × 10 cm (Bio-Rad)
- Ethanolamine (Sigma Aldrich), minimum 98%
- 2-Propanol (Fisher:Chemical)
- S-Methyl methanethiosulfonate (MMTS, Sigma Aldrich)
- Sodium bicarbonate (Sigma Aldrich)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma Aldrich)
- Triton-X-100 (Sigma Aldrich)
- Urea (Sigma Aldrich)

#### Διαλύματα

(A) Διάλυμα ενεργοποίησης (Activation Buffer): Το διάλυμα έχει σύσταση 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.8 σε νερό.



(B) Διάλυμα ομογενοποίησης (homogenization buffer): Το διάλυμα έχει σύσταση 250 mM Hepes, 1mM διεθυλενοτριαμίνη πεντακετοξικό (DTPA), 0.1 mM neocuproine, και ρυθμίζεται σε pH 7.7.

(Γ) Διάλυμα εξισσορόπησης (Equilibration Buffer): Το διάλυμα έχει σύσταση 50 mM NaCl, 50 mM MES, 1 mM DTPA, pH 6.0.

(Δ) Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer): Το διάλυμα έχει σύσταση 250 mM MES, 1mM DTPA, pH 6.0. Πριν τη χρήση, στο διάλυμα προστίθεται SDS σε τελική συγκέντρωση 1%.

(E) Διαλύματα πλύσης (Washing Buffers)

Διάλυμα A: 50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 7.5 + 0.5% (w/v) SDS

Διαλυμα B: 50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 7.5 + 0.05% (w/v) SDS

Διάλυμα Γ: 50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 7.5 + 1% (v/v) Triton X-100 + 1M Urea

Διάλυμα Δ: 50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 7.5 + 0.1% (v/v) Triton X-100  
+ 0.1M Urea

Διάλυμα E: 1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.3 M NaCl

Διάλυμα Z: 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.3 M NaCl

### Πειραματική Διαδικασία

(A) Παρασκευή ρητίνης Υδραργύρου

Εκατό mL Affi-Gel-10 αφήνονται να ξεπαγώσουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρονται ποσοτικά στην επιφάνεια χωνιού Buchner καλυμένο με χαρτί Whatman. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται έκπλυση του gel με άνυδρη ισοπροπυλική αλκοόλη ενώ παράλληλα αναδεύεται ήπια. Σημαντική είναι η επαρκής ενυδάτωση του διαλύματος αγαρόζης ώστε να μη σχηματιστούν συσσωματώματα αυτής. Σε όγκομετρικό κύλινδρο 50mL, διαλύονται 2,1 gr p-αμινο-φενυλ-ακετοξικού υδραργύρου σε 30 mL DMF σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλήρης διάλυση του υδραργύρου απαιτεί ανάδευση για χρονικό διάστημα 15 έως 20 λεπτά. Τα σφαιρίδια αγαρόζης μεταφέρονται σε σκοτεινό δοχείο όπου προστίθεται το διάλυμα υδραργύρου. Το μείγμα αφήνεται υπό ήπια ανάδευση για τουλάχιστον 4 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται 1mL αιθανολαμίνης προκειμένου να «μπλοκάρει» τις ενεργές θέσεις της ρητίνης που δεν έχουν αντιδράσει με τον οργανικό υδράργυρο. Η ρητίνη υδραργύρου μεταφέρεται ποσοτικά σε χωνί Buchner καλυμένο με χαρτί Whatman και πλένεται αρχικά με 300mL DMF και κατόπιν με 1000mL άνυδρης ισοπροπυλικής αλκοόλης. Η ρητίνη υδραργύρου μεταφέρεται σε σκοτεινό δοχείο αφού αναμειχθεί με 100mL

άνυδρης ισοπροπυλικής αλκοόλης. Η ρητίνη είναι σταθερή για διάστημα έως και 3 μήνες αν αποθηκευθεί στους 4°C.

(B) Ενεργοποίηση ρητίνης υδραργύρου.

Ένας όγκος ρητίνης υδραργύρου μεταφέρεται στις κολώνες χρωματογραφίας. Αρχικά, πλένεται με 10 όγκους ισοπροπανόλης και στη συνέχεια με 20 όγκους νερού. Αν σχηματιστούν φυσαλίδες αέρα αυτές απομακρύνονται με ήπια ανάδευση με γυάλινη ράβδο. Η ρητίνη ενεργοποιείται με την προσθήκη 20 όγκων  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ , pH 8.8. Σε αλκαλικό περιβάλλον ευνοείται η απομάκρυνση της ακετοξυ ομάδας με υδρόλυση και κατά συνέπεια η μετατροπή του υδραργύρου σε μορφή που μπορεί να αντιδράσει με S-νιτροζυλιωμένη κυστεΐνη. Στη συνέχεια, η ρητίνη πλένεται με 20 όγκους equilibration buffer.

(Γ) Αλκυλίωση ανηγμένων κυστεϊνών (blocking of reduced cysteines).

Η αλκυλίωση των ανηγμένων θειολών πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες. Στο πρωτεϊνικό ομογενοποίηση που βρίσκεται στο διάλυμα ομογενοποίησης προστίθεται SDS σε τελική συγκέντρωση 2.5%. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και προσθήκη του αλκυλιωτικού παράγοντα MMTS σε συγκέντρωση 40mM υπό έντονη ανάδευση. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 50°C για 35 λεπτά, με ενδιάμεση έντονη ανάδευση ανά 5 λεπτά. Ακολουθεί καταβύθιση των πρωτεϊνών με 3 όγκους παγωμένης ακετόνης και παραμονή στους -20°C για 30 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 6000 x g στους 4°C για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορίπτεται και το ίζημα χρησιμοποιείται για τη συνέχεια του πειράματος.

(Δ) Αντίδραση S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών με τον οργανικό υδράργυρο.

Το ίζημα των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν επαναιωρείται με 1mL Loading Buffer και φορτώνεται σταδιακά στη στήλη. Αφού το δείγμα εισέλθει στη ρητίνη βιδώνεται το καπάκι στην έξοδο της κολώνας και προστίθενται 500μL νερού ώστε να μην στεγνώσει η ρητίνη. Η κολώνα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο ώστε να μην έρθει σε επαφή με το φως και συγκεκριμένα με ακτινοβολία UV, και αφήνεται να λάβει χώρα η αντίδραση για χρονικό διάστημα 120 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.

(E) Εξάλειψη μη ειδικών αλληλεπιδράσεων

Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η ρητίνη εκπλένεται διαδοχικά με 10 όγκους των διαλυμάτων Α-Δ. Τέλος, η ρητίνη εκπλένεται με 20 όγκους νερού. Οι

εκπλύσεις στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών που δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με τη ρητίνη.

Στο σημείο αυτό ακολουθείται διαφορετική διαδικασία έκλουσης των προσδεδεμένων πρωτεϊνών ανάλογα με τη στόχευση του πειράματος. Οι δύο εναλλακτικές διαδικασίες περιγράφονται παρακάτω.

#### (Z) Έκλουση πρωτεϊνών

Η παρακάτω διαδικασία έκλουσης και επεξεργασίας του δείγματος χρησιμοποιείται όταν ο στόχος του πειράματος είναι η ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western ή η ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας μετά από διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση ακολουθούμενη από πέψη των πρωτεϊνών στο gel ηλεκτροφόρησης (in gel digestion).

Μετά την τελευταία έκπλυση, προστίθεται στην ρητίνη διπλάσιος όγκος 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης με συνέπεια την αναγωγή του δεσμού Hg-S και την έκλουση των συνδεδεμένων στη ρητίνη πρωτεϊνών. Το πρωτεϊνικό κλάσμα συμπυκνώνεται με χρήση φίλτρων Amicon Ultra 0.5mL, 10kDa cut off. Προστίθεται ποσότητα δείγματος 500μL στο φίλτρο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10000 x g για 15 λεπτά, απόρριψη του όγκου που δεν έχει κατακρατηθεί από το φίλτρο και προσθήκη νέας ποσότητας δείγματος. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι όλο το δείγμα να συμπυκνωθεί σε τελικό όγκο 30μL. Το φίλτρο αναστρέφεται σε καθαρό Eppendorf, φυγοκεντρείται στα 1000 x g για χρονικό διάστημα 5 λεπτών ώστε να συλλεχθεί το πρωτεϊνικό κλάσμα. Το συμπυκνωμένο πλέον κλάσμα αποθηκεύεται στους -20°C.

#### (H) Έκλουση πεπτιδίων

Η παρακάτω διαδικασία έκλουσης χρησιμοποιείται όταν ο στόχος είναι η ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίου.

Με την ολοκλήρωση των πλύσεων με νερό, η ρητίνη εκπλένεται με 5 όγκους 0.1M NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>. Στη συνέχεια, προστίθεται ένας όγκος 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> που περιέχει 1 μg /mL θρυψίνης (Mass spectrometry grade). Οι στήλες καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και η διαδικασία της πέψης διαρκεί για τουλάχιστον 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πέψη, η ρητίνη εκπλένεται διαδοχικά με 40 όγκους διαλύματος E-Z και τουλάχιστον 200 όγκους νερό. Για την έκλουση των προσδεδεμένων στη ρητίνη πεπτιδίων προστίθεται 1% υπερφορμικό οξύ (performic acid). Το υπερφορμικό οξύ συντίθεται με την ανάμειξη ίσων όγκων 2% φορμικού οξέως και υπεροξειδίου του υδρογόνου και την αντίδραση τους υπό ανάδευση για 45 λεπτά

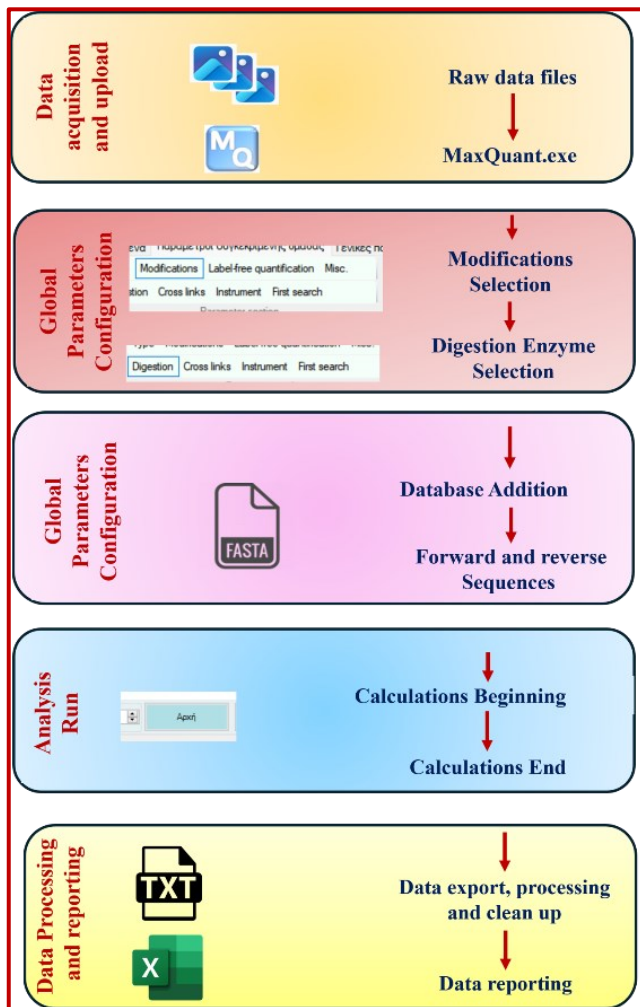
σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερφορμικό οξύ λύει το δεσμό Hg-S οξειδώνοντας μη αντιστρεπτά τηθειόλη σε σουλφονικό οξύ (SO<sub>3</sub>). Η οξείδωση προσδίδει στην αντίστοιχη κυστεΐνη επιπλέον μάζα 45Da, διευκολύνοντας την ανίχνευση των αντίστοιχων πεπτιδίων με φασματομετρία μάζας [37,47,56,57]. Τα πεπτίδια συλλέγονται σε γυάλινα σωληνάκια με την προσθήκη 2mL νερού και αποθηκεύονται στους -80°C. Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων γίνεται με δίδυμη φασματομετρία μάζας όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου [37,56].

### 3.6 Ανάλυση δεδομένων δίδυμης φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS)

Με την ολοκλήρωση της δίδυμης φασματομετρίας μάζας τα raw files που προκύπτουν επεξεργάζονται με βάση τα βήματα που περιγράφονται στην εικόνα 15. Για την επεξεργασία των raw files χρησιμοποιείται το λογισμικό MaxQuant που σχεδιάστηκε για την ανάλυση μεγάλης κλίμακας δεδομένων. Περισσότερες πληροφορίες για το MaxQuant υπάρχουν στον παρακάτω ιστότοπο από όπου γίνεται και η λήψη του λογισμικού δωρεάν (<https://www.maxquant.org/>).

1. Τα Raw Files εισάγονται στο πρόγραμμα MaxQuant
2. Στην καρτέλα “Modifications” επιλέγονται οι εξής τροποποιήσεις. (α) Cysteine Trioxidation, ήτοι, επιπλέον μάζα 48Da στην κυστεΐνη, καθώς για την έκλυση των πεπτιδίων από τη ρητίνη υδραργύρου χρησιμοποιείται υπερφορμικό οξύ (performic acid) το οποίο οξειδώνει τηνθειόλη σε σουλφονικό οξύ. (β) Methionine/Tryptophan deoxidation, δηλαδή επιπλέον μάζα 32Da στα δύο αμινοξέα. Οφείλεται στην επίδραση του υπερφορμικού οξέως.
3. Στην καρτέλα “Digestion” επιλέγεται ως ένζυμο πέψης των πρωτεϊνών σε πεπτίδια η θρυψίνη .
4. Στην καρτέλα General Parameters, επιλέγεται το tab Sequence και εισάγεται το πρωτέωμα αναφοράς σε μορφή FASTA. Το πρωτέωμα αναφοράς, στην περίπτωση μας το πρωτέωμα του ποντικού, λαμβάνεται από τον ιστότοπο Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) πληκτρολογώντας M.Musculus ή Mouse και επιλέγοντας το Reviewed Proteome.
5. Έναρξη της ανάλυσης (“Run” ).
6. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε μορφή .txt

7. Η επεξεργασία πραγματοποιείται σε φύλλα Excel.



**Εικόνα 15:** Διαδικασία ανάλυσης πειραματικών δεδομένων που προκύπτουν από τη φασματομετρία μάζας.

Για την παρουσίαση των πειραματικών δεδομένων, τα φύλλα του Excel διαμορφώνονται όπως δείχνει η εικόνα 16. Τα δεδομένα χωρίζονται σε στήλες που εμφανίζουν το accession number της κάθε πρωτεΐνης με βάση το Uniprot, το όνομα του γονιδίου, το όνομα της πρωτεΐνης, τον αριθμό των τροποποιημένων πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν, τα κατάλοιπα κυστεΐνης που είναι τροποποιημένα, η αλληλουχία των αντίστοιχων πεπτιδίων.

Gene name	Protein names	# peptides	Cysteine F	Peptide sequence 1	Peptide start	Peptide size	Peptide sequence 2	Peptide size
055028	Bckdk [3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kir	1	118	AHRIKGFRLSPFHGNCPTLHVHLYRAAF	103	133		
Q9DCT1	Akrl2 1,5-anhydro-D-fructose reductase	1	178	DKPLRVRPITNQIEHPYLNKQKLDFCI	163	193		
Q8R3B1	Plcd1 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase	1	96	TEGLEKFAFDIPEDRCFSVFKDQKNTLD	81	111		
Q9CQ62	Decr1 2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	1	86	LGKAMTTFLLSTLGAQCVIASRNIVLKA1	71	101		
Q88986	Gcat 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial	2	103, 26	TLEEFAGLSSTRFCIGTQSIHKNLEAKIA	88	118	LSPGRRHSAALQRCILDSELEGIRGAG	11 41
Q60597	Ogdh 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	6	507, 283, 1	'EWRNTHFDKVVVLDVLCYRRNGHNEIME	491	522	LQKWSSEKFRFGLGCEVLPALKTIIDM:	267 298 GP
Q8RWT1	Acaa2 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	1	179	TAENLAAKYNISREDCDRYALQSQQRW	164	194		
P62281	Rps11 40S ribosomal protein S11	1	60	KTPKEAIEGYIDKKCFPTGNVSRGRILSI	45	75		
P62855	Rps26 40S ribosomal protein S26	1	74,77	FDAVYLPKLYVKLHYCVSAIHSKVRNR	59	89		
P62242	Rps8 40S ribosomal protein S8	1	174,182	SSLLEEFQGGKLLACIASRPGQCGRAD	159	189		
Q88R88	Prkaa2 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2	2	382, 543	PERMPPLIADSPKARCPDLALNTTKPKSL	367	397	ASPRLGSHTMDFEMCASLITALAR	528 552
Q8K010	Oplah 5-oxoprolinase	3	236, 382, 1	'EVMPPMVRIVPRGHTACADAYLTPTIQR'	221	251	FVWGPESAGHPGACRYKGGPVITVD	367 397 NLI
P63038	Hspd1 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1	442	ATRAAEEVIGVGGCALLRCPALDSLK	427	457		
Q9CR57	Rpl14 60S ribosomal protein L14	1	54	DGPCTRVRRQAMPFKCMLQTLFILKFP1	39	69		
P62717	Rpl18a 60S ribosomal protein L18a	1	22	UREYKVGRCPLTPKCHTPLYRMRIFAF	7	37		
Q88P67	Rpl24 60S ribosomal protein L24	1	36	YARTDGKVFQFLNAKCESAFSKRNRPQ	21	51		
P83862	Rpl36a 60S ribosomal protein L36a	1	72,77	RKKAKTKKIVRLRCEVPCNCRSKRMLAI	57	87		
Q9D8E6	Rpl4 60S ribosomal protein L4	1	125	RWIRRVNTTQRYAICSAASAALPAL	110	140		
Q8QZT1	Acat1 Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	3	193, 410, 1	KDGLTQVYNNHMGCAENTAKMNIIS	178	208	MAHALKPGEGFLASICNGGGASALLIE	395 424 TR
Q99K10	Aco2 Aconitate hydratase, mitochondrial	5	410, 126, 1	RSAAVAQKALAHGLKCKSQFTIFPQSEQ	394	425	ISSGLPKVAVPSTIHCCHLIEAQVGGEDI	110 141 KE
P68134	Actc1 Actin, alpha cardiac muscle 1	3	287, 259, 1	'ESAGIHETTYNSIMKCDIRKDYANNV	272	302	LPDGQVITIGNERFRCPETLFPQFIGME	244 274 TFA

Εικόνα 16: Απεικόνιση των δεδομένων σε φύλλα Excel.

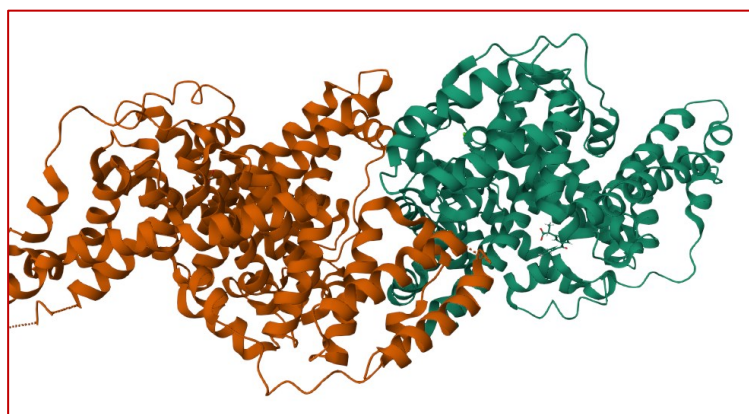
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Έλεγχος της εκλεκτικότητας του χημικού εμπλουτισμού έναντι τροποποιήσεων της κυστεΐνης

Αρχικά αξιολογήθηκε η εκλεκτικότητα του χημικού εμπλουτισμού έναντι τροποποιήσεων της κυστεΐνης. Ως πρωτεΐνη μοντέλο χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη βοώς (bovine serum albumin, BSA, protein accession number P02769). Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης (Uniprot Accession Number P02769) αποκαλύπτει ότι η BSA διαθέτει 35 κυστεΐνες, από τις οποίες οι 32 συμμετέχουν σε 16 δισουλφιδικούς δεσμούς και οι υπόλοιπες 3 βρίσκονται στην ανηγμένη τους μορφή (εικόνα 17).

[>sp|P02769|ALBU\\_BOVIN Albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4](#)

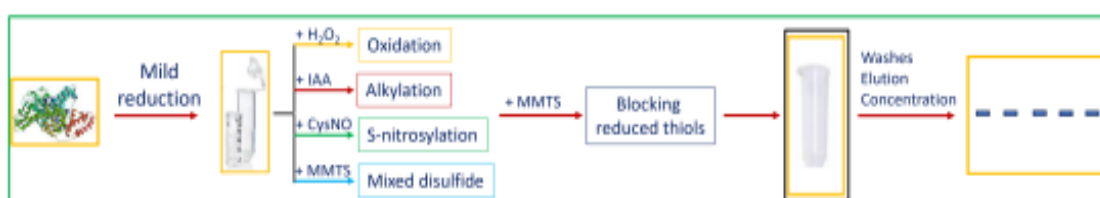
MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIASF  
QYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVA  
SLRETYGDMADCCCEKQPERNECFLSHKDDSPDLPKLPDPNTLCCDEFKA  
DEKKFWGKYLYEIAARRHPYFYAPELLYANKYNGVVFQECQAEDKGA  
CLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFV  
EVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECC  
DKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSF  
LYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCAKDDPHACYSTVFDKCLKHL  
VDEPQNLIKQNCDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLG  
KVGTRCCCKPESERMPCTEDYLSLILNRLC  
VLHEKTPVSEKVTKCC  
TESLV  
NRRP  
CFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLK  
HKPKATEEQKLTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA



**Εικόνα 17:** Απεικόνιση της αλληλουχίας και της κρυσταλλικής δομής της BSA. Με κίτρινο σημειώνονται τα κατάλοιπα κυστεΐνης της πρωτεΐνης.

Αρχικά, η πρωτεΐνη εκτέθηκε για 30 λεπτά σε διθειοθρεϊτόλη (DTT) προκειμένου να αναχθούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Με βάση προηγούμενες μελέτες [47], επιλέχθηκε «ήπια» αναγωγή της πρωτεΐνης, επομένως η αντίδραση

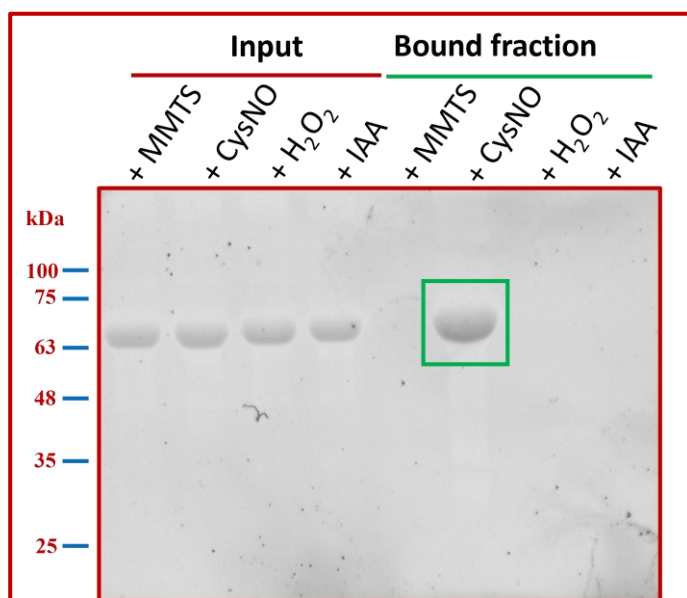
πραγματοποιήθηκε με αναλογία κυστεΐνης προς αναγωγικό παράγοντα 1:5. Πιο συγκεκριμένα, σε 500μL BSA συγκέντρωσης 1μg/μL, που αντιστοιχεί σε 14μM πρωτεΐνης και 490μM κυστεΐνης προστέθηκαν 2.5 mM DTT. Στη συνέχεια η ανηγμένη BSA χωρίστηκε σε κλάσματα και κάθε κλάσμα της εκτέθηκε σε 5mM του τροποποιητικού παράγοντα που φαίνεται στην εικόνα 18. Σύμφωνα με μελέτες η έκθεση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) επάγει τον σχηματισμό σουλφινικού (SO<sub>2</sub>) και σουλφονικού (SO<sub>3</sub>) οξεώς στην κυστεΐνη. Η αντίδραση με ιοδοακεταμίδιο (IAA) επάγει την αλκυλίωση των κυστεϊνών ενώ η αντίδραση με τη νιτροζυλιωμένη κυστεΐνη (CysNO) δημιουργεί νιτροζυλίωση στην πρωτεΐνη. Τέλος, το θειοσουλφονικό του μεθανίου (MMTS) αντιδρά με ανηγμένες κυστεΐνες σχηματίζοντας μεικτό δισουλφιδικό δεσμό.



**Εικόνα 18** : Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για την αξιολόγηση της εκλεκτικότητας της μεθόδου.

Στα κλάσματα της τροποποιημένης BSA πραγματοποιήθηκε χημικός εμπλουτισμός με την ρητίνη υδραργύρου και συλλέχθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν τις δεσμευμένες πρωτεΐνες (bound fractions) (Εικόνα 19, σειρές 6-10). Τα παραπάνω κλάσματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ακολούθησε χρώση του gel. Στο ίδιο gel ηλεκτροφορήθηκε και τροποποιημένη BSA η οποία δεν είχε υποστεί χημικό εμπλουτισμό (Εικόνα 19, σειρές 2-5). Παρατηρήθηκε μια ζώνη που αντιστοιχεί στη μοριακή μάζα της μονομερούς BSA στις σειρές 2-5 που αντιστοιχούν σε τροποποιημένη BSA χωρίς χημικό εμπλουτισμό. Το αποτέλεσμα αυτό σημαίνει ότι παρά τις χημικές τροποποιήσεις η BSA παραμένει σε μονομερή μορφή. Σε ότι αφορά τα bound fractions, παρατηρήθηκε χρώση μόνο στο δείγμα που αντιστοιχούσε στην S-νιτροζυλιωμένη BSA (σειρά 7, πράσινο πλαίσιο) γεγονός που υποδηλώνει ότι ο οργανικός υδράργυρος παρουσιάζει χημική δραστηριότητα μόνο έναντι νιτροζυλιωμένης κυστεΐνης. Το πείραμα αυτό αποδεικνύει ότι η ρητίνη υδραργύρου είναι κατάλληλη για τον εκλεκτικό χημικό εμπλουτισμό νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών.





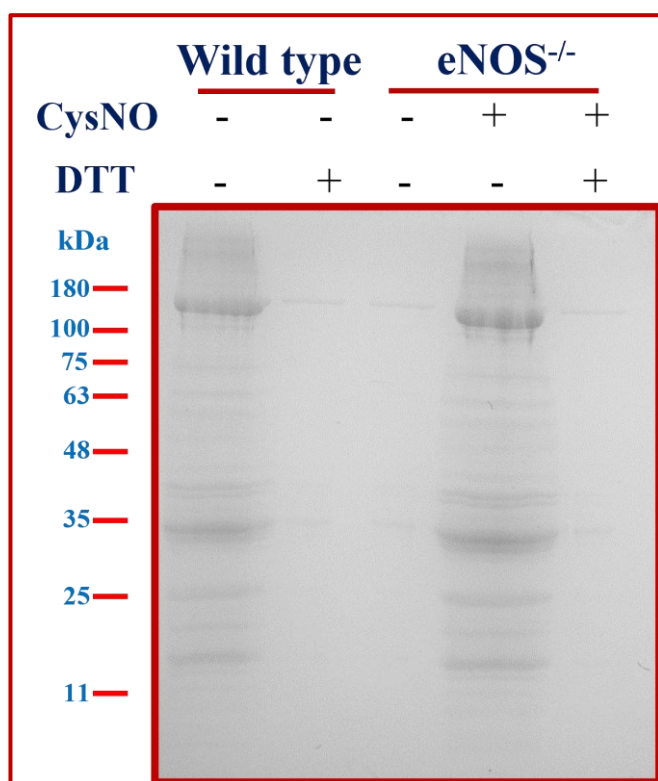
**Εικόνα 19** : Απεικονίζεται gel πρωτεΐνης μετά από χρώση με Coomassie blue. Απεικονίζεται η κινητικότητα χημικά τροποποιημένης BSA απουσία χημικού εμπλουτισμού (input) και χημικά τροποποιημένης BSA μετά από χημικό εμπλουτισμό (bound fraction). Η παρουσία χρώσης στο bound fraction που αντιστοιχεί στην S-νιτροζυλιωμένη BSA ,

επιβεβαιώνει την εκλεκτικότητα της μεθόδου ως προς τις S-νιτροσοκυστεΐνες. Το πείραμα αυτό είναι αντιπροσωπευτικό δύο πειραμάτων με ουσιαστικά τα ίδια αποτελέσματα.

#### 4.2 Έλεγχος της εκλεκτικότητας του χημικού εμπλουτισμού

Προκειμένου να αξιολογηθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός βιολογικών και χημικών θετικών ή αρνητικών controls. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιάς προερχόμενα από ποντίκια αγρίου τύπου (WT) ή ποντίκια με γενετική απαλοιφή της ενδοθυλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS<sup>-/-</sup> mice). Χημικά, η νιτροζυλίωση αυξήθηκε μετά από έκθεση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε 10μM CysNO για 30 λεπτά, ενώ για την απαλοιφή της το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επιδράστηκε με 5mM DTT για 30 λεπτά. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για χημικό εμπλουτισμό με χρήση της ρητίνης υδραργύρου και τα bound fractions διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε SDS-page gel στο οποίο στη συνέχεια έγινε χρώση με Coomassie blue (Εικόνα 20). Παρατηρήθηκε χρώση στο δείγμα που αντιστοιχεί στο εκχύλισμα καρδιάς ποντικού αγρίου τύπου γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης στην καρδιά (Εικόνα 20, σειρά 2). Η έκθεση σε DTT οδηγεί σε απαλοιφή της νιτροζυλίωσης μέσω της αναγωγής του δεσμού S-NO. Παρατηρήθηκε σημαντικά περιορισμένη χρώση στο bound fraction που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα ποντικού αγρίου τύπου που υπέστη επεξεργασία με DTT (Εικόνα 20, σειρά 3). Η γενετική απαλοιφή της eNOS οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της ενδογενούς νιτροζυλίωσης στην καρδιά [35]. Σε συμφωνία με τα επίπεδα νιτροζυλίωσης, παρατηρήθηκε περιορισμένη χρώση στο bound fraction που προκύπτει μετά από χημικό εμπλουτισμό του πρωτεϊνικού

εκχυλίσματος προερχόμενο από ποντίκι  $eNOS^{-/-}$  (Εικόνα 20, σειρά 4). Η έκθεση σε CysNO επάγει τα επίπεδα της S-νιτροζυλίωσης μέσω αντιδράσεων μεταφοράς του NO από το CysNO στην πρωτεΐνη δέκτη [37]. Παρατηρήθηκε έντονη χρώση στο bound fraction προερχόμενο από  $eNOS^{-/-}$  ποντίκι μετά από έκθεση σε CysNO (Εικόνα 20, σειρά 5). Η χρώση ήταν εξαιρετικά περιορισμένη όταν την έκθεση σε CysNO ακολούθησε επώαση με DTT (Εικόνα 20, σειρά 6). Συνολικά, το παραπάνω πείραμα δείχνει ότι ο χημικός εμπλουτισμός είναι ανάλογος των επιπέδων S-νιτροζυλίωσης. Συνδυαζόμενο δε με το πείραμα που περιγράφει η εικόνα 19 προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο χημικός εμπλουτισμός με χρήση οργανικού υδραργύρου είναι ειδικός για S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες και έχει την απαιτούμενη ευαισθησία να ανιχνεύει ενδογενή S-νιτροζυλίωση. Επιπλέον, φαίνεται πώς το NO που προέρχεται από την eNOS είναι υπεύθυνο για την ενδογενή S-νιτροζυλίωση στον καρδιακό μυ.



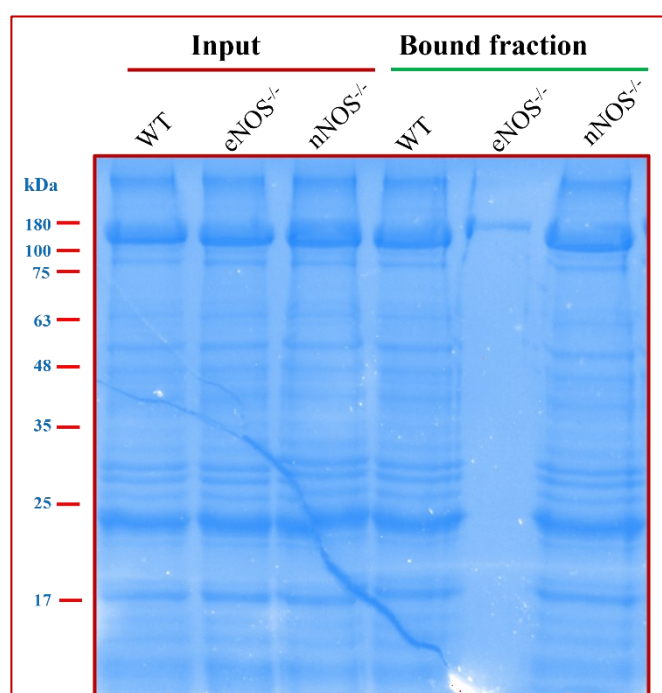
**Εικόνα 20:** Απεικονίζεται το gel ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) των bound fractions που προκύπτουν από τον χημικό εμπλουτισμό πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρδιακού μυ. Πραγματοποιήθηκε χρώση του gel με Coomassie Blue. Τα βιολογικά δείγματα ελήφθησαν από ποντίκια αγρίου τύπου (WT) και  $eNOS^{-/-}$ , και εκτέθηκαν στα χημικά αντιδραστήρια που φαίνονται στην εικόνα. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό δύο πειραμάτων με τα ίδια αποτελέσματα.

### 4.3 Εξάρτηση της S-Νιτροζυλίωσης στην καρδιά από τις συνθήκες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της εξάρτησης της ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης στον καρδιακό μυ από την έκφραση των συνθασών του NO. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από ποντίκια αγρίου τύπου

(WT) και από ποντίκια με γενετική απαλοιφή της ενδοθηλιακής ή της νευρικής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου ( $eNOS^{-/-}$ , και  $nNOS^{-/-}$  mice, αντίστοιχα). Με την ολοκλήρωση του χημειοεκλεκτικού εμπλουτισμού τα κλάσματα που περιέχουν τις δεσμευμένες πρωτεΐνες (bound fractions) ηλεκτροφορήθηκαν υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ακολούθησε χρώση του gel με Coomassie Blue (εικόνα 21).

Στο ίδιο gel, ηλεκτροφορήθηκαν, και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, που δεν επεξεργάστηκαν με χημικό εμπλουτισμό. Παρατηρήθηκε παρόμοιο μοτίβο και ένταση χρώσης στις σειρές 1 έως 3 της εικόνας 21, που αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χωρίς χημικό εμπλουτισμό. Η παρατήρηση αυτή παρέχει μια εκτίμηση πώς η αρχική πρωτεΐνη ανά δείγμα ήταν ίδια. Σε ότι αναφορά τα bound fractions, παρατηρήθηκε χρώση στις σειρές 4 και 6 που αντιστοιχούν σε εκχυλίσματα καρδιάς ποντικού WT και  $nNOS^{-/-}$  (εικόνα 21) ενώ ασθενής χρώση παρατηρήθηκε στην καρδιά ποντικού  $eNOS^{-/-}$ . Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης στην καρδιά ποντικών WT και  $nNOS^{-/-}$  και την απουσίας της στην καρδιά ποντικών  $eNOS^{-/-}$  επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της εικόνας 20 καθώς και προηγούμενες μελέτες [35,37]. Συνολικά, προκύπτει το συμπέρασμα, ότι η έκφραση της  $eNOS$  καθορίζει την S-νιτροζυλίωση στην καρδιά. Φαίνεται επίσης ότι οι διαφορετικές συνθάσες εξυπηρετούν διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους και η έλλειψη της μιας δεν υποκαθίσταται από την άλλη.

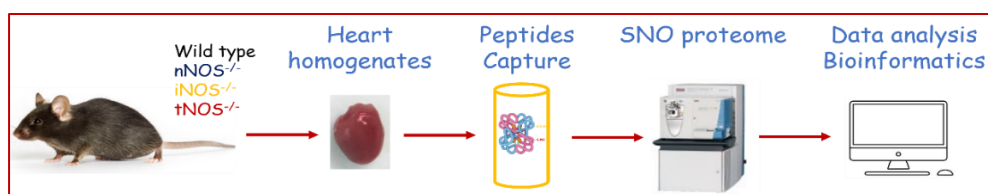


**Εικόνα 21:** Απεικονίζεται ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρδιακού μυ ποντικών WT,  $eNOS^{-/-}$ , ( $NOS3$ ) και  $nNOS^{-/-}$  ( $NOS1$ ) χωρίς (input) και μετά από χημικό εμπλουτισμό με ρητίνη υδραργύρου (bound fractions). Η έλλειψη χρώσης στο bound fraction που αντιστοιχεί στο δείγμα προερχόμενο από ποντίκι  $eNOS^{-/-}$  υποδηλώνει την έλλειψη S-νιτροζυλίωσης. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές με τα ίδια αποτελέσματα.

#### 4.4 Ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης με φασματομετρία μάζας

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.5 ο χημειοεκλεκτικός εμπλουτισμός επιτρέπει την ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης. Στην περίπτωση αυτή, οι συνδεδεμένες στη ρητίνη πρωτεΐνες υφίστανται πέψη ακολουθούμενη από έκλυση των πεπτιδίων που περιέχουν τα κυστεϊνικά κατάλοιπα που ήταν S-νιτροζυλιωμένα. Η αλληλουχία των πεπτιδίων ταυτοποιείται με δίδυμη φασματομετρία μάζας.

Η εικόνα 22 περιγράφει σχηματικά το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην μελέτη αυτή.



**Εικόνα 22:** Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

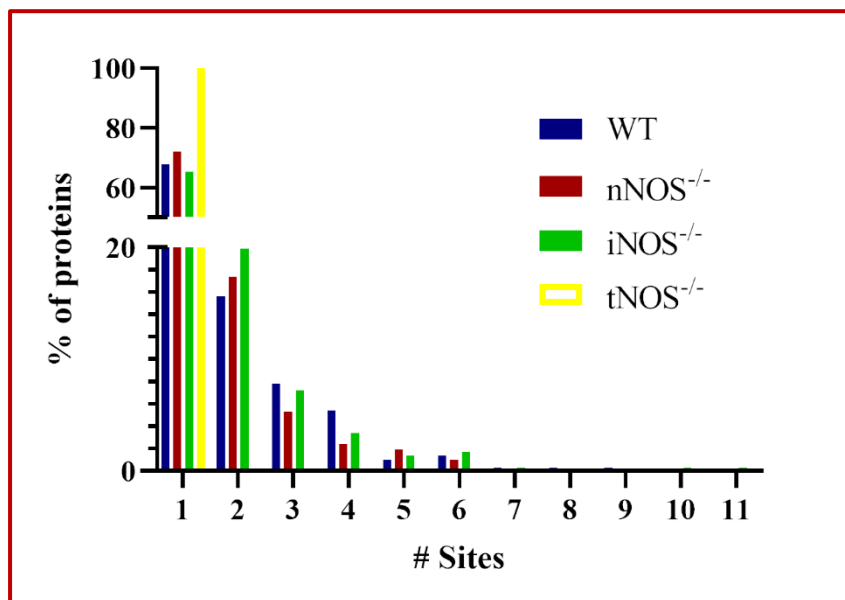
Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 486 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 294 πρωτεΐνες στην καρδιά ποντικών αγρίου τύπου (Πίνακας 2). Ο αριθμός των θέσεων είναι μεγαλύτερος του αριθμού των τροποποιημένων πρωτεϊνών γεγονός που υποδηλώνει ότι σε κάποιες πρωτεΐνες υπάρχουν πολλαπλές θέσεις νιτροζυλίωσης (Πίνακας 2). Παρόμοιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [38,39]. Η ίδια ανάλυση αποκάλυψε 487 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 291 πρωτεΐνες στην καρδιά ποντικών iNOS<sup>-/-</sup> και 292 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 207 πρωτεΐνες στην καρδιά ποντικών nNOS<sup>-/-</sup> (Πίνακας 2). Ο αριθμός θέσεων νιτροζυλίωσης μειώθηκε δραματικά σε ποντίκια που δεν εκφράζουν καμία συνθάση του NO (41 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 41 πρωτεΐνες).

Γενότυπος	Αριθμός πρωτεϊνών	Αριθμός θέσεων
Wild type (N=4)	294	486
nNOS <sup>-/-</sup> (N=3)	207	292
iNOS <sup>-/-</sup> (N=6)	291	487
tNOS <sup>-/-</sup> (N=6)	41	41

**Πίνακας 2:** Αριθμός πρωτεϊνών και θέσεων S-νιτροζυλίωσης στο καρδιακό μυ

Η εικόνα 23 παρουσιάζει την κατανομή των θέσεων S-νιτροζυλίωσης ανά πρωτεΐνη και ανά γενότυπο. Με εξαίρεση τα tNOS<sup>-/-</sup> όπου ο αριθμός των πρωτεϊνών και πεπτιδίων είναι ο ίδιος, η κατανομή του αριθμού θέσεων ανά πρωτεΐνη είναι

παρόμοια στους υπόλοιπους γενότυπους. Το ποσοστό των πρωτεϊνών που περιέχουν μία θέση νιτροζυλίωσης κυμαίνεται μεταξύ 65-72%, ενώ 16-20% και 5-7% των πρωτεϊνών περιέχουν δύο και τρεις θέσεις αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε κάθε γενότυπο υπάρχουν πρωτεΐνες με περισσότερες από 4 θέσεις νιτροζυλίωσης (Εικόνα 23).

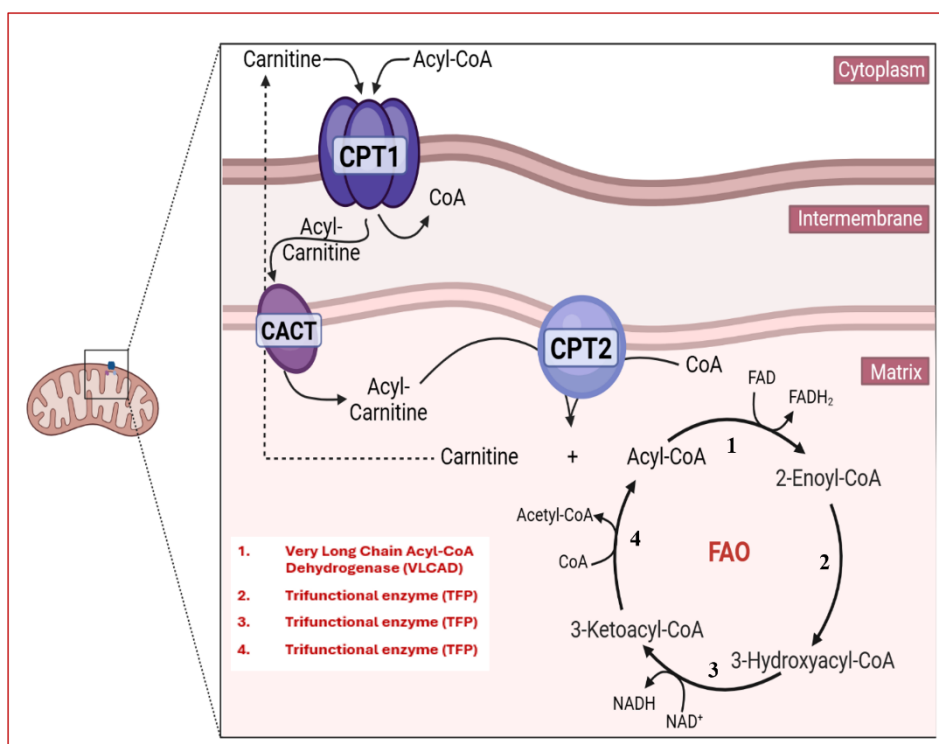


**Εικόνα 23:** Κατανομή θέσεων S-νιτροζυλίωσης ανά πρωτεΐνη στον καρδιακό μυ.

#### 4.5 Το μονοπάτι της β-Οξειδωσης αποτελεί στόχο της S-νιτροζυλίωσης *in vivo*

Τα επόμενα πειράματα εστίασαν στα ένζυμα της β-οξειδωσης μιας και η ρύθμιση του μονοπατιού αυτού σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις αποτελεί κύριο ερευνητικό στόχο του εργαστηρίου. Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου αποκάλυψε ότι η S-νιτροζυλίωση αποτελεί ρυθμιστικό μηχανισμό της β-οξειδωσης στο ήπαρ αυξάνοντας την ενεργότητα ενζύμων που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό [37]. Το μονοπάτι της β-οξειδωσης είναι αποφασιστικής σημασίας για την ενεργειακή ομοιόσταση της καρδιάς μιας και σε φυσιολογικές συνθήκες το 60-70% των μορίων ATP που απαιτούνται για την συστολική, ιοντική και τις υπόλοιπες λειτουργίες της καρδιάς προέρχονται από την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Για την πρόσληψη και β-οξειδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια απαιτείται μια σειρά βημάτων (Εικόνα 24) που συνοπτικά περιγράφονται παρακάτω. Αρχικά, τα εστεροποιημένα με συνένζυμο A λιπαρά οξέα (acyl-CoA), εστεροποιούνται με καρνιτίνη σχηματίζοντας εστέρες της καρνιτίνης (acyl-carnitines). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο CPT1

που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Για την είσοδο των λιπαρών οξέων στην μιτοχονδριακή μήτρα, οι ακυλοκαρνιτίνες μεταφέρονται από τον μεταφορέα CACT που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ακολούθως, μετατρέπονται ξανά σε εστέρες του συνενζύνου Α (acyl-CoAs) με την δράση του ενζύμου CPT2. Τα εστεροποιημένα λιπαρά οξέα υφίστανται β-οξείδωση σε τέσσερα βήματα όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 24. Κάθε στροφή του κύκλου παράγει ένα μόριο acetyl-CoA και ένα λιπαρό οξύ βραχύτερο κατά δύο άτομα άνθρακα. Ειδικά για τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας που αποτελούν το κύριο είδος λιπαρών οξέων που προέρχονται από τη διατροφή η β-οξείδωση τους απαιτεί τα ένζυμα Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD), Trifunctional enzyme subunit alpha (TFPa) και Trifunctional enzyme subunit beta (TFPb). Η Α υπομονάδα της Trifunctional enzyme καταλύει το δεύτερο και τρίτο βήμα της β-οξείδωσης ενώ η υπομονάδα Β καταλύει το τέταρτο βήμα (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24:** Το μονοπάτι της β-οξείδωσης λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας. Η εικόνα τροποποιήθηκε από το [59]

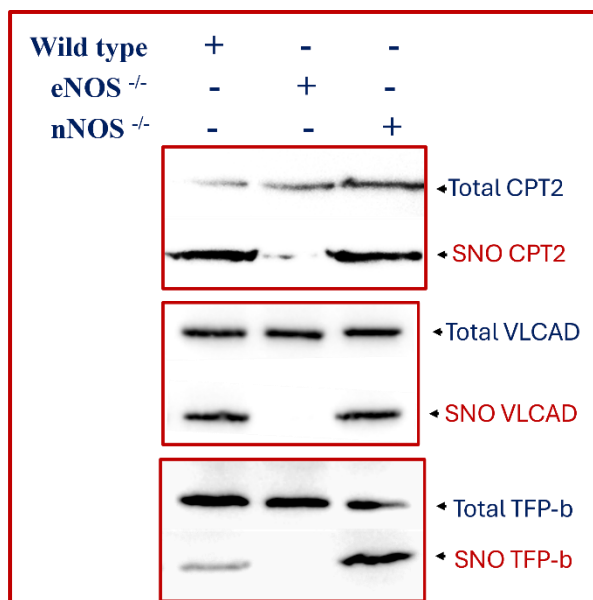
Σύμφωνα με την πρωτεωμική ανάλυση τα ένζυμα CPT2, VLCAD και TFP-a/b είναι ενδογενώς S-νιτροζυλιωμένα σε μια ή περισσότερες θέσεις στον καρδιακό μυ ποντικών αγρίου τύπου (Πίνακας 3). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στον καρδιακό μυ ποντικών nNOS<sup>-/-</sup> (Πίνακας 3).

Πρωτεΐνη	Wild type	nNOS <sup>-/-</sup>
Carnitine O-palmitoyl-transferase 2 (CPT2), P23786	Cys489, Cys512	Cys489, Cys512
Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD), P49748	Cys238	Cys238
Trifunctional enzyme subunit alpha (TFPa), Q8BMS1	Cys349, Cys550	Cys349, Cys550
Trifunctional enzyme subunit beta (TFPb), P55084	Cys459	Cys459

**Πίνακας 3.** Θέσεις ενδογενούς S-Νιτροζυλίωσης των ενζύμων της β-οξειδωσης

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα αυτά με μια διαφορετική μέθοδο, πραγματοποιήθηκε χημικός εμπλουτισμός σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ποντικών αγρίου τύπου, nNOS<sup>-/-</sup> και eNOS<sup>-/-</sup>. Ο τελευταίος γενότυπος χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό βιολογικό control αφού προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου έδειξε ότι τα eNOS<sup>-/-</sup> ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα S-νιτροζυλίωσης και μειωμένο ρυθμό β-οξειδωσης στην καρδιά [34,37]. Τον χημικό εμπλουτισμό ακολούθησε έκλυση των πρωτεϊνών και ανίχνευση των ενζύμων CPT2, VLCAD και TFP-b με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στην εικόνα 25 παρουσιάζονται τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης όπου παρατηρείται ότι οι τρεις πρωτεΐνες εκφράζονται και στους τρεις γενότυπους σε συγκρίσιμα επίπεδα (Εικόνα 25, total protein) γεγονός που υποδηλώνει ότι η γενετική απαλοιφή των συνθασών του NO δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων της β-οξειδωσης. Παρατηρείται επίσης ότι οι τρεις πρωτεΐνες είναι ενδογενώς S-νιτροζυλιωμένες στην καρδιά ποντικών αγρίου τύπου και nNOS<sup>-/-</sup> και όχι στην καρδιά ποντικών eNOS<sup>-/-</sup> (Εικόνα 25, SNO protein). Συνολικά, τα αποτελέσματα της εικόνας 25 υποδηλώνουν ότι η γενετική απαλοιφή των συνθασών του NO δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων της β-οξειδωσης αλλά επηρεάζει την νιτροζυλίωση τους η οποία διαμεσολαβείται από NO που παράγει η eNOS. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με την πρωτεομική ανάλυση και προηγούμενες μελέτες [37], χρίζουν όμως περαιτέρω διερεύνησης σχετικά με τον ρόλο της S-νιτροζυλίωσης στην λειτουργία των ενζύμων. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη η νιτροζυλίωση αποτελεί θετικό τελεστή της ενζυμικής δραστηριότητας της ηπατικής VLCAD, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα του ενζύμου 29-φορές σε σχέση με το μη τροποποιημένο [37]. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η βραχεία ή/και μακροχρόνια φαρμακολογική χορήγηση βιοδραστικού NO σε ποντίκια eNOS<sup>-/-</sup> επαναφέρει τον ρυθμό της καρδιακής β-οξειδωσης σε φυσιολογικά

επίπεδα [35] παραμένοντας όμως άγνωστο αν η δράση του NO διαμεσολαβείται από S-νιτροζυλίωση ή την ενεργοποίηση της sGC ή σε συνδυασμό των δύο σηματοδοτικών πορειών. Μελλοντικές μελέτες θα διερευνήσουν το μηχανισμό αυτό και θα τον συσχετίσουν με γνωστούς φαινότυπους που προκαλεί η γενετική απαλοιφή της eNOS.



**Εικόνα 25:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι των πρωτεϊνών CPT2, VLCAD και TFP-b σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιάς ποντικών WT, eNOS<sup>-/-</sup> και nNOS<sup>-/-</sup>. Τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων προσδιορίστηκαν σε εκχυλίσματα χωρίς χημικό εμπλουτισμό (total protein) ενώ η S-νιτροζυλίωση τους προσδιορίστηκε στα bound fractions (SNO protein) μετά από χημικό εμπλουτισμό με ρητίνη υδραργύρου. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές με ουσιαστικά τα ίδια αποτελέσματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα μελέτη εντάσσεται σε ένα ευρύτερο ερευνητικό πλαίσιο που στοχεύει στη διερεύνηση των αλλαγών που συμβαίνουν στην σηματοδοτική δράση του NO σε συνθήκες που τα επίπεδα του βιοδραστικού NO είναι μειωμένα. Μειωμένα επίπεδα NO έχουν συνδεθεί μεταξύ άλλων με την υπέρταση, την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, τις παθήσεις του καρδιαγγειακού, την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στη σηματοδοτική δράση του NO μέσω της S-Νιτροζυλίωσης και θέτει δύο ξεκάθαρους στόχους. Αρχικά, εξετάζει την εξειδίκευση, ευαισθησία και εκλεκτικότητα του χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων με χρήση ρητίνης υδραργύρου.



Χρησιμοποιώντας αλβουμίνη ως πρωτεΐνη μοντέλο και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιακού μυ ως πολύπλοκα βιολογικά δείγματα αποδεικνύεται ότι ο χημικός εμπλουτισμός είναι ειδικός για S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες, επιτρέπει την ανίχνευση ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης και επιτρέπει την ανίχνευση αλλαγών των επιπέδων S-νιτροζυλίωσης (Εικόνες 17-20). Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η εξάρτηση της ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης στην καρδιά κατά κύριο λόγο από την eNOS (Εικόνα 21). Ένα ενδιαφέρον ερώτημα που προκύπτει αφορά το είδος των κυττάρων που εκφράζουν την eNOS από την οποία προέρχεται το NO που διαμεσολαβεί την S-νιτροζυλίωση. Ο καρδιακός μυς αποτελείται από τέσσερα είδη κυττάρων. Ινοβλάστες, μυοκαρδιοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Οι eNOS και nNOS εκφράζονται στα μυοκαρδιοκύτταρα. Η eNOS εκφράζεται επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ομογενοποιημένες καρδιές που περιείχαν μυοκαρδιοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, κατά συνέπεια δεν είναι δυνατόν να προσδιορισθεί η κυτταρική προέλευση του NO. Αυτό που είναι αδιαμφισβήτητο είναι πώς η έλλειψη της eNOS δεν αναπληρώνεται από κάποια άλλη συνθάση του NO.

Οι πρωτεωμικές μελέτες μεγάλης κλίμακας παρέχουν πολλαπλές και σε πολλά επίπεδα πληροφορίες που μπορούν να αξιοποιηθούν προκειμένου να κατανοηθεί η φυσιολογία και να διερευνηθούν οι αλλαγές που οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη που ταυτοποιεί θέσεις ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης στην καρδιά διερευνώντας ταυτόχρονα τις αλλαγές σε συνάρτηση με την έκφραση των συνθασών του NO. Παρόλο που απαιτείται διεξοδική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής και προσεκτική σύγκριση μεταξύ των γενοτύπων, κάποια σχετικά ασφαλή συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν. Η ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης στον καρδιακό μυ ποντικών που δεν εκφράζουν καμία συνθάση του NO υποδηλώνει ότι ένα μικρό κλάσμα της ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης οφείλεται σε μη ενζυμικά παραγόμενο NO. Πιθανότερη πηγή μη ενζυμικά παραγόμενου βιοδραστικού NO αποτελεί η δίαιτα των ποντικών που περιέχει νιτρώδη και νιτρικά. Στην ενότητα 1.4.2 περιγράφεται ο μηχανισμός S-νιτροζυλίωσης που διαμεσολαβείται από νιτρικά. Ένα δεύτερο συμπέρασμα που προκύπτει, βασιζόμενο αποκλειστικά στον αριθμό θέσεων νιτροζυλίωσης, είναι ότι η iNOS δεν διαμεσολαβεί την ενδογενή S-νιτροζυλίωση στην καρδιά. Το συμπέρασμα ενισχύεται από βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν ότι σε φυσιολογικές συνθήκες η iNOS εκφράζεται σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα στον καρδιακό μυ [58]. Τέλος, ο μειωμένος αριθμός θέσεων S-

νιτροζυλίωσης απουσία της nNOS υποδηλώνει την εμπλοκή του NO που παράγεται από την nNOS στους μηχανισμούς της S-νιτροζυλίωσης στον καρδιακό μυ. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου που δείχνουν ότι η ενδογενής S-νιτροζυλίωση στον καρδιακό μυ παρουσιάζει την μικρότερη εξάρτηση από την eNOS σε σύγκριση με τα υπόλοιπα όργανα του ποντικού [37]. Βρίσκεται επίσης σε συμφωνία με αδημοσίευτα αποτελέσματα που δείχνουν ότι στον σκελετικό μυ η ενδογενής S-νιτροζυλίωση εξαρτάται σχεδόν στον ίδιο βαθμό από τις eNOS και nNOS.

Από μηχανιστικής σκοπιάς έχει ενδιαφέρον να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο η S-νιτροζυλίωση συντονίζει τη δράση των ενζύμων της καρδιακή β-οξειδωσης και καθορίζει την ενεργειακή απόδοση του μονοπατιού αυτού. Το ερώτημα αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας αφού είναι γνωστό ότι σε φυσιολογικές συνθήκες ο καρδιακός μυς αντλεί σχεδόν 70% των μορίων ATP που χρειάζεται για την λειτουργία του από την β-οξειδωση. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα ένζυμα CPT2 που εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, VLCAD που καταλύει το πρώτο βήμα της οξειδωσης έχοντας ως ρόλο την αφυδρογόνωση των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας και TFP η οποία έχει τρεις ενζυμικές δραστηριότητες καταλύοντας τα τρία τελευταία βήματα της β-οξειδωσης (εικόνα 20) είναι ενδογενώς S-νιτροζυλιωμένα και για την τροποποίηση τους απαιτείται η ενεργότητα της eNOS. Ένα ελκυστικό σενάριο είναι το δίκτυο πρωτεϊνών της β-οξειδωσης να αποτελεί και δίκτυο νιτροσυλασών και απονιτροσυλασών όπου το ένζυμο που βρίσκεται ανοδικά στο μονοπάτι να αποτελεί τη νιτροσυλάση του επόμενου ενζύμου. Για παράδειγμα, η CPT2 νιτροζυλιώνει την VLCAD, η οποία με τη σειρά της νιτροζυλιώνει την TFP. Με τον τρόπο αυτό το μονοπάτι αυτορυθμίζει την απόδοση του ανάλογα με την διαθεσιμότητα του υποστρώματος. Κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό αυτό παίζει η eNOS, η οποία έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την AMPK που αποτελεί αισθητήρα της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. Σε συνθήκες μεταβολικού στρες, π.χ. σωματική άσκηση η ενεργοποίηση της AMPK οδηγεί σε ενεργοποίηση της eNOS και αύξηση της παραγωγής NO στον καρδιακό μυ. Η αύξηση των επιπέδων βιοδραστικού NO επάγει/αυξάνει την S-νιτροζυλίωση των ενζύμων της β-οξειδωσης και συνολικά αυξάνει την απόδοση του μονοπατιού ώστε να καλυφθεί η αυξημένη ζήτηση σε ATP. Αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου υποστηρίζουν τον προτεινόμενο μηχανισμό μιας και σε ποντίκια αγρίου τύπου έχει παρατηρηθεί αυξημένη S-νιτροζυλίωση και ενζυμική δραστηριότητα της VLCAD στην καρδιά μετά

από άσκηση. Μελλοντικές μελέτες θα διερευνήσουν συστηματικά την παραπάνω υπόθεση.

Η παρούσα μελέτη ανοίγει τον δρόμο σε επόμενες που θα διερευνήσουν τον ρόλο της S-νιτροζυλίου στον ενεργειακό μεταβολισμό της καρδιάς πέρα από την β-οξείδωση. Η ενδελεχής ανάλυση των πειραματικών δεδομένων της πρωτεωμικής με χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής αναμένεται να αποκαλύψουν δίκτυα πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε κοινές μεταβολικές πορείες ή σε σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούν λειτουργίες ζωτικής σημασίας για τον καρδιακό μυ.

## Βιβλιογραφία

1. Lancaster JR (2017). A concise history of the discovery of mammalian nitric oxide (nitrogen monoxide) biogenesis. In L. J. Ignarro & B. A. Freeman (Eds.), *Nitric Oxide* (Third Edition) (pp. 1–7). Academic Press.
2. Lundberg JO, Weitzberg E. (2022). Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell*, 185(16), 2853–2878.
3. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/>
4. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373–376.
5. Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan, D (1982). Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *PNAS* 79: 2106–2110.
6. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 61: 866–879
7. Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki, S, Kimura H (1978). Guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucl Res*, 9: 145–158.
8. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J CYCLIC NUCL PROT*, 3: 23–35.

9. Katsuki, S., & Murad, F. (1977). Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, 13: 330–341.
10. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *PNAS* 74: 3203–3207.
11. Li H, Poulos TL (2005). Structure–function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem*, 99: 293-305.
12. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE (2016). Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* 575: 584–599
13. Ludwig ML, Marletta MA (1999). A new decoration for nitric oxide synthase – a Zn(Cys)<sub>4</sub> site. *Structure*, 7: R73-R79.
14. Lundberg J, Weitzberg E, Gladwin M. (2008). The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7: 156–167.
15. Denninger JW, Marletta MA (1999). Guanylate cyclase and the ·NO/cGMP signaling pathway. *BBA-Bioenergetics*, 1411: 334–350.
16. Tenopoulou M, Doulias PT (2020). Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Res*, 9: 1190.
17. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *PNAS* 89: 444–448.
18. Stomberski CT, Hess DT, Stamler JS (2019). Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30: 1331–1351.
19. Gould N, Doulias PT, Tenopoulou, M, Raju K, Ischiropoulos H. (2013). Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *JBC* 288: 26473–26479.
20. Patel RP, Yuan S, Kevil CG (2017). S-Nitrosothiols and Nitric Oxide Biology. In L. J. Ignarro & B. A. Freeman (Eds.), *Nitric Oxide* (Third Edition) (pp. 45–56). Academic Press.

21. Nakamura T, Tu S, Akhtar MW, Sunico CR, Okamoto S, Lipton SA. (2013). Aberrant protein s-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *Neuron* 78: 596-614.
22. Broniowska KA, Hogg N (2012). The chemical biology of S-nitrosothiols. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17: 969–980.
23. Zhou HL, Zhang R, Anand P, Stomberski CT, Qian Z, Hausladen A, Wang L, Rhee EP, Parikh SM, Karumanchi SA, Stamler JS (2019). Metabolic reprogramming by the S-nitroso-CoA reductase system protects against kidney injury. *Nature* 565: 96-100.
24. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* 7: 665-674.
25. Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A. (2009). Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 10: 866-73.
26. Zhang R, Hess DT, Qian Z, Hausladen A, Fonseca F, Chaube R, Reynolds JD, Stamler JS. (2015). Hemoglobin  $\beta$ Cys93 is essential for cardiovascular function and integrated response to hypoxia. *PNAS* 112: 6425-6430.
27. Mitchell DA, Marletta MA (2005). Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat Chem Biol* 1: 154-158.
28. Dulce RA, Kulandavelu S, Hernandez Schulman, I, Fritsch J, Hare JM (2017). Nitric Oxide Regulation of Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. In L. J. Ignarro & B. A. Freeman (Eds.), *Nitric Oxide (Third Edition)* (pp. 313-338). Academic Press.
29. Kohr MJ, Murphy E, Steenbergen C. (2014). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart. *PLoS One* 9: e111448.
30. Bahadoran Z, Mirmiran P, Ghasemi A (2020). Role of Nitric Oxide in Insulin Secretion and Glucose Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 31: 118–130
31. Król M, Kepinska M (2020). Human Nitric Oxide Synthase-Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 56

32. Li W, Mital S, Ojaimi C, Csiszar A, Kaley G, Hintze TH. (2004). Premature death and age-related cardiac dysfunction in male eNOS-knockout mice. *J Mol Cell Cardiol* 37: 671-680
33. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U. (2001). Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 104(3), 342–345.
34. Le Gouill E, Jimenez M, Binnert C, Jayet PY, Thalmann S, Nicod P, Scherrer U, Vollenweider P (2007). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mice have defective mitochondrial beta-oxidation. *Diabetes*, 56(11), 2690–2696.
35. Tenopoulou M, Doulias PT, Nakamoto K, Berrios K, Zura G, Li C, Faust M, Yakovishina V, Evans P, Tan L, Bennett MJ, Snyder NW, Quinn WJ 3rd, Baur JA, Atochin DN, Huang PL, Ischiropoulos H (2018). Oral nitrite restores age-dependent phenotypes in eNOS-null mice. *JCI Insight*, 3: e122156.
36. Carlström M, Larsen FJ, Nyström T, Hezel M, Borniquel S, Weitzberg E, Lundberg JO (2010). Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *PNAS* 107: 17716–17720.
37. Doulias PT, Tenopoulou M, Greene JL, Raju K, Ischiropoulos, H (2013). Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation. *Science Signaling*, 6: rs1.
38. Hegeman AD, Harms AC, Sussman MR, Bunner AE, Harper JF. (2004). An isotope labeling strategy for quantifying the degree of phosphorylation at multiple sites in proteins. *J Am Soc Mass* 15: 647-53. doi: 10.1016/j.jasms.2003.12.019.
39. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325: 834-840. doi: 10.1126/science.1175371
40. Foster MW, Hess DT, Stamler JS (2009). Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends. Mol. Med.* 15: 391–404.
41. Anand P, Stamler JS (2012). Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J. Mol. Med.* 90: 233–244.

42. Zhang Y, Deng Y, Yang X, Xue H, Lang Y (2020). The Relationship Between Protein S-Nitrosylation and Human Diseases: A Review. *Neurochemical research*, 45: 2815–2827.
43. Devarie-Baez NO, Zhang D, Li S, Whorton AR, Xian M. (2013). Direct methods for detection of protein S-nitrosylation *Methods* 62: 171-176
44. Duan J, Gaffrey MJ, Qian WJ (2017). Quantitative proteomic characterization of redox-dependent post-translational modifications on protein cysteines. *Molecular bioSystems* 13: 816–829.
45. Foster MW (2012). Methodologies for the characterization, identification and quantification of S-nitrosylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820: 675-683.
46. Raju K, Doulias PT, Tenopoulou M, Greene JL, Ischiropoulos H. (2012). Strategies and tools to explore protein S-nitrosylation. *BBA* 1820: 684–688.
47. Doulias PT, Raju K, Greene JL, Tenopoulou M, Ischiropoulos H. (2013). Mass spectrometry-based identification of S-nitrosocysteine in vivo using organic mercury assisted enrichment. *Methods* 62: 165-70.
48. Jaffrey SR, Snyder SH. (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 200:pl1
49. Greco, TM, Hodara R, Parastatidis I, Heijnen HF, Dennehy MK, Liebler DC, Ischiropoulos H (2006). Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. *PNAS* 103: 7420–7425.
50. Camerini S, Polci ML, Restuccia U, Usuelli V, Malgaroli A, Bachi A. (2007). A novel approach to identify proteins modified by nitric oxide: the HIS-TAG switch method. *J Proteome Res* 6: 3224-3231
51. Forrester MT, Thompson JW, Foster MW, Nogueira L, Moseley MA, Stamler JS. (2009). Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nat Biotechnol.* 27: 557-559
52. Faccenda A, Bonham CA, Vacratsis PO, Zhang X, Mutus B. (2010). Gold nanoparticle enrichment method for identifying S-nitrosylation and S-glutathionylation sites in proteins. *J Am Chem Soc* 132: 11392-11394.
53. Seneviratne U, Godoy LC, Wishnok JS, Wogan GN, Tannenbaum SR. (2013). Mechanism-based triarylphosphine-ester probes for capture of endogenous RSNOs *J Am Chem Soc.* 135: 7693-7704

54. Seneviratne U, Nott A, Bhat VB, Ravindra KC, Wishnok JS, Tsai LH, Tannenbaum SR. (2016). S-nitrosation of proteins relevant to Alzheimer's disease during early stages of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci* 113: 4152-4157.
55. Saville B (1958). A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst*, 83, 670-672.
56. Doulias PT, Greene JL, Greco TM, Tenopoulou M, Seeholzer SH, Dunbrack RL, Ischiropoulos H. (2010). Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci*, 107: 16958-16963.
57. Doulias PT, Tenopoulou M, Zakopoulos I, Ischiropoulos H. (2021). Organic mercury solid phase chemoselective capture for proteomic identification of S-nitrosated proteins and peptides. *Nitric Oxide* 117: 1-6
58. Li H, Xia N, Förstermann U. (2015). Nitric Oxide Synthesis in Vascular Physiology and Pathophysiology. In: Schmidt, M., Liebner, S. (eds) *Endothelial Signaling in Development and Disease*. Springer, New York, NY.
59. Cintolesi A, Rodríguez-Moyá M, Gonzalez R. (2013).. Fatty acid oxidation: Systems analysis and applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 5, 575–585