

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ-ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ -ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ>>

<<Μηχανισμοί S-Νιτροζυλίωσης στα μιτοχόνδρια>>

ΖΟΡΖΟΜΠΟΚΟΥ ΜΑΡΙΑ ΛΥΔΙΑ, ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ :
ΔΟΥΛΙΑΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ – ΘΩΜΑΣ, PhD, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ,ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ , ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

UNIVERSITY OF IOANNINA
FACULTY OF NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



POSTGRADUATE PROGRAM
<<SYNTHETIC CHEMISTRY, BIOCHEMISTRY, BIOACTIVE
COMPOUNDS>>

<<Mechanism of S-Nitrosylation in mitochondria>>

ZORZOMPOKOU MARIA LYDIA, CHEMIST

SUPERVISOR:

DOULIAS PASCHALIS – THOMAS, PhD, ASSISTANT PROFESSOR OF
BIOCHEMISTRY, DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF
IOANNINA

IOANNINA 2025

Πίνακας περιεχομένων	
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του μονοξειδίου του αζώτου ($\cdot\text{NO}$)	8
1.2 Βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου.....	9
1.2.1 Συνθάσες μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthase, NOS)	9
1.2.2 Βιοσύνθεση μονοξειδίου του αζώτου από νιτρικά-νιτρώδη	11
1.3 Σηματοδοτική Δράση του μονοξειδίου του αζώτου	11
1.3.1 Σηματοδότηση μέσω NO/cGMP	12
1.3.2 S-Νιτροζυλίωση	13
1.3.3 Νίτρωση (Nitration)	15
1.4 Σχηματισμός S-Νιτροζοθειολών (RSNO) σε βιολογικά συστήματα.....	15
1.4.1 Κατάλυση από μεταλλοπρωτεΐνες.....	15
1.4.2 Νιτροζυλίωση που διαμεσολαβείται από νιτρώδη	16
1.4.3 S-Νιτροζυλίωση που προκαλείται από ανώτερα οξείδια του NO	17
1.5 Διανιτροζυλίωση.....	17
1.6 Απονιτροζυλίωση.....	19
1.6.1 Σύστημα θειορεδοξίνης (Trx).....	19
1.6.2 Απονιτροζυλάσες μικρού μοριακού βάρους (LMW-SNO Denitrosylases)	21
1.7 Σημασία της σηματοδότησης του NO για την καρδιαγγειακή και μεταβολική λειτουργία.....	23
1.8 Μέθοδοι χημικού εμπλουτισμού S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων.	25
1.8.1 Biotin Switch	26
1.8.2 Μέθοδος οργανικού υδραργύρου	28
1.8.3 Cys TMT and IodoTMT reagents_ Βασική παραλλαγή της Biotin switch assay...30	
1.8.4 CysxICAT.....	31
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	33
2.1 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί Cysteine-Reactive Tandem Mass Tags (Cys-TMT) για χημικό εμπλουτισμό	33
2.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί οργανικό υδράργυρο για χημικό εμπλουτισμό.....	33
2.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί Dual Labeling Biotin Switch Assay για χημικό εμπλουτισμό.....	34

2.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί isotope-coded affinity tag labeling για χημικό εμπλουτισμό	34
2.5 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων και δημιουργία μιτοχονδριακού S-νιτροσοπρωτεώματος	35
2.6 Ανάλυση του ενδοκυττάρου εντοπισμού των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών.....	35
2.7 Ανάλυση του Δείκτη Υδροφοβικότητας των S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών	36
2.8 Υπολογισμός του pKa	38
2.9 Ανάλυση της Σχετικής Προσβασιμότητας Αμινοξικών Καταλοίπων στον Διαλύτη.....	39
2.10 Ανάλυση δευτεροταγούς δομής	41
2.11 Γραμμικά μοτίβα.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
3.1 Χαρακτηριστικά της παρούσας μελέτης.....	44
3.2 Δείκτης υδροφοβικότητας (Hydropathy Index)	45
Ισοηλεκτρικό σημείο, pKa.....	47
3.4 Σχετική προσβασιμότητα των κυστεϊνικών καταλοίπων στο διαλύτη.....	48
3.5 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής	50
3.6 Εύρεση γραμμικών μοτίβων	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α ΤΕΛΙΚΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΡΩΤΕΩΜΑ	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β PRIMARY SEQUENCE MOTIF	135
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	145

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στην Κατεύθυνση Συνθετική Χημεία-Βιοχημεία-Βιοδραστικές Ενώσεις υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Πασχάλη-Θωμά Δούλια .

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα BIOMED-20 “Ανάπτυξη νέων υποδομών που οικοδομούν ‘ικανότητα ’στην βιοϊατρική έρευνα”.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Πασχάλη-Θωμά Δούλια, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, επιβλέποντα της διπλωματικής μου, για την εξαιρετική καθοδήγηση και υποστήριξη που μου υπέδειξε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές του και η στήριξή του αποτέλεσαν πηγή έμπνευσης και ενθάρρυνσης για την επίτευξη των στόχων μου.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς εξεταστικής επιτροπής την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαργαρίτα Τενοπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Ευστράτιο Μυλωνά για τις εύστοχες υποδείξεις τους που συνέβαλαν στην τελική μορφή του κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τον σύντροφό μου, Γιάννη, για την στήριξη και την αγάπη που μου υπέδειξαν καθ 'όλη την διάρκεια του των σπουδών μου.

Αφιερωμένο στον αγαπημένο μου πατέρα,

Σταύρο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η S-νιτροζυλίωση αποτελεί μια μεταμεταφραστική τροποποίηση που προκαλείται από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος μεταξύ της βιοσύνθεσης και της σηματοδοτικής δράσης του. Η διαταραχή της ομοιόστασης της S-νιτροζυλίωσης έχει συσχετιστεί με καρδιαγγειακά, μεταβολικά και νευροεκφυλιστικά νοσήματα, καθώς και με διάφορες μορφές καρκίνου.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών που οδηγούν σε S-νιτροζυλίωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών *in vivo*. Για τον σκοπό αυτό, αξιοποιήθηκαν τέσσερις ανεξάρτητες μελέτες, οι οποίες ταυτοποίησαν θέσεις S-νιτροζυλίωσης στον καρδιακό μυ. Πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση βιοφυσικών, βιοχημικών και δομικών παραμέτρων των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών έναντι των μη S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών, εντός των ίδιων πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες παρουσιάζουν μειωμένη υδροφοβικότητα, χαμηλότερο pKa, μειωμένη σχετική έκθεση στο διαλύτη σε σύγκριση με τις μη νιτροζυλιωμένες. Επιπλέον, οι περισσότερες S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες εντοπίζονται σε α-έλικες, και βρίσκονται σε περιβάλλον πλούσιο σε όξινα και βασικά αμινοξέα.

Συνολικά, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες διαθέτουν διακριτά βιοφυσικά και δομικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τις μη νιτροζυλιωμένες. Επιπλέον, αναδεικνύεται η διανιτροζυλίωση ως πιθανός ενδομιτοχονδριακός μηχανισμός S-νιτροζυλίωσης, ανοίγοντας τον δρόμο για μελλοντικές μελέτες που θα διερευνήσουν την ύπαρξη δικτύων πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος του NO.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Βιοπληροφορική, Γραμμικά μοτίβα, Διανιτροζυλίωση, Δευτεροταγής δομή, Μονοξείδιο του αζώτου, Μεταγωγή σήματος, Μιτοχόνδρια, S-Νιτροζυλίωση.

ABSTRACT

S-nitrosylation is a post-translational modification induced by nitric oxide (NO), acting as a molecular link between NO biosynthesis and its signaling functions. Disruption of S-nitrosylation homeostasis has been associated with cardiovascular, metabolic, and neurodegenerative diseases, as well as various forms of cancer.

The aim of the present study was to investigate the mechanisms leading to S-nitrosylation of mitochondrial proteins *in vivo*. To this end, four independent studies were utilized, which identified S-nitrosylation sites in cardiac muscle. A comparative analysis of the biophysical, biochemical, and structural parameters of S-nitrosylated cysteines versus non-S-nitrosylated cysteines—within the same proteins—was conducted.

The results showed that S-nitrosylated cysteines exhibit reduced hydrophobicity, lower pKa, and decreased relative solvent accessibility compared to their non-nitrosylated counterparts. Furthermore, most S-nitrosylated cysteines were found in α -helices, located in environments enriched with acidic and basic amino acids.

Overall, the findings suggest that S-nitrosylated cysteines possess distinct biophysical and structural characteristics compared to non-nitrosylated ones. Additionally, the data support the hypothesis that trans-nitrosylation may represent a potential mechanism of S-nitrosylation within mitochondria, paving the way for future studies exploring the existence of protein networks mediating NO signal transduction.

Keywords: Bioinformatics, Mitochondria, Linear Motifs, Nitric oxide, Secondary structure, Signal transduction, S-nitrosylation, Transnitrosylation.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του μονοξειδίου του αζώτου ($\cdot\text{NO}$)

Το μονοξείδιο του αζώτου ($\cdot\text{NO}$) αποτελεί ένα διατομικό μόριο, το οποίο συνίσταται από ένα άτομο αζώτου και ένα άτομο οξυγόνου, ενωμένα μεταξύ τους μέσω ενός τριπλού δεσμού. Πρόκειται για ένα από τα κύρια οξειδία του αζώτου, με εξαιρετικά μικρό χρόνο ημιζωής, λόγω της αέριας φύσης του. Τα οξειδία αυτά παράγονται κυρίως κατά τη διάρκεια διεργασιών καύσης, ενώ σε μικρότερο βαθμό προκύπτουν κατά την διάρκεια μικροβιακών μεταβολικών δραστηριοτήτων στο έδαφος. Επιπλέον, το εν λόγω μόριο μπορεί να παραχθεί και ενδογενώς στον ανθρώπινο οργανισμό [1-6].

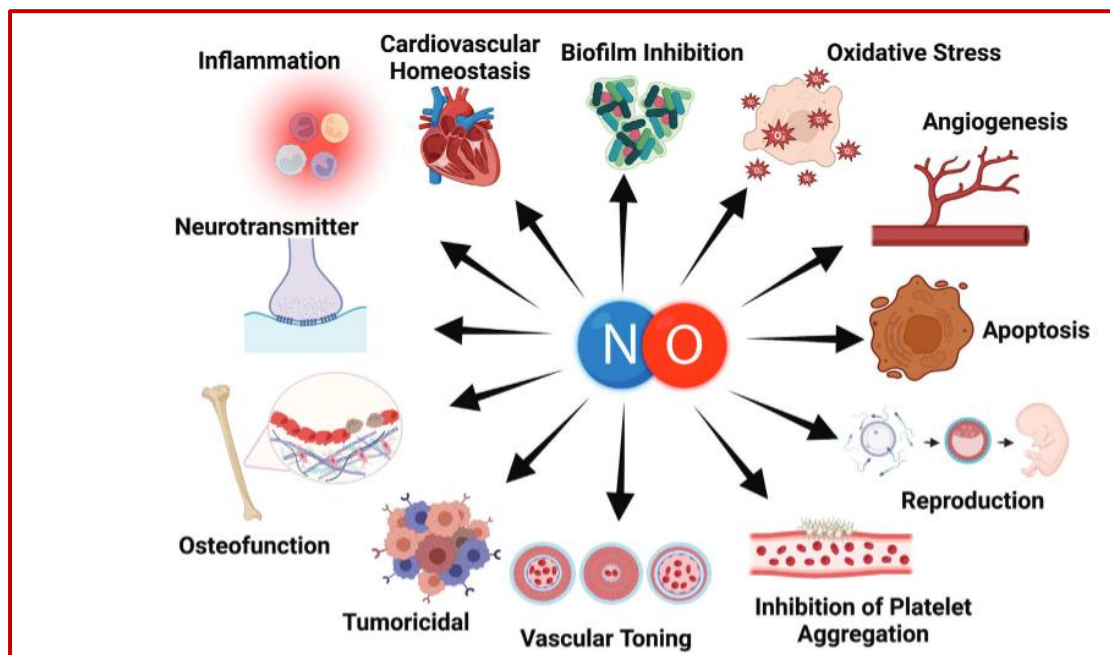
Διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, το οποίο συμβολίζεται με μια τελεία στον χημικό τύπο ($\cdot\text{NO}$), καθιστώντας το μια μορφή ελεύθερης ρίζας, ένα άκρως αντιδραστικό μόριο.

Αρχικά, το μόριο αυτό συσχετιζόταν με την ατμοσφαιρική ρύπανση, και θεωρούνταν ένας επιβλαβής ρύπος της ατμόσφαιρας [1-6]. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες έχει αποκαλυφθεί ότι διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο ως σηματοδοτικό μόριο στο καρδιαγγειακό σύστημα. Η ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε με το Βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1998 [7], αναδεικνύοντας τον ρόλο του NO στην κυτταρική σηματοδότηση ως έναν από τους πλέον ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς της Βιολογίας κατά τις τελευταίες 3 δεκαετίες [1-7].

Λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα του, το NO έχει τη δυνατότητα να διαπερνά τις μεμβράνες, επηρεάζοντας τη ρύθμιση τόσο του κυττάρου στο οποίο βρίσκεται, αλλά και των γειτονικών σε αυτό κυττάρων, καθιστώντας το ένα ευέλικτο μόριο επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων. Από τα τέλη του 20ού αιώνα, το NO αναγνωρίστηκε ως ενδογενής ενδοθηλιακός παράγοντας χαλάρωσης (Endothelium-Derived Relaxing Factor - EDRF), ο οποίος συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμβάλλει καθοριστικά στην αγγειοδιαστολή [2,4,5].

Η ενδογενής παραγωγή και λειτουργία του NO συνδέεται με ποικίλες κυτταρικές και μοριακές διεργασίες, όπως η αγγειοδιαστολή, οι ανοσολογικές αποκρίσεις, η νευροδιαβίβαση, η απόπτωση, η αναπαραγωγή, η ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής, η μετάφραση του mRNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών (Εικόνα 1). Οι φυσιολογικές δράσεις του NO επιτυγχάνονται

σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξεως των picomolar έως nanomolar (pM–nM) [6,8].



Εικόνα 1: Βιολογικές διεργασίες που διαμεσολαβούνται από το ενδογενώς παραγόμενο NO. Αναπαράγεται από την [6].

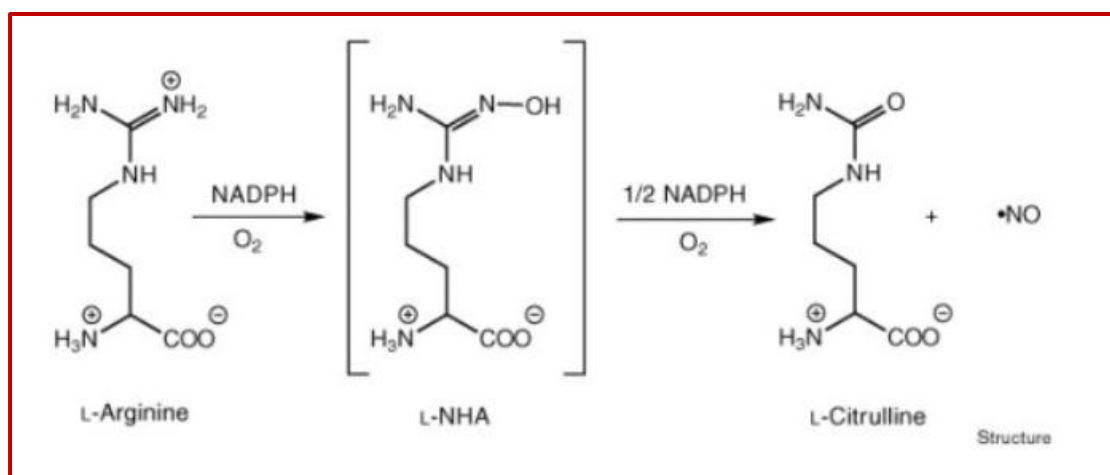
1.2 Βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου

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

Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου ($\bullet\text{NO}$), περιλαμβάνει την ενζυμική παραγωγή του μορίου από τις συνθάσες του ($\bullet\text{NO}$), έχοντας ως υπόστρωμα την L-αργινίνη. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές συνθασών νιτρικού οξέος, όλες παράγουν μονοξείδιο του αζώτου και L-κιτροουλίνη από L-αργινίνη, μοριακό οξυγόνο και NADPH. Οι ισομορφές είναι η νευρωνική συνθάση (NOS1 ή nNOS), η επαγόμενη συνθάση (NOS2 ή iNOS) και τέλος η ενδοθηλιακή συνθάση (NOS3 ή eNOS) [9,10]. Οι συνθάσες είναι ομοδιμερή ένζυμα που περιέχουν έναν δακτύλιο αίμης, μια N-τελική περιοχή οξυγενάσης συνδεδεμένη με μια περιοχή πρόσδεσης καλμοδουλίνης και με μια C-τελική περιοχή με ενεργότητα αναγωγής. Τα παραπάνω ένζυμα εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι ισομορφές NOS1 και NOS3 εκφράζονται συνεχώς σε φυσιολογικές συνθήκες, καθώς είναι απαραίτητες σε διεργασίες όπως η νευρωνική σηματοδότηση, η λειτουργία του αιμοστατικού μηχανισμού, η αγγειοδιαστολή και ο

έλεγχος της αρτηριακής πίεσης ,ενώ η NOS2 παράγει υψηλές ποσότητες NO κυρίως σε φλεγμονώδεις καταστάσεις [11].

Το NO παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος, την αγγειοδιαστολή και σε καταστάσεις φλεγμονώδους απόκρισης [1-11]. Η αντίδραση με την οποία παράγεται το εν λόγω μόριο, περιλαμβάνει ως υπόστρωμα την L-αργινίνη που υφίσταται συνολική οξείδωση πέντε ηλεκτρονίων κατά τη μετατροπή της σε κιτρουλίνη και ενός μορίου NO με ενδιάμεσο προϊόν την NG-υδροξυ-L-αργινίνη (L-NHA) (Εικόνα 2). Οι δύο κύριες περιοχές των ισομορφών, η N-τελική περιοχή οξυγενάσης, η οποία καταλύει την οξείδωση της L-αργινίνης και το C-τελικό άκρο αναγωγάσης ενώνονται με μια περιοχή πρόσδεσης καλμοδοουλίνης (CaM). Η οξείδωση της L-αργινίνης καταλύεται από την περιοχή οξυγενάσης της NOS που περιέχει το N-τελικό άκρο - ο διμερισμός των περιοχών είναι απαραίτητος για τη δραστηριότητα αυτή. Τα αναγωγικά ισοδύναμα που απαιτούνται για τη δημιουργία σιδηρούχου αίμης παρέχονται από το NADPH μέσω των C-τελικών περιοχών αναγωγάσης που ενσωματώνουν FAD και FMN και σχετίζονται με την οικογένεια των πρωτεϊνών της αναγωγάσης του κυτοχρώματος P450. Ο σχηματισμός του -NO από την L-αργινίνη απαιτεί όχι μόνο την αίμη και τους συμπαραγόντες των τομέων της αναγωγάσης, αλλά και 6(R)-τετραϋδρο-L-βιοπτερίνη (H4B) [12, 13].



Εικόνα 2 : Αντίδραση καταλυόμενη από τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου. Σε πρώτο στάδιο έχουμε την υδροξυλίωση της L-αργινίνη προς σχηματισμό L-NHA ,ενώ σε δεύτερο βήμα η L-NHA μετατρέπεται σε κιτρουλίνη και NO.

1.2.2 Βιοσύνθεση μονοξειδίου του αζώτου από νιτρικά-νιτρώδη

Μια ακόμη σημαντική πηγή βιοδραστικού μονοξειδίου του αζώτου, αποτελούν τα νιτρικά και νιτρώδη τα οποία λαμβάνονται διαμέσω της τροφής [14-15]. Πρώτο βήμα στην βιοενεργοποίηση των νιτρικών αποτελούν τα βακτήρια του στόματος [16]. Αυτά διαθέτουν το ένζυμο της νιτρικής αναγωγάσης, ανάγοντας τα νιτρικά σε νιτρώδη που καταλήγουν στο στομάχι. Στις όξινες συνθήκες του στομάχου, τα νιτρώδη ανάγονται, κατά πάσα πιθανότητα, μη ενζυμικά προς NO. Συμπληρωματικά των προαναφερομένων έχουν αναφερθεί διαφορετικοί ενζυματικοί και μη μηχανισμοί μέσω των οποίων γίνεται η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη στο αίμα και στους ιστούς [14-16]. Η βιοσύνθεση NO από νιτρικά και νιτρώδη ευνοείται σε υποοξικές και όξινες συνθήκες, όταν δηλαδή οι συνθήκες του NO εμφανίζουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Ως εκ τούτου, ο άξονας νιτρικών-νιτρωδών-NO θεωρείται ως ένα εφεδρικό ή/και συμπληρωματικό σύστημα διασφάλισης επαρκών επιπέδων βιοδραστικού NO όταν η παραγωγή του NO από τις συνθήκες του NO δεν επαρκεί. Λόγω της αφθονίας των νιτρικών και νιτρωδών σε πράσινα λαχανικά και τρόφιμα, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην διατροφή ως πηγή πρόσληψης τους [14-17].

1.3 Σηματοδοτική Δράση του μονοξειδίου του αζώτου

Όπως προαναφέρθηκε, το NO εμπλέκεται σε πολλαπλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στο σώμα των θηλαστικών. Το μικρό αυτό αέριο μόριο διαχέεται ταχέως δρώντας ως ενδο- και εξωκυτταρικός αγγελιοφόρος ,λειτουργώντας ως μεσολαβητής σηματοδοτικών μονοπατιών των κυττάρων -στόχων ,ποικίλων λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων της αγγειοδιαστολής, της νευροδιαβίβασης, των αντικαρκινικών δραστηριοτήτων και των δραστηριοτήτων έναντι παθογόνων [1-11].

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τον σηματοδοτικό ρόλο του NO στα φυτά, ενεργοποιώντας αμυντικά γονίδια και δρώντας ως ρυθμιστής ανάπτυξης. Στην περίπτωση των φυτών ,το NO είναι δυνατόν να παραχθεί από την νιτρική αναγωγή[18].

Η σηματοδοτική δράση του μονοξειδίου του αζώτου πραγματοποιείται είτε στο κύτταρο από το οποίο παράγεται με μια διαδικασία που καλείται αυτοκρινής σηματοδότηση, είτε διαπερνώντας ,λόγω της φύσης του, τις μεμβράνες προκειμένου

να έρθει σε άμεση επαφή με μόρια-στόχους γειτονικών κυττάρων, με διαδικασία που είναι γνωστή ως παρακρινής σηματοδότηση[7].

Οι σηματοδοτικές λειτουργίες του οξειδίου του αζώτου επιτυγχάνονται μέσω δύο πρωταρχικών μηχανισμών: της φωσφορυλίωσης με τη μεσολάβηση της cGMP(Cyclic guanosine monophosphate) και του σχηματισμού S-νιτροσοκυστεΐνης σε πρωτεΐνες.

1.3.1 Σηματοδότηση μέσω NO/cGMP

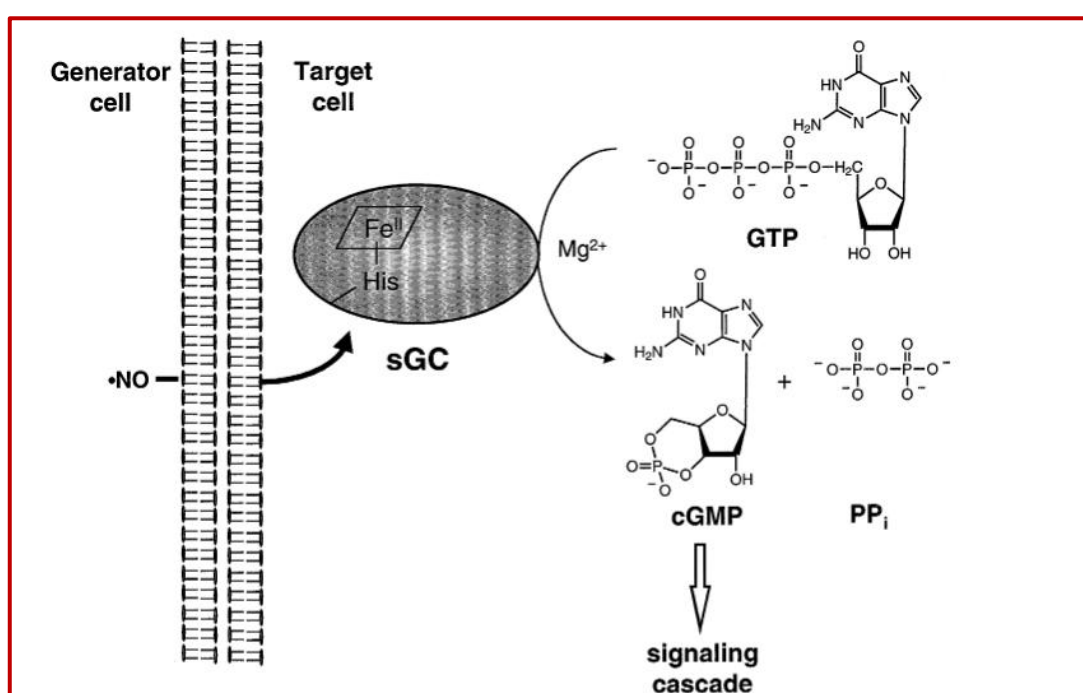
Η διαλυτή γουανυλική κυκλάση (sGC) είναι ο μόνος αποδεδειγμένος υποδοχέας μονοξειδίου του αζώτου(ΝΟ). Η διαλυτή γουανυλική κυκλάση είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη και πιο συγκεκριμένα μια αιμοπρωτεΐνη ,η οποία συνίσταται από τριςυπομονάδες α και β. Η ρίζα μονοξειδίου του αζώτου συνδέεται με τον σίδηρο (Fe^{+2}) της αίμης, οδηγώντας σε διάσπαση του δεσμού σιδήρου- ιστιδίνης κι ενεργοποιώντας κατ' αυτόν τον τρόπο το ένζυμο (Εικόνα 3).

Η ενεργοποίηση της κυκλικής γουανυλικής κυκλάσης (sGC) και η ακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP), επιτρέπουν στην sGC να μεταδώσει ένα σήμα ΝΟ στα μεταγενέστερα στοιχεία του καταρράκτη σηματοδότησης ,τα οποία είναι εξαρτώμενα από την cGMP [19, 20].

Πιο συγκεκριμένα, η sGC καταλύει την μετατροπή της 5'- τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) σε κυκλική 3',5'-μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP) αυξάνοντας τη δραστικότητα κυκλάσης του ενζύμου. Τα κυκλικά μόρια ενεργοποιούν αλλοστερικά κινάσες, μεταξύ των οποίων οι πρωτεϊνικές κινάσες G, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν καθοδικά πρωτεϊνικά μόρια. Οι φωσφοδιεστεράσες (Phosphodiesterase, PDKs) 5, 6 και 9 διαμεσολαβούν στην ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού καταβολίζοντας το κυκλικό GMP [19, 20].

Οι ερευνητές Drs Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, and Ferid Murad, οι οποίοι έλαβαν και το βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 1998, ανακάλυψαν το μοριακή οδό μέσω της οποίας το ΝΟ που προέρχεται από το ενδοθήλιο διεγείρει την sGC στα λεία μυϊκά κύτταρα και τη σύνθεση της cGMP. Η ενδοκυττάρια αύξηση των επιπέδων της cGMP ακολουθείται από έναν καταρράκτη φωσφορυλίωσης που οδηγεί στη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και στη ρύθμιση της αιματικής ροής[7].

Ο εν λόγω σηματοδοτικός μηχανισμός κέντρισε το ενδιαφέρον, και λόγω των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών. Το cGMP διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στις αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις του NO, λειτουργώντας ως βάση στον σχεδιασμό φαρμάκων με σκοπό την ενίσχυση ή την εξασθένηση της σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από την cGMP [21]. Η νιτρογλυκερίνη και τα οργανικά νιτρικά άλατα, μια κατηγορία ενώσεων που προκαλούν αγγειοδιαστολή, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη θεραπεία της στεφανιαίας αρτηριακής νόσου. Από την άλλη πλευρά, οι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης χρησιμοποιούνται με επιτυχία για τη θεραπεία της στυτικής δυσλειτουργίας [22, 23].



Εικόνα 3: Μηχανισμός ενεργοποίησης της γουανυλικής κυκλάσης από το NO.

1.3.2 S-Νιτροζυλίωση

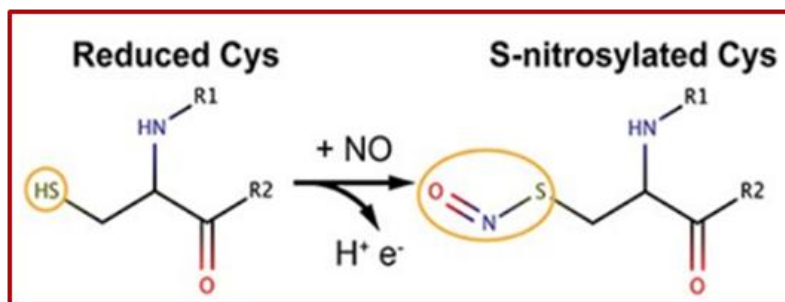
Η S-Νιτροζυλίωση (Cysteine-S-nitrosylation, Cys-NO) είναι μια αντιστρεπτή οξειδωτική μετα μεταφραστική τροποποίηση (Post Translational Modification, PTM) της κυστεΐνης από το NO [24-28]. Έχει προταθεί ότι επηρεάζει άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως την φωσφορυλίωση, την ακετυλίωση, την ουβικιτινίλωση και το σχηματισμό δισουλφιδίου [24]. Πειραματικές μελέτες απέδειξαν το ρόλο της στη λειτουργία των πρωτεϊνών, τη σταθερότητα, τον εντοπισμό και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η S-νιτροζυλίωση αποτελεί ένα νέο

παράδειγμα μεταγωγής σήματος με πλέον 3.000 πρωτεΐνες να έχουν ταυτοποιηθεί τροποποιημένες [24-28].

Ο μηχανισμός με τον οποίο μετάγεται και τερματίζεται το σήμα της S-νιτροζυλίωσης παραμένει εν πολλοίς άγνωστος. Μια νέα ιδέα είναι ότι η νιτροζυλίωση επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες, με σηματοδοτικό μηχανισμό που στηρίζεται σε πρωτεϊνικά δίκτυα όμοια με την φωσφορυλίωση και την ουβικιτινίωση. Ανεξάρτητα του μηχανισμού σηματοδότησης, θεωρείται ότι το NO ασκεί τις πρωταρχικές βιολογικές λειτουργίες του μέσω της S-νιτροζυλίωσης των πρωτεϊνών, παρά μέσω της ενεργοποίησης της sGC [25, 28].

Χημικά, η S-Νιτροζυλίωση περιλαμβάνει την ομοιοπολική προσθήκη ενός ισοδύναμου NO σε μια θειόλη που βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή της. Η οξείδωση των θειολικών ομάδων των κυστεϊνών, η καταλυόμενη από μέταλλα μεταφορά του NO και η ανταλλαγή με θειόλες μικρού μοριακού βάρους (MB), αντιπροσωπεύουν 3 από τους μηχανισμούς της μετα-μεταφραστικής αυτής τροποποίησης [26, 27]. Θειόλες μικρού μοριακού βάρους όπως η γλουταθειόνη (GSH) και το συνένζυμο A (CoA) δύνανται να υποστούν την εν λόγω μετα-μεταφραστική τροποποίηση προς σχηματισμό S-νιτροσογλουταθειόνης (GSNO) και S-νιτροσο-συνένζυμο A (SNO-CoA), αντίστοιχα. Η φυσιολογική σημασία των θειολών μικρού μοριακού βάρους υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι έχουν ταυτοποιηθεί ένζυμα που ανάγουν το GSNO και SNO-CoA αντίστοιχα [29, 30].

Το NO από μόνο του δεν είναι οξειδωτικό και δεν παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα έναντι μιας πρωτεϊνικής θειόλης. Απεναντίας, ως επί το πλείστον το NO αντιδρά πρώτα με το οξυγόνο για να αυξηθεί η οξειδωτική του κατάσταση κι εν συνεχεία αντιδρά με μια θειόλη (Εικόνα 4). Όπως προαναφέρθηκε η S-Νιτροζυλίωση των πρωτεϊνών διαμεσολαβεί τη δράση του NO σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Δημοσιευμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι διαταραχές της S-νιτροζυλίωσης εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακές, πνευμονικές, μυοσκελετικές και νευρολογικές καθώς και στον καρκίνο [24, 25].



Εικόνα 4: Σχηματισμός S-νιτροζοθειόλης

1.3.3 Νίτρωση (Nitration)

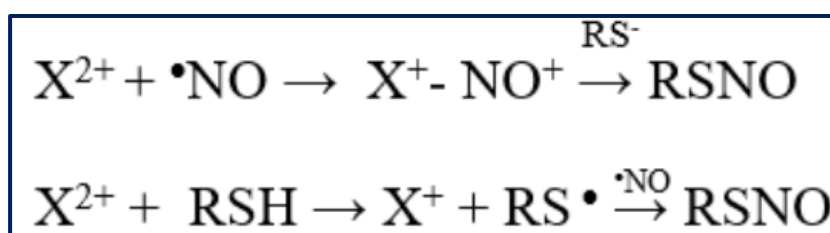
Η Νίτρωση περιλαμβάνει την εισαγωγή μιας νιτρομάδας ($-\text{NO}_2$) σε μια οργανική ένωση, συνήθως σε έναν αρωματικό δακτύλιο προς σχηματισμό νιτροτυροσίνης. Παρόλο που ο σχηματισμός νιτροτυροσίνης σε βιολογικά συστήματα είναι αποδεδειγμένος, ο ρόλος της νίτρωσης ως εκκινήτης, διαμεσολαβητής ή σήμα τερματισμού της σηματοδοτικής δράσης του NO δεν έχει τεκμηριωθεί οκόμενη. τροποποίησης αυτής ως εΟι αντιδράσεις νίτρωσης παράγουν διάφορες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των νιτροαρωματικών και των εκρηκτικών υλών, και είναι απαραίτητες ως χημικά ενδιάμεσα και πρόδρομα προϊόντα. Η αντίδραση πραγματοποιείται συνήθως σε υψηλές θερμοκρασίες και αποτελεί παράδειγμα ηλεκτροφιλικής αρωματικής υποκατάστασης [31, 32].

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

Στην παρούσα ενότητα θα περιγραφούν λεπτομερώς οι επικρατέστεροι μηχανισμοί που μεσολαβούν στην δημιουργία των S-Νιτροζοθειολών.

1.4.1 Κατάλυση από μεταλλοπρωτεΐνες

Σε πολλές μελέτες επισημαίνεται η συμμετοχή των μεταλλοπρωτεϊνών στις αντιδράσεις σχηματισμού S-Νιτροζοθειολών. Ο μηχανισμός εμπλέκει μέταλλα μετάπτωσης, μέσω των ακόλουθων δύο αντιδράσεων.



Εικόνα 5: Σχηματισμός S-Νιτροζοθειολών μέσω αντιδράσεων καταλυόμενες από μεταλλοπρωτεΐνες.

Αρχικά, πραγματοποιείται οξείδωση του NO από ένα δισθενές μέταλλο μετάπτωσης προς σχηματισμό μέταλλο-νιτροζυλ-συμπλόκων (αντίδραση 1, εικόνα 5). Η σύνδεση επιτρέπει την μεταφορά ισοδυνάμου NO με τη μορφή κατιόντων (NO⁺) (nitrosonium ions) σε ανηγμένες θειόλες πρωτεϊνών που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με το κέντρο μετάλλου-νιτροζυλ-συμπλόκου.

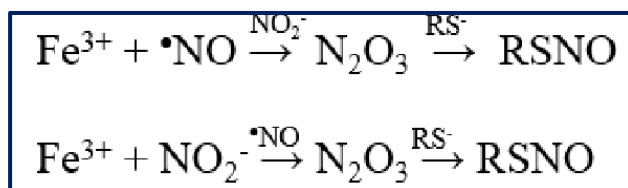
Εναλλακτικά, ο μηχανισμός περιλαμβάνει την οξείδωση της θειολικής ομάδας (RSH) από ένα στοιχείο μετάπτωσης προς σχηματισμό μιας ρίζας θειόλης (RS•). Η εν λόγω ρίζα στην συνέχεια αντιδρά με ένα μόριο του NO σε μια αντίδραση συνδυασμού δύο ελευθέρων ριζών σχηματίζοντας S-Νιτροσοθειόλη (RSNO) (αντίδραση 2, Εικόνα 5.). Τις παραπάνω οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, διαμεσολαβούν πρωτεΐνες όπως το κυτόχρωμα C, η αιμογλοβίνη και η σερουλοπλασμίνη, οι οποίες στο ενεργό κέντρο τους περιέχουν μέταλλα μετάπτωσης [33].

1.4.2 Νιτροζυλίωση που διαμεσολαβείται από νιτρώδη

Ο σχηματισμός των S-Νιτροσοθειολών διαμέσω των νιτρώδων, τα οποία προσλαμβάνονται από την διατροφή ακολουθεί την ακόλουθη πορεία. Στο πρώτο στάδιο όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 6 προτείνονται δύο πιθανοί μηχανισμοί.

(α) Το NO αντιδρά με τρισθενές σίδηρο αίμης, προς σχηματισμό ενός νιτροζυλ-συμπλόκου. Το σύμπλοκο αυτό εν συνεχεία αντιδρά με ένα νιτρώδες ιόν (NO₂⁻) και σχηματίζεται τριοξείδιο του διαζώτου(N₂O₃), το οποίο είναι ισχυρός νιτροζυλιωτικός παράγοντας μεταφέροντας μια νιτροζο-ομάδα στην θειόλη της κυστεΐνης, γεγονός που τελικά οδηγεί στο σχηματισμό νιτροσοθειόλης [αντίδραση 1 Εικόνα 6].

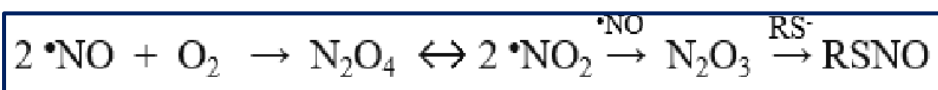
(β) Εναλλακτικά, το νιτροζυλ-σύμπλοκο αντιδρά με μια δεύτερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου, σχηματίζοντας το τριοξείδιο του διαζώτου (N₂O₃) [αντίδραση 2 Εικόνα 6]. Ακολουθεί η αντίδραση του N₂O₃ με μια ανηγμένη κυστεΐνη προς σχηματισμό S-νιτροσοθειόλης που έχει αποπρωτονιωθεί με απώτερο σκοπό τον σχηματισμό S-Νιτροσοθειολών[αντίδραση 2 Εικόνα 6] [33].



Εικόνα 6: Σχηματισμός S-Νιτροσοθειολών μέσω αντιδράσεων που περιλαμβάνουν νιτρώδη ιόντα.

1.4.3 S-Νιτροζυλίωση που προκαλείται από ανώτερα οξείδια του $\cdot\text{NO}$

Ένας επιπλέον μηχανισμός σχηματισμού του νιτροποιητικού παράγοντα (N_2O_3), αποτελεί η αυτοοξειδωση $\cdot\text{NO}$ παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου προς σχηματισμό τετροξειδίου του διαζώτου (N_2O_4). Το τετροξείδιο του διαζώτου βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με τη ρίζα του διοξειδίου του αζώτου ($\cdot\text{NO}_2$), το οποίο αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο $\cdot\text{NO}$ και σχηματίζεται με αυτό τον τρόπο τριοξείδιο του διαζώτου (N_2O_3). Ο συγκεκριμένος νιτροποιητικός παράγοντας αντιδρά με ελεύθερες θειόλες, σχηματίζοντας S-νιτροσοθειόλες [Εικόνα 7].

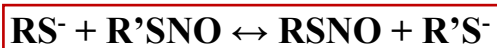


Εικόνα 7: Μηχανισμός S-Νιτροζυλίωσης από ανώτερα οξείδια του $\cdot\text{NO}$

Πρόκειται για μια αντίδραση 2^{ης} τάξης, γεγονός που υποδηλώνει ότι όταν υπάρχουν χαμηλές συγκεντρώσεις του $\cdot\text{NO}$, εμφανίζει χαμηλή ταχύτητα. Αντίθετα, σε υδρόφοβες περιοχές, όπου παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση $\cdot\text{NO}$, η ταχύτητα αυξάνεται. Αυτό υποδηλώνει ότι οι θειόλες που βρίσκονται κοντά σε αυτές τις περιοχές μπορούν να υποστούν S-Νιτροζυλίωση, μέσω του παραπάνω μηχανισμού λαμβάνοντας υπόψιν κι άλλες παραμέτρους όπως το pKa της συγκεκριμένης κυστεΐνης [25, 27, 33]

1.5 Διανιτροζυλίωση

Η διανιτροζυλίωση ίσως να αποτελεί τον σημαντικότερο μηχανισμό S-νιτροζυλίωσης. Στην ουσία, ένα ισοδύναμο NO μεταφέρεται από μια S-νιτροσοθειόλη σε μια ανηγμένη κυστεΐνη προς σχηματισμό μιας νέας S-Νιτροσοθειόλης (Αντίδραση 1).



[Αντίδραση 1]: Γενικός μηχανισμός διανιτροζυλίωσης

Πρόκειται για μια αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσβολή ενός θειολικού ανιόντος στο άζωτο της νιτροομάδας. Προϊόντα της εν λόγω αντίδρασης είναι μια S-νιτροζοθειόλη και μια ανηγμένη θειόλη. Εάν ένα από τα αντιδρώντα είναι πρωτεΐνη, τότε η αντίδραση αυτή αντιπροσωπεύει το μηχανισμό της S-διανιτροζυλίωσης πρωτεϊνών. Η θέση ισορροπίας της αντίδρασης 1 εξαρτάται από το λόγο των σταθερών ταχύτητας προς τα δεξιά και αριστερά αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις διανιτροζυλίωσης δεν είναι ιδιαίτερα

γρήγορες και οι ταχύτητες τους κυμαίνονται μεταξύ περίπου 0,1 και 500 M⁻¹s⁻¹, ανάλογα με τη φύση των αντιδρώντων. Οι μετρούμενες σταθερές ισορροπίας συχνά προσεγγίζουν την τιμή ένα για δεδομένο συνδυασμό θειόλης και νιτροζοθειόλης [34]. Παρόλο που κινητικά οι αντιδράσεις S-διανιτροζυλίωσης δεν ευνοούνται σε φυσιολογικές συνθήκες, πραγματοποιούνται κατά πάσα πιθανότητα με τη διαμεσολάβηση πρωτεϊνών που δίκην ενζύμων διαμεσολαβούν τη μεταφορά του NO από τη μια κυστεΐνη στην άλλη. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται νιτροσουλάσες.

Το •NO μπορεί να εκτελέσει την δράση του, μέσω διανιτροζυλίωσης, σε πιο απομακρυσμένες περιοχές από την περιοχή σύνθεσής του, όπως ο πυρήνας και τα μιτοχόνδρια, που σε άλλη περίπτωση θα ήταν αδύνατον λόγω του μικρού χρόνου ζωής του [35]. Κάποια παραδείγματα διανιτροζυλίωσης αποτελούν οι πρωτεΐνες αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και η αιμοσφαιρίνη [36, 37]. Η πρωτεΐνη GAPDH νιτροζυλιώνεται στην κυστεΐνη 150 που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η τροποποίηση οδηγεί σε μετατόπιση της πρωτεΐνης στον πυρήνα αφού πρώτα αλληλεπιδράσει με το ένζυμο Siah1, μια E3 λιγάση ουβικιτίνης. Εκεί η S-νιτροζυλιωμένη GAPDH λαμβάνει μέρος σε αντιδράσεις διανιτροζυλίωσης με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες [37, 38]. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα διανιτροζυλίωσης αποτελεί η αιμοσφαιρίνη. Αυτή αυτό-νιτροζυλιώνεται στην οξυγονωμένη της μορφή, με μεταφορά της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου από τον σίδηρο της αίμης στην θέση 93 της κυστεΐνης στην β' υπομονάδα [36]. Επίσης, αντιδράσεις διανιτροζυλίωσης διαμεσολαβούν οι μικρού μοριακού βάρους S-Νιτροσοθειόλες (GSNO, CysNO) και η μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνη θειορεδοξίνη (Trx, Uniprot ID: P10639, MB 11.6 kDa). Η κυστεΐνη στη θέση 73 της Trx έχει αναγνωριστεί ως ένα βασικό κατάλοιπο στις αντιδράσεις διανιτροζυλίωσης από την Trx των πρωτεϊνών στόχων, πχ κασπάση 3 [39].

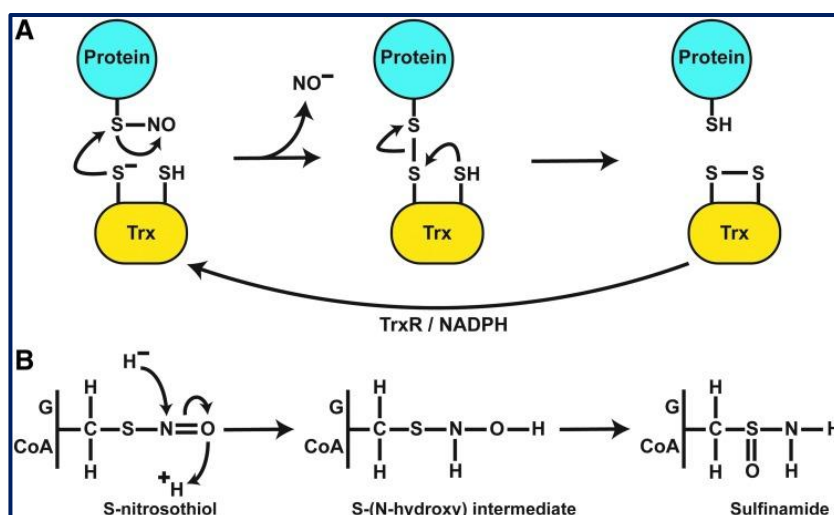
Γενικά, η εκλεκτικότητα της S-διανιτροζυλίωσης καθορίζεται από τις ακόλουθες παραμέτρους: (α) το pKa, (β) την προσβασιμότητα της θειόλης, (γ) την σταθερά διάστασης, (δ) τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών (ε) την μεταξύ τους απόσταση [24-28, 34].

1.6 Απονιτροζυλίωση

Τόσο η S-Νιτροζυλίωση όσο και η απονιτροζυλίωση ρυθμίζονται με ακρίβεια στον χώρο και τον χρόνο. Η απονιτροζυλίωση των πρωτεϊνών επάγεται από την διέγερση κάποιων κατηγοριών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένων των μελών της οικογένειας υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων, των υποδοχέων των G πρωτεϊνών και των υποδοχέων των κινασών Tyroσίνης [40]. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται δύο ιδιαίτερα συντηρημένα ενζυμικά συστήματα που λειτουργούν ως απονιτροζυλάσες: (α) Το σύστημα θειορεδοξίνης (Trx), το οποίο περιλαμβάνει την Trx και την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR) και το σύστημα αναγωγής της S-νιτροσουλφουταθειόνης (GSNOR), στο οποίο περιλαμβάνονται η γλουταθειόνη (GSH) και η αναγωγή αυτής, GSNOR, επίσης γνωστή ως αφυδρογονάση της φορμαλδεΰδης που εξαρτάται από την GSH και την αλκοολική αφυδρογονάση τάξης III (ADH5) που κωδικοποιείται από το ανθρώπινο γονίδιο ADH5[41].

1.6.1 Σύστημα θειορεδοξίνης (Trx)

Το σύστημα της θειορεδοξίνης ανήκει στις απόνιτροσυλάσες υψηλού μοριακού βάρους. Το σύστημα της Trx αποτελείται από την Trx-1/2, την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR) και το NADPH που συμμετέχει ως συμπαράγοντας. Χρησιμοποιώντας ένα ενεργό κέντρο διθειόλης (C-X-X-C), η Trx1 ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών-στόχων με ταυτόχρονη οξείδωση των κυστεϊνικών καταλοίπων στις θέσεις 32 και 35, Cys32 και Cys35, της Trx1. Η επακόλουθη αναγωγή του Trx1 από τον TrxR συνδέεται με την κατανάλωση NADPH, αναγεννώντας το αναγωγικό Trx1. Το σύστημα της θειορεδοξίνης εκτός από τον ρόλο τους στην αναγωγή των δισουλφιδίων, παίζει καθοριστικό ρόλο και στην απονιτροζυλίωση των SNO-πρωτεϊνών[42]. Η δράση του εν λόγω συστήματος ακολουθεί τον μηχανισμό Που παρουσιάζεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7: Μηχανισμός απονιτροζυλίωσης πρωτεϊνών διαμεσολαβούμενος από την θειορεδοξίνη.

Η απονιτροζυλίωση μέσω του συστήματος θειορεδοξίνης απαιτεί την άμεση αλληλεπίδραση με τις S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες-στόχους. Πρόκειται για μια πυρηνόφιλη προσβολή της πρωτεΐνης στόχου από ένα δραστικό κατάλοιπο κυστεΐνης της θειορεδοξίνης, στη θέση 32 (Εικόνα 7). Ως αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός δισουλφιδίου μεταξύ Trx και πρωτεϊνών -στόχων με ταυτόχρονη απελευθέρωση NO, υπό μορφή ανιόν νιτροζυλίου, HNO. Εν συνέχεια ,παρατηρείται διάσπαση του δισουλφιδίου από την δεύτερη κυστεΐνη του ενεργού κέντρου,Cys-35, προς τον σχηματισμό οξειδωμένης θειορεδοξίνης και τέλος ,αναγωγή του δισουλφιδίου Trx από την αναγωγή αυτής, TrxR. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός δράσης της Trx υποστηρίχθηκε από μελέτες όπου η Trx μεταλλαγμένη στην κυστεΐνη 32 χρησιμοποιήθηκε για την «παγίδευση» SNO-πρωτεϊνών-στόχων. Η ανάλυση αυτή έδειξε ενισχυμένη αλληλεπίδραση της Trx με τις πρωτεΐνες-στόχους σε συνθήκες αυξημένου NO ή SNO, ενώ η επεξεργασία με H₂O₂ (που προορίζεται ως οξειδωτικό των πρωτεϊνών και για τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών) είχε ως αποτέλεσμα συγκριτικά μικρή παγίδευση πρωτεϊνών [43].

Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι οι SNO-πρωτεΐνες αποτελούν κρίσιμο κυτταρικό υπόστρωμα για την Trx. Ένα προτεινόμενο, εναλλακτικό αρχικό βήμα στη διαμεσολαβούμενη από την Trx απονιτροζυλίωση είναι η διανιτροζυλίωση από την πρωτεΐνη-στόχο του ενεργού κέντρου της Cys32 της θειορεδοξίνης, Trx και η επακόλουθη απελευθέρωση νιτροζυλικού ανιόντος (ή HNO) . Η Trx υπάρχει κυρίως στην ανηγμένη μορφή της λόγω της δραστικότητας της TrxR, η οποία μπορεί να

διευκολύνει το ρόλο της ως απονιτροσυλάση. Η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη θειορεδοξίνη (Thioredoxin Interacting Protein, TXNIP) αναστέλλει τη δραστηριότητα απονιτροζυλίωσης της Trx. Ωστόσο, το ενδογενές NO περιορίζει αυτή την αναστολή καταστέλλοντας την TXNIP, παρέχοντας έναν μηχανισμό δυναμικής ρύθμισης της διαμεσολαβούμενης από την Trx απονιτροσυλίωσης πρωτεϊνών σε απόκριση στο NO[43].

1.6.2 Απονιτροζυλάσες μικρού μοριακού βάρους (LMW-SNO

Denitrosylases)

Δύο μικρού μοριακού βάρους θειόλες που πιθανά δρουν ως απονιτροζυλάσες σε βιολογικά συστήματα είναι η γλουταθειόνη (GSH) και το συνένζυμο A, (HS-CoA).

Τόσο η GSH όσο και το CoA μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις πρωτεΐνες-στόχους και να τις απονιτροσυλιώσουν μέσω διανιτροσυλίωσης, δημιουργώντας GSNO και SNO-CoA, αντίστοιχα. Ο μεταβολισμός των GSNO και SNO-CoA από τις αναγωγάσες GSNOR και SNOCoAR αντίστοιχα ρυθμίζει την δράση τους ως νιτροζυλάσες μικρού μοριακού βάρους και εμμέσως επηρεάζει το ισοζύγιο της ενδογενούς νιτροζυλίωσης. Μέχρι σήμερα, η GSNOR και η καρβονυλική αναγωγή 1 (CBR1) έχουν ταυτοποιηθεί ως GSNOR των θηλαστικών και η GSNOR είναι συντηρημένη από τα βακτήρια στον άνθρωπο- η αλκοολική αφυδρογονάση 6 (Adh6) και η αλδο-κετο αναγωγή 1A1 (AKR1A1) έχουν ταυτοποιηθεί ως SNOCoARs στη ζύμη και στα θηλαστικά, αντίστοιχα [29, 30].

Η νιτροσογλουταθειόνη αποτελεί μια βασική μορφή μεταφοράς του -NO σε βιολογικά συστήματα [29]. Η GSNOR είναι ένα άτυπο μέλος της οικογένειας της αλκοολικής αφυδρογονάσης, δεδομένου ότι δεν έχει γνωστό υπόστρωμα με βάση την αλκοόλη. Στα μεθυλοτροφικά βακτήρια, η GSNOR μεταβολίζει επίσης τη φορμαλδεϋδη[29].

Όπως προαναφέρθηκε, η αναγωγή της S-νιτροζογλουταθειόνης (GSNOR), αποτελεί ένα ένζυμο που προάγει την αναγωγή του GSNO. Παράλληλα, ρυθμίζει τόσο τον περιφερικό αγγειακό τόνο όσο και την καρδιακή συσταλτικότητα που διεγείρεται από τον β-αδρενεργικό αγωνιστή, ο οποίος προηγουμένως αποδιδόταν αποκλειστικά στη δράση του NO/cGMP. Ποντίκια με γενετική απαλοιφή του ενζύμου GSNOR παρουσιάζουν μειωμένο περιφερικό αγγειακό τόνο και μειωμένα επίπεδα ασβεστίου. Μηχανιστικά αυτό οφείλεται στην μειωμένη απονιτροζυλίωση του καρδιακού υποδοχέα ριανοδίνης 2 (RyR2) [44]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο

αγγειακός τόνος και καρδιακή συσταλτικότητα, τόσο υπό βασικές συνθήκες όσο και μετά από διέγερση ρυθμίζονται μέσω συντονισμένων δράσεων της σύνθεσης του NO και της GSNOR και ότι η μειωμένη απονιτροζυλίωση βλάπτει την καρδιαγγειακή λειτουργία. Τα ευρήματά αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι η δυναμική ρύθμιση των αντιδράσεων S-νιτροσυλίωσης/απονιτροσυλίωσης είναι ουσιώδεις στην ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας [44].

Αναφέρθηκε προηγουμένως το ένζυμο αναγωγή του SNO-CoA. Το συνένζυμο A (CoA), μια θειόλη μικρού μοριακού βάρους, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και στις διαδικασίες της μεταγωγής σήματος κυρίως μέσω της ακετυλίωσης λυσινών. Αν και ο ρόλος του CoA στην αντίστοιχη μεταφορά μονοξειδίου του αζώτου (NO) μέσω S-νιτροζυλίωσης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, ο Stamler και συνεργάτες περιέγραψαν έναν μηχανισμό στη ζύμη, κατά τον οποίο η πρωτεϊνική S-νιτροζυλίωση διαμεσολαβείται από το S-nitroso-CoA (SNO-CoA) [30].

Σε αυτό το πλαίσιο, έχει αναγνωριστεί μια εξειδικευμένη αναγωγή του SNO-CoA, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6 (ADH6). Η απαλοιφή του γονιδίου ADH6 σε ποντίκια, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα κυτταρικής S-νιτροζυλίωσης και διαταραχές στον μεταβολισμό του CoA. Η πρωτεΐνη Adh6 δρα ως εκλεκτική αναγωγή του SNO-CoA, προστατεύοντας τη θειολάση του ακετοακετυλο-CoA από την ανασταλτική δράση της S-νιτροζυλίωσης. Μέσω αυτής της προστασίας, επηρεάζει σημαντικά τη βιοσύνθεση των στερολών [30]. Προτείνεται επίσης ότι η Adh6 ρυθμίζει την S-νιτροσυλίωση των πρωτεϊνών μέσω του SNO-CoA, παρέχοντας έναν ρυθμιστικό μηχανισμό που λειτουργεί παράλληλα με την ακετυλίωση πρωτεϊνών. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι αναγωγάσες του SNO-CoA απαντώνται από τα βακτήρια έως τα θηλαστικά, με την αλδο-κετο-αναγωγή 1A1 (AKR1A1) να αποτελεί το λειτουργικό ανάλογο της Adh6 στα θηλαστικά [30]. Οι μελέτες της ομάδας του Jonathan Stamler υποστηρίζουν την ύπαρξη ενζύμων που ρυθμίζουν την S-νιτροζυλίωση πρωτεϊνών σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών και υποδεικνύουν ότι η S-νιτροσυλίωση που επάγεται από το SNO-CoA μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού[30].

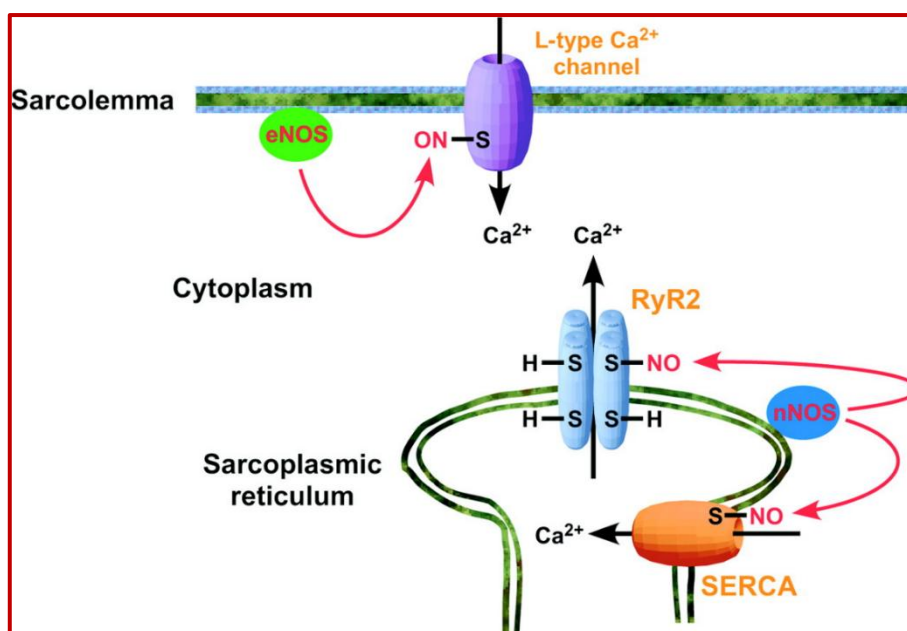
1.7 Σημασία της σηματοδότησης του NO για την καρδιαγγειακή και μεταβολική λειτουργία.

Η σηματοδότηση του μονοξειδίου του αζώτου ρυθμίζει τη μεταβολική και καρδιαγγειακή δραστηριότητα [6, 45, 46]. Το μονοξείδιο του αζώτου, το οποίο παράγεται από την ενδοθηλιακή συνθάση (eNOS) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ροής του αίματος και την αγγειακή αναδιαμόρφωση και στην προστασία του ενδοθηλίου από την συσσώρευση αιμοπεταλίων και την προσκόλληση λευκοκυττάρων. Δυσλειτουργία του μεταβολισμού του NO έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει σε διάφορες αγγειακές παθολογικές καταστάσεις, όπως η αθηροσκλήρωση, η υπερχοληστερολαιμία, ο διαβήτης, η υπέρταση και το σηπτικό σοκ [6, 46]. Εκτός από το καρδιαγγειακό σύστημα έχει αποδειχθεί ότι το •NO, το οποίο παράγεται από την ενδοθηλιακή συνθάση (eNOS), καθορίζει και την μεταβολική ομοιοστασία [23].

Καρδιαγγειακές νόσοι που προκαλούνται από διαταραχές του μεταβολισμού έχουν συνδεθεί με μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου που παράγεται από την eNOS [23]. Στόχος κλινικών δοκιμών αποτελεί η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και η ενίσχυση της σηματοδότησης του σε ασθενείς που πάσχουν από καρδιακή ανεπάρκεια, υπέρταση ή βρίσκονται στο φάσμα μεταβολικού συνδρόμου. Σε επίπεδο μορίων και μηχανισμών η καρδιαγγειακή ρύθμιση και η μεταβολική λειτουργία, η οποία ρυθμίζεται από το NO κατανοήθηκε από την γενετική απαλοιφή του eNOS σε ποντικούς. Φαινοτυπικά, τα αρσενικά ποντίκια εμφανίζουν σταδιακή επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας, ελαττώνοντας το προσδόκιμο ζωής τους [47]. Τα ποντίκια εμφανίζουν υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη και ελαττωμένη ικανότητα οξείδωσης των λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες, την καρδιά και το ήπαρ. Παράλληλα, εμφανίζουν χαμηλό μεταβολικό ρυθμό σε κατάσταση ηρεμίας και ελαττωμένη κατανάλωση οξυγόνου στα μιτοχόνδρια της καρδιάς και των σκελετικών μυών [48-50]. Από τα παραπάνω, διαπιστώνει κανείς ότι το προερχόμενο από το eNOS μονοξείδιο του αζώτου επηρεάζει την ενεργειακή ομοιοστασία.

Το μοριακό οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα αποτελούν κρίσιμα μόρια στην καρδιαγγειακή παθοφυσιολογία. Πιο πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένας επιπλέον ενδογενής ρυθμιστής της καρδιαγγειακής φυσιολογίας και της κυτταρικής αναπνοής, λειτουργώντας σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις από το O₂ ή το CO₂.

Η S-νιτροζυλίωση έχει αναδειχθεί σε μια πανταχού παρούσα σηματοδοτική λειτουργία, η οποία επηρεάζει σχεδόν κάθε πτυχή της καρδιακής λειτουργίας και δυσλειτουργίας.



Εικόνα 8 : S-νιτροσυλίωση στην καρδιακή σηματοδότηση μέσω του σαρκοπλασματικού δικτύου.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, η S-νιτροζυλίωση ρυθμίζει τα επίπεδα Ca^{2+} και κατ' επέκταση την σύζευξη διέγερσης-σύσπασης. Ο υποδοχέας ρυανοδίνης, RyR2, η καρδιακή μορφή του τετραμερούς διαύλου-υποδοχέα ρυανοδίνης/καναλιού απελευθέρωσης Ca^{2+} , εντοπίζεται στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου (sarcoplasmic reticulum, SR), σε εγγύτητα με το κανάλι ασβεστίου τύπου L της πλασματικής μεμβράνης, το οποίο παρέχει το υπόστρωμα για τη διαμεσολαβούμενη από ασβέστιο απελευθέρωση ασβεστίου από το SR στο κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη SERCA αναπληρώνει το Ca^{2+} του SR. Ο RyR2 συνεντοπίζεται με την nNOS στο SR και η S-νιτροζυλίωση του RyR2 ενισχύει την απελευθέρωση Ca^{2+} . Όπως και στον RyR1 των σκελετικών μυών, η φυσιολογική S-νιτροζυλίωση μιας ή λίγων κυστεϊνών εντός κάθε μονομερούς RyR2 είναι πιθανόν να συμβαίνει. Η S-νιτροζυλίωση του διαύλου ασβεστίου τύπου L (υπομονάδα $\alpha_1\text{C}$ - με αποτέλεσμα την εξασθενημένη συσταλτικότητα εξαρτώμενη από τον β -AR) και της SERCA είναι ανασταλτική. Η υπο-S-νιτροζυλίωση του RyR2 σχετίζεται με διαστολική διαρροή Ca^{2+} και αρρυθμία χαρακτηριστική του αιφνίδιου καρδιακού θανάτου. Η S-νιτροζυλίωση του διαύλου ασβεστίου L-τύπου έχει συσχετιστεί με το ισχαιμικό preconditioning που περιορίζει τη

βλάβη επαναιμάτωσης, ενώ η υπερ-S-νιτροζυλίωση του διαύλου ασβεστίου L-τύπου έχει συσχετιστεί με κολπική μαρμαρυγή. Σημειώνεται, επιπλέον, ότι η ανώμαλη S-νιτροζυλίωση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μετατόπισης του nNOS στην πλασματική μεμβράνη που παρατηρείται σε συνδυασμό με το έμφραγμα του μυοκαρδίου και την μυοκαρδιοπάθεια. Τέλος, η ανώμαλη και ιδίως η υπερ-S-νιτροζυλίωση μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη οξειδωτική τροποποίηση των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την αντίδραση.[51]

Ο μηχανισμός της S-Νιτροζυλίωσης έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε πληθώρα μεταβολικών μονοπατιών. Η μιτοχονδριακή αναπνοή, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η γλυκόλυση, ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού και ο κύκλος TCA αποτελούν κάποια από τα συγκεκριμένα μονοπάτια [52]. Οι διεργασίες της S-Νιτροζυλίωσης μεταβάλλουν επίσης τον καρκινικό μεταβολισμό [53].

1.8 Μέθοδοι χημικού εμπλουτισμού S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι χημικού εμπλουτισμού S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων, οι οποίες συνδυάζονται με αναλυτικές τεχνικές και κυρίως φασματομετρία μάζας, με σκοπό τον ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμό θέσεων S-Νιτροζυλίωσης σε βιολογικά δείγματα.

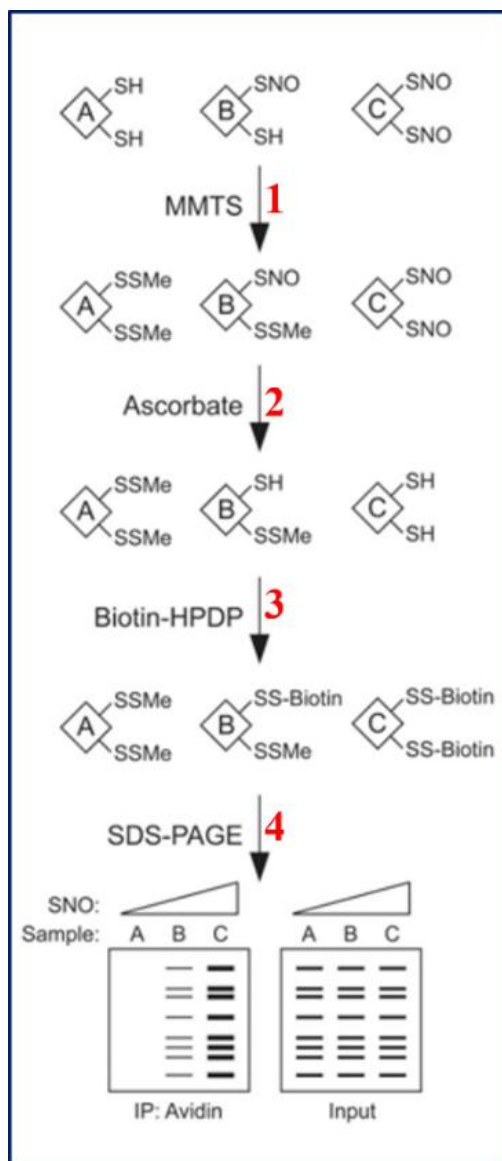
Οι μέθοδοι αποτελούνται από τα ακόλουθα στάδια

1. Την προετοιμασία του βιολογικού δείγματος
2. Την αλκυλίωση των ανηγμένων κυστεϊνών
3. Τον χημικό εμπλουτισμό
4. Την έκλυση πρωτεϊνών ή πεπτιδίων και
5. Τον ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμό με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών.

Στο παρόν κεφάλαιο θα περιγραφούν οι τεχνικές χημικού εμπλουτισμού, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες, από τις οποίες αντλήθηκαν τα αποτελέσματα των μετα-αναλύσεων. Για ιστορικούς λόγους περιλαμβάνεται και η biotin switch που ήταν η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε.

1.8.1 Biotin Switch

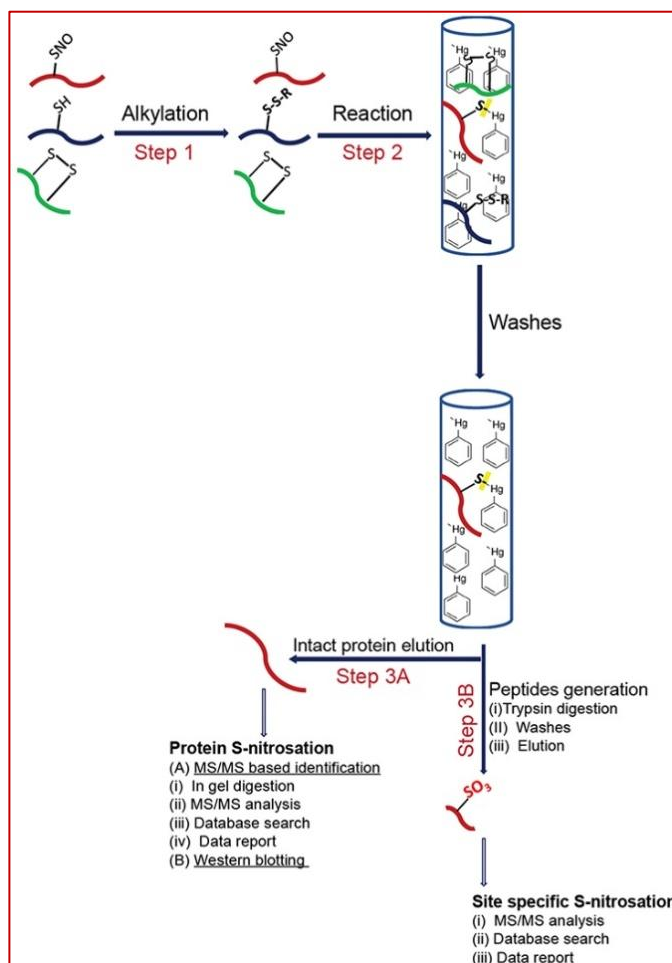
Η πρώτη μέθοδος χημικού εμπλουτισμού S- νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών ήταν η Biotin Switch [54]. Αναπτύχθηκε από τον Jaffrey και τους συνεργάτες του το 2001 και μέχρι σήμερα, μαζί με τις παραλλαγές της, αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο εμπλουτισμού. Η biotin switch, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 9, ξεκινάει με το μπλοκάρισμα-αλκυλίωση των ανηγμένων θειολών(-SH) (Στάδιο 1), η οποία επιτυγχάνεται με S-μεθυλοθειλίωση με MMTS (μεθανοθειοσουλφονικό μεθύλιο). Στο στάδιο 2 όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 9, οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες ανάγονται αρχικά με ασκορβικό οξύ και στη συνέχεια οι ανηγμένες κυστεΐνες σημαίνονται με Biotin-HPDPμ(N-[6-(βιοτιναμιδο)εξυλ]-3'-(2'-πυριδυλθειο)-προπιοναμίδιο) (Στάδιο 3). Η σύνδεση των πρωτεϊνών με βιοτίνη επιτρέπει τον εμπλουτισμό τους με χρήση αβιδίνης ή στρεπταβιδίνης. Το στάδιο της έκλουσης (Στάδιο 4) αποσκοπεί στην απελευθέρωση των σημασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες θα ταυτοποιηθούν είτε με ανοσοαποτύπωση (στοχευμένη ταυτοποίηση πρωτεϊνών) είτε με μη στοχευμένη ταυτοποίηση κάνοντας χρήση φασματομετρίας μάζας. Μια παραλλαγή της biotin switch επιτρέπει την ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης [55]. Στην περίπτωση αυτή, μετά τον χημικό εμπλουτισμό με biotin-HPDP, οι πρωτεΐνες υφίστανται πέψη με θρυψίνη. Τα πεπτίδια που παραμένουν συνδεδεμένα στην βιοτίνη εμπλουτίζονται με αβιδίνη ή στρεπταβιδίνη και η αλληλουχία τους καθώς και οι πρωτεΐνες από τις οποίες προέρχονται ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας [55].



Εικόνα 9: Μέθοδος χημικού εμπλουτισμού γνωστή ως *biotin switch*. Τα νούμερα 1-4 περιγράφουν τα στάδια που απαιτούνται .

1.8.2 Μέθοδος οργανικού υδραργύρου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 2010 και βασίζεται στην απ' ευθείας και εκλεκτική αντίδραση του οργανικού υδραργύρου με S-νιτροσοκυστεΐνη, προς σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού Hg-S (Βήμα 2, Εικόνα 10). Τα βήματα του χημικού εμπλουτισμού με χρήση οργανικού υδραργύρου περιγράφονται αναλυτικά προηγουμένως [56-59]. Όπως και στις προηγούμενες μεθόδους, οι ανηγμένες κυστεΐνες αλκυλιώνονται με μεθανοθειοσουλφονικό μεθύλιο (MMTS), όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 10 (Step 1). Ακολουθεί ο χημικός εμπλουτισμός των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών, ο οποίος σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεθόδους δεν απαιτεί την αναγωγή των S-νιτροσοκυστεϊνών με ασκορβικό οξύ. Ο οργανικός υδράργυρος συνδέεται χημικά σε σφαιρίδια αгарόζης, σχηματίζοντας μια ρητίνη που τοποθετείται σε χρωματογραφικές στήλες. Οι S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες διέρχονται μέσω της ρητίνης και αντιδρούν με τον υδράργυρο με αποτέλεσμα την σύνδεση τους στη ρητίνη (Step 2). Στη συνέχεια, οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλύονται (Step 3A) και ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας ή με ανοσοαποτύπωση. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες υφίστανται πέψη με θρυψίνη όσο είναι συνδεδεμένες στη ρητίνη, μια προσέγγιση που επιτρέπει την ταυτοποίηση των θέσεων της S-νιτροσουλίωσης. Τα αντίστοιχα πεπτίδια εκλύονται και ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας (Step 3B) [56-59].

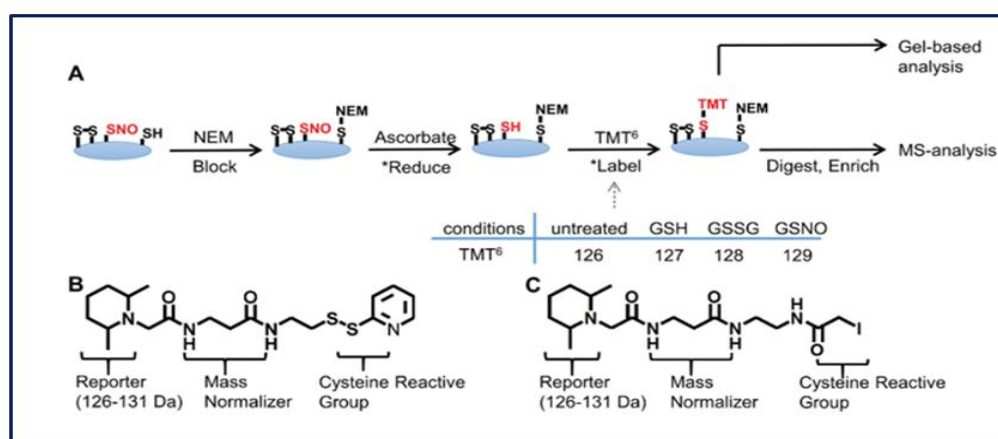


Εικόνα 10: Διάγραμμα ροής χημικού εμπλουτισμού με χρήση οργανικού υδραργύρου. Στην εικόνα, εκτός των βημάτων που οδηγούν στον χημικό εμπλουτισμό παρέχονται και πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων. Η εικόνα αναπαράγεται αυτούσια από το [59]

1.8.3 Cys TMT and IodoTMT reagents_ Βασική παραλλαγή της Biotin switch assay

Μια τροποποιημένη εκδοχή της γενικής μεθόδου Biotin switch Assay περιλαμβάνει τη χρήση των αντιδραστηρίων Cys TMT⁶ και Iodo TMT⁶, στη θέση του HPDP-biotin. Η χημεία της αρχικής μεθόδου (Biotin switch) είναι αντιστρεπτή με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ταυτοποίησης των θέσεων S-Νιτροζυλίωσης στις πρωτεΐνες με τη χρήση φασματομετρίας μαζών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια Iodoacetyl Tandem Mass TagTM (iodoTMTTM) και Cys Tandem Mass TagTM (CysTMTTM), δύο ισοβαρή αντιδραστήρια ίδιας χημικής δομής και διαφορετικής αντίδρασης της κυστεϊνικής ομάδας, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 11

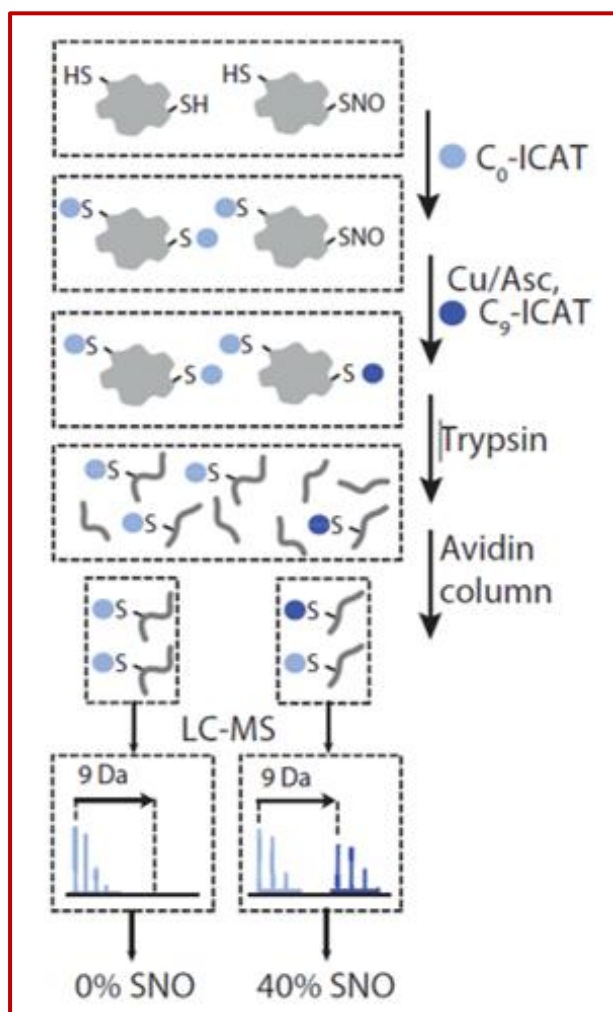
Β και 11C. Αυτά επιτρέπουν τον πολύπλοκο ημιποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών που περιέχουν κυστεΐνη με τη χρήση φασματομετρίας μάζας με έναν μη αναστρέψιμο τρόπο υπό αναγωγικές συνθήκες. Η ταυτόχρονη επισήμανση με Cys TMT⁶ και iodo TMT⁶ παρουσιάζει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση των τροποποιημένων θέσεων. Αρχικά, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 11Α, πραγματοποιείται η αλκυλίωση των ανηγμένων κυστεϊνών με Ν-αιθυλομαλεϊμίδιο (NEM), ένα μόριο που αντιδράει μη αντιστρεπτά με τις κυστεΐνες προκειμένου μην είναι διαθέσιμες για περαιτέρω αντιδράσεις. Ακολουθεί η αναγωγή των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών με ασκορβικό οξύ και η σήμανση τους με TMT⁶ (Cysteines or Iodo), (Εικόνα 11Α και 11C αντίστοιχα). Οι θέσεις νιτροζυλίωσης ταυτοποιούνται με φασματομετρία μαζών [60].



Εικόνα 11: Χημικός εμπλουτισμός με χρήση αντιδραστηρίων Cys-TMT και Iodo-TMT. (α). Γενική πειραματική διαδικασία, (β) Χημική δομή αντιδραστηρίου Cys-TMT⁶, (γ) Iodo TMT⁶. Η εικόνα αναπαράγεται από το [60]

1.8.4 CysxICAT

Η μέθοδος χημικού εμπλουτισμού και ταυτοποίησης της S-Νιτροζυλίσωσης στην τέταρτη μελέτη [61] περιλαμβάνει την μεθοδολογία Cys-ICAT, μια επέκταση της OxICAT (Εικόνα 12). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία ξεκινά ομογενοποίηση του καρδιακού μύ παρουσία τριγλωρικού οξέος, (TCA) και σουλφανιλαμιδίου προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική S-Νιτροζυλίσωση κατά την επεξεργασία του δείγματος. Ακολουθεί η σήμανση των μη τροποποιημένων κυστεϊνών με ^{12}C -ICAT (παρίσταται ως C_0), ακολουθεί αναγωγή των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών με συνδυασμό χαλκού (Cu(I)) και ασκορβικού οξέος και σήμανση των ανηγμένων θειολών με ^{13}C -ICAT (παρίσταται ως C_9 -ICAT) (Εικόνα 12). Ακολουθεί η πέψη των πρωτεϊνών με χρήση του ενζύμου θρυψίνη και τα σημασμένα με ICAT πεπτίδια (C_0 και C_9) «απομονώνονται» με βιοτίνη και ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας. Το ποσοστό της S-νιτροζυλίσωσης για συγκεκριμένες θέσεις υπολογίζεται λαμβάνοντας τον λόγο της έντασης των σημάτων C_9 και C_0 . Απαραίτητο είναι προφανώς η ταυτοποίηση των αντίστοιχων πεπτιδίων, δηλαδή τόσο του σημασμένου με C_9 όσο και του σημασμένου με C_0 , των σημάτων αποτελεσμάτων.



Εικόνα 12: Η εικόνα παρουσιάζει τα βασικά στάδια του χημικού εμπλουτισμού με χρήση ισοτόπων Cys-ICAT. Η εικόνα αναπαράγεται από το [61]

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στους μηχανισμούς που οδηγούν σε S-νιτροζυλίωση στα μιτοχόνδρια. Πρόκειται για μετα-ανάλυση των πειραματικών δεδομένων τεσσάρων ανεξάρτητων μελετών που η κάθε μια χρησιμοποιεί διαφορετικό χημικό εμπλουτισμό θέσεων ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης. Τα αποτελέσματα των τεσσάρων μελετών συνδυάστηκαν και προέκυψε πρωτόωμα αποτελούμενο από 1974 θέσεις ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 761 πρωτεΐνες.

ΚΕΦΑΛΙΟ 2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί Cysteine-Reactive Tandem Mass Tags (Cys-TMT) για χημικό εμπλουτισμό

Στην πρώτη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια αγρίου τύπου με γονότυπο C57BL/6, ηλικίας 3 έως 3,5 μηνών [60]. Ελήφθη ο καρδιακός μυς και καταψύχθηκε αμέσως. Οι ανηγμένες κυστεΐνες αλκυλιώθηκαν με Cys-TMT-126. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χημικός εμπλουτισμός των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών. Αρχικά, οι νιτροκυστεΐνες ανήχθηκαν με ασκορβικό οξύ και οι ανηγμένες κυστεΐνες που προέκυψαν σημάνθηκαν με CysTMT-131. Ακολούθησε πέψη των πρωτεϊνών και δέσμευση των σημασμένων Cys-TMT πεπτιδίων σε κατάλληλη ρητίνη (anti-CysTMT resin). Η ταυτοποίηση των θέσεων S-νιτροζυλίωσης πραγματοποιήθηκε με δίδυμη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Στη μελέτη αυτή ταυτοποιήθηκαν 287 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 175 πρωτεΐνες.

2.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί οργανικό υδράργυρο για χημικό εμπλουτισμό

Η δεύτερη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε αρσενικά ποντίκια αγρίου τύπου με γονότυπο C57BL/6, ηλικίας 2-8 μηνών [52]. Χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η καρδιά. Οι ανηγμένες κυστεΐνες αλκυλιώθηκαν με μέθυλο μεθάνιοθειοσουλφονικό (MMTS), το οποίο αντιδρά με ανηγμένες κυστεΐνες σχηματίζοντας μεικτό δισουλφιδικό δεσμό. Ο χημικός εμπλουτισμός των S-Νιτροσυλιωμένων πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με ρητίνη οργανικού υδραργύρου, ο οποίος αντιδρά απευθείας με τις S-νιτροσθειόλες σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό με το θείο. Τα πεπτίδια εκλόνστηκαν με υπερφορμικό οξύ και ταυτοποιήθηκαν με δίδυμη φασματομετρία μάζας. Στη μελέτη αυτή ταυτοποιήθηκαν 576 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 311 πρωτεΐνες.

2.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί Dual Labeling Biotin Switch Assay για χημικό εμπλουτισμό

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν αριστερές κοιλίες καρδιάς που απομονώθηκαν από αρσενικά ποντίκια αγρίου τύπου με γενότυπο C57BL/6 ηλικίας 8 μηνών, αρσενικά και θηλυκά ποντίκια C57BL/6 ηλικίας 4 έως 5 μηνών [62]. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιείται μια παραλλαγή της μεθόδου biotin switch. Αρχικά, οι ανηγμένες κυστεΐνες αλκυλιώνονται με N-αιθυλομαλεϊμίδιο (NEM). Στη συνέχεια, οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες ανάγονται με ασκορβικό οξύ. Το δείγμα χωρίζεται σε δύο μέρη, στο ένα μέρος προστίθεται Cys-TMT ενώ στο δεύτερο iodo-TMT. Τα δύο αντιδραστήρια διαφέρουν ως προς την ηλεκτροφιλικότητα τους και επομένως αναμένεται να αντιδράσουν με διαφορετικές ομάδες κυστεϊνών το κάθε ένα. Η ταυτοποίηση θέσεων S-νιτροζυλίωσης πραγματοποιείται με δίδυμη φασματομετρία μάζας. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 640 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 362 πρωτεΐνες.

2.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελέτης που χρησιμοποιεί isotope-coded affinity tag labeling για χημικό εμπλουτισμό

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε αρσενικά ποντίκια αγρίου τύπου με γονότυπο C57BL/6 ηλικίας 2 με 2,5 μηνών [61]. Χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρες καρδιές οι οποίες ομογενοποιήθηκαν και στη συνέχεια οι ανηγμένες κυστεΐνες σημάνθηκαν με το αντιδραστήριο C₀-ICAT. Οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες ανάγονται με ασκορβικό οξύ παρουσία χαλκού που κάνει την αναγωγή πιο αποτελεσματική και ακολουθεί σήμανση αυτών των κυστεϊνών με "βαρύ" ¹³C₉-ICAT. Ακολουθεί πέψη των πρωτεϊνών, εμπλουτισμός των σημασμένων πεπτιδίων με βιοτίνη και ταυτοποίηση τους με δίδυμη φασματομετρία μάζας. Ταυτοποιήθηκαν 1104 θέσεις ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 492 πρωτεΐνες.

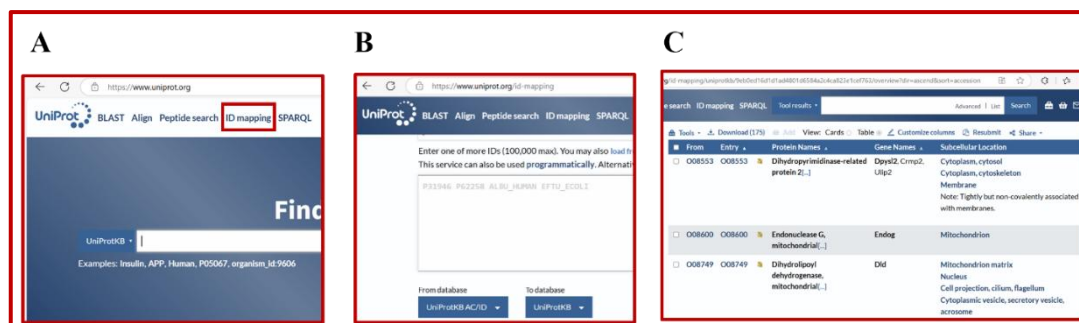
2.5 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων και δημιουργία μιτοχονδριακού S-νιτροσωπρωτεώματος.

Αρχικά, τα πειραματικά δεδομένα των τεσσάρων μελετών ανακτήθηκαν από το διαδίκτυο και αποθηκεύτηκαν με μορφή αρχείου excel (Files 1-4). Ακολούθως, δημιουργήθηκε ένα αρχείο Excel στο οποίο τέσσερα υπολογιστικά φύλλα αντιστοιχούσαν στις μελέτες 1-4. Ακολούθησε ενοποίηση των μελετών 1-4 σε ξεχωριστό φύλλο και επεξεργασία των δεδομένων, ώστε στην τελική λίστα οι θέσεις νιτροζυλίωσης και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες να εμφανίζονται μία φορά. Αν η ίδια πρωτεΐνη ταυτοποιείται με διαφορετικές θέσεις νιτροζυλίωσης σε διαφορετικές μελέτες, όλες οι θέσεις αυτές εμφανίζονται στην τελική λίστα. Με βάση τα παραπάνω προέκυψε μια λίστα που περιελάμβανε 1.974 μοναδικές θέσεις S-νιτροζυλίωσης καταταξιμεμένες σε 761 πρωτεΐνες. Επίσης, σε ξεχωριστό φύλλο εργασίας καταγράφηκε η συχνότητα με την οποία οι πρωτεΐνες ταυτοποιούνται στις διαφορετικές μελέτες. Παρατηρήθηκε ότι 81 πρωτεΐνες ταυτοποιούνται και στις τέσσερις μελέτες, 93 στις τρεις από τις τέσσερις, 143 σε δύο από τις τέσσερις, ενώ 444 πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν σε μία μόνο μελέτη.

Προκειμένου να μειωθεί το μεθοδολογικό bias, για την συνέχεια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα κυστεϊνικά κατάλοιπα που είχαν ταυτοποιηθεί σε τουλάχιστον δύο από τις τέσσερις αρχικές μελέτες. Αυτή η διαδικασία οδήγησε στη διαμόρφωση ενός μικρότερου νιτροζοπρωτεώματος, το οποίο αποτελείται από 893 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 325 πρωτεΐνες.

2.6 Ανάλυση του ενδοκυττάρου εντοπισμού των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών

Για τον ενδοκυττάριο εντοπισμό των S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο ιστότοπος www.uniprot.org. Αρχικά, δημιουργείται ένα αρχείο μορφής κειμένου (text file) όπου περιέχονται τα ονόματα των γονιδίων που κωδικοποιούν τις S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες. Στην αρχική σελίδα του ιστότοπου επιλέγεται η εντολή «ID mapping» (Εικόνα 13Α). Στην επόμενη οθόνη (Εικόνα 13Β) η λίστα των γονιδίων επικολλάται στο αντίστοιχο πλαίσιο και επιλέγεται η εντολή “Map IDs”. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα πειραματικά δεδομένα εμφανίζονται με τη μορφή πίνακα (Εικόνα 13C) ο οποίος μπορεί να αποθηκευτεί με την μορφή αρχείου Excel.



Εικόνα 13: Χρήση του UniProt ID Mapping για τον ενδοκυττάριο εντοπισμό των S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών. (Α) Επιλογή του εργαλείου ID mapping, (Β) Εισαγωγή λίστας γονιδίων και αντιστοίχιση, (C) Εμφάνιση και αποθήκευση των αποτελεσμάτων.

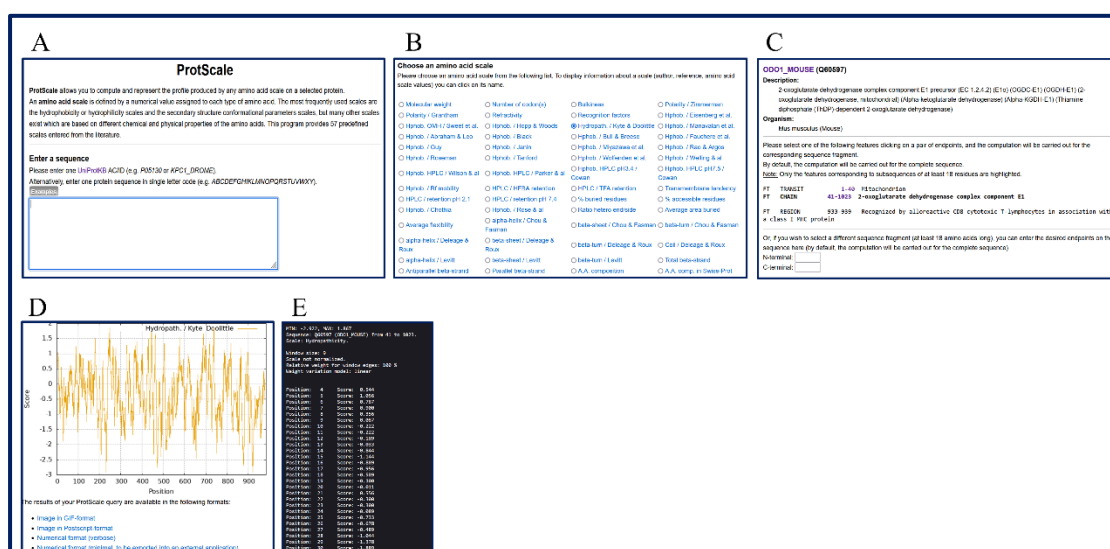
Σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, αναλύθηκε η ενδοκυττάρια θέση των 325 πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν σε τουλάχιστον δύο από τις τέσσερις αρχικές μελέτες. Για την συνέχεια της μελέτης επιλέχθηκαν 145 πρωτεΐνες για τις οποίες η κύρια ενδοκυττάρια θέση τους είναι τα μιτοχόνδρια. Στις πρωτεΐνες αυτές αντιστοιχούν 550 θέσεις νιτροζυλίωσης.

2.7 Ανάλυση του Δείκτη Υδροφοβικότητας των S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών

Η ανάλυση του δείκτη υδροφοβικότητας των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας EXPASY ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>), η οποία προσφέρει εργαλεία για την υπολογιστική ανάλυση χαρακτηριστικών των πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Στην αρχική σελίδα της εφαρμογής (Εικόνα 13Α), εισήχθη είτε το UniProt ID της κάθε πρωτεΐνης είτε η πλήρης αμινοξική αλληλουχία της, η οποία ελήφθη από τη βάση δεδομένων UniProt.

Από τις διαθέσιμες επιλογές στην πλατφόρμα EXPASY, επιλέχθηκε η κλίμακα "Hydropathy index/ Kyte & Doolittle" (Εικόνα 14Β), η οποία υπολογίζει την υδροφοβικότητα και επιτρέπει την ανίχνευση των περιοχών της αλληλουχίας που εμφανίζουν χαρακτηριστικά υδρόφοβης συμπεριφοράς. Στη συνέχεια, με την υποβολή της αναζήτησης, η πλατφόρμα μεταφέρει τον χρήστη σε ένα περιβάλλον ανάλυσης όπου υπάρχει η δυνατότητα να επιλέξει συγκεκριμένα τμήματα της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (Εικόνα 14C), βάσει των αμινοξικών καταλοίπων του ενδιαφέροντος, στην προκειμένη περίπτωση των καταλοίπων κυστεΐνης (Cys).

Αφού επιλέχθηκε το κατάλληλο εύρος αμινοξικών καταλοίπων που περιλάμβανε το αμινοξύ Cys, επιλέχθηκε η επιλογή «Αριθμητική μορφή (λεπτομερής)» (Numerical format - verbose) (Εικόνα 14D), η οποία παρέχει τις τιμές του δείκτη υδροφοβικότητας για κάθε αμινοξύ της αλληλουχίας (Εικόνα 14E). Η ανάλυση αυτή αποτυπώνει την τιμή του δείκτη υδροφοβικότητας για κάθε αμινοξύ, η οποία κυμαίνεται από -2 έως +2. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου είχε ως στόχο να αποκαλύψει την υδροφοβικότητα των τροποποιημένων και μη κυστεϊνικών καταλοίπων των 145 μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.



Εικόνα 14: Υπολογισμός υδροφοβικότητας με χρήση ExPASy -ProtScale. (a) Αρχική σελίδα, (b) Εργαλεία ανάλυσης φυσικοχημικών ιδιοτήτων αμινοξέων, (c) Αποτελέσματα ανάλυσης συγκεκριμένης πρωτεΐνης, (d) Διάγραμμα υδροφοβικότητας με βάση την κλίμακα Kyte/Doolittle, για την πρωτεΐνη 2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1, (e) Αποτελέσματα με μορφή πίνακα, παρουσιάζονται με αλφαβητική σειρά. Επιλέγεται η εντολή “numerical format verbose” που εμφανίζεται κάτω από το διάγραμμα του πάνελ (d).

2.8 Υπολογισμός του pKa

Για τον υπολογισμό του pKa έγινε χρήση της ηλεκτρονικής έκδοσης του PropKa 2.0, ενός λογισμικού το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ισοηλεκτρικού σημείου των αμινοξέων [63]. Τα φαινόμενα αποδιάταξης και οι αλληλεπιδράσεις εντός της πρωτεΐνης, οι οποίες προκαλούν διακυμάνσεις στις τιμές pKa των ιοντιζόμενων πρωτεϊνικών ομάδων καθώς και η θέση και η χημική φύση των διαφορετικών ομάδων επηρεάζουν την τιμή pKa. Ο αλγόριθμος PROPKA υπολογίζει αυτόματα την τιμή pKa με βάση αυτές τις εμπειρικές σχέσεις. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο αλγόριθμος υπολογίζει και ασυνήθιστες τιμές pKa που συνδέονται με κατάλοιπα στο εσωτερικό των πρωτεϊνών [63].

Βασική προϋπόθεση για τον υπολογισμό του pKa με χρήση του PROPKA είναι η ύπαρξη κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης. Τα αντίστοιχα αρχεία, τα οποία ονομάζονται PDB-IDs αντλούνται από την Protein Data Base (<https://www.rcsb.org/>) (Εικόνα 15A).

Στην αρχική οθόνη του λογισμικού εκχωρείται το PDB ID, εναλλακτικά προστίθεται η αλληλουχία της πρωτεΐνης σε μορφή FASTA (Εικόνα 15B). Στη συνέχεια πατώντας το κουμπί Run PropKa ο αλγόριθμος εκτελεί τους υπολογισμούς και αναδύεται το παράθυρο των αποτελεσμάτων, στο οποίο παρουσιάζονται με αλφαβητική σειρά τα αμινοξέα και η τιμή pKa που αντιστοιχεί σε καθένα από αυτά (Εικόνα 15C).

RESIDUE	pKa	pKaRef1
ASP 26A	4.13	3.80
ASP 31A	1.40	3.80
ASP 52A	4.08	3.80
ASP 65A	2.42	3.80
ASP 141A	3.56	3.80
ASP 146A	-9.93	3.80
ASP 156A	6.74	3.80
ASP 198A	3.36	3.80
ASP 205A	2.79	3.80
ASP 281A	3.80	3.80
ASP 283B	6.02	3.80
ASP 282A	4.01	3.80
ASP 255A	3.99	3.80
ASP 286A	2.31	3.80
ASP 288A	3.21	3.80
ASP 283A	2.67	3.80
ASP 115A	2.22	3.80
ASP 252A	2.46	3.80
ASP 337A	2.33	3.80
ASP 209	4.08	3.80
ASP 319	9.18	3.80
ASP 520	3.38	3.80
ASP 608	2.47	3.80
ASP 1410	3.58	3.80
ASP 1480	-9.43	3.80
ASP 1540	6.57	3.80
ASP 1880	3.32	3.80
ASP 1850	2.72	3.80
ASP 2810	3.80	3.80

Εικόνα 15: Υπολογισμός pKa με χρήση του αλγόριθμου PROPKA. (a) Αρχική σελίδα βάσης δεδομένων αρχείων PDB για εύρεση της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης, (b) Αρχική οθόνη PropKa, στο γαλάζιο πεδίο επικολλείται το PDB ID ή η γραμμική αλληλουχία της πρωτεΐνης σε μορφή FASTA, (c) Πίνακας που παρουσιάζει τις τιμές pKa των αμινοξέων με χρήση του αλγόριθμου

2.9 Ανάλυση της Σχετικής Προσβασιμότητας Αμινοξικών Καταλοίπων στον Διαλύτη

Για τη μελέτη της σχετικής προσβασιμότητας των κυστεϊνικών καταλοίπων στο διαλύτη έγινε χρήση του αλγόριθμου E-pRSA [64]. Ο αλγόριθμος προβλέπει τη σχετική προσβασιμότητα των καταλοίπων μιας πρωτεΐνης στο διαλύτη χωρίς να απαιτείται προηγούμενη γνώση της τρισδιάστατης δομής. Η αλληλουχία-στόχος επεξεργάζεται πρώτα από δύο διαφορετικά και συμπληρωματικά Μοντέλα Πρωτεϊνικής Γλώσσας (Protein Language Models, PLM), για να παραχθεί ένα σύνολο 2304 χαρακτηριστικών για κάθε κατάλοιπο. Στη συνέχεια, ο αλγόριθμος επεξεργάζεται κάθε κατάλοιπο ως μέρος ενός παράθυρου 31 αμινοξέων. Το εξαγόμενο αποτελείται από μία μόνο τιμή μεταξύ 0 και 1, που αντιπροσωπεύει το υποτιθέμενο RSA του υπολείμματος. Επίσης, υιοθετείται ένα κατώφλι 20% για τη διάκριση των υπολειμμάτων σε απομακρυσμένα (Buried) και σε εκτεθειμένα (Exposed). Ο αλγόριθμος αναπτύχθηκε από την ομάδα Βιοπληροφορικής του Πανεπιστημίου της Μπολόνια ([Biocomputing Group - University of Bologna](#)).

Για την ανάλυση, η αλληλουχία της πρωτεΐνης εισάγεται στο αντίστοιχο πεδίο σε μορφή FASTA (Εικόνα 16A). Με την υποβολή της αμινοξικής αλληλουχίας οδηγείται κανείς στην σελίδα αναμονής των αποτελεσμάτων (Εικόνα 16B) έως ότου ολοκληρωθεί η ανάλυση και τα αποτελέσματα εμφανιστούν στην επόμενη αναδυόμενη σελίδα (Εικόνα 16C). Στη σελίδα αυτή επιλέγεται η μορφή παρουσίασης των τιμών του δείκτη RSA για κάθε αμινοξύ (Εικόνα 16D).

A

Please, paste input FASTA sequence (only 1, min 50 residues, max 5000) in the area below:

Load example FASTA

```
>sp|Q8BWT1|THIM_MOUSE 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acaa2 PE=1 SV=3
MALLRGVFIVAAKRTPEFAYGGLLKDFSATDLTEFAARAALSAGKVPPEIDSVVGNVM
QSSSDAAYLARHVGRLRVGVPETGALTINRLCGSGFOSIVSGCOEICKDAFVVLGGTF
SMSQSPYCVRNVRFGTKFGLDLKLEDTLWAGLTQHVKLPMGMTAENLAAYNISREDCD
RYALQSQQRWKAANEAGYFNEEMAPIEVKTKKGKQTMQVDEHARPQTTLEQLKPLPSVFK
KDGTVTAGNASGVSDGAGAVIASEDAVKKHNETPLARVVGYFVSGCDPTIMGIGPVPAI
NGALKKAGLSLKDMDLIDVNEAFAPQFLSVQKALDLPSTNVSGGAIALGHPLGGSGSR
ITAHLVHELRRRGKYAVGSACIGGGQGIALIQNTA|
```

Sequence is valid!

Alternatively, select and upload a FASTA file :

Περιήγηση... Δεν επιλέχθηκε αρχείο.

Submit

B

E-pRSA

Embeddings improve the prediction of residue Relative Solvent Accessibility in protein sequence.
Part of the [Bioinformatics Sweeties](#) collection.

Job successfully submitted

Submission date: 18/02/2025, 13:03:48, UTC

Your job is currently **queued**.

Please bookmark this page or save your Job ID. You can use it from the [Results](#) page to search your job and be redirected here.
This page automatically refreshes **every 10 seconds**. As soon as the predictions are ready you will be able to see the results instead of this message.

Job ID: **6db6249e-3197-4121-a6eb-f5d4c23116ea** [Copy](#)

C

Visualize Results

Job ID:	6db6249e-3197-4121-a6eb-f5d4c23116ea
Submitted on date:	18/02/2025, 13:03:48, UTC
Completed on date:	18/02/2025, 14:54:38, UTC
Protein ID:	sp Q8BWT1 THIM_MOUSE
Protein Length:	397 residues
Exposed / Buried:	177 (44.58%) / 220 (55.42%)
Interaction Sites:	80 (22.67%)

Sequence feature view

Legend:

Exposure track: ■ Exposed (RSA > 20%) ■ Buried (RSA < 20%)

Interaction Sites track: ■ Interaction Site

[Reset query](#) [Export as CSV](#) [Export as TSV](#) [Download](#) [Save image](#)

D

Showing 1 to 25 of 397 entries

Previous [1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) ... [16](#) Next [Download TSV](#)

Filters Active - 0 [Clear All](#)

Residue

Position	Residue	Putative RSA	Exposure (binary)	Interaction Sites
1	M	0.52	Exposed	N
2	A	0.51	Exposed	N
3	L	0.54	Exposed	N
4	L	0.36	Exposed	IS
5	R	0.42	Exposed	IS
6	G	0.13	Buried	N

Alanine (A) 45
Arginine (R) 17
Asparagine (N) 13
Aspartic Acid (D) 20
Cysteine (C) 8
Glutamic Acid (E) 18
Glutamine (Q) 17

Εικόνα 16: Υπολογισμός σχετικής προσβασιμότητας στο διαλύτη (Relative Solvent Exposure) με χρήση του αλγόριθμου E-pRSA. (a) Αρχική σελίδα όπου πραγματοποιείται η εισαγωγή της αλληλουχίας της πρωτεΐνης σε μορφή FASTA, (b) Σελίδα ενημέρωσης χρήστη για την πορεία της ανάλυσης, (c) Σελίδα ενημέρωσης χρήστη για την επιτυχή ολοκλήρωση της ανάλυσης, (d) Εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε μορφή πίνακα.

2.10 Ανάλυση δευτεροταγούς δομής

Για την ανάλυση στοιχείων δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Alpha fold (Alpha Fold Protein Structure Database). Προσδιορίστηκε η παρουσία 538 τροποποιημένων και 559 μη τροποποιημένων κυστεϊνών σε διαφορετικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Η ανάλυση γίνεται για κάθε μια πρωτεΐνη ξεχωριστά. Στην αρχική σελίδα αντιγράφεται το Uniprot ID τη πρωτεΐνης (Εικόνα 17Α). Στην σελίδα που ανοίγει, γίνεται πλοήγηση στη λίστα πρωτεϊνών που εμφανίζονται και επιλέγεται η κατάλληλη (Εικόνα 17Β). Ακολουθεί ανακατεύθυνση στην σελίδα των πληροφοριών για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη (Εικόνα 17C). Στην σελίδα υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την πρωτεΐνη, προβάλλεται η δομή της, μέσω της οποίας Προσδιορίζεται η θέση συγκεκριμένων κυστεϊνών σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής (Εικόνα 17C).

The image displays the AlphaFold Protein Structure Database interface, divided into three main sections labeled A, B, and C.

Section A: The main header of the AlphaFold Protein Structure Database, developed by Google DeepMind and EMBL-EBI. It features a search bar with the input "Q8QZS1" and a "Search" button. Below the search bar, there are examples of protein sequences and a link to "See our updates - September 2024".

Section B: The search results page for "Q8QZS1". It shows "Showing all search results for Q8QZS1" and "1 - 1 of 1 results". The results are filtered by "3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial" (AF-Q8QZS1-F1-v4). The status is "Protein", the gene is "Hbbh", the source is "Mus musculus", and the organism is "Mus musculus". The reference proteome is "Q8QZS1" (go to UniProt). The average pLDDT is "92.24 (Very High)" and the sequence length is "387".

Section C: The "Structure viewer" for the protein "AF-Q8QZS1-F1". It shows the sequence of the protein and a 3D structure visualization. The structure is a blue ribbon model. The "Structure Tools" panel on the right includes options for "Structure" (AF-Q8QZS1-F1), "Type" (Model), "Nothing Focused", "Quick Styles" (Default, Illustrative, Stylize Current), and "Components" (AF-Q8QZS1-F1, Preset, + Add, Polymer, Cartoon).

Εικόνα 17: Κατανομή κυστεϊνών σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής με χρήση AlphaFold. (α) Οθόνη υποδοχής χρήστη, (β) Πρωτεΐνη που συνδέεται με το Uniprot ID που εισάγει ο χρήστης στην προηγούμενη οθόνη, (γ) Δεδομένα που υπάρχουν στο AlphaFold για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη

2.11 Γραμμικά μοτίβα

Για την εύρεση γραμμικών μοτίβων, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος RoLiM, στην διεύθυνση <http://langelab.org/rolim/> [65]. Κατά την είσοδό στην αρχική σελίδα του RoLiM (Εικόνα 18Α), συμπληρώνονται τα πεδία email, Title, Description (Εικόνα 18Β) κι εν συνεχεία επιλέγεται το αρχείο με τα πειραματικά δεδομένα που θα μεταφορτωθεί (Select foreground data file to upload). Μεταφορτώθηκε ένα text file το οποίο περιελάμβανε τις αλληλουχίες των πεπτιδίων που περιείχαν τις τροποποιημένες κυστεΐνες και τα Protein Accession Number των αντίστοιχων πρωτεϊνών (Παράθεμα Β). Στο πεδίο Select foreground data set format επιλέχθηκε το Text file peptide list και στο Select context data set format επιλέχθηκε το Other (uploaded FASTA file) (Εικόνα 18C). Στο Select context FASTA file to upload (Optional) μεταφορτώθηκε το πρωτόμα του ποντικού, το οποίο ελήφθη από τη Βάση Δεδομένων Uniprot. Το επιθυμητό πλάτος της ακολουθίας (Enter desired width of expanded sequences) ορίστηκε 15. Στο Advanced Options πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες ρυθμίσεις: στο Select sequence extension direction επιλέχθηκε το Both (Εικόνα 18D), το P-value threshold ορίστηκε η τιμή 0,0001, το Minimum occurrences 20, στο Select sequence redundancy elimination level επιλέγεται το “none” και τέλος στο Select level at which to merge multiple peptide alignments καθορίστηκε η ένδειξη All.

A

The Lange Lab - for Translational Proteomics in Childhood

RoLiM
Robust detection of linear motifs in sequence data.

*Browser compatibility notice: RoLiM works best when used with Firefox, Chrome, or Internet Explorer.

Description

RoLiM iteratively detects over-represented linear motifs in sequence data sets.

Citing RoLiM

Please visit our [main lab website](#) for more information about citing RoLiM.

RoLiMviz

For enhanced, interactive visualization and analysis capabilities, please visit [RoLiMviz here](#).

B

Submit a new job for analysis.

Email

Title (20 characters max.)

Description

Select foreground data file to upload.

C

Select foreground data set format.

☐ Prealigned text file ([Example](#))

☐ Text file peptide list ([Example](#))

Select context data set format.

☒ Swiss-Prot Human

☐ Other (uploaded FASTA file)

Select context FASTA file to upload. (Optional)

Enter desired width of expanded sequences. (MEROPS co

D

Advanced options ▼

☐ Center sequence position numbers?

☒ Detect compound residue groups?

☒ Enable compound residue decomposition?

Select custom compound residue file to upload.

 [Example](#)

E

P-value threshold.

Minimum occurrences

☒ Only use first protein identifier provided for each peptide?

Select sequence redundancy elimination level.

☒ None

☐ Protein

☐ Sequence

Select level at which to merge multiple peptide alignments.

☐ None

☐ Protein

☒ All

☒ Enable hierarchical clustering of sequences and motifs?

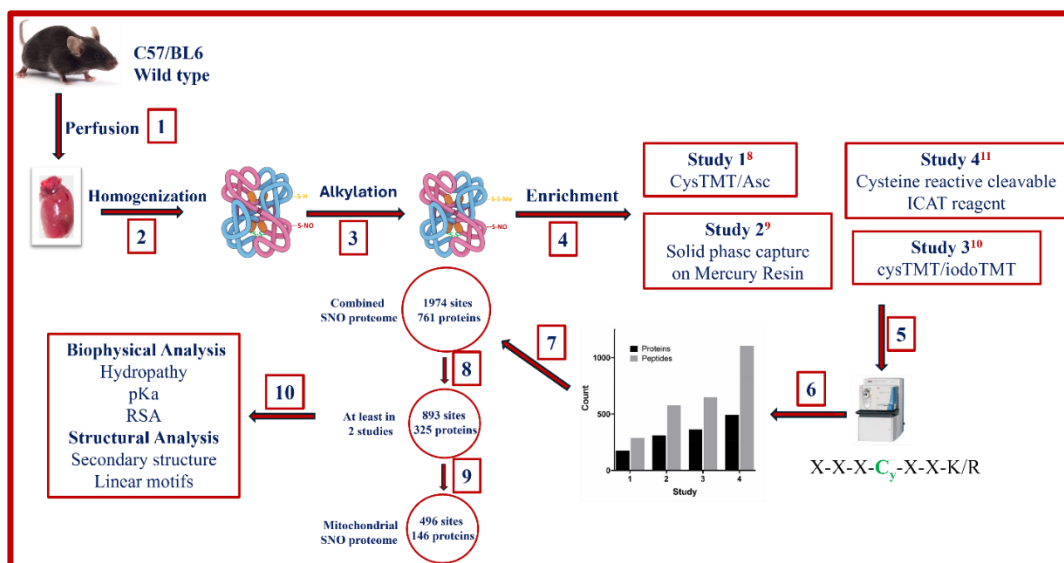
Εικόνα 18: Ανάλυση νιτροζυλιωμένων πεπτιδίων με τον αλγόριθμο RoLiM για εύρεση πιθανών γραμμικών αλληλουχιών. (α) Σελίδα υποδοχής χρήστη, (β) Προσθήκη στοιχείων επικοινωνίας και μεταφόρτωση αρχείου πειραματικών δεδομένων, (γ) Βασικές ρυθμίσεις που αφορούν το αρχείο πειραματικών δεδομένων (δ) Προχωρημένες ρυθμίσεις, (ε) επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηριστικά της παρούσας μελέτης

Στην εικόνα 19 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η πειραματική πορεία στην οποία βασίστηκε η παρούσα μελέτη. Τα βήματα 1-6 αφορούν προηγούμενες μελέτες πρωτεομικής από τις οποίες αντλήθηκαν πειραματικά δεδομένα, τα οποία στα πλαίσια της παρούσας μελέτης (βήματα 7-11) συλλέχθηκαν, ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ως προς τις βιοφυσικές και δομικές ιδιότητες τους.

Συνοπτικά, ο καρδιακός μυς απομονώνεται από ποντίκια αγρίου τύπου και ομογενοποιείται (βήματα 1-2). Στη συνέχεια, αλκυλιώνονται οι ανηγμένες κυστεΐνες (βήμα 3). Ακολουθεί χημικός εμπλουτισμός νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων (βήμα 4) και η ταυτοποίηση πρωτεϊνών και θέσεων νιτροζυλίωσης με δίδυμη φασματομετρία μάζας (βήματα 5-6). Τα τέσσερα πρωτεώματα συνδυάζονται προσμετρώντας μια φορά τις θέσεις νιτροζυλίωσης και τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που ταυτοποιούνται σε περισσότερες της μιας μελέτης. Έτσι, προκύπτει το ολικό νιτροσοπρωτέωμα αποτελούμενο από 1974 θέσεις νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 761 πρωτεΐνες (βήμα 7). Για τη συνέχεια της μελέτης επιλέγονται οι θέσεις νιτροζυλίωσης που ταυτοποιήθηκαν σε τουλάχιστον δύο πρωτεομικές μελέτες προκειμένου να μειωθεί όσο το δυνατόν το πειραματικό bias που συνδέεται με τις επιμέρους αντιδράσεις χημικού εμπλουτισμού. Έτσι, προκύπτει ένα μικρότερο νιτροσοπρωτέωμα που αποτελείται από 893 θέσεις νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 325 πρωτεΐνες (βήμα 8). Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες οπότε το πρωτέωμα που προέκυψε κατά το βήμα 8 αναλύθηκε σχετικά με τον ενδοκυττάριο εντοπισμό των πρωτεϊνών. Προέκυψε λοιπόν το μιτοχονδριακό νιτροσοπρωτέωμα που αποτελείται από 550 θέσεις νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 146 πρωτεΐνες. Οι κυστεΐνες αυτές αναλύθηκαν στη συνέχεια σχετικά με την υδροφοβικότητα, το pKa και την έκθεση στο διαλύτη και συγκρίθηκαν με τις μη τροποποιημένες κυστεΐνες που ανήκουν στις ίδιες πρωτεΐνες. Επίσης, εξετάστηκε η κατανομή των νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών σε δευτεροταγείς δομές, καθώς και η ύπαρξη γραμμικών αλληλουχιών γύρω από τις τροποποιημένες κυστεΐνες.



Εικόνα 19: Διαγραμματική αναπαράσταση της παρούσας μελέτης (βήματα 7-10) η οποία αποτελεί meta-analysis τεσσάρων ανεξάρτητων δημοσιευμένων μελετών πρωτεωμικής που ταυτοποίησαν θέσεις ενδογενούς S-Νιτροζυλίωσης στον καρδιακό μυ (βήματα 1-6).

3.2 Δείκτης υδροφοβικότητας (Hydropathy Index)

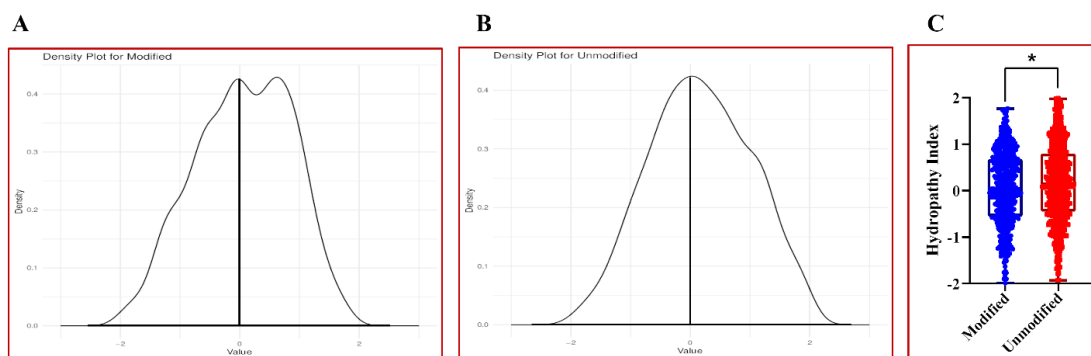
Η διερεύνηση των βιοφυσικών χαρακτηριστικών των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνικών καταλοίπων ξεκίνησε με τον υπολογισμό του δείκτη υδροφοβικότητας τους και τη σύγκριση με τον αντίστοιχο δείκτη των καταλοίπων κυστεΐνης που ανήκουν στις ίδιες πρωτεΐνες αλλά δεν είναι τροποποιημένες. Η κλίμακα Kyte-Doolittle υπολογίζει την υδροφοβικότητα συγκεκριμένων αμινοξέων μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας ένα «παράθυρο» 13 αμινοξικών καταλοίπων (έξι αριστερά και έξι δεξιά) και αποδίδει μια τιμή μεταξύ -2 και 2. Αρνητικές τιμές του δείκτη υδροφοβικότητας αντιστοιχούν σε υδρόφιλα αμινοξέα ενώ οι θετικές σε υδρόφοβα. Η συγκεκριμένη κλίμακα αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα εργαλεία για την ανίχνευση υδρόφοβων περιοχών σε πρωτεϊνικές αλληλουχίες, επιτρέποντας τον διαχωρισμό των περιοχών που εκτίθενται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών από τις διαμεμβρανικές περιοχές. Συνολικά, για τον υπολογισμό της μέσης τιμής υδροφοβικότητας χρησιμοποιήθηκαν 542 S-νιτροσυλιωμένα και 546 μη νιτροζυλιωμένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Τιμές που ήταν μικρότερες του -2 ή μεγαλύτερες του 2 απορρίφθηκαν. Ο πίνακας 1 παρουσιάζει τον αριθμό, και τα αντίστοιχα ποσοστά,

των υδρόφοβων και υδρόφιλων καταλοίπων κυστεΐνης για τις δύο ομάδες. Σε ότι αφορά την ομάδα των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών, παρατηρείται μικρότερος αριθμός υδρόφοβων σε σχέση με τα υδρόφιλα κατάλοιπα. Αντίθετα, τα περισσότερα μη τροποποιημένα κατάλοιπα είναι υδρόφοβα και μικρότερος αριθμός υδρόφιλα. Οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες λαμβάνουν τιμές υδροφοβικότητας με εύρος -1,989 έως 1,767 ενώ το αντίστοιχο εύρος της ομάδας των μη τροποποιημένων κυστεϊνών είναι -1,933 έως 1,989. Και οι δύο ομάδες παρουσιάζουν κανονική κατανομή όπως υποδεικνύουν τα Kernel density plots της εικόνας 20 Α και 20 Β. Παρατηρώντας την κατανομή των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών υπάρχει δεύτερη κορυφή για τιμή υδροφοβικότητας μεταξύ 0,7 και 0,8. Μια προσεκτικότερη εξέταση των τιμών των δύο ομάδων δείχνει ότι 93 τροποποιημένες κυστεΐνες εμφανίζουν δείκτη υδροφοβικότητας μεταξύ 0,6-0,9 έναντι 40 των μη τροποποιημένων.

Τροποποιημένα κατάλοιπα Κυστεϊνών		Μη τροποποιημένα κατάλοιπα κυστεϊνών	
Υδρόφοβα	250 (46%)	Υδρόφοβα	306 (56%)
Υδρόφιλα	287 (53%)	Υδρόφιλα	238 (44%)

Πίνακας 1 : Αποτελέσματα σύγκρισης κυστεϊνικών καταλοίπων ως προς τον δείκτη υδροφοβικότητας κατά Kyte & Doolittle .

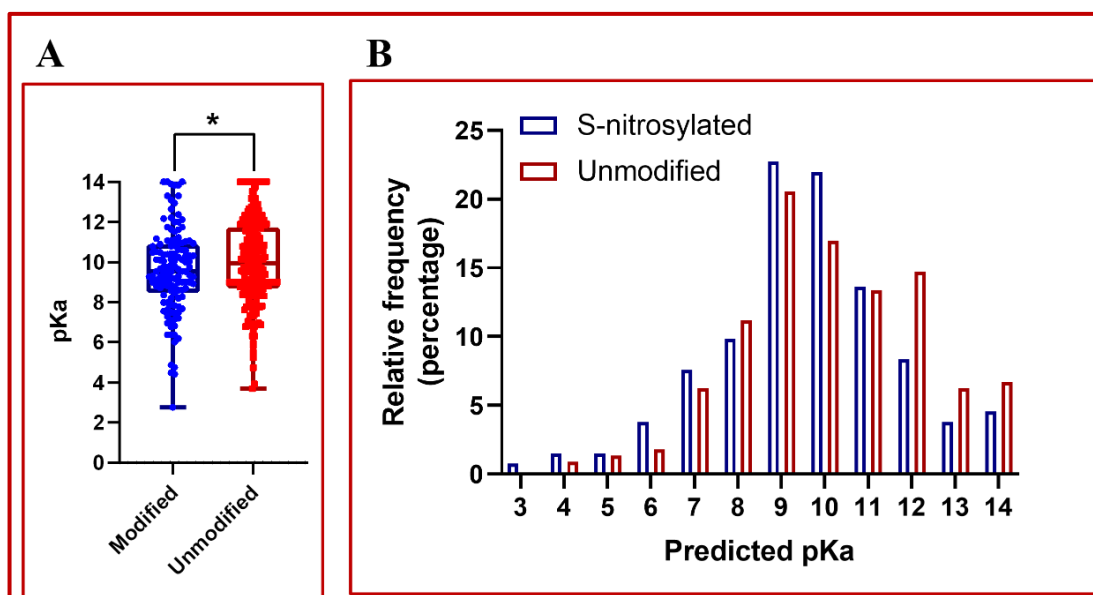
Συγκρίνοντας τη μέση τιμή των δύο ομάδων παρατηρείται ότι η ομάδα των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών εμφανίζει στατιστικά σημαντικά μικρότερη μέση τιμή υδροφοβικότητας σε σχέση με την ομάδα των μη τροποποιημένων κυστεϊνών ($0,06 \pm 0,034$ έναντι $0,17 \pm 0,036$. $p = 0.02$) (εικόνα 20Γ) γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών σε σχετικά υδρόφιλες περιοχές των πρωτεϊνών συγκριτικά με τις μη τροποποιημένες.



Εικόνα 20. Δείκτης Υδροφοβικότητας κατά Kyte-Doolittle. (a-b) Kernel density plots των καταλοίπων S-νιτροσοκυστεΐνης (αριστερά) και των μη τροποποιημένων κυστεϊνών (δεξιά). (C) Whisker box plot των τιμών υδροφοβικότητας των S-νιτροζυλιωμένων και μη τροποποιημένων κυστεϊνών. * $p = 0.027$

3.3 Ισοηλεκτρικό σημείο, pKa

Η επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν το ισοηλεκτρικό σημείο των κυστεϊνικών καταλοίπων. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο Propka 2.0 όπως περιγράφεται λεπτομερώς στο τμήμα 2.8. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί αρχεία σε μορφή PDB γεγονός που περιορίζει τον αριθμό των κυστεϊνικών καταλοίπων που αναλύονται. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις ο αλγόριθμος επιστρέφει τιμές ακραίες διότι το αρχείο PDB είναι ασυνεχές ή χαμηλής ευκρίνειας. Οι τιμές αυτές δεν ελήφθησαν υπόψιν στην ανάλυση. Τιμές μεγαλύτερες του 14 ορίστηκαν ίσες με 14. Συνολικά, αναλύθηκαν 366 κατάλοιπα κυστεΐνης, 142 S-νιτροζυλιωμένα και 224 μη τροποποιημένα. Η ομάδα των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών παρουσιάζει σημαντικά μικρότερη τιμή pKa σε σύγκριση με την ομάδα των μη τροποποιημένων κυστεϊνών (9.59 ± 0.183 VS 10.04 ± 0.14 , $p = 0.046$, Εικόνα 21A). Στην εικόνα 21B παρουσιάζεται η σχετική συχνότητα (ποσοστό επί τοις εκατό) των τιμών pKa των S-νιτροζυλιωμένων και των μη τροποποιημένων κυστεϊνικών καταλοίπων. Αυξημένο ποσοστό S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών εμφανίζουν τιμές pKa μικρότερες ή ίσες του 8, που αποτελεί το ισοηλεκτρικό σημείο της πλευρικής ομάδας της κυστεΐνης, σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό των μη τροποποιημένων κυστεϊνών (24.2% έναντι 21.5%). Επιπλέον, υψηλότερο ποσοστό S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών παρουσιάζει τιμές pKa μεταξύ 9-10. Τέλος, το ποσοστό των μη τροποποιημένων κυστεϊνών εμφανίζεται αυξημένο για τιμές pKa υψηλότερες του 11.



Εικόνα 21: Ανάλυση τιμών pKa. (a) Box plot τιμών pKa των S-νιτροζυλιωμένων και μη τροποποιημένων κυστεϊνικών καταλοίπων, (b) Κατανομή των S-νιτροζυλιωμένων και μη τροποποιημένων κυστεϊνών σε συνάρτηση με το pKa, (* $p = 0.0486$)

Τα ευρήματα της ενότητας αυτής υποδηλώνουν ότι σε ουδέτερο pH η πλειοψηφία των κυστεϊνών και των δύο ομάδων βρίσκεται στην πρωτονιωμένη της μορφή. Επομένως, η τιμή pKa δεν φαίνεται να αποτελεί κριτήριο για το αν μια κυστεΐνη υφίσταται S-Νιτροζυλίωση.

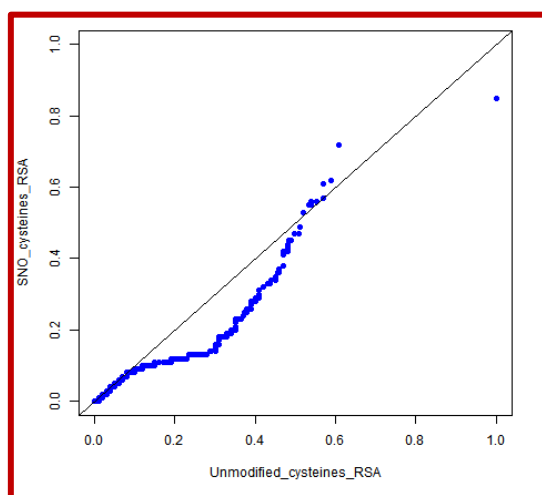
3.4 Σχετική προσβασιμότητα των κυστεϊνικών καταλοίπων στο διαλύτη

Η σχετική προσβασιμότητα στον διαλύτη (Relative Solvent Exposure, RSA) αποτελεί ένα δείκτη κατά πόσο ένα συγκεκριμένο αμινοξύ βρίσκεται εκτεθειμένο ή απομακρυσμένο από τον διαλύτη ή «θαμμένο στο εσωτερικό της πρωτεΐνης» στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος E-pRSA που αναπτύχθηκε από το Bologna Biocomputing Group (<https://e-prsa.biocomp.unibo.it/main/>). Ο αλγόριθμος προσδιορίζει τον RSA χωρίς να απαιτείται η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης και κάθε κυστεΐνη λαμβάνει μία τιμή μεταξύ 0 και 1. Συνολικά, υπολογίστηκαν τιμές RSA για 1089 κυστεϊνικά κατάλοιπα, 504 S-νιτροζυλιωμένα και 585 μη τροποποιημένα αντίστοιχα. Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει την κατανομή των κυστεϊνικών καταλοίπων των δύο ομάδων σε εκτεθειμένες (exposed) και απομακρυσμένες από τον διαλύτη (buried).

S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες		Μη τροποποιημένες κυστεΐνες	
Εκτεθειμένες (Exposed)	95	Εκτεθειμένες Cys(Exposed)	228
Απομακρυσμένες (Buried)	409	Απομακρυσμένες (Buried)	357

Πίνακας 2: Κατανομή κυστεϊνικών καταλοίπων σε εκτεθειμένες (exposed) και απομακρυσμένες (buried) από το διαλύτη.

Για καλύτερη σύγκριση των δύο ομάδων, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε quantile-quantile (Q-Q) plot με τις τιμές RSA των τροποποιημένων κυστεϊνών (SNO-cysteines) στον κάθετο άξονα και τις αντίστοιχες τιμές των μη τροποποιημένων κυστεϊνών (Unmodified cysteines) στον οριζόντιο άξονα. Παρατηρείται ότι η καμπύλη αποκλίνει από την ευθεία που υποδηλώνει ότι οι δύο ομάδες διαφέρουν ως προς την έκθεση στον διαλύτη. Το γεγονός ότι η καμπύλη στρέφεται προς τις μη τροποποιημένες κυστεΐνες υποδηλώνει ότι τα κατάλοιπα της ομάδας αυτής βρίσκονται σε περιοχές των πρωτεϊνών που είναι περισσότερο εκτεθειμένες στον διαλύτη σε σχέση με τις αντίστοιχες περιοχές στις οποίες εδράζονται οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες.



Εικόνα 22: Κατανομή S-νιτροζυλιωμένων και μη τροποποιημένων κυστεϊνών σε σχέση με την τιμή RSA.

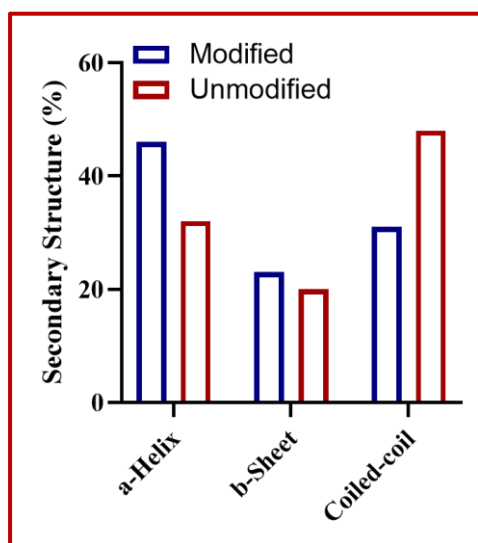
3.5 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής

Στην συνέχεια, εξετάστηκε η κατανομή των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών σε διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη κατανομή των μη τροποποιημένων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση της βάσης δεδομένων AlphaFold ([AlphaFold Protein Structure Database](#)). Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει τον αριθμό και τα αντίστοιχα ποσοστά των τροποποιημένων και μη τροποποιημένων κυστεϊνών όπως αυτά κατανέμονται ανά τύπο δευτεροταγούς δομής. Η παρουσία των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών και στους τρεις τύπους δευτεροταγούς δομής υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών που οδηγούν σε S-νιτροζύλιωση *in vivo*.

S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες		Μη τροποποιημένες κυστεΐνες	
α-έλικα	240 (46%)	α-έλικα	175 (31%)
β-φύλλο	123 (23%)	β-φύλλο	116 (22%)
Τυχαίο σπείραμα	175 (31%)	Τυχαίο σπείραμα	268 (48%)

Πίνακας 3: Κατανομή S-νιτροζυλιωμένων και μη κυστεϊνικών καταλοίπων σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

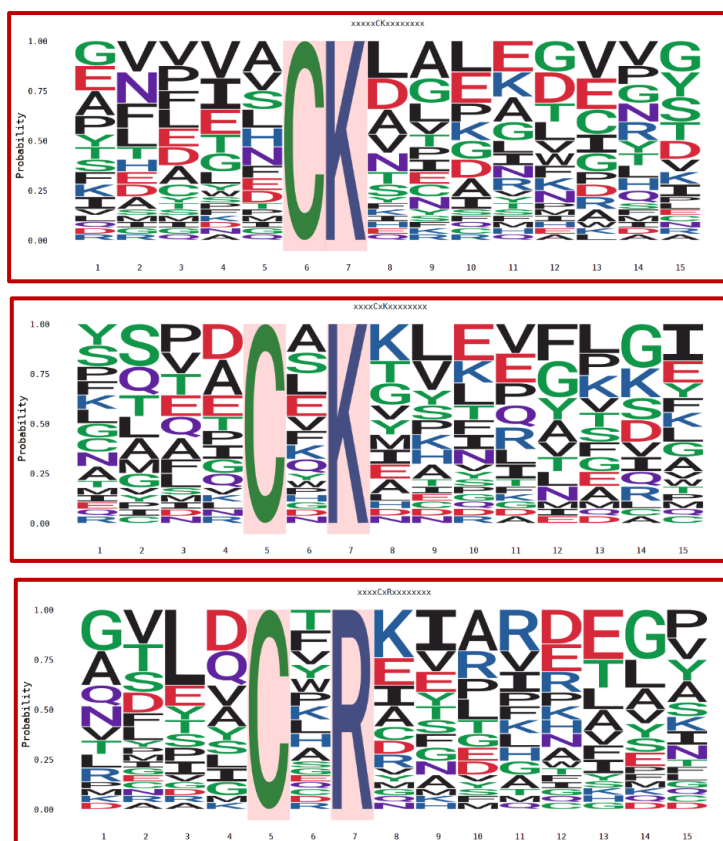
Η εικόνα 23 παρουσιάζει το ποσοστό των καταλοίπων S-νιτροσοκυστεΐνης ($n = 538$, μπλε ράβδοι) και μη τροποποιημένων καταλοίπων κυστεΐνης ($n = 559$, κόκκινες ράβδοι) των ίδιων πρωτεϊνών σε διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής. Παρατηρήθηκε ότι οι S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες υπερπαρουσιάζονται σε α-έλικες και υποπαρουσιάζονται σε τυχαία σπειράματα (coiled coils) σε σύγκριση με τις μη τροποποιημένες (χ^2 -test, $p = 0,0356$).



Εικόνα 23: Κατανομή τροποποιημένων και μη κυστεϊνικών καταλοίπων σε διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής.

3.6 Εύρεση γραμμικών μοτίβων

Για την εύρεση γραμμικών μοτίβων χρησιμοποιήθηκε ο online αλγόριθμος RoLiM. Ο αλγόριθμος υπολογίζει τη συχνότητα με την οποία συγκεκριμένα αμινοξέα απαντώνται στην αλληλουχία των πεπτιδίων που περιέχουν τις S-Νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες και την αντιπαραβάλλει με τη συχνότητα που τα αμινοξέα αυτά εμφανίζονται στο πρωτέωμα. Στη συνέχεια, σχηματίζει γραμμικά μοτίβα στα οποία το μέγεθος των αμινοξέων είναι αντιπροσωπευτικό της συχνότητας εμφάνισης τους στην συγκεκριμένη θέση του μοτίβου (Εικόνα 24). Θέτοντας αυστηρά κριτήρια κατά την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων προέκυψαν συνολικά 7 γραμμικά μοτίβα. Από αυτά, τα τρία με το υψηλότερο σκορ παρουσιάζονται στην Εικόνα 34. Παρατηρείται η ύπαρξη λυσίνης(K) ή/και αργινίνης(R) αποκλειστικά σε θέσεις +1 και +2 σε σχέση με την κυστεΐνη. Επιπλέον, χαρακτηριστική είναι η παρουσία ασπαρτικού (D) ή και γλουταμίνης (Q) σε θέση -1 σε σχέση με την κυστεΐνη (24B και 24Γ). Η παρουσία όξινων ή βασικών αμινοξέων στην άμεση « γειτονιά» της κυστεΐνης έχει επιβεβαιωθεί σε προηγούμενες μελέτες [55, 56, 66]. Μάλιστα, έχει προταθεί ότι όξινα ή/και βασικά αμινοξέα είναι απαραίτητα για αντιδράσεις μεταφοράς νιτροσομάδας από την κυστεΐνη δότη στην κυστεΐνη δέκτη(διανιτροζυλίωση).



Εικόνα 24: Γραμμικά μοτίβα που πλαισιώνουν τις S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η S-νιτροζυλίωση (ή S-nitrosylation) αποτελεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών, κατά την οποία ένα ισοδύναμο NO προστίθεται στην θειολική ομάδα μιας κυστεΐνης σχηματίζοντας S-νιτροζυλοκυστεΐνη (S-nitrosocysteine).

Ο βιολογικός ρόλος της S-νιτροζυλίωσης σχετίζεται με τη ρύθμιση της λειτουργίας πρωτεϊνών, της ενζυμικής δραστηριότητας και της κυτταρικής σηματοδότησης. Παίζει ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες όπως η αγγειοδιαστολή (μέσω του μονοξειδίου του αζώτου – NO), η ανοσολογική απόκριση, η μεταφορά οξυγόνου (πλέον είναι γενικά αποδεκτό ότι η αιμοσφαιρίνη μπορεί να S-νιτροζυλιωθεί), η ρύθμιση του μεταβολισμού και η παραγωγή ενέργειας. Διαταραχές των επιπέδων της S-Nιτροζυλίωσης σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις όπως νευροεκφυλιστικές νόσοι (π.χ. Alzheimer, Parkinson), καρκίνος, καρδιοπάθειες, διαβήτης, μεταβολικό σύνδρομο.

Παρότι ο βιολογικός ρόλος της S-νιτροζυλίωσης είναι καλά τεκμηριωμένος, οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτή την τροποποίηση δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί. Σε βιολογικά συστήματα το NO παράγεται ενζυμικά από τις τρεις συνθάσες του NO ενώ η αναγωγή ανωτέρων οξειδίων του NO όπως τα νιτρώδη και νιτρικά συμβάλουν στην ομοιόσταση του NO.

Χημικά, το NO είναι ελεύθερη ρίζα, γεγονός που του προσδίδει αυξημένη χημική δραστηριότητα. Παρά τη χημική φύση του, το NO παρουσιάζει εκλεκτική δραστηριότητα γεγονός που συνάγει με τους βιολογικούς ρόλους που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο. Ένα σημαντικό εύρος τιμών σταθερών αντίδρασης έχουν μετρηθεί για τις αντιδράσεις του NO με διαφορετικά μόρια [67]. Για παράδειγμα, η αντίδραση του NO με το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) είναι ταχύτερη με σταθερά αντίδρασης $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ γεγονός που την καθιστά μια από τις ταχύτερες αντιδράσεις που συμβαίνουν σε βιολογικά συστήματα. Από την άλλη πλευρά, η αντίδραση του NO με το O_2 ακολουθεί κινητική τρίτης τάξης και είναι αργή σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις NO. Η αντίδραση του NO με την θειολική ομάδα της κυστεΐνης ακολουθεί κινητική δεύτερης τάξης και εξαρτάται από το ποσοστό της κυστεΐνης που είναι αποπρωτονιωμένη. Σε φυσιολογικό pH, η κυστεΐνη βρίσκεται κυρίως στην πρωτονιωμένη της μορφή, μιας και το pKa της θειολικής ομάδας είναι 8.8, επομένως η ταχύτητα της αντίδρασης είναι εξαιρετικά χαμηλή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός S-νιτροσοκυστεΐνης *in vivo* δεν ευνοείται από την απευθείας αντίδραση του NO και της θειολικής ομάδας.

Τέσσερις κύριοι μηχανισμοί έχουν προταθεί σχετικά με το σχηματισμό S-νιτροσοκυστεΐνης σε βιολογικά συστήματα, οι οποίοι αναλύονται στις ενότητες 1.4-1.5. Η σχετική γνώση προήλθε κυρίως από την ανάλυση πειραματικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας με χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής και δομικής βιολογίας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για την μεγάλη κλίμακας ταυτοποίηση S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και των αντίστοιχων θέσεων S-νιτροζυλίωσης απαιτείται χημικός εμπλουτισμός και στη συνέχεια η χρήση φασματομετρίας μάζας. Για τον παραπάνω λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα εμπλουτισμού που βασίζονται στην χημική εκλεκτικότητα δραστικών ομάδων έναντι των S-νιτροσοθειολών είτε στα παράγωγα τους, κυρίως ανηγμένες θειόλες που προκύπτουν από αναγωγή των S-νιτροσοθειολών με ασκορβικό οξύ. Ένα κοινό μειονέκτημα όλων των πρωτοκόλλων χημικού εμπλουτισμού είναι το μεθοδολογικό bias, δηλαδή, η επιλεκτικότητα που

παρουσιάζει η δραστική ομάδα έναντι συγκεκριμένων κυστεϊνών με αποτέλεσμα στο τελικό πρωτέωμα να υπερπαρουσιάζονται θέσεις S-νιτροζυλίωσης με συγκεκριμένες χημικές και δομικές ιδιότητες.

Η παρούσα μελέτη διαφοροποιήθηκε από προηγούμενες μελέτες ως προς το τελευταίο. Συνδυάζοντας τέσσερις μεγάλης κλίμακας μελέτες που βασίστηκαν σε διαφορετικού τύπου χημικό εμπλουτισμό χρησιμοποίησε ένα πιο αντιπροσωπευτικό S-νιτροζοπρωτέωμα προκειμένου να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν σε S-νιτροζυλίωση *in vivo*. Ξεκινώντας από αρχικό πρωτέωμα 1.974 θέσεων S-νιτροζυλίωσης, κατανεμημένες σε 761 πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκαν αυστηρά κριτήρια ώστε να περιοριστεί η ανάλυση στις πιο αντιπροσωπευτικές από αυτές. Έτσι, ο αριθμός των θέσεων και πρωτεϊνών περιορίστηκε σε 893 και 325 αντίστοιχα.

Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν τον ρόλο της S-νιτροζυλίωσης ως σημαντικό μηχανισμό της κυτταρικής σηματοδότησης, ρυθμιστή της ενεργειακής ομοιόστασης και της βιολογίας των μιτοχονδρίων. Επομένως, παρουσιάζει ενδιαφέρον να μελετηθούν οι μηχανισμοί που διέπουν την S-νιτροζυλίωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό επικεντρωθήκαμε στο μιτοχονδριακό πρωτέωμα που αποτελείται από 550 θέσεις S-νιτροζυλίωσης που ανήκουν σε 146 πρωτεΐνες. Κάνοντας χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής και βάσεων δεδομένων υπολογίστηκαν τιμές και προσδιορίστηκαν βιοφυσικές παράμετροι των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών. Ως ομάδα σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν οι μη S-Νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες που ανήκουν στις ίδιες πρωτεΐνες χωρίς όμως να γνωρίζουμε αν οι κυστεΐνες αυτές υφίστανται κάποια άλλη τροποποίηση.

Το γεγονός ότι οι S-Νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες παρουσιάζουν μειωμένη υδροφοβικότητα σε σχέση με τις μη τροποποιημένες (Εικόνα 20) υποδηλώνει την παρουσία τους σε περιοχές των πρωτεϊνών που εκτίθενται στον διαλύτη ή σε περιοχές των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανομή των S-Νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών (Εικόνα 20Α) όπου διακρίνονται δύο υποπληθυσμοί, ένας με μέση τιμή υδροφοβικότητας περίπου στο “0” και ο δεύτερος με μέση τιμή στο “1”. Το τελευταίο υποδηλώνει ότι μέρος των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών εντοπίζεται σε διαμεμβρανικές περιοχές των πρωτεϊνών. Με βάση τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα φαίνεται ότι η τροποποίηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών μηχανισμών S-νιτροζυλίωσης.

Μια παράμετρος που έχει προταθεί ότι είναι σημαντική για την S-νιτροζυλίωση είναι ο ιοντισμός της θειολικής ομάδας. Η αντίδραση του NO με την θειολική ομάδα δεν πραγματοποιείται όταν αυτή είναι πρωτονιωμένη. Επομένως, προκειμένου να διαχωρίσουμε τις S-νιτροζυλιωμένες από τις μη, προχωρήσαμε στον υπολογισμό της τιμής pKa και για τις δύο ομάδες κυστεϊνών. Αν και παρατηρήθηκε στατιστικά μικρότερη μέση τιμή pKa για τις S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες, η τιμή ήταν 9.58, δηλαδή σε φυσιολογικό pH μια «τυπική» S-νιτροζυλιωμένη κυστεΐνη είναι πρωτονιωμένη. Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην κατανομή των κυστεϊνών (τροποποιημένων και μη) με βάση το pKa και παρατηρήθηκε ότι τιμές pKa μεταξύ 3 και 7 εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα για τις S-νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένες βρίσκονται σε μορφή ανιόντος σε φυσιολογικό pH γεγονός που ευνοεί την νιτροζυλίωση τους.

Μια άλλη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η κατανομή των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Παρατηρήθηκε αυξημένη παρουσία των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών σε α-έλικες (Πίνακας 3 και Εικόνα 23). Τυπικά, οι α-έλικες διευκολύνουν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με άλλα βιομόρια. Έτσι, απαντώνται στο ενεργό κέντρο ενζύμων καθώς και σε περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών όπου λειτουργούν ως εκμαγείο για την αλληλεπίδραση. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνουν και την μεταγωγή σημάτων που απαιτούν η «πληροφορία» να μεταφερθεί από τη μια πρωτεΐνη στην άλλη. Επομένως, η παρουσία των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών σε α-έλικες πιθανά συνδέεται με τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας και την μεταγωγή σήματος. Η μεταγωγή σήματος μέσω S-νιτροζυλίωσης αποτελεί ένα αναδυόμενο πεδίο έρευνας. Σημαντικές πτυχές του μηχανισμού αυτού δεν είναι ακόμα γνωστές. Για παράδειγμα, ακολουθεί το πρότυπο της φωσφορυλίωσης, δηλαδή εκκινεί με την S-νιτροζυλίωση μιας πρωτεΐνης η οποία ακολουθείται από την διάχυση του σήματος καθοδικά (ενίσχυση) και οδηγεί σε έναν βιολογικό φαινότυπο. Εναλλακτικά, η S-Νιτροζυλίωση ακολουθεί το μοτίβο της ουβικιτινυλίωσης, όπου η νιτροσο-ομάδα μεταφέρεται από μια πρωτεΐνη στην επόμενη είτε απευθείας είτε με τη βοήθεια τρίτης πρωτεΐνης που λειτουργεί ως εκμαγείο που φέρνει κοντά τον δότη με τον δέκτη της νιτροσο-ομάδας. Το σήμα τερματίζεται με τη δράση πρωτεϊνών που καλούνται απονιτροζυλάσες. Μελλοντικές μελέτες θα διερευνήσουν διεξοδικά τους μηχανισμούς αυτούς.

Η εύρεση γραμμικών μοτίβων (linear motifs) αποτέλεσε εργαλείο για την πρόβλεψη πιθανών θέσεων μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Διαφορετικά μοτίβα έχουν περιγραφεί ότι αναγνωρίζονται από διαφορετικές κινάσες, π.χ. το μοτίβο R-R/K-X-S/T, όπου R (λυσίνη) ή K (αργινίνη) σε θέση -3 ή -2 και X οποιοδήποτε αμινοξύ σε θέση -1 ως προς τη σερίνη (S) ή θρεονίνη (T), αναγνωρίζεται από την πρωτεϊνική κινάση A (Protein Kinase A, PKA). Σε ότι αφορά τη νιτροζυλίωση η εύρεση μοτίβων που αναγνωρίζονται από συγκεκριμένες νιτροζυλάσες δεν είναι εφικτή μιας και δεν γνωρίζουμε τις νιτροζυλάσες. Η ανάλυση γραμμικών μοτίβων χρησιμοποιείται ώστε να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό της S-νιτροζυλίωσης. Έτσι, έχει προταθεί ότι η παρουσία σε γειτονικές θέσεις της κυστεΐνης όξινων ή/και βασικών αμινοξέων είναι σημαντική για την διανιτροζυλίωση, δηλαδή, τη μεταφορά ενός ισοδυνάμου NO από μια νιτροζυλιωμένη κυστεΐνη (δότη) σε μια άλλη κυστεΐνη (δέκτη). Τα αμινοξέα αυτά συμμετέχουν μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στην αποπρωτονίωση της κυστεΐνης και σταθεροποίηση του θειολικού ανιόντος. Η ανάλυση του μιτοχονδριακού S-νιτροσοπρωτεώματος ανέδειξε την ύπαρξη τουλάχιστον τριών γραμμικών μοτίβων (Εικόνα 24). Και στα τρία, δεσπόζουν βασικά αμινοξέα και με μικρότερη συχνότητα όξινα, γεγονός που συνάδει με το μηχανισμό της διανιτροζυλίωσης. Επίσης, παρατηρούνται υδρόφοβα αμινοξέα όπως βαλίνη (V), λευκίνη (L) και ισολευκίνη (I) τα οποία δημιουργούν υδρόφοβο περιβάλλον που διευκολύνει την αντίδραση του NO με την κυστεΐνη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΤΕΛΙΚΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΡΩΤΕΩΜΑ

Protein name	Accession number	Gene name	SNO cysteine residues	SNO peptide(s) sequence(s)	Hydropathy index	pKa value	PDB ID
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3, mitochondrial	B1AR13	Cisd3	81	NQPFCDGSHFFQR	-1,244	4,87	6AVJ
Hexokinase-2 (EC 2.7.1.1)	O08528	Hk2	158, 517, 886/909, 368/375, 438, 133, 628	KLPLGFTFSFPCHQTK	-0,511	9,19	5HEX
				MLPTYVCATPDGTEK	0,033	9,27	
				CDVSFLESEDGSGKGAALITAVACR	0,456	8,845	
				LGLSPLQEDCVATHRICQIVSTR	-1	9,21	
				LVPDCDVR	0,489	8,7	
				GSGTQLFDHIAECLANFMDKLQIK	1	9,145	
				ASGCEGEDVVTLK	-0,4	9,53	
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.8.1.4)	O08749	Dld	69/80/85,306/312,477,484,58/80	SAQLGFKTVICIEKNETLGGTCLNVGCIPSK	0,311	ΔEN ΑΝΑΓΡΑ ΦΕΤΑΙ	6I4Q
				AEVITCDVLLVCIGR	0,867		
				VLGAHILGPGAGEMVNEAALALEYGASCEDIAR	-0,233		
				VCHAHPTLSEAFR	-0,322		
				NETLGGTCLNVGCIPSK	0,844		
Delta(3,5)-Delta(2,4)-	O35459	Ech1	91,186	ELVECFQK	0,678	6,006	1DCI

dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial (EC 5.3.3.-)				YCTQDAFFQIK	-0,211	10,035	
Branched-chain-amino-acid aminotransferase , mitochondrial (BCAT(m)) (EC 2.6.1.42)	O35855	Bcat2	136/148,343/346,346	LCLPDFDKQELLECI			
				EVFGSGTACQVCPVHQILYEGK			
				EVFGSGTACQVCPVHQILYEGK			
Protein NipSnap homolog 2 (NipSnap2) (Glioblastoma-amplified sequence)	O55126	Nipsnap2 Gbas	80,88,80/88	LQFHNVKPECLDAYNK	-0,167	0	5KAK
				ICQEVLPK	-0,078	0	
				LQFHNVKPECLDAYNKICQEVLPK			
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX4 (PHGPx) (EC 1.11.1.12)	O70325	Gpx4	75,93,158,191,498	ILAFPCNQFGR	-1.344	6,36	2OBI
				YAECGLR	-0,178	0	
				ILAFPCNQFGR	-0,078	9	
				GSSSFECTHYSSYLEYMK	-0,111		
				DTVCAGLTGAINVAK			
Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 7.1.1.9)	P0040	Mtco2	200,196/200	CGSNHSFMPIVLEMVPLK	-0,667		7O37
				LNQATVTSNRPLFYGCSEICGSNHSFMPIVLEMVPLK	-0,044	1,77	
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 (EC 7.1.1.2)	P03899	mt-Nd3	39	ANPYECGFDPTSSAR	-0,811	9,66	6ZTQ
Aspartate aminotransferase	P05202	Got2	106,187,212,272,272/274,295,382	NLDKEYLPIGGLAEFCK	-0,111	9,54	-
				TCGFDFSGALEDISK	-0,311	8,545	

, mitochondrial (mAspAT) (EC 2.6.1.1)				IPEQSVLLHACAHNPTGVD	-0,256	8,595	
				HFIEQGINVCLCQSYAK	0,933	10,6	
				HFIEQGINVCLCQSYAK	0,589	11,52	
				VGAFTVVCK	-0,267	9,345	
				GMFCFTGLKPEQVER	0,9339	8,36	
-Malate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.37)	P08249	Mdh2	89,89/93,87/95,93,212,222/224,275,285	GYLGPEQLPDCLK	-0,033	0	2DFD
				ANVKGYLGPEQLPDCLKGCDVVVIPAGVPR	-0,867	0	
				CFAETHPECLQHVAVSSSGSQNDLER	-0,7	0	
				GCDVVVIPAGVPR	1,733	12	
				TIPLISQCTPK	-0,311	8,7825	
				GHIISDGGCTCPGDVAK	-0,456	0	
				EGVVECSFVQSK	1,033	7,885	
				ETECTYFSTPLLLGK	-0.656	0	
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (EC 1.15.1.1)	P09671	Sod2	220,164	AIWNVINWENVTERYTACKK	ΔEN ΑΝΑΓΡΑ ΦΕΤΑΙ	8,79	1LUV
				LQIAACSNQDPLQGTGLIPLLIDVWEHAYYLQYK	-0,256	10,105	
Hexokinase-1 (EC 2.7.1.1)	P17710	Hk1	162,214,662,684,890,942	KLPVGFTFSFPCR	-0,589	Δεν αναγράφεται	1BG3
				KLPVGFTFSFPCR	-0,589		
				MPLGFTFSFPCR	-0,244		
				ATDCVGHDTVATLLR	0,156		
				AAQLCGAGMAAVVEK	1,033		
				CTVSFLLSEDGSGK	0,611		
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	P19536	Cox5b	112,115,112/115	CPNCGTHYK	-1,111	6,38	8PW5
				CPNCGTHYK	-1,067	12	
				CPNCGTHYKLVPHQMAH			
Thioredoxin-dependent peroxide reductase,	P20108	Prdx3	230	AFQFVETHGEVCPANWTPESPTIKPSPTASK	-0,233	Δεν αναγράφεται	5JCG

mitochondrial (EC 1.11.1.24)							
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GDH 1) (EC 1.4.1.3)	P26443	Glud1 Glud	112,172,376	IHKPCNHVLSLSFPIRR	0,222	7,291	8SK8
				CAVVDVPFGGAK	0,833	11,165	
				VYEGSILEADCILIPAASEK	0,556	9,173	
Ornithine aminotransferase , mitochondrial (EC 2.6.1.13)	P29758	Oat	150,93	VLPMNTGVEAGETACK	-0,8	12	2OAT
				QYFDLFSAYGAVSQGHCHPK	-0,478	8,92	
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial (EC 1.2.4.1)	P35486	Pdha1	41,181,218,218/222,222, 261,273,91/94/100/101	CDLHRLEEGPPVTTVLTR	-0,489	0	1NI4
				NFYGGNGIVGAQVPLGAGIALACK	-0,344	0	
				LPCIFICENNR	1,289	0	
				VDGMDILCVR	0,511	0	
				FAAAYCR	-0,578	0	
				GFCHLCDGQEACCVGLEAGINPTDHLITAYR	1,022	10.805	
Oxygen- dependent coproporphyrino gen-III oxidase, mitochondrial (COX) (EC 1.3.3.3)	P36552	Cpox	116,362	CSTFMSSPVTELK	-0,256	Δεν αναγράφετ αι	2AEX
				HCDDSYTPR	-2,033		
0Hydroxymethyl glutaryl-CoA lyase, mitochondrial (HL) (HMG- CoA lyase) (EC 4.1.3.4)	P38060	Hmgcl	141,307,323	NANCSIEESFQR	-0,756	8,612	2CW6
				LLEAGDFICQALNR	0,044	7,986	
				TSSKVAQATCKL			

Stress-70 protein, mitochondrial	P38647	Hspa9	66,317,608	GAVVGIDLGTTNSCVAVMEGK	0,678	10,32	9BLS
				CELSSSVQTDINLPYLTMDASGPK	-0,622	9,16	
				DQLPADECNK	-1,522	ΔEN ΑΝΑΓΡ	
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 (EC 6.2.1.3)	P41216	Acsl1	55,109,133,221,242,275, 297,298,487,510,626	ALKPPCDLSMQSVEIAGTTDGIR	-0,744	ΔEN ΑΝΑΓΡΑ ΦΕΤΑΙ	6OZ1
				GIQVSNNGPCLGSR	-0,978		
				EVAELAECIGSGLIQK	1,256		
				LTPCLK	1,9		
				CGVEIISLKALEDLGRVNR	0,4		
				VKPKPPEPEDLAIICTSGTTGNPK	1,5		
				GAMITHQNIINDCSGFIK	1,178		
				GAMITHQNIINDCSGFIK	0,244		
				TAGHVGAPMPCNYVK	0,056		
				GEGEVCVK	0,111		
				GLQGSFEELCR	-1,289		
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (MCAD) (EC 1.3.8.7)	P45952	Acadm	156/159,159,244	MTEQPMMCAYCVTEPSAGSDVAAIK	1,244	Δεν αναγραφεται	4P13
				MTEQPMMCAYCVTEPSAGSDVAAIK	0,344		
				CSDTRGIAFEDVR	-1,756		
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.2.1.3)	P47738	Aldh2	68,388	TFPTVNPSTGEVICQVAEGNK	0,7	6,1925	1O02
				LLCGGGAAADR	0,956	8,86	
ADP/ATP translocase 1 (ADP,ATP carrier protein 1)	P48962	Slc25a4	11,129,160,257	GTDIMYTGTLDCWR	0,756	0	1OKC
				YFAGNLAGGAAGATSLCFVYPLDFAR	1,411	9	
				EFNGLGDCLTK	0,989	10,1	
				GADIMYTGTLDCWR	-0,1	9,74	
	P50544			VASGQALAAFLTEPSSGSDVASIR	0,678	11,625	8CA1

Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.8.9) (MVLCAD) (VLCAD)		Acadvl Vlcad	216,238,423,434,478,604 /608	SSAIPSPCGK	-1,011	4,42	
				IFCSEAAWK	0,478	12	
				VADECIQIMGGMGFMK	0,478	10,59	
				LFVALQGCMKD	-0,822	9,43	
				MLCDSWCIEAATR	0,678	12	
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (LCAD) (EC 1.3.8.8)	P51174	Acadl	129,166,303,342,351,383	HGGIGGDLLSTAVTWEEQAYSNCTGPGFSLHSDIVM PYIANYGTK	-0,378	ΔEN AN.	8WOT
				CIGAIAMTEPGAGSDLQGVR	1,356		
				LLIAELAISACEFMFEETR	0,944	12	
				THICVTR	0,744	11,025	
				AFVDSCQLQHETKR	-0,022	11,07	
				YWASELQNSVAYECVQLHGGWGYMWEYPIAK	0,044		
ADP/ATP translocase 2 (ADP,ATP carrier protein 2)	P51881	Slc25a5	129,160,257	YFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFAR	1,411	0	1OKC
				GLGDCLVK	1,078	0	
				GTDIMYTGTLDCWR	-0,100	9,54	
Thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1) (Rhodanese)	P52196	Tst	64,248	HVPGASFFDIEECR	-1,133	12	8Q5Z
				KVDLSQPLIATCR	0,311	6,82	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	P52503	Ndufs6 Ip13	79,104/107	IIACDGGGGALGHPK	0,911	6,96	6G2J
				TGTCGYCGLQFK	0,544	12	
	P52825	Cpt2	84,324/326,489,512,535	TEVLCK	-0,511	10,07	2DEB

Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial (EC 2.3.1.21)				VDSAVFCLCLDDFPMK	1,6	12	
				QYGQTVATYESCSTAAFK	0.2	10,48	
				HSVGEHQHMAECSK	-1,367	12	
				CSEAFVREPSK	-0,233	10,39	
Holocytochrome c-type synthase (EC 4.4.1.17)	P53702	Hccs	70	AYDYVECPVTGAR	0,578		
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial (IDH) (EC 1.1.1.4)	P54071	Idh2	113154,235,308,336,402,418	CATITPDEAR	0,878	8,99	5196
				NILGGTVFREPIICK	0,1	10,25	
				SCFQYSIQKK	0,222	10,785	
				SSGGFVWACK	-0,556	10,63	
				NYDGDVQSDILAQGFGLMTSVLVCPDGK	0,511	10,475	
				VCVQTVESGAMTK	0	10,395	
				DLAGCIHGLSNVK	1,289	9,27	
ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	P56382	Atp5f1e Atp5e	19	FSQICAK	0,233	12	8H9S
Cytochrome c oxidase subunit 6B1	P56391	Cox6b1 Cox6b	30,54,65	NCWQNYLDFHR	-1,222	8,2	7O37
				GGDVSVCEWYR	-0,511	10,79	
				SLCPVSWVSAWDDR	0,744	12	
Dynammin-like GTPase OPA1, mitochondrial (EC 3.6.5.5)	P58281	Opa1	412,551,786	EGCTVSPETISLNVK	-1,178		6JTG
				NLSLAVSDCFWK	0,722		
				TQEQC VHNETK	-1,633		
	P63038		237,442,447	CEFQDAYVLLSEK	-1,244	9,77	9ES2

60 kDa heat shock protein, mitochondrial (EC 5.6.1.7)		Hspd1 Hsp60		AAVEEGIVLGGGCALLR	0,967	8,575	
				CIPALDSLKPANEDQK	1,178	9,64	
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1, mitochondrial	P70404	Idh3g	81,148,235/236,333	HACVPVDFEEVHVSSNADEEDIR	0,3	11,23	6L59
				TSLDLYANVIHCK	0,567	11,62	
				LGDGLFLQCCR	0,678	12	
				NIANPTATLLASCMMMLDHLK	0,911	9,13	
5-demethoxyubiquinone hydroxylase, mitochondrial	P97478	Coq7	137,207	EGAMACTVAVEESIANHYNNQIR	1,556	7,622	7SSS
				IIQAGCSAAIYLSERF	0,711	8,812	
Fumarate hydratase, mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)	P97807	Fh Fh1	91,290,391,431	LLGDASVSFTDNCVVGIQANTER	1,789		5UPP
				VAALTGLPFVTAPNKFEALAAHDALVELSGAMNTAA CSLMK	0,478		
				LLGDASVSFTDNCVVGIQANTER	0,989		
				LLGDASVSFTDNCVVGIQANTER	0,422	9	
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	P99028	Uqcrh	51,65	LELCDNR	-0,167	10,045	8PW6
				SQTEEDCTEELFDLHAR	-1,011	10,305	
Peroxiredoxin-5, mitochondrial (EC 1.11.1.24)	P99029	Prdx5 Prdx6	48,96,152	GVLFVGPGAFTPGCSKTHLPGFVEQAGALK	0,8	4,493	3MNG
				KGVLFVGPGAFTPGCSK	-0,556		
				ALNVEPDGTGLTCSLAPNLSQL	-0,144	9,08	
	Q03265	Atp5f1a	244,294	LYCIYVAIGQK	0,956		8H9E

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial				YTIVVSATASDAAPLQYLAPYSGCSMGEYFR	-0,456		
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Q07417	Acads	109,151,246,289	ACASTGVIMSVNNSLYLGPIK	0,344	4,75	2VIG
				IGCFALSEPGNGSDAGAASTAR	0,756	10,96	
				ASSTANLIFEDCR	-1,189	9,44	
				IGIASQALGIAQASLDCAVK	0,511	10,132	
Oxaloacetate tautomerase Fahd2a, mitochondrial (EC 5.3.2.2)	Q3TC72	Fahd2a	119,214,300	VICVGLNYADHCQEQNVR	0,422	10,36	8GST
				TFDTFCPLGPALVTK	1,089		
				GDEVQCEIEELGVIINK	-0,056		
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Q3ULD5	Mccc2	58,131,167,267,431,453	VLIANRGEIACR	-1,078	0	8XL6
				VSGVECMIVANDATVK	1,3	10,317	
				LPCIYLVDSGGANLPR	0,878	7,982	
				AATGEEVSAEDLGGADLHCR	-0,644	0	
				MVAAVACAK	0,767	6,765	
				ITVIIGGSYGAGNYGMCGR	-0,278	7,142	
2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1	Q60597	Ogdh	283,331,385,395,487,507,556,566,604,832,904	RFGLEGCEVLIPALK	1,089	11,74	8I0K
				ELEQIFCQFDSK	-0,289	7,825	
				AEQFYCGDTEGK	0,178	0	
				TKAEQFYCGDTEGKK	-0,889	9	
				VVNAPIFHVNSDDPEAVMYVCK	0,856	11,995	
				DVVVDLVCYR	-0,8	12	
				ICEEAFTR	-1,9	0	
				ICEEAFTR	-0.389	9,75	
				SMTCPSTGLEEDVLFHIGK	0,356	8,27	

				IVVNCSTPGNFFHVLR			
				???	0,044	0	
				LLFCTGK	1,2	10,52	
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2) (mVDAC2)	Q60930	Vdac2	48,77,104	TKSCSGVEFSTSGSSNTDTGK	-0,067	0	9EII
				WCEYGLTFTEK	-0,633		
				WNTDNTLGTEIAIEDQICQGLK	-0,022		
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3)	Q60931	Vdac3	65,229	CNTPTYCDLGK	-0,367	0	9EII
				VCNYGLTFTQK	-0,067	0	
				YKLDC229RTSLSAK	-0,456	7,485	
???	Q60932	Vdac1	127,140,232,245	EHINLGCDVDVFDIAGPSIR	-1,256	8,705	4C69
				YQVDPDACFSAK	-0,233	7,485	
				YQVDPDACFSAK	0,367	0	
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial (HCDH) (EC 1.1.1.35)	Q61425	Hadh Hadhsc Mschad Schad	99,201,211	TLSCLSTSTDAASVVHSTDLVVEAIVENLK	0,622	0	1F0Y
				TFESLVDFCK	0,1	0	
				HPVSCK	-0,644	7,675	
NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial (EC 1.18.1.6)	Q61578	Fdxr	108,398	CAFQGNVVVGR	-1,011	0	1CJC
				VVNVPGLYCSGWVK	0,311	0	
2-oxoisovalerate dehydrogenase	Q6P3A8	Bckdhb	107,233,312,314	YRSGDLFNCGSLTIR	-0,422	0	1U5B
				NPCIFFEPK	-0,167	0	

subunit beta, mitochondrial (EC 1.2.4.4) beta)				CYDALRK	0,3	0	
				TIVPWDVDTVCK	0,289	7,09	
Creatine kinase S-type, mitochondrial (EC 2.7.3.2)	Q6P8J7	Ckmt2	63/67,90,180,238,288,317,397	HNNCMAECLTPTIYAK	0,889	10,05	4Z9M
				MTPSGYTLDQCIQTGVNPGHPFIK	0,378	10,921	
				GLSLPPACSR	-1,156	6,37	
				LIDDHFLFDKPVSPLLTCAGMAR	1,111	10,942	
				VFERFCR	-1,244	9,292	
				LGYILTCPSNLGTGLR	0,844	7,787	
				SEVELVQIVIDGVNYLVDCEK	-0,444	9,27	
Leucine-rich PPR motif- containing protein, mitochondrial	Q6PB66	Lrpprc	112,207,393,412,626,689,847,862,1042	VFESTCSSGSPGSNQALLLR	-0,767		8ANY
				LIAAYCNVGDIEGASK	0,678		
				LIDYCR	-1,222		
				LHSSSLQFTLHCALQANR	0,311		
				GICNLLNTYHVPelik	0,289		
				QLLLLLCSEENMQK	0,5		
				GDLPAALEASIACHK	-0,911		
				TLLSNCK	-0,744		
MICOS complex subunit Mic27 (Apolipoprotein O-like) (Protein FAM121A)	Q78IK4	Apool Fam121a Mic27	152	IAYPLGLATLGATVCYPAQSVIIAK	0,267	0	
Methionine-R- sulfoxide	Q78J03	Msrb2	132,162	LDTSLGCPR	0,178		2L1U

reductase B2, mitochondrial				FCINSVALK	0,389		
Mitochondrial carrier homolog 2	Q791V5	Mtch2	49,79,132,296,317	QVCQLPGLFCYAQHIASIDGRR	0,089		
				LCSGVLGTVVHGK	0,733		
				LDTSLGCPR	1,356		
				KVPCGKTYCYDLR	-0,778		
				CMALSTAILVGEAKK			
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Q7TMF3	Ndufa12	92	WLHCMTDDPPTTNPTAR	-0,578	12	6ZTQ
D-beta- hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.30)	Q80XN0	Bdh1	115,221,288	TIQLNVCNSEEVEK	-0,011	0	1A27
				FGIEAFSDCLR	-0,289	10,89	
				METYCNSGSTDTSSVINAVTHALTAATPYTR	-1,022	0	
Glutaredoxin- related protein 5, mitochondrial	Q80Y14	Glr5	63	GTPEQPQCGFSNAVQILR	-0,689	12	2WUL
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl- transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial (EC 2.7.11.2)	Q8BFP9	Pdk1	221,238	HIGSINPNCDVVEVIK	-0,056	9,52	2Q8G
				LCDLYYVNSPELELEELNAK	-0,089	9,78	
				LCDLYYVNSPELELEELNAK			
	Q8BFR5	Tufm	127,222,238,290	HYAHTDCPGHADYVK	-1,311	11,735	7O9K
				KGDECELLGHNK	0,156	7,472	

Elongation factor Tu, mitochondrial				LCDLYYVNSPELELEELNAK	0,678	0	
				GDECELLGHKNIR	-0,489	9,295	
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Q8BGH2	Samm50	65,403,445,457	DDIIIICEIGEVFK	1,922	0	
				THFFLNAGNLCNLNYGEGPK	-0,278	0	
				LELNYCIPMGVQGGDR	1,122	0	
				ICDGVQFGAGIR	-0,156	0	
Electrogenic aspartate/glutamate antiporter SLC25A12, mitochondrial	Q8BH59	Slc25a12	375,435,487,505,563	NSFDCFK	0,444	0	4P5X
				DGSIPLPAEILAGGCAGGSQVIFTNPLEIVK	0,022	0	
				ACFLR	0,589	0	
				DIPFSAIYFPVYAHCK	1,011	0	
				AGQTTYSGVVDCFR	1,122	0	
D-glutamate cyclase, mitochondrial (EC 4.2.1.48)	Q8BH86	Dglucy	86,252	TICPQLQK	-0,767	0	
				APLAFASPPGCMVMVPK	1,056	0	
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial (EC 4.2.1.17)	Q8BH95	Echs1	111, 225	TFQDCYSSK	-0,522	9,845	
				LVEEAIQCAEK	0,667	10,433	
Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial (EC 6.1.1.5)	Q8BIJ6	Iars2	1002	HTSETADALCPR	-0,078	0	8C9G
Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	Q8BKZ9	Pdhx	170,307	DVSAPPPVSKPPAPTQPSPQPQIPCPAR	-1,089	0	1ZY8
				STVPHAYATADCDLGAVLK	0,667	0	

Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.12)	Q8BMF4	Dlat	162,163,290,483,581,613	ASALACLK	1,644		8PIU
				DVPVGSIIICITVEKPDIEAFK	1,256		
				DVPLGAPLCIIVEK	1,367		
				ASALACLK			
				NFSAIINPPQACILAIGASEDK	1,489		
				GFDVASVMSVTLSCDHR	0,222		
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Q8BMS1	Hadha	97/110 , 145/156 , 349 , 470 , 550 , 747	SAVLISSKPGCFVAGADINMLSSCTTPQEATR	0,756	7,96	6DV2
				SPKPVVAAISGSCLGGGLELAACQYR	0,767	11,783	
				ALMGLYNGQVLCKK	-0,6	11,528	
				EVESVTPEHCIFASNTSALPINQIAAVSK	-0,111	9,446	
				CLAPMMSEVMR	0,489	12	
				YESAYGTQFTPCQLLDHANNSSK	0,822	6,905	
Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase, mitochondrial	Q8BMS4	Coq3	156	ILDVGC GGGLLTEPLGR	1,022	0	4KDC
Amine oxidase [flavin-containing] B (EC 1.4.3.21)	Q8BW75	Maob	26,365	LLHDCGLSVVLEAR	1,178	8,8	1OJA
				LCELYAK	-0,578	8,745	
Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.2.1.24)	Q8BWF0	Aldh5a1	81,260,328,330	LGTVADCGVPEAR	0,611	0	2W8N
				EVGEVLCTDPLVSK	1,022	11,73	
				NAGQTCVCSNR	-0,467	10,1	
				NAGQTCVCSNR	0,7	10,57	

3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial (EC 2.3.1.16)	Q8BWT1	Acaa2	92/103/107,116,128,179, 287, 382	LCGSGFQSIVSGCQEICK	-0,444	5,88	4C2J
				GGKYAVGSACIGGGQGIALIIQNTA	0,989	12	
				DAEVVLCGGTESMSQSPYCVR	-0,589	10,967	
				YNISREDCDRYALQSQQR	-1,411	9,74	
				VVGYFVSGCDPTIMGIGPVPAINGALK	0,678	10,477	
				YAVGSACIGGGQGIALIIQNTA	0,322	12	
von Willebrand factor A domain-containing protein 8	Q8CC88	Vwa8 Kiaa0564	161, 723,857	AGTAFYIDQCAVR	0,567	12	5C3C
				CEVVAGSLK	0,011	12	
				LGHILVVDEADKAPTNVTCILK	1,111	12	
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 (EC 1.1.1.n11)	Q8CG76	Akr7a2 Afar Akr7a5	164,221	ACHQLHQEGK	-0,667		2C9I
				QVEAELLPLRHFGLR	0,433		
Complex I assembly factor ACAD9, mitochondrial	Q8JZN5	Acad9	183,275,617	LSSGEHIAAFCLTEPASGSDAASIQR	0,967	7,925	8PHE
				GSNTCEVHFENTR	-0,633	7,4	
				AYICAHPLDRAS	0,533	0	
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	Q8K2B3	Sdha	89,189,190,191,238, 266,287, 357,438/443,467/475,536 ,654	AAFGLSEAGFNTACLT	0,656	12	8DYD
				CCCVADR	0,456	12	
				CCCVADR	-0,244	12	
				CCCVADR	0,033	11,06	
				GVIALCIEDGSIHR	0,989	10,62	
				TYFCTSAHTSTGDTAMVTR	-0,044	10,61	
				AGLPCQDLEFVQFHPTGIYGAGCLITEGCR	0,044	12	

				GCGPEK	-1,744	12	
				HVNGQDQIVPGLYACGEAACASVHGANR	1,0	12	
				ACALSIAESCRPGDKVPSIK	1,167	12	
				VGSVLQEGCEK	-1,344	10,03	
NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial (EC 2.3.1.-)	Q8K2C6	Sirt5 Sir2l5	124,166,181	EPNPGHLAIAQCEAR	-0,178	8,71	5BWL
				CTSCGTVAENYR	-0,744	4,815	
				SPICPALAGK	1,111	6,354	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q8K3J1	Ndufs8	119,123	LCEAICPAQAITIEAEPR	0,956	12	8OM1
					0,922	0	
				LCEAICPAQAITIEAEPR			
Presequence protease, mitochondrial (EC 3.4.24.-)	Q8K411	Pitrm1 Kiaa1104 Ntup1	736,741,780	YLLNCDNMR	-0,733	0	4L3T
				CSVNATPQQMPQAEKEVENFLR	-0,389	0	
				CSVNATPQQMPQAEK	-0,289	11,03	
NAD(P)H-hydrate epimerase (EC 5.1.99.6)	Q8K4Z3	Naxe Aibp Apoa1bp	152,277	RPNKPLFTGLVTQCQK	-0,222	0	2O8N
				YQLNLPSYPDTECVYR	-0,722	0	
3-hydroxyisobutyryl-CoA	Q8QZS1	Hibch	44,94,270,335	GCGGVITLNRPK	0,033	6,5	3BPT
				AFCAGGDIK	0,578	8,18	
				INSCFSANTVEQIIENLR	0,256	8,89	

hydrolase, mitochondrial				ITQACMEGHDFHEGVR	-0,956	11,53	
Acetyl-CoA acetyltransferase , mitochondrial (EC 2.3.1.9)	Q8QZT1	Acat1	116,193,410	QATLGAGLPSTPCTTVNK	-0,578	10,507	
				IHMGNCAENTAK	-0,4	11,592	
				IVVHMAHALKPGEFGLASICNGGGGASALLIEK	0,322	12	
Solute carrier family 25 member 3, mitochondria	Q8VEM8	Slc25a3	63/71,86,131,232,272	YYALCGFGGVLSCLTHTAVVPLDLVK	1,4	0	8HBV
				CRMQVDPQKYK	0,133	0	
				GWAPTLIGYSMQGLCK	0,267	0	
				FACFER	0,167	9,01	
				IAGVFCAIVSHPADSVVSVLNK	1,733	8,88	
NADH- ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q91VD9	Ndufs1	64,75, 78,92,128/131/137, 176/179,367,463, 554, 564, 727	FCYHER	-1,056	11,82	6ZTQ
				LSVAGNCR	0,922	8,49	
				MCLVEIEK	0,878	6,96	
				VVAACAMPVMK	2,056	12	
				EGVMEFLLANHPLDCPICDQGGECDLQDQSMFSG DR	-0,044	10,88	
				CIQCTR	0,367	12	
				VDSDNLCTEEIFPTEGAGTDLR	-0,122	8,68	
				HSFCEVLK	-0,178	0	
				MLFLLGADGGCITR	-1,056	12	
				DCFIVYQGHGVDVGAPMADVILPGAAYTEK	0,022	7,93	
				AVTEGAQAVEEPSIC	0	0	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur	Q91WD5	Ndufs2	332,347	YLCRVEEMR	-0,544	11,62	6ZTQ

protein 2, mitochondrial (EC 7.1.1.2)				IIEQCLNK	-0,367		
CDGSH iron- sulfur domain- containing protein 1	Q91WS0	Cisd1 D10Ert2 14e Zcd1	72,83	VVHAFDMEDLGDKAVYCR	-0,111	3,685	3EW0
				KFPFCDGAHIK	0,633	1,692	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (NDUFV1) (EC 7.1.1.2)	Q91YT0	Ndufv1 125,142, 187,206,2 38/255,28 6,379,425	125,142, 187,206,238/255,286,379 ,425	YLVVNADEGEPTGCK	-1,233	11,7	6ZTQ
				LVEGCLVGGR	0,611	12	
				NACGSDYDFDVVVR	-1,4	10,09	
				GAGAYICGEETALIESIEGK	0,133	11,04	
				LKPPFPADVGVFGCPTTVANVETVAVSPTICR	1,344	9,25	
				LFNISGHVNHPCVVEEEMSVPLK	-1,422	11,2	
				LIEFYKHESCGQCTPCR	-0,967	7,46	
				QIEGHTICALGDGAAPVQGLIR	0,489	12	
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	Q91ZA3	Pcca	107,394	MADEAVCVGPAPTSK	0,822	7,13	7YBU
				QEDIPIGWAVECR	0,189	12	
Electron transfer flavoprotein- ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	Q921G7	Etfldh	85/88,100,117,247,265, 386,501,560,560/585/588 , 591	LQINAQNCVHCK	0,622	9,44	2GMH
				VCLVEK	1,011	0	
				AAQIGAHTLSGACLDPAAFK	0,6	0	

				VTVFAEGCHGHLAK	-0,089	11,48	
				ASCDATYIGILK	-0,911	0	
				FCPAGVYEFVPLEQGDGFRLQINAQNCVHCK	1,367	0	
				DCTPIEYKPDGQISFDLLSSVALSGTNHEHDQPAHL TLK	-0,633	0	
				FCPAGVYEFVPLEQGDGFR	0	11,815	
				FCPAGVYEFVPLEQGDGFRLQINAQNCVHCK	-0,4222	0	
				TCDIKDPSQNINWVVEGGGGPAYNGM	-0,844	0	
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	Q924X2	Cpt1b	90, 305, 448,462,526,548,586,608	CLPER	-0,9		1NM8
				EEIKPVMALGMVPMCSYQMER	-0,022		
				ALLHGNCYNR	-1,333		
				SFTLISCK	-1,089		
				LPWDIPEQCR	-1,256		
				ALADDVELYCFQLPFGK	0,644		
				FCLTYEASMTR	0,122		
				SCTNESAAFVQAMMK	-0,589		
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	Q99JY0	Hadhb	336,436,459,747	ALMGLYNGQVLCKK	-1,144		6DV2
				FNIWGGSLSLGHPFGATGCR	1,156		
				DGGQYALVAACAAGGQGHAMIVEAYPK	1,067		

				KYESAYGTQFTPCQLLLDHANNSSK		6,905	
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99KI0	Aco2	126,277/284,385,410,448,451,592	VAVPSTIHCDHLIEAQVGGEK	0,133		7ACN
				GGTGAIVEYHGPVDSISCTGMATICNMGAIEGATTSVFPYNHR	0,811		
				VGLIGSCTNSSYEDMGR	-0,144		
				CKSQFTITPGSEQIR	-0,456		
				DVGGIVLANACGPCIGQWDR	0,8		
				DVGGIVLANACGPCIGQWDR	-0,089		
				CTTDHISAAGPWLK	-1,033		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	Q99KR7	Ppif	81,103,156,202	ALCTGEKGFGYK	-0,589		2BIT
				VIPAFMCQAGDFTNHNGTGGR	0,689		
				HVGPVLSMANAGPNTNGSQFFICTIK	0,922		
				IVITDCGQLS	0		
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Q99LC3	Ndufa10	67,112,183	VITVDGNICSGK	-1,044	10,63	6ZTQ
				HYPEAGIQYSSTTTGDGRPLDIEFSGSCSLEK	-0,122	9,03	
				QCVDHYNEIK	-1,856	12	
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Alpha-ETF)	Q99LC5	Etfa	53,53/60,53/60/68,68,109,155,	LGGEVSCLVAGTK	1,233	11,49	1EFV
				LGGEVSCLVAGTKCDK	-0,556	9,31	
				LGGEVSCLVAGTKC60DKVVQDLCK			
				VVQDLCK			
				QFSYTHICAGASAFGK	0,811	9,14	
				ECHDPSDR			

Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (subunit beta)	Q99MN9	Pccb	202,293,367	NVTASGVIPQISLIMGPCAGGAVYSPALTDFTFMVK	1,044	11,97	7YBU
				ECHDPSDR	-1,511	12	
				TVGIVGNQPNVASGCLDINSSVK	0,4	10,17	
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial (MCCase subunit alpha) (EC 6.4.1.4)	Q99MR8	Mcc	186,450,505	DQSDQCLR	-1,211		8XL6
				YCLHQYNIVGLR	-0,8		
				ESVCQAALGLLK	0,656		
Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial (EC 6.2.1.1)	Q99NB1	Acas21	144,178,206,235	ELLETTCT	-0,611	8,55	5IFI
				VAIYMPVSPLAVAAMLACAR	1	10,8	
				CKAVITFNQGLRGGR	0,311	7,536	
				SC235PTVQHVLVAHR	-0,311	9,023	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	Q9CPP6	Ndufa5	17	TTGLVGLAVCDTPHER	-0,022	9	7B93
Glutathione S-transferase 3, mitochondrial (EC 2.5.1.-)	Q9CPU4	Mgst3	56	VEYPVMYSTDPENGHMFNCIQR	-0,133	8,967	6SSS
	Q9CPV4	Glod4	41,182,206,	HEEFEEGCK	-0,689	0	3ZI1

Glyoxalase domain-containing protein 4				ALLGYADNQCK	-1,256	9	
				IAFSCPQK		9	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	Q9CQ54	Ndufc2	40	LVYMGLLGYCTGLMDNMLR	0,633	9,935	6ZTQ
2,4-dienoyl-CoA reductase [(3E)-enoyl-CoA-producing], mitochondrial (EC 1.3.1.124)	Q9CQ62	Decr1	86, 116, 268	AMTTFLSTLGAQCVIASR	0,622	12	7UCW
				CDVRDPDMVHNTVLELIK	-0,511	11,96	
				IPCGR	-0,144	11,587	
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	Q9CQA3	Sdhb	70, 100/103/115,241/251/255	CGPMVLDALIK	0,756	9,07	8GS8
				EGICGSCAMNINGGNTLACTR	0,9	9,14	
				CHTIMNCTQTCPK	-0,6	11,24	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	Q9CQJ8	Ndufb9	4,31,42	MAFCAPPAYLTHQQK	0,9	0	6ZTQ
				HLESWCIHR	-1,478	7,63	
				YFACLMR	0,478	11,41	
Acyl carrier protein, mitochondrial	Q9CR21	Ndufab1	140	LMCPQEIVDYIADK	0,489	9	6ZTQ
NADH dehydrogenase	Q9CR61	Ndufb7	59,80,90	DYCAHYLIR	-0,133	12	8J1N
				DSFPNFLACK	-0,711	12	

[ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7				HEQHDWDYCEHLDYVK	-1,211	12	
Mitochondrial 2- oxoglutarate/mal ate carrier protein (OGCP) (alpha- oxoglutarate carrier)	Q9CR62	Slc25a11	184	GCIPTMAR	0,289	8,83	8HBV
MICOS complex subunit Mic19	Q9CRB9	Chchd3	183,193	YEYHPVCADLQTK	-0,022	0	
				ILQCYR	-0,689	0	
Mitochondrial- processing peptidase subunit beta (EC 3.4.24.64)	Q9CXT8	Pmpcb	79,265,389,481	VASENSGLSTCTVGLWIDAGSR	1,2	9	3TGU
				FHFGDSLCSHK	-0,5	6,11	
				LCTDVTSESEVAR	-0,7	12	
				LPDFNQICSNMR	-0,867	0	
Cytochrome b- c1 complex subunit 1, mitochondrial	Q9CZ13	Uqcrc1	51,69,268,380,410,445/4 53,453	ERLELCDNR	0,011	12	8IB7
				VASEQSSHATCTVGWIDAGSR	0,756	12	
				VYEEDAVPGLTPCR	0,044	0	
				LCTSATESEVTR	-0,022	12	
				NALVSHLDGTTTPCEDIGR	-0,033	0	
				DICKSYFYDQCPAVAGYGPIEQLPDYNR	-0,611	12	
				YFYDQCPAVAGYGPIEQLPDYNR			
Succinate dehydrogenase cytochrome	Q9CZB0	Sdhc	70,107	WSLPMALSVCHR	0,044	9,07	8GS8
				SLCLGPTLIYSAK	0,722	8,01	

b560 subunit, mitochondrial							
Elongation factor Ts, mitochondrial	Q9CZR8	Tsfm	63,148,239,314	TGYSFVNCK	0,033	12	2CP9
				FQQLVQQVALGTMAHCQNLTD	-0,489	12	
				YGALVICETPEQIANLEEVGR	0,244	12	
				FECGEDEQVAEAE	-1,9	12	
Citrate synthase, mitochondrial (EC 2.3.3.1)	Q9CZU6	Cs	101,211,359	GYSIPECQK	-0,156	9,765	8ZVV
				LPCVAAK	1,022	9,77	
				YSCQR	-1,222	10,535	
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B) (EC 1.2.4.1)	Q9D051	Pdhb	41,249,263,306	CDLHRLEEGPPVTTVLTR	-1,078		2OZL
				SRPVGHCLEAAVLSK	0,978	10,97	
				EGIECEVINLR	0,956	10,97	
				TNHLVTVEGGWPQFGVGAEICAR	0,611	10,97	
Succinyl-CoA:3- ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial (SCOT) (EC 2.8.3.5)	Q9D0K2	Oxct1	235,456,504	NFNLPMCK	0,578	12	3DLX
				CTLPLTGK	0,178	10,722	
				STGCDFAVSPNLMPPMQQIST	0,567	9,842	
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (EC 7.1.1.8) (Complex III subunit 4)	Q9D0M3	Cyc1	139,160,219	HLVGVCYTEEEAK	-0,222	8,64	8PW6
				HGGEDYVFSLLTGYCEPPTGVSLR	-1,3	11,175	
				ARHGGEDYVFSLLTGYCEPPTGVSLR	-0,856	10,03	
Adenosine 5'- monophosphora	Q9D0S9	Hint2	75	SLPADILYEDQQCLVFR	-0,578	6,48	4INC

midase HINT2 (EC 3.9.1.-)							
Glutamine amidotransferase -like class 1 domain- containing protein 3, mitochondrial	Q9D172	Gatd3	151, 174/175,174, 219,242	NLSTFAVDGKDCK	-1,767	0	1VHQ
				EFHGAKKPIGLCCIPVLA AK	2,344	0	
				KPIGLCCIPVLA AK	2,422	9	
				HCVKGVTEAHVDQK	0,067	0	
				VVTTPAFCETALHHIHDGIGAMVK	0,8	0	
Dihydrolipoyllys ine-residue succinyltransfera se component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.61)	Q9D2G2	Dlst	246	EAQNTCAMLTTFNEVDMSNIQEMR	0,1		6H05
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q9D6J6	Ndufv2	134,134/139,223,223/224	YHIQVCTTTPCMLR	0,722	0	6ZTQ
				YHIQVCTTTPCMLR	-0,4	0	
				FCCEPAGGLTSLTEPPKGPFGVQAGL	-0,089	0	
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (EC 1.1.1.41)	Q9D6R2	Idh3	127,222,273/281, 331,351,359,351/359	TFDLYANVRPCVSIEGYK	0,511	9	6L59
				CREVAENCK	-0,744	11,885	
				CSDFTTEEICRR	0,567	11,91	
				IEAACFATIK	0,789	11,91	
				CSDFTTEEICR DLGGNAKCSDFTTEEICRR	1,7	0	

				CSDFTTEEICR	-1,356	9	
Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.8.5)	Q9D7B6	Acad8	249,281	AVIFEDCAVPVANR	0,967	8,61	1RX0
				INVASCSLGAAHASVILTQEHLK	1,544	11,77	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	Q9D8B4	Ndufa11	17,18,66,86,95,97	TTGLVGLAVCDTPHERLTILYTK	-1,989	0	6ZTQ
				FFESYHEVPDGTQCHR	-1,744	8,53	
				LVNGCALNFFR	1,733	8,73	
				MGSQVIIPYRCDVYDIMHLR	-1,367	9,74	
				EKPDDPLNYFIGGCAGGLTLGAR	1,144	12	
				EKPDDPLNYFIGGCAGGLTLGAR	1,067	0	
ATP synthase subunit O, mitochondrial	Q9DB20	Atp5po	141	GEVPCTVTTASPLDDAVLSELK	0,611		8H9S
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Q9DB77	Uqcrc2	192	NALANPLYCPDYR	-0,622	9,1856ZTQ	8IOG
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	Q9DC69	Ndufa9	86	CDVYDIMHLR	-0,05	10,015	6ZTQ
NADH dehydrogenase	Q9DC70	Ndufs7	164,194	YVVSMSGSCANGGGYYHYSYSVVR	0,033	12	6ZTQ

[ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial (EC 7.1.1.2)				IVPVDIYVPGCPPTAEALLYGILQLQR	-0,1	10,37	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	Q9DCJ5	Ndufa8	36,66,110	LVNGCALNFFR	-1,389	10,95	6ZTQ
				AAAHHYGAQCDK	1,278	8,73	
				FDQCVLDK	-0,556	12	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Q9DCS9	Ndufb10	77,84,125	RVPDITECK	-1,333	0	6ZTQ
				EGDVLCIYEAMQWR	0,9	0	
				EGDVLCIYEAMQWR	-1,233	11,7	
Electron transfer flavoprotein subunit beta (Beta-ETF)	Q9DCW4	Etfb	42,66,71,131	HSMNPFCEIAVEEAVR	1,011	6,83	1EFV
				EIIAVSCGPSQCQETIR	0,656	8,9	
				EIIAVSCGPSQCQETIR	-0,778	6,68	
				QAIDDDCNQTGQMTAGLLDWPQGTFASQVTLEGDK VK	-1,289	10,776	
ATP synthase subunit d, mitochondrial	Q9DCX2	Atp5pd Atp5h	101	SCAEFVSGSQLR	0,422	8,95	2CLY
Methylmalonate - semialdehyde/m alonate- semialdehyde dehydrogenase	Q9EQ20	Aldh6a1	86,149,249,317,368,413,	VPQSTKAEMDAAVESCKR	0,044	0	8XXQ
				GLQVVEHACSVTSLMLGETMPSITK	0,411	9,38	
				LLQDSGAPDGTLNIIHGQHDAVNFICDHPDIK	-0,144	9	
				CMALSTAILVGAEK	0,289	0	

[acylating], mitochondrial (MMSDH) (EC 1.2.1.27)				VCNLIDSGTK	-0,433	9	
				GYENGNFVGPTIISNVKPSMTCYK	-1,211	99	
Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (IVD) (EC 1.3.8.4)	Q9JHI5	Ivd	134,252/259, 348,	ASGAVGLSYGAHSNLCVNQIVR	0,878	10,78	9JQ3
				GSNTCELVFEDCK	0,144	9,17	
				ACDEGHIIPK	0,067	9,52	
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl- transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial (EC 2.7.11.2)	Q9JK42	Pdk2	45,392	QFLDFGSSNACEK	-0,678	8,9	4MPC
				HYQTIQEAGDWCVSTEPK	-0,522	9	
Electrogenic aspartate/glutam ate antiporter SLC25A13, mitochondrial	Q9QXX4	Slc25a13	201,378,490,504,566	DIMVTIRPHVLTPFVEECLVAAAGGTR	1,456	9,035	4P5W
				NSFDCFK	0,444	0	
				ACFLR	0,589	0	
				DIPFSAIYFPCYAHVK	0	0	
				AGQTTYNGVTDCFR	0,578	0	
Succinate--CoA ligase [ADP/GDP- forming] subunit alpha, mitochondrial (EC 6.2.1.4)	Q9WUM5	Suc1g1	60,172/181	IICQGFTGK	0,567	0	6WCV
				LIGPNCPGVINPGECK	0,911	0	
	Q9WUR2	Eci2	246,279,332,365	ATFHTPFSQLGQSPEACSSYTFPK	1,667	11,243	4U19

Enoyl-CoA delta isomerase 2 (EC 5.3.3.8) pECI)				ATFHTPFSQLGQSPEACSSYTFPK	-0,578	7,386	
				LYAVNAEECTTLQAR	-1,144	9,337	
				LYAVNAEECTTLQAR	-0,811	9,126	
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial (EC 1.6.99.-)	Q9Z0X1	Aifm1	255,316	SITVIGGGFLGSELACALGR	0,733	12	5KVI
				CLIATGGTPR	0,5	12	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	Q9Z1P6	Ndufa7	55	LSNNYYCTR	-1,8	7,86	6ZTQ
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial (EC 6.2.1.5)	Q9Z2I9	Sucla2	152,158,270,320,384,430	ICNQVLVCER	0,811	9	6G4Q
				ICNQVLVCER	-0,011	9	
				VLCMDAK	0,822	8,89	
				EAANADINYIGLDGSIGCLVNGAGLAMATMDIIK	1,3	9	
				CDVIAQGIVMAVK	0,878	0	
				ILACDDLDEAAK	0,267	9	
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein (Carnitine/acylcarnitine translocase) (CAC) (CACT)	Q9Z2Z6	Cact	23,58,89,136/155,136,155,283	NLLAGGFGGMCLVFGHPLDTVK	2,022		8J1N
				LQTQPPSLSGQPPMYSGTLDCFR	-0,044		
				LQTQPPSLSGQPPMYSGTLDCFR	2,1		
				CLLQIQASSGENKYSGTLDCAK	0,411		
				CLLQIQASSGENK	-0,156		
				YSGTLDCAK			
				AFPANAACFLGFEIAMK	0,9		

Protein name	Accession number	Gene name	SNO cysteine residues	SNO peptide(s) sequence(s)	Hydropathy index	pKa value	PDB ID
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3, mitochondrial	B1AR13	Cisd3	81	NQPFCDGSHFFQR	-1,244	4,87	6AVJ
Hexokinase-2 (EC 2.7.1.1)	O08528	Hk2	158, 517, 886/909, 368/375, 438, 133, 628	KLPLGFTSFPCHQTK	-0,511	9,19	5HEX
				MLPTYVCATPDGTEK	0,033	9,27	
				CDVSFLESEDGSGKGAALITAVACR	0,456	8,845	
				LGLSPLQEDCVATHRICQIVSTR	-1	9,21	
				LVPDCDVR	0,489	8,7	
				GSGTQLFDHIAECLANFMDKLQIK	1	9,145	
				ASGCEGEDVVTLLK	-0,4	9,53	
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.8.1.4)	O08749	Dld	69/80/85,306/312,477,484,58/80	SAQLGFKTVCIKNETLGGTCLNVGCIPSK	0,311	ΔEN ΑΝΑΓΡΑ ΦΕΤΑΙ	6I4Q
				AEVITCDVLLVCIGR	0,867		
				VLGAHILGPGAGEMVNEAALALEYGASCEDIAR	-0,233		
				VCHAHPTLSEAFR	-0,322		
				NETLGGTCLNVGCIPSK	0,844		

Delta(3,5)- Delta(2,4)- dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial (EC 5.3.3.-)	O35459	Ech1	91,186	ELVECFQK	0,678	6,006	1DCI
				YCTQDAFFQIK	-0,211	10,035	
Branched-chain- amino-acid aminotransferase	O35855	Bcat2	136/148,343/346,346	LCLPDFDKQELLECIR			
				EVFGSGTACQVCPVHQILYEGK			

, mitochondrial (BCAT(m)) (EC 2.6.1.42)				EVFGSGTACQVCPVHQILYEGK			
Protein NipSnap homolog 2 (NipSnap2) (Glioblastoma-amplified sequence)	O55126	Nipsnap2 Gbas	80,88,80/88	LQFHNVKPECLDAYNK	-0,167	0	5KAK
				ICQEVLPK	-0,078	0	
				LQFHNVKPECLDAYNKICQEVLPK			
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX4 (PHGPx) (EC 1.11.1.12)	O70325	Gpx4	75,93,158,191,498	ILAFPCNQFGR	-1.344	6,36	2OBI
				YAEGLR	-0,178	0	
				ILAFPCNQFGR	-0,078	9	
				GSSSFECTHYSSYLEYMK	-0,111		
				DTVCAGLTGAINVAK			
Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 7.1.1.9)	P00405	Mtco2	200,196/200	CGSNHSFMPIVLEMVPLK	-0,667		7O37
				LNQATVTSNRPGIFYGQCSEICGSNHSFMPIVLEMVPLK	-0,044	1,77	
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 (EC 7.1.1.2)	P03899	mt-Nd3	39	ANPYECGFDPTSSAR	-0,811	9,66	6ZTQ
Aspartate aminotransferase , mitochondrial	P05202	Got2	106,187,212,272,272/274,295,382	NLDKEYLPIGGLAEFCK	-0,111	9,54	-
				TCGFDFSGALEDISK	-0,311	8,545	

(mAspAT) (EC 2.6.1.1)				IPEQSVLLHACAHNPTGVD	-0,256	8,595	
				HFIEQGINVCLCQSYAK	0,933	10,6	
				HFIEQGINVCLCQSYAK	0,589	11,52	
				VGAFTVVCK	-0,267	9,345	
				GMFCFTGLKPEQVER	0,9339	8,36	
-Malate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.37)	P08249	Mdh2	89,89/93,87/95,93,212,222/224,275,285	GYLGPEQLPDCLK	-0,033	0	2DFD
				ANVKG YLGPEQLPDCLKGCDVVVIPAGVPR	-0,867	0	
				CFAETHPECLQHVAVSSGSGQNDLER	-0,7	0	
				GCDVVVIPAGVPR	1,733	12	
				TIIP LISQCTPK	-0,311	8,7825	
				GHIISDGGCTCPGDVAK	-0,456	0	
				EGVVECSFVQSK	1,033	7,885	
				ETECTYFSTPLLLGK	-0.656	0	
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (EC 1.15.1.1)	P09671	Sod2	220,164	AIWNVINWENVTERYTACKK	ΔEN ΑΝΑΓΡΑ ΦΕΤΑΙ	8,79	1LUV
				LQIAACSNQDPLQGTGLIPLL GIDVWEHAYYLQYK	-0,256	10,105	
Hexokinase-1 (EC 2.7.1.1)	P17710	Hk1	162,214,662,684,890,942	KLPVGFTFSFPCR	-0,589	Δεν αναγράφεται	1BG3
				KLPVGFTFSFPCR	-0,589		

				MPLGFTFSFPCK	-0,244		
				ATDCVGHDTVATLLR	0,156		
				AAQLCGAGMAAVVEK	1,033		
				CTVSFLLSEDGSGK	0,611		
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	P19536	Cox5b	112,115,112/115	CPNCGTHYK	-1,111	6,38	8PW5
				CPNCGTHYK	-1,067	12	
				CPNCGTHYKLVPHQMAH			
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial (EC 1.11.1.24)	P20108	Prdx3	230	AFQFVETHGEVCPANWTPESPTIKPSPTASK	-0,233	Δεν αναγράφεται	5JCG
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GDH 1) (EC 1.4.1.3)	P26443	Glud1 Glud	112,172,376	IHKPCNHVLSLSFPIRR	0,222	7,291	8SK8
				CAVVDVPFGGAK	0,833	11,165	
				VYEGSILEADCILIPAASEK	0,556	9,173	
Ornithine aminotransferase, mitochondrial (EC 2.6.1.13)	P29758	Oat	150,93	VLPMNTGVEAGETACK	-0,8	12	2OAT
				QYFDLSAYGAVSQGHCHPK	-0,478	8,92	

Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial (EC 1.2.4.1)	P35486	Pdha1	41,181,218,218/222,222,261,273,91/94/100/101	CDLHRLEEGPPVTTVLTR	-0,489	0	1NI4
				NFYGGNGIVGAQVPLGAGIALACK	-0,344	0	
				LPCIFICENNR	1,289	0	
				VDGMDILCVR	0,511	0	
				FAAAYCR	-0,578	0	
				GFCHLCDGQEACCVGLEAGINPTDHLITAYR	1,022	10.805	
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial (COX) (EC 1.3.3.3)	P36552	Cpox	116,362	CSTFMSSPVTELRL	-0,256	Δεν αναγράφεται	2AEX
				HCDDSYTPR	-2,033		
0Hydroxymethyl glutaryl-CoA lyase, mitochondrial (HL) (HMG-CoA lyase) (EC 4.1.3.4)	P38060	Hmgcl	141,307,323	NANCSIEESFQR	-0,756	8,612	2CW6
				LLEAGDFICQALNR	0,044	7,986	
				TSSKVAQATCKL			
Stress-70 protein, mitochondrial	P38647	Hspa9	66,317,608	GAVVGIDLGTTNSCAVMEGK	0,678	10,32	9BLS
				CELSSSVQTDINLPYLTMDASGPK	-0,622	9,16	
				DQLPADECNK	-1,522	ΔΕΝ ΑΝΑΓΡ	

Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 (EC 6.2.1.3)	P41216	Acs1l	55,109,133,221,242,275,297,298,487,510,626	ALKPPCDLSMQSVEIAGTTDGIR	-0,744	ΔΕΝ ΑΝΑΓΡΑ ΦΕΤΑΙ	6OZ1
				GIQVSNNGPCLGSR	-0,978		
				EVAELAECIGSGLIQK	1,256		
				LTPCLK	1,9		
				CGVEIISLKALEDLGRVNR	0,4		
				VKPKPPEPEDLAHCFTSGTTGNPK	1,5		
				GAMITHQNIINDCSGFIK	1,178		
				GAMITHQNIINDCSGFIK	0,244		
				TAGHVGAPMPCNYVK	0,056		
				GEGEVCVK	0,111		
				GLQGSFEELCR	-1,289		
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (MCAD) (EC 1.3.8.7)	P45952	Acadm	156/159,159,244	MTEQPMMCAYCVTEPSAGSDVAAIK	1,244	Δεν αναγραφε ται	4P13
				MTEQPMMCAYCVTEPSAGSDVAAIK	0,344		
				CSDTRGIAFEDVR	-1,756		
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.2.1.3)	P47738	Aldh2	68,388	TFPTVNPSTGEVICQVAEGNK	0,7	6,1925	1O02
				LLCGGGAAADR	0,956	8,86	

ADP/ATP translocase 1 (ADP,ATP carrier protein 1)	P48962	Slc25a4	11,129,160,257	GTDIMYTGTLDCWR	0,756	0	1OKC
				YFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFAR	1,411	9	
				EFNGLGDCLTK	0,989	10,1	
				GADIMYTGTLDCWR	-0,1	9,74	
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.8.9) (MVLCAD) (VLCAD)	P50544	Acadv1 Vlcad	216,238,423,434,478,604 /608	VASGQALAAFCLTEPSSGSDVASIR	0,678	11,625	8CA1
				SSAIPSPCGK	-1,011	4,42	
				IFCSEAAWK	0,478	12	
				VADECIQIMGGMGFMK	0,478	10,59	
				LFVALQGCMDK	-0,822	9,43	
				MLCDSWCIEAATR	0,678	12	
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (LCAD) (EC 1.3.8.8)	P51174	Acadl	129,166,303,342,351,383	HGGIGGDLSTAVTWEEQAYSNCTGPGFSLHSDIVM PYIANYGTK	-0,378	ΔEN AN.	8WOT
				CIGAIAMTEPGAGSDLQGVR	1,356		
				LLIAELAISACEFMFEETR	0,944	12	
				THICVTR	0,744	11,025	
				AFVDSCLQLHETKR	-0,022	11,07	
				YWASELQNSVAYECVQLHGGWGYMWEYPIAK	0,044		

ADP/ATP translocase 2 (ADP,ATP carrier protein 2)	P51881	Slc25a5	129,160,257	YFAGNLASGGAAGATSLCFVYPLDFAR	1,411	0	1OKC
				GLGDCLVK	1,078	0	
				GTDIMYTGTLDCWR	-0,100	9,54	
Thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1) (Rhodanese)	P52196	Tst	64,248	HVPGASFFDIEECR	-1,133	12	8Q5Z
				KVDLSQPLIATCR	0,311	6,82	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	P52503	Ndufs6 Ip13	79,104/107	IIACDGGGGALGHPK	0,911	6,96	6G2J
				TGTCGYCGLQFK	0,544	12	
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial (EC 2.3.1.21)	P52825	Cpt2	84,324/326,489,512,535	TEVLCK	-0,511	10,07	2DEB
				VDSAVFCLCLDDFPMK	1,6	12	
				QYGQTVATYESCSTAAFK	0.2	10,48	
				HSVGEHQHMMAECSK	-1,367	12	
				CSEAFVREPSK	-0,233	10,39	

Holocytochrome c-type synthase (EC 4.4.1.17)	P53702	Hccs	70	AYDYVECPVTGAR	0,578		
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial (IDH) (EC 1.1.1.4)	P54071	Idh2	113,154,235,308,336,402,418	CATITPDEAR	0,878	8,99	5196
				NILGGTVFREPIICK	0,1	10,25	
				SCFQYSIQKK	0,222	10,785	
				SSGGFVWACK	-0,556	10,63	
				NYDGDVQSDILAQQFGSLGLMTSVLVCPDGK	0,511	10,475	
				VCVQTVESGAMTK	0	10,395	
				DLAGCIHGLSNVK	1,289	9,27	
ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	P56382	Atp5f1e Atp5e	19	FSQICAK	0,233	12	8H9S
	P56391	Cox6b1 Cox6b	30,54,65	NCWQNYLDFHR	-1,222	8,2	7O37

Cytochrome c oxidase subunit 6B1				GGDVSVCEWYR	-0,511	10,79	
				SLCPVSWVSAWDDR	0,744	12	
Dynamin-like GTPase OPA1, mitochondrial (EC 3.6.5.5)	P58281	Opa1	412,551,786	EGCTVSPETISLNVK	-1,178		6JTG
				NLSLAVSDCFWK	0,722		
				TQEQCVHNETK	-1,633		
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (EC 5.6.1.7)	P63038	Hspd1 Hsp60	237,442,447	CEFQDAYVLLSEK	-1,244	9,77	9ES2
				AAVEEGIVLGGGCALLR	0,967	8,575	
				CIPALDSLKPANEDQK	1,178	9,64	
Isocitrate dehydrogenase	P70404	Idh3g	81,148,235/236,333	HACVPVDFEEVHVSSNADEEDIR	0,3	11,23	6L59

[NAD] subunit gamma 1, mitochondrial				TSLDLYANVIHCK	0,567	11,62	
				LGDGLFLQCCR	0,678	12	
				NIANPTATLLASCMMLDHLK	0,911	9,13	
5- demethoxyubiqu inone hydroxylase, mitochondrial	P97478	Coq7	137,207	EGAMACTVAVEESIANHYNNQIR	1,556	7,622	7SSS
				IIQAGCSAAIYLSERF	0,711	8,812	
Fumarate hydratase,	P97807	Fh Fh1	91,290,391,431	LLGDASVSFTDNCVVGIQANTER	1,789		5UPP

mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)				VAALTGLPFVTAPNKFEALAAHDALEVELSGAMNTAA CSLMK	0,478		
				LLGDASVSFTDNCVVGIQANTER	0,989		
				LLGDASVSFTDNCVVGIQANTER	0,422	9	
Cytochrome b- c1 complex subunit 6, mitochondrial	P99028	Uqcrh	51,65	LELCDNR	-0,167	10,045	8PW6
				SQTEEDCTEELDFDLHAR	-1,011	10,305	
Peroxioredoxin-5, mitochondrial (EC 1.11.1.24)	P99029	Prdx5 Prdx6	48,96,152	GVLFGVPGAFTPGCSKTHLPGFVEQAGALK	0,8	4,493	3MNG

				KGVLFGVPGAFTPGCSK	-0,556		
				ALNVEPDGTGLTCSLAPNLSQL	-0,144	9,08	
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Q03265	Atp5f1a	244,294	LYCIYVAIGQK	0,956		8H9E
				YTIVVSATASDAAPLQYLAPYSGCSMGEYFR	-0,456		
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Q07417	Acads	109,151,246,289	ACASTGVIMSVNNSLYLGPIK	0,344	4,75	2VIG
				IGCFALSEPGNGSDAGAASTTAR	0,756	10,96	
				ASSTANLIFEDCR	-1,189	9,44	
				IGIASQALGIAQASLDCAVK	0,511	10,132	
Oxaloacetate tautomerase Fahd2a, mitochondrial (EC 5.3.2.2)	Q3TC72	Fahd2a	119,214,300	VICVGLNYADHCQEQNVR	0,422	10,36	8GST
				TFDTCPLGPALVTK	1,089		
				GDEVQCEIEELGVIINK	-0,056		

Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Q3ULD5	Mccc2	58,131,167,267,431,453	VLIANRGEIACR	-1,078	0	8XL6
				VSGVECMIVANDATVK	1,3	10,317	
				LPCIYLVDSGGANLPR	0,878	7,982	
				AATGEEVSAEDLGADLHCR	-0,644	0	
				MVAAVACAK	0,767	6,765	
				ITVIIGGSYGAGNYGMCGR	-0,278	7,142	
2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1	Q60597	Ogdh	283,331,385,395,487,507,556,566,604,832,904	RFGLEGCEVLIPALK	1,089	11,74	8I0K
				ELEQIFCQFDSK	-0,289	7,825	
				AEQFYCGDTEGK	0,178	0	
				TKAEQFYCGDTEGKK	-0,889	9	
				VVNAPIFHVNSDDPEAVMYVCK	0,856	11,995	
				DVVVDLVCYR	-0,8	12	
				ICEEAFTR	-1,9	0	
				ICEEAFTR	-0.389	9,75	

				SMTCPSTGLEEDVLFHIGK IVVNCSTPGNFFHVLRL	0,356	8,27	
					0,044	0	
				LLFCTGK	1,2	10,52	
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2) (mVDAC2)	Q60930	Vdac2	48,77,104	TKSCSGVEFSTSGSSNTDTGK	-0,067	0	9EII
				WCEYGLTFTEK	-0,633		
				WNTDNTLGTEIAIEDQICQGLK	-0,022		
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3)	Q60931	Vdac3	65,229	CNTPTYCDLGK	-0,367	0	9EII
				VCNYGLTFTQK	-0,067	0	
				YKLDC229RTLSAK	-0,456	7,485	
	Q60932	Vdac1	127,140,232,245	EHINLGCDVDFDIAGPSIR	-1,256	8,705	4C69
				YQVDPDACFSAK	-0,233	7,485	
				YQVDPDACFSAK	0,367	0	

Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial (HCDH) (EC 1.1.1.35)	Q61425	Hadh Hadhsc Mschad Schad	99,201,211	TLSCSLSTSDAASVVHSTDLDVVEAIVENLK	0,622	0	1F0Y
				TFESLVDFCK	0,1	0	
				HPVSCK	-0,644	7,675	
NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial (EC 1.18.1.6)	Q61578	Fdxr	108,398	CAFQGNVVVGR	-1,011	0	1CJC
				VVNVPGLYCSGWVK	0,311	0	
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial (EC 1.2.4.4) beta)	Q6P3A8	Bckdhb	107,233,312,314	YRSGDLFNCGSLTIR	-0,422	0	1U5B
				NPCIFFEPK	-0,167	0	
				CYDALRK	0,3	0	
				TIVPWDVDTVCK	0,289	7,09	
Creatine kinase S-type, mitochondrial (EC 2.7.3.2)	Q6P8J7	Ckmt2	63/67,90,180,238,288,317,397	HNNCMAECLTPTIYAK	0,889	10,05	4Z9M
				MTPSGYTLQCIQTGVDPNGHPFIK	0,378	10,921	
				GLSLPPACSR	-1,156	6,37	
				LIDDHFLFDKPVSPLLTCAGMAR	1,111	10,942	
				VFERFCR	-1,244	9,292	
				LGYILTCPSNLGTGLR	0,844	7,787	

				SEVELVQIVIDGVNYLVDCEK	-0,444	9,27	
Leucine-rich PPR motif- containing protein, mitochondrial	Q6PB66	Lrpprc	112,207,393,412,626,689 ,847,862,1042	VFESTCSSGSPGSNQALLLR	-0,767		8ANY
				LIAAYCNVGDIEGASK	0,678		
				LIDYCR	-1,222		
				LHSSLQFTLHCALQANR	0,311		
				GICNLLNTYHVPelik	0,289		
				QLLLLLCSEENMQK	0,5		
				GDLPAALEASIACHK	-0,911		
				TLLSNCK	-0,744		
MICOS complex subunit Mic27 (Apolipoprotein O-like) (Protein FAM121A)	Q78IK4	Apool Fam121a Mic27	152	IAYPLGLATLGATVCYPAQSVIIAK	0,267	0	
Methionine-R- sulfoxide reductase B2, mitochondrial	Q78J03	MsrB2	132,162	LDTSLGCPR	0,178		2L1U
				FCINSVALK	0,389		

Mitochondrial carrier homolog 2	Q791V5	Mtch2	49,79,132,296,317	QVCQLPGLFCYAQHIASIDGRR	0,089		
				LCSGVLGTVVHGK	0,733		
				LDTSLGCPR	1,356		
				KVPCGKTYCYDLR	-0,778		
				CMALSTAILVGEAKK			
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	Q7TMF3	Ndufa12	92	WLHCMTDDPPTTNPTAR	-0,578	12	6ZTQ
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.30)	Q80XN0	Bdh1	115,221,288	TIQLNVCNSEEVEK	-0,011	0	1A27
				FGIEAFSDCLR	-0,289	10,89	
				METYCNSGSTDTSSVINAVTHALTAATPYTR	-1,022	0	
Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial	Q80Y14	Glr5	63	GTPEQPQCGFSNAVQILR	-0,689	12	2WUL
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)]	Q8BFP9	Pdk1	221,238	HIGSINPNCDVVEVIK	-0,056	9,52	2Q8G
				LCDLYYVNSPELELEELNAK	-0,089	9,78	

kinase isozyme 1, mitochondrial (EC 2.7.11.2)				LCDLYYVNSPELELEELNAK			
Elongation factor Tu, mitochondrial	Q8BFR5	Tufm	127,222,238,290	HYAHTDCPGHADYVK	-1,311	11,735	7O9K
				KGDECELLGHNK	0,156	7,472	
				LCDLYYVNSPELELEELNAK	0,678	0	
				GDECELLGHNKNIR	-0,489	9,295	
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Q8BGH2	Samm50	65,403,445,457	DDIIIICEIGEVFK	1,922	0	
				THFFLNAGNLCNLNYGEGPK	-0,278	0	
				LELNYCIPMGVQGGDR	1,122	0	
				ICDGVQFGAGIR	-0,156	0	
Electrogenic aspartate/glutamate antiporter SLC25A12, mitochondrial	Q8BH59	Slc25a12	375,435,487,505,563	NSFDCFK	0,444	0	4P5X
				DGSIPLPAEILAGGCAGGSQVIFTNPLEIVK	0,022	0	
				ACFLR	0,589	0	
				DIPFSAIYFPVYAHCK	1,011	0	
				AGQTTYSGVVDCFR	1,122	0	
D-glutamate cyclase, mitochondrial (EC 4.2.1.48)	Q8BH86	Dglucy	86,252	TICPQLQK	-0,767	0	
				APLAFASPPGCMVMVPK	1,056	0	

Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial (EC 4.2.1.17)	Q8BH95	Echs1	111, 225	TFQDCYSSK	-0,522	9,845	
				LVEEAIQCAEK	0,667	10,433	
Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial (EC 6.1.1.5)	Q8BIJ6	Iars2	1002	HTSETADALCPR	-0,078	0	8C9G
Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	Q8BKZ9	Pdhx	170,307	DVSAPPPVSKPPAPTQPSPQPQIPCPAR	-1,089	0	1ZY8
				STVPHAYATADC DLGAVLK	0,667	0	
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.12)	Q8BMF4	Dlat	162,163,290,483,581,613	ASALACLK	1,644		8PIU
				DVPVGSIICTVEKPDIEAFK	1,256		
				DVPLGAPLCIIVEK	1,367		
				ASALACLK			
				NFSAIINPPQACILAIGASEDK	1,489		
				GFDVASVMSVTLSCDHR	0,222		
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Q8BMS1	Hadha	97/110 , 145/156 , 349 ,470 , 550 ,747	SAVLISSKPGCFVAGADINMLSSCTTPQEATR	0,756	7,96	6DV2
				SPKPVVAAISGSLGGGLELAACQYR	0,767	11,783	

				ALMGLYNGQVLCKK	-0,6	11,528	
				EVESVTPEHCIFASNTSALPINQIAAVSK	-0,111	9,446	
				CLAPMMSEVMR	0,489	12	
				YESAYGTQFTPCQLLLDHANNSSK	0,822	6,905	
Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase, mitochondrial	Q8BMS4	Coq3	156	ILDVGCGGGLLTEPLGR	1,022	0	4KDC
Amine oxidase [flavin-containing] B (EC 1.4.3.21)	Q8BW75	Maob	26,365	LLHDCGLSVVLEAR	1,178	8,8	1OJA
				LCELYAK	-0,578	8,745	
Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.2.1.24)	Q8BWF0	Aldh5a1	81,260,328,330	LGTVADCGVPEAR	0,611	0	2W8N
				EVGEVLCTDPLVSK	1,022	11,73	
				NAGQTCVCSNR	-0,467	10,1	

				NAGQTCVCSNR	0,7	10,57	
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial (EC 2.3.1.16)	Q8BWT1	Acaa2	92/103/107,116,128,179, 287, 382	LCGSGFQSIVSGCQEICK	-0,444	5,88	4C2J
				GGKYAVGSACIGGGQGIALIIQNTA	0,989	12	
				DAEVVLCGGTESMSQSPYCVR	-0,589	10,967	
				YNISREDCDRYALQSQQR	-1,411	9,74	
				VVG YFVSGDPTIMGIGPVPAINGALK	0,678	10,477	
				YAVGSACIGGGQGIALIIQNTA	0,322	12	
von Willebrand factor A domain-containing protein 8	Q8CC88	Vwa8 Kiaa0564	161, 723,857	AGTAFYIDQCAVR	0,567	12	5C3C
				CEVVAGSLK	0,011	12	
				LGHILVVDEADKAPTNVTCILK	1,111	12	
Aflatoxin B1 aldehyde reductase	Q8CG76	Akr7a2 Afar Akr7a5	164,221	ACHQLHQEGK	-0,667		2C91

member 2 (EC 1.1.1.n11)				QVEAELLPCRHFGLR	0,433		
Complex I assembly factor ACAD9, mitochondrial	Q8JZN5	Acad9	183,275,617	LSSGEHIAAFCLTEPASGSDAASIQR	0,967	7,925	8PHE
				GSNTCEVHFENTR	-0,633	7,4	
				AYICAHPLDRAS	0,533	0	
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	Q8K2B3	Sdha	89,189,190,191,238, 266,287, 357,438/443,467/475,536,654	AAFGLSEAGFNTACLT	0,656	12	8DYYD
				CCCVADR	0,456	12	
				CCCVADR	-0,244	12	
				CCCVADR	0,033	11,06	
				GVIALCIEDGSIHR	0,989	10,62	
				TYFSCTSAHTSTGDGTAMVTR	-0,044	10,61	
				AGLPCQDLEFVQFHPTGIYGAGCLITEGCR	0,044	12	
				GCGPEK	-1,744	12	
				HVNGQDQIVPGLYACGEAACASVHGANR	1,0	12	
				ACALSIAESCRPGDKVPSIK	1,167	12	

				VGSVLQEGCEK	-1,344	10,03	
NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial (EC 2.3.1.-)	Q8K2C6	Sirt5 Sir2l5	124,166,181	EPNPGHLAIAQCEAR	-0,178	8,71	5BWL
				CTSCGTVAENYR	-0,744	4,815	
				SPICPALAGK	1,111	6,354	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q8K3J1	Ndufs8	119,123	LCEAICPAQAITIEAEPR	0,956	12	8OM1
					0,922	0	
				LCEAICPAQAITIEAEPR			

Presequence protease, mitochondrial (EC 3.4.24.-)	Q8K411	Pitrm1 Kiaa1104 Ntup1	736,741,780	YLLNCDNMR	-0,733	0	4L3T
				CSVNATPQQMPQAEKEVENFLR	-0,389	0	
				CSVNATPQQMPQAEK	-0,289	11,03	
NAD(P)H-hydrate epimerase (EC 5.1.99.6)	Q8K4Z3	Naxe Aibp Apoa1bp	152,277	RPNKPLFTGLVTQCQK	-0,222	0	2O8N
				YQLNLPSYPDTECVYR	-0,722	0	
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	Q8QZS1	Hibch	44,94,270,335	GCGGVITLNRPK	0,033	6,5	3BPT
				AFCAGGDIK	0,578	8,18	
				INSCFSANTVEQIIENLR	0,256	8,89	
				ITQACMEGHDFHEGVR	-0,956	11,53	
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial (EC 2.3.1.9)	Q8QZT1	Acat1	116,193,410	QATLGAGLPSTPCTTVNK	-0,578	10,507	
				IHMGNCAENTAK	-0,4	11,592	
				IVVHMAHALKPGEFGLASICNGGGGASALLIEK	0,322	12	
Solute carrier family 25	Q8VEM8	Slc25a3	63/71,86,131,232,272	YYALCGFGGVLSCGLTHTAVVPLDLVK	1,4	0	8HBV

member 3, mitochondria				CRMQVDPQKYK	0,133	0	
				GWAPTLIGYSMQGLCK	0,267	0	
				FACFER	0,167	9,01	
				IAGVFCAIVSHPADSVVSVLNK	1,733	8,88	
NADH- ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q91VD9	Ndufs1	64,75, 78,92,128/131/137, 176/179,367,463, 554, 564, 727	FCYHER	-1,056	11,82	6ZTQ
				LSVAGNCR	0,922	8,49	
				MCLVEIEK	0,878	6,96	
				VVAACAMPVMK	2,056	12	
				EGVMEFLLANHPLDCPICDQGGECDLQDQSMFGR	-0,044	10,88	
				CIQCTR	0,367	12	
				VSDNLCTEEIFPTEGAGTDLR	-0,122	8,68	
				HSFCEVLK	-0,178	0	
				MLFLLGADGGCITR	-1,056	12	
				DCFIVYQGHGADVGMADVILPGAAYTEK	0,022	7,93	
				AVTEGAQAVEEPSIC	0	0	

NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q91WD5	Ndufs2	332,347	YLCRVEEMR	-0,544	11,62	6ZTQ
				IIEQCLNK	-0,367		
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	Q91WS0	Cisd1 D10Ert2 14e Zcd1	72,83	VVHAFDMEDLGDKAVYCR	-0,111	3,685	3EW0
				KFPFCDGAHIK	0,633	1,692	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (NDUFV1) (EC 7.1.1.2)	Q91YT0	Ndufv1 125,142, 187,206,2 38/255,28 6,379,425	125,142, 187,206,238/255,286,379 ,425	YLVVNADEGEPGTCK	-1,233	11,7	6ZTQ
				LVEGCLVGGR	0,611	12	
				NACGSDYDFDVFVVR	-1,4	10,09	
				GAGAYICGEETALIESIEGK	0,133	11,04	
				LKPPFPADVGVFGCPTTVANVETVAVSPTICR	1,344	9,25	
				LFNISGHVNHPTVEEEMSVPLK	-1,422	11,2	
				LIEFYKHESCGQCTPCR	-0,967	7,46	

				QIEGHTICALGDGAAWPVQGLIR	0,489	12	
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	Q91ZA3	Pcca	107,394	MADEAVCVGPAPTSK	0,822	7,13	7YBU
				QEDIPISGWAVECR	0,189	12	
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	Q921G7	Etfdh	85/88,100,117,247,265,386,501,560,560/585/588,591	LQINAQNCVHCK	0,622	9,44	2GMH
				VCLVEK	1,011	0	
				AAQIGAHTLSGACLDPAAFK	0,6	0	
				VTVFAEGCHGLAK	-0,089	11,48	
				ASCDATYIGILK	-0,911	0	
				FCPAGVYEFVPLEQGDGFRLQINAQNCVHCK	1,367	0	
				DCTPIEYKPDGQISFDLLSSVALSGTNHEHDQPAHL TLK	-0,633	0	
				FCPAGVYEFVPLEQGDGFR	0	11,815	
				FCPAGVYEFVPLEQGDGFRLQINAQNCVHCK	-0,4222	0	
				TCDIKDPSQNINWVVEGGGGPAYNGM	-0,844	0	
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	Q924X2	Cpt1b	90,305,448,462,526,548,586,608	CLPER	-0,9		1NM8
				EEIKPVMALGMVPMCSYQMER	-0,022		

				ALLHGNCYNR	-1,333		
				SFTLISCK	-1,089		
				LPWDIPEQCR	-1,256		
				ALADDVELYCFQLPFGK	0,644		
				FCLTYEASMTR	0,122		
				SCTNESAAFVQAMMK	-0,589		
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	Q99JY0	Hadhb	336,436,459,747	ALMGLYNGQVLCKK	-1,144		6DV2
				FNIWGGSLSLGHPFGATGCR	1,156	12,483	
				DGGQYALVAACAAGGQGHAMIVEAYPK	1,067	9,095	
				KYESAYGTQFTPCQLLDHANNSSK		6,905	
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99KI0	Aco2	126,277/284,385,410,448,451,592	VAVPSTIHCDHLIEAQVGGEK	0,133		7ACN
				GGTGAIVEYHGPVDSISCTGMATICNMGAIEGATTS VFPYNHR	0,811		

				VGLIGSCTNSSYEDMGR	-0,144		
				CKSQFTITPGSEQIR	-0,456		
				DVGGIVLANACGPCIGQWDR	0,8		
				DVGGIVLANACGPCIGQWDR	-0,089		
				CTTDHISAAGPWLK	-1,033		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	Q99KR7	Ppif	81,103,156,202	ALCTGEKGFGYK	-0,589		2BIT
				VIPAFMCQAGDFTNHNGTGGR	0,689		
				HVGPGVLSMANAGPNTNGSQFFICTIK	0,922		
				IVITDCGQLS	0		
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Q99LC3	Ndufa10	67,112,183	VITVDGNICSGK	-1,044	10,63	6ZTQ
				HYPEAGIQYSSTTTGDGRPLDIEFSGSCSLEK	-0,122	9,03	

				QCVDHYNEIK	-1,856	12	
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Alpha-ETF)	Q99LC5	Etfa	53,53/60,53/60/68,68,109,155,	LGGEVSCLVAGTK	1,233	11,49	1EFV
				LGGEVSCLVAGTKCDK	-0,556	9,31	
				LGGEVSCLVAGTKC60DKVVQDLCK			
				VVQDLCK			
				QFSYTHICAGASAFGK	0,811	9,14	
				ECHDPSDR			
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (subunit beta)	Q99MN9	Pccb	202,293,367	NVTASGVIPQISLIMGPCAGGAVYSPALTDFTFMVK	1,044	11,97	7YBU
				ECHDPSDR	-1,511	12	
				TVGIVGNQPNVASGCLDINSSVK	0,4	10,17	

Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial (MCCase subunit alpha) (EC 6.4.1.4)	Q99MR8	Mcc	186,450,505	DQSDQCLR	-1,211		8XL6
				YCLHQYNIVGLR	-0,8		
				ESVCQAALGLILK	0,656		
Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial (EC 6.2.1.1)	Q99NB1	Acas2l	144,178,206,235	ELLETTCT	-0,611	8,55	5IFI
				VAIYMPVSPLAVAAMLACAR	1	10,8	

				CKAVITFNQGLRGGR	0,311	7,536	
				SC235PTVQHVLVAHR	-0,311	9,023	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	Q9CPP6	Ndufa5	17	TTGLVGLAVCDTPHER	-0,022	9	7B93
Glutathione S-transferase 3, mitochondrial (EC 2.5.1.-)	Q9CPU4	Mgst3	56	VEYPVMYSTDPENGHMFNCIQR	-0,133	8,967	6SSS
Glyoxalase domain-containing protein 4	Q9CPV4	Glod4	41,182,206,	HEEFEEGCK	-0,689	0	3ZI1
				ALLGYADNQCK	-1,256	9	
				IAFSCPQK		9	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	Q9CQ54	Ndufc2	40	LVYMGLLGYCTGLMDNMLR	0,633	9,935	6ZTQ
2,4-dienoyl-CoA reductase [(3E)-enoyl-CoA-producing],	Q9CQ62	Decr1	86, 116, 268	AMTTFLSTLGAQCVIASR	0,622	12	7UCW

mitochondrial (EC 1.3.1.124)				CDVRDPDMVHNTVLELIK	-0,511	11,96	
				IPCGR	-0,144	11,587	
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	Q9CQA3	Sdhb	70, 100/103/115,241/251/255	CGPMVLDALIK	0,756	9,07	8GS8
				EGICGSCAMNINGGNTLACTR	0,9	9,14	
				CHTIMNCTQTCPK	-0,6	11,24	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1	Q9CQJ8	Ndufb9	4,31,42	MAFCAPPAYLTHQQK	0,9	0	6ZTQ

beta subcomplex subunit 9				HLESWCIHR	-1,478	7,63	
				YFACLMR	0,478	11,41	
Acyl carrier protein, mitochondrial	Q9CR21	Ndufab1	140	LMCPQEIVDYIADK	0,489	9	6ZTQ
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	Q9CR61	Ndufb7	59,80,90	DYCAHYLIR	-0,133	12	8J1N
				DSFPNFLACK	-0,711	12	
				HEQHDWDYCEHLDYVK	-1,211	12	
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (OGCP) (alpha-oxoglutarate carrier)	Q9CR62	Slc25a11	184	GCIPTMAR	0,289	8,83	8HBV

MICOS complex subunit Mic19	Q9CRB9	Chchd3	183,193	YEYHPVCADLQTK	-0,022	0	
				ILQCYR	-0,689	0	
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta (EC 3.4.24.64)	Q9CXT8	Pmpcb	79,265,389,481	VASENSGLSTCTVGLWIDAGSR	1,2	9	3TGU
				FHFGDSLCSHK	-0,5	6,11	
				LCTDVTSEVAR	-0,7	12	
				LPDFNQICSNMR	-0,867	0	
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Q9CZ13	Uqcrc1	51,69,268,380,410,445/453,453	ERLELCDNR	0,011	12	8IB7
				VASEQSSHATCTVGVWIDAGSR	0,756	12	
				VYEEDAVPGLTPCR	0,044	0	
				LCTSATESEVTR	-0,022	12	
				NALVSHLDGTTPVCEDIGR	-0.033	0	
				DICSKYFYDQCPAVAGYGPIEQLPDYNR	-0,611	12	
				YFYDQCPAVAGYGPIEQLPDYNR			

Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	Q9CZB0	Sdhc	70,107	WSLPMALSVCHR	0,044	9,07	8GS8
				SLCLGPTLIYSAK	0,722	8,01	
Elongation factor Ts, mitochondrial	Q9CZR8	Tsfm	63,148,239,314	TGYSFVNCK	0,033	12	2CP9
				FQQLVQQVALGTMAHCQNLTDR	-0,489	12	
				YGALVICETPEQIANLEEVGR	0,244	12	
				FECGEDEQVAEAE	-1,9	12	
Citrate synthase, mitochondrial (EC 2.3.3.1)	Q9CZU6	Cs	101,211,359	GYSIPECQK	-0,156	9,765	8ZVV
				LPCVAAK	1,022	9,77	
				YSCQR	-1,222	10,535	
Pyruvate dehydrogenase	Q9D051	Pdhb	41,249,263,306	CDLHRLEEGPPVTTVLTR	-1,078		2OZL

E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B) (EC 1.2.4.1)				SRPVGHCLEAAVLSK	0,978	10,97	
				EGIECEVINLR	0,956	10,97	
				TNHLVTVEGGWPQFGVGAEICAR	0,611	10,97	
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial (SCOT) (EC 2.8.3.5)	Q9D0K2	Oxct1	235,456,504	NFNLP MCK	0,578	12	3DLX
				CTLPLTGK	0,178	10,722	
				STGCDFAVSPNLM PMQQIST	0,567	9,842	
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (EC 7.1.1.8) (Complex III subunit 4)	Q9D0M3	Cyc1	139,160,219	HLVGVCYTEEEAK	-0,222	8,64	8PW6

				HGGEDYVFSLLTGYCEPPTGVSLR	-1,3	11,175	
				ARHGGEDYVFSLLTGYCEPPTGVSLR	-0,856	10,03	
Adenosine 5'-monophosphorimidase HINT2 (EC 3.9.1.-)	Q9D0S9	Hint2	75	SLPADILYEDQQCLVFR	-0,578	6,48	4INC
Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3, mitochondrial	Q9D172	Gatd3	151, 174/175,174, 219,242	NLSTFAVDGKDCK	-1,767	0	1VHQ
				EFHGAKKPIGLCCIPVLA AK	2,344	0	
				KPIGLCCIPVLA AK	2,422	9	
				HCVKGVTEAHVDQK	0,067	0	
				VVTTPAFMCETALHHIHDGIGAMVK	0,8	0	
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex,	Q9D2G2	Dlst	246	EAQNTCAMLTTFNEVDM SNIQEMR	0,1		6H05

mitochondrial (EC 2.3.1.61)							
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q9D6J6	Ndufv2	134,134/139,223,223/224	YHIQVCTTTPCMLR	0,722	0	6ZTQ
				YHIQVCTTTPCMLR	-0,4	0	
				FCCEPAGGLTSLTEPPKGPFGVQAGL	-0,089	0	
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (EC 1.1.1.41)	Q9D6R2	Idh3a	127,222,273/281, 331,351,359,351/359	TFDLYANVRPCVSIEGYK	0,511	9	6L59
				CREVAENCK	-0,744	11,885	
				CSDFTTEEICRR	0,567	11,91	
				IEAACFATIK	0,789	11,91	
				CSDFTTEEICR	1,7	0	
				DLGGNAKCSDFTTEEICRR			
				CSDFTTEEICR	-1,356	9	

Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.8.5)	Q9D7B6	Acad8	249,281	AVIFEDCAVPVANR	0,967	8,61	1RX0
				INVASCSLGAAHASVILTQEHLK	1,544	11,77	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	Q9D8B4	Ndufa11	17,18,66,86,95,97	TTGLVGLAVCDTPHERLTILYTK	-1,989	0	6ZTQ
				FFESYHEVPDGTQCHR	-1,744	8,53	
				LVNGCALNFFR	1,733	8,73	
				MGSQVIIPYRCDVYDIMHLR	-1,367	9,74	
				EKPDDPLNYFIGGCAGGLTLGAR	1,144	12	
				EKPDDPLNYFIGGCAGGLTLGAR	1,067	0	
ATP synthase subunit O, mitochondrial	Q9DB20	Atp5po	141	GEVPCTVTTASPLDDAVLSELK	0,611		8H9S
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Q9DB77	Uqcrc2	192	NALANPLYCPDYR	-0,622	9,1856ZTQ	8IOG
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex	Q9DC69	Ndufa9	86	CDVYDIMHLR	-0,05	10,015	6ZTQ

subunit 9, mitochondrial							
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial (EC 7.1.1.2)	Q9DC70	Ndufs7	164,194	YVSMGSCANGGGYYHYSYSVVR	0,033	12	6ZTQ
				IVPVDIYVPGCPPTAEALLYGILQLQR	-0,1	10,37	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	Q9DCJ5	Ndufa8	36,66,110	LVNGCALNFFR	-1,389	10,95	6ZTQ
				AAAHHYGAQCDK	1,278	8,73	
				FDQCVLDK	-0,556	12	

NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Q9DCS9	Ndufb10	77,84,125	RVPDITECK	-1,333	0	6ZTQ
				EGDVLCIYEAEQWR	0,9	0	
				EGDVLCIYEAEQWR	-1,233	11,7	
Electron transfer flavoprotein subunit beta (Beta-ETF)	Q9DCW4	Etfb	42,66,71,131	HSMNPFCEIAVEEAVR	1,011	6,83	1EFV
				EIIAVSCGPSQCQETIR	0,656	8,9	
				EIIAVSCGPSQCQETIR	-0,778	6,68	
				QAIDDDCNQTGQMTAGLLDWPQGTFASQVTLEGDK VK	-1,289	10,776	
ATP synthase subunit d, mitochondrial	Q9DCX2	Atp5pd Atp5h	101	SCAEFVSGSQLR	0,422	8,95	2CLY

Methylmalonate - semialdehyde/malonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial (MMSDH) (EC 1.2.1.27)	Q9EQ20	Aldh6a1	86,149,249,317,368,413,	VPQSTKAEMDAAVESCKR	0,044	0	8XXQ
				GLQVVEHACSVTSLMLGETMPSITK	0,411	9,38	
				LLQDSGAPDGTLNIIHGQHDAVNFCIDHPDIK	-0,144	9	
				CMALSTAILVGEAK	0,289	0	
				VCNLIDSGTK	-0,433	9	
				GYENGNFVGPTIISNVKPSMTCYK	-1,211	99	
Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Q9JHI5	Ivd	134,252/259, 348,	ASGAVGLSYGAHSNLCVNQIVR	0,878	10,78	9JQ3

(IVD) (EC 1.3.8.4)				GSNTCELVFEDCK	0,144	9,17	
				ACDEGHIIPK	0,067	9,52	
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial (EC 2.7.11.2)	Q9JK42	Pdk2	45,392	QFLDFGSSNACEK	-0,678	8,9	4MPC
				HYQTIQEAGDWCVPSTEPK	-0,522	9	
Electrogenic aspartate/glutamate antiporter SLC25A13, mitochondrial	Q9QXX4	Slc25a13	201,378,490,504,566	DIMVTIRPHVLTPFVEECLVAAAGGTR	1,456	9,035	4P5W
				NSFDCFK	0,444	0	
				ACFLR	0,589	0	
				DIPFSAIYFPCYAHVK	0	0	
				AGQTTYNGVTDCFR	0,578	0	

Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial (EC 6.2.1.4)	Q9WUM5	SucIgl1	60,172/181	IICQGFTGK	0,567	0	6WCV
				LIGPNCPGVINPGECK	0,911	0	
Enoyl-CoA delta isomerase 2 (EC 5.3.3.8) pECI)	Q9WUR2	Eci2	246,279,332,365	ATFHTPFSQLGQSPEACSSYTFPK	1,667	11,243	4U19
				ATFHTPFSQLGQSPEACSSYTFPK	-0,578	7,386	
				LYAVNAEECTTLQAR	-1,144	9,337	
				LYAVNAEECTTLQAR	-0,811	9,126	
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial (EC 1.6.99.-)	Q9Z0X1	Aifm1	255,316	SITVIGGGFLGSELACALGR	0,733	12	5KVI

				CLIATGGTPR	0,5	12	
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	Q9Z1P6	Ndufa7	55	LSNNYYCTR	-1,8	7,86	6ZTQ
Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial (EC 6.2.1.5)	Q9Z2I9	SucLa2	152,158,270,320,384,430	ICNQVLCER	0,811	9	6G4Q
				ICNQVLCER	-0,011	9	
				VLCMDAK	0,822	8,89	
				EAANADINYIGLDGSIGCLVNGAGLAMATMDIHK	1,3	9	
				CDVIAQGIVMAVK	0,878	0	
				ILACDDLDEAAK	0,267	9	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Primary Sequence motifs

Πίνακας 1. Πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση γραμμικών μοτίβων.

Sample_number	Peptide_sequence	Protein_accession_numbers
1	LCEHKYGNAPR	O55028
1	IGSINPNCDVVEVIK	Q8BFP9
1	YENARRLCDLYYVNS	Q8BFP9
1	DFGSSNACEKTSFTF	Q9JK42
1	IQEAGDWCVSTEPK	Q9JK42
1	IRLALGGCTNRPFYR	Q9CPX7
1	IVAAHNKCPRDGRFV	Q9CPX7
1	MFHLRTCAAKLRPL	Q60597
1	KRFGLEGCEVLIPAL	Q60597
1	KELEQIFCQFDSKLE	Q60597
1	TKAEQFYCGDTEGKK	Q60597
1	PEAVMYVCKVAAEWR	Q60597
1	DVVVDLVCYRRNGHN	Q60597
1	ISKYDKICEEAFTRS	Q60597
1	GQPRSMTCPSTGLEE	Q60597
1	CNWIVVNCSTPGNFF	Q60597
1	KVKRLLFCTGKVYYD	Q60597
1	AFGGVFRCTVGLRDK	Q6P3A8
1	CIEDKNPCIFFEPKI	Q6P3A8
1	PWDVDTVCKSVIKTG	Q6P3A8
1	KPAINPRCLPPPPKP	Q3TBW2
1	VGLGRNKCLYALEEG	Q99N92
1	TVKFLRSCHLEVGMK	Q99N94
1	YDVFPDVCKEFKEAG	Q99L13
1	VLLERRGCGGVITIN	Q8QZS1
1	GAGGKAFCAGGDIKA	Q8QZS1
1	HMDKINSCFSANTVE	Q8QZS1
1	EYRITQACMEGHDFH	Q8QZS1
1	ALTLNRLCGSGFQSI	Q8BWT1
1	FQSIVSGCQEICKSD	Q8BWT1
1	VSGCQEICKDAEVV	Q8BWT1
1	KDAEVVLCGGTESMS	Q8BWT1
1	SMSQSPYCVNRVRF	Q8BWT1
1	YNISREDCDRYALQS	Q8BWT1
1	VGYFVSGCDPTIMGI	Q8BWT1
1	KYAVGSACIGGGQGI	Q8BWT1
1	MDKVCVAVFGGSR	Q91VT4
1	GNHLAFRCDDVAKEQD	Q91VT4
1	DEYKNIPCSVAAYVP	Q9D404
1	NPDPKLACRPFHPR	Q9D404
1	GKEGAMACTVAVEES	P97478
1	KRIIQAGCSAAIYLS	P97478
1	GLPISTPCTTVNKVC	Q8QZT1
1	CTTVNKCASGMKAI	Q8QZT1
1	NKIHMGNCAENTAKK	Q8QZT1
1	EFGLASICNGGGGAS	Q8QZT1

1	RNSLPSSCQRPPRNP	E9Q4Z2
1	RELLETTCTRLANTIK	Q99NB1
1	AVAAMLACARIGAIH	Q99NB1
1	GRINDAKCKAVITFN	Q99NB1
1	VDEAVKSCPTVQHVL	Q99NB1
1	AVPSTIHCDHLIEAQ	Q99KI0
1	PGVDSISCTGMATIC	Q99KI0
1	CTGMATICNMGAIEG	Q99KI0
1	RVGLIGSCTNSSYED	Q99KI0
1	ALAHGLKCKSQFTIT	Q99KI0
1	GIVLANACGPCIGQW	Q99KI0
1	LANACGPCIGQWDRK	Q99KI0
1	LIKVKGKCTTDHISA	Q99KI0
1	IDAEKLMCPQEIVDY	Q9CR21
1	SGAGNPKCKIAIVLG	Q80XL6
1	AAPEKLICEMKVEEQ	Q9CQR4
1	ISTMALMCTERGAPG	Q9CQR4
1	VEPEGRSCWDEPLSI	Q9QYR9
1	AKSFTSSCPVSAFVP	Q8R0F8
1	LAENFCVCHLATGDM	Q9WTP6
1	AAGATSLCFVYPLDF	P51881
1	EFKGLGDCLVKIYKS	P51881
1	MYTGTLDCWRKIARD	P51881
1	GGGGVDGCIHRAAGS	Q922B1
1	GSLTDECRTLQNC	Q922B1
1	ECRTLQNCETGKAKI	Q922B1
1	QAAELRSCYLSSLDL	Q922B1
1	TDRSRLGCQVCLTKA	P46656
1	SRLGCQVCLTKAMDN	P46656
1	LARKNAPCILFIDEI	Q8JZQ2
1	PSTGEVICQVAEGNK	P47738
1	QEGAKLLCGGGAAAD	P47738
1	AAKLLHDCGLSWVLE	Q8BW75
1	EERLRKLCELYAKVL	Q8BW75
1	SQITFEKCLIATGGT	Q9Z0X1
1	FLGSELACALGRKSQ	Q9Z0X1
1	IGGLAEFCKASAELA	P05202
1	RYYDPKTCGFDFSGA	P05202
1	SVLLHACAHNPTGV	P05202
1	IEQGINVCLCQSYAK	P05202
1	QGINVCLCQSYAKNM	P05202
1	VGAFTVVCKDAEEAK	P05202
1	TDQIGMFCFTGLKPE	P05202
1	EKEDVKSCAEFVSGS	Q9DCX2
1	YIRFSQICAKAVRDA	P56382
1	VSSDRGLCGAIHSSV	Q91VR2
1	MALRACGLIIFRR	P56380
1	LRSARRLCLPDFDKQ	O35855
1	DKQELLECIQRLIEV	O35855
1	VFGSGTACQVCPVHQ	O35855
1	SGTACQVCPVHQILY	O35855
1	MYKNSFDCFKKVIRY	Q8BH59
1	AEILAGGCAGGSQVI	Q8BH59
1	LYKGAKACFLRDIPF	Q8BH59
1	YFPVYAHCKLLLADE	Q8BH59
1	TYSGVVDCFRKILRE	Q8BH59
1	LTPFVEECLVAAAGG	Q9QXX4
1	MYKNSFDCFKKVLRV	Q9QXX4

1	IYKGAKACFLRDIPF	Q9QXX4
1	FSAIYFPCYAHVKAS	Q9QXX4
1	TYNGVTDCFRKILRE	Q9QXX4
1	GGQTALNCGVELFKR	Q8C196
1	VSGKTSACFEPSLDY	Q8C196
1	FQKALRMCHPSVDGF	Q8C196
1	SDKQISKCLGLTEAQ	Q8C196
1	NDVLVIECNLRASRS	Q8C196
1	FLGGQPLCMNQYYQI	P47934
1	YYQILSSCRVPGPKQ	P47934
1	QKSIFTVCLDKQVPR	P47934
1	IVAEDGSCGMVYEHA	P47934
1	YRIYGQACATYESAS	P47934
1	FRKTEVLCKDFENGI	P52825
1	KVDSAVFCLCLDDFP	P52825
1	DSAVFCLCLDDFPMK	P52825
1	TVATYESCSTAAFKH	P52825
1	ASIFTKRCSEAFVRE	P52825
1	LQHMMAECSKYHGQL	P52825
1	NAREFLHCVQKCLED	P52825
1	FLHCVQKCLEDMFDA	P52825
1	RSKNQPFCDGSHFFQ	B1AR13
1	IPSLKVDCAVLDCED	Q8R4N0
1	VDCAVLDCEDGVAEN	Q8R4N0
1	RGYSIPECQKMLPKA	Q9CZU6
1	DLIAKLPCVAAKIY	Q9CZU6
1	KTDPRYSCQREFALK	Q9CZU6
1	GEHIAAFCLTEPASG	Q8JZN5
1	GIRGSNTCEVHFENT	Q8JZN5
1	LEKRAYICAHPLDRAS	Q8JZN5
1	EELQKIQCMLQDVG	Q9D273
1	DLRKHNNCMAECLTP	Q6P8J7
1	HNNCMAECLTPTIYA	Q6P8J7
1	SGYTLDQCIQTGVND	Q6P8J7
1	GLSLPPACSRAERRE	Q6P8J7
1	PVSPLLCAGMARDW	Q6P8J7
1	KRVFERFCRGLKEVE	Q6P8J7
1	RLGYILTCPSNLGTG	Q6P8J7
1	GVNYLVDCEKKLERG	Q6P8J7
1	EQSSHATCTVGVWID	Q9CZ13
1	AVPGLTPCRFTGSEI	Q9CZ13
1	QGQWMRLCTSATESE	Q9CZ13
1	LDGTTVPVCEDIGRSL	Q9CZ13
1	AQMLRDICSKYFYDQ	Q9CZ13
1	SKYFYDQCPAVAGYG	Q9CZ13
1	ALANPLYCPDYRMGK	Q9DB77
1	ARERLELCDNRVSSR	P99028
1	RSQTEEDCTEELFDF	P99028
1	DVKRPFLCRESLSGQ	Q9CR68
1	LDVENTPCARESILY	Q9D7J4
1	NLEWLHGCPPPYHTF	P00397
1	PGLFYGQCSEICGSN	P00405
1	YGQCSEICGSNHSFM	P00405
1	IDAALRACRRLNDFA	P12787
1	NQNQTKNCWQNYLDF	P56391
1	KGGDVSVCWYRRVY	P56391
1	RRVYKSLCPVSWVSA	P56391
1	KKIFVQKCAQCHTVE	P62897

1	FVQKCAQCHTVEKGG	P62897
1	YRHLVGVCYTEEEAK	Q9D0M3
1	FSLLTGYCEPPTGVS	Q9D0M3
1	RTIQLNVCNSEEVEK	Q80XN0
1	GIEAFSDCLRYEMHP	Q80XN0
1	IAKMETYCNSGSTDT	Q80XN0
1	FWRELVECFQKISKD	O35459
1	SACDIRYCTQDAFFQ	O35459
1	FEYGGQKCSACSRLY	Q8CHT0
1	GGQKCSACSRLYVPK	Q8CHT0
1	VSDIRTICPQLQKYK	Q8BH86
1	AFASPPGCMVMVPKD	Q8BH86
1	VPVGSIIICITVEKPQ	Q8BMF4
1	VPLGAPLCHIVEKQE	Q8BMF4
1	IKASALACLKVPEAN	Q8BMF4
1	IINPPQACILAIGAS	Q8BMF4
1	VMSVTLSCDHRVVDG	Q8BMF4
1	RGALGSRVCQAFRAR	Q8BVI4
1	DVTVPQLQCLVKDSKL	Q5U458
1	LPGFYDPCVGEEKSL	Q5U458
1	RLGGEVSCLVAGTKC	Q99LC5
1	CLVAGTKCDKVVDL	Q99LC5
1	DKVVQDLCKVAGVAK	Q99LC5
1	QFSYTHICAGASAFG	Q99LC5
1	IYAGNALCTVKCDEK	Q99LC5
1	KHSMNPFCEIAVEEA	Q9DCW4
1	KEIIAVSCGPSQCQE	Q9DCW4
1	VSCGPSQCQETIRTA	Q9DCW4
1	KQAIDDDCNQTGQMT	Q9DCW4
1	QGKDIRVCLVEKAAQ	Q921G7
1	AHTLSGACLDPAAFK	Q921G7
1	VTVFAEGCHGHLAKQ	Q921G7
1	KFDLRASCDAAQTYGI	Q921G7
1	PGLLIGCSPGEMNV	Q921G7
1	QLKPAKDCTPIEYPK	Q921G7
1	DGPEQRFCPAGVYEF	Q921G7
1	LQINAQNCVHCKTCD	Q921G7
1	NAQNCVHCKTCDIKD	Q921G7
1	NCVHCKTCDIKDPSQN	Q921G7
1	EKGFLDACEKGPLSG	Q8K0D5
1	TGYSFVNCKKALET	Q9CZR8
1	ALGTMAHCQNLTDRL	Q9CZR8
1	KYGALVICETPEQIA	Q9CZR8
1	VDFVRFECGEDEQVA	Q9CZR8
1	RHYAHTDCPGHADYV	Q8BFR5
1	GTAPLDGCILVVAAN	Q8BFR5
1	VIVGSALCALEQRDP	Q8BFR5
1	ILKKGDECELLGHNK	Q8BFR5
1	TYQNVYVCTGPLFLP	O08600
1	RVVRVLGCNPGPMTL	Q99KR3
1	VNSLSLECLTEFTIS	P42125
1	GVILTSECPGIFSAG	P42125
1	LGQSPEAC279SSYTFFK	Q9WUR2
1	YAVNAEEC365TTLQARW	Q9WUR2
1	QNRTFQDCYSSKFLS	Q8BH95
1	LVEEAIQCAEKIASN	Q8BH95
1	SVSFTDNCVVGIIQAN	P97807
1	GLNYADHCQEQNVRV	Q3TC72

1	GKTFDTFCPLGPALV	Q3TC72
1	KKGDEVQCEIEELGV	Q3TC72
1	FAVDGKDCKVNKEVE	Q9D172
1	AKKPIGLCCIAPVLA	Q9D172
1	KKPIGLCCIAPVLA	Q9D172
1	KALGAKHCVKGVTEA	Q9D172
1	VTTAFMCETALHHI	Q9D172
1	GTPEQPQCGFSNAV	Q80Y14
1	PTIKGYGCAGVSSVA	Q60759
1	AKGELLGCFGLTEPN	Q60759
1	IENTDAACKYGAFGL	Q9DCM2
1	HEEFEEGCKAACNGP	Q9CPV4
1	LGYADNQCKLELQGI	Q9CPV4
1	FGRIAFSCPQKELPD	Q9CPV4
1	KLRHKLVCQGVLPE	Q9CQN1
1	TRNIYYLCAPNRHLA	Q9CQN1
1	ILYEDQQCLVFRDVA	Q9D0S9
1	FVEKTLSCSTSTDA	Q61425
1	FESLVDFCKTLGKHP	Q61425
1	LGKHPVSCDTPGFI	Q61425
1	PPDTKVYCGHEYTVN	Q99KB8
1	FTRKNANCSIEESFQ	P38060
1	LEAGDFICQALNRKT	P38060
1	SKVAQATCKL	P38060
1	NTGKLAGCTVFITGA	Q2TPA8
1	AGGTALPCVVDVRDE	Q2TPA8
1	GSGVENQCRKVDIIA	Q2TPA8
1	DIPLKADCKEEHDIP	Q91VM9
1	LQVEGGGCSGFQYKF	Q9DCB8
1	NPQAQQGCSCGSSFS	Q9DCB8
1	GLVGAPACGDVMKLQ	Q9D7P6
1	LPPVKLHCSMLAEDA	Q9D7P6
1	RAVIFEDCAVPVANR	Q9D7B6
1	GRINVASCSLGAHA	Q9D7B6
1	IRPVSKTCFSMVPAL	P85094
1	GQSPLTSC	P85094
1	LYANVRPCVSIEGYK	Q9D6R2
1	CREVAENCKDIKFNE	Q9D6R2
1	AAKIEAACFATIKDG	Q9D6R2
1	DLGGNAKCSDFTTEEI	Q9D6R2
1	SDFTEEICRRVKDLD	Q9D6R2
1	KSVFRHACVPVDFEE	P70404
1	LYANVIHCKSLPGVV	P70404
1	GDGLFLQCCREVAAH	P70404
1	DGLFLQCCREVAAHY	P70404
1	TATLLASCMMMLDHLK	P70404
1	KYSVAVKCATITPDE	P54071
1	VFREPIICKNIPRLV	P54071
1	ISGFAHSCFQYSIQK	P54071
1	SGGFVWACKNYDGDV	P54071
1	LMTSVLVCPDGKTIE	P54071
1	AQTLEKVCVQTVESG	P54071
1	MTKDLAGCIHGLSNV	P54071
1	SETADALCPRCAEVI	Q8BIJ6
1	YGAHSNLCVNQIVRN	Q9JHI5
1	GMRGSNTCELVFEDC	Q9JHI5
1	CELVFEDCKVPAANV	Q9JHI5
1	VYNVAKACDEGHIIP	Q9JHI5

1	AIPVSAFCDSKSKPH	Q71RI9
1	NASVDENCQNITYKA	P53395
1	STQGKILCFHGPPGV	Q8CGK3
1	VPQARTLCGLDESKA	Q8CGK3
1	EEQAYSNCTGPGFSL	P51174
1	PQMTAGKCIGAIAMT	P51174
1	AELAISACEFMFEET	P51174
1	AELKTHICVTRAFVD	P51174
1	QNSVAYECVQLHGGW	P51174
1	TRAFVDSCLQLHETK	P51174
1	GPEQLPDCLKGCDVV	P08249
1	LPDCLKGCDVVVIPA	P08249
1	IIP LISQCTPKVD FP	P08249
1	GKEGVVECSFVQSKE	P08249
1	VQSKETECTYFSTPL	P08249
1	GPRGRRICGGLAASA	Q99J39
1	PAPAEGQCADFVSFY	Q99J39
1	VLQKISECEAVHPVK	Q99J39
1	VSGGFHTCLMEPAVD	Q8R3F5
1	VQAFLQMC51NLPVKVV	O88441
1	RLDTS LGCPRMEVVC	Q78J03
1	KPTGQRFCINSVALK	Q78J03
1	GRVSGVECMIVANDA	Q3ULD5
1	ALQNRLPCIYLVDSG	Q3ULD5
1	LGGADLHCRKSGVTD	Q3ULD5
1	KMVA AVACAKVPKIT	Q3ULD5
1	GAGNYGMCGRAYSPR	Q3ULD5
1	SEVPGIFCAGADLKE	Q9JLZ3
1	MDAAVESCKRAFFAW	Q9EQ20
1	LQVVEHACSVTSLML	Q9EQ20
1	HDAVN FICDHPDIKA	Q9EQ20
1	FGAAGQRCMALSTAI	Q9EQ20
1	PQAKERVCNLIDSGT	Q9EQ20
1	NVKPSMTCYKEE IFG	Q9EQ20
1	IFLHPKDCGGVLVEL	Q9D1I5
1	VDAARARCTVGEITD	P16332
1	LGRKWDRCMADTVVK	Q7TNS2
1	YQFSQYVCQQTGLEM	Q8R404
1	RYEYHPVCADLQTKI	Q9CRB9
1	LQTKILQCYRQNTQQ	Q9CRB9
1	ATLGATVCYPAQSVI	Q78IK4
1	VEAIRVNCSDNEFTQ	Q8CAQ8
1	LLSYASYCIEHGDLE	Q8CAQ8
1	VPTLWRGCIPTMARA	Q9CR62
1	ERMVFGACAGLIGQS	Q8R0Y8
1	TNLPLKPCPRASFET	Q9CWE0
1	ASLYQARCRYLQPRW	Q8BGX2
1	RPQLVALCKLLELQS	Q9Z2I0
1	LEKHGGICDCQTSRD	Q9DC61
1	KHGGICDCQTSRDTT	Q9DC61
1	ENSGLSTCTVGLWID	Q9CXT8
1	FHFGDSLCSHKGAI P	Q9CXT8
1	GHLAIAQCEARLRDQ	Q8K2C6
1	GTLFKTRCTSCGTVA	Q8K2C6
1	ENYRSPICPALAGKG	Q8K2C6
1	ITVDGNICSGKNKLA	Q99LC3
1	DIEFSGSCSLEKFYD	Q99LC3
1	QGYIRKQCVDHYNEI	Q99LC3

1	EWHRWLHCMTDDPPT	Q7TMF3
1	GLVGLAVCDTPHERL	Q9CPP6
1	KLSNNYYCTRDGRRE	Q9Z1P6
1	AHHYGAQCDKTNKEF	Q9DCJ5
1	EGKLVNGCALNFFRQ	Q9DCJ5
1	QQAQFDQCVLDKLGW	Q9DCJ5
1	QVIIPYRCDVYDIMH	Q9DC69
1	RVPDITECKEGDVLC	Q9DCS9
1	CKEGDVLCIYEAMQ	Q9DCS9
1	GENYQQNCAKELEQF	Q9DCS9
1	TLQQRDYCAHYLRL	Q9CR61
1	FPNFLACKHEQHDW	Q9CR61
1	EQHDWDYCEHLDYVK	Q9CR61
1	MAFCAPPAYLT	Q9CQJ8
1	LRHLESWCIHRDKYR	Q9CQJ8
1	DKYRYFACLMRARFE	Q9CQJ8
1	DEGEPGTCKDREIMR	Q91YT0
1	PHKLVEGCLVGGRAM	Q91YT0
1	GLIGKNACGSDYDFD	Q91YT0
1	RGAGAYICGEETALI	Q91YT0
1	ADVGVFGCPTTVANV	Q91YT0
1	VAVSPTICRRGGTWF	Q91YT0
1	SGHVNHPCTVEEEMS	Q91YT0
1	EFYKHESCGQCTPCR	Q91YT0
1	QIEGHTICALGDGAA	Q91YT0
1	GKYHIQVCTTTPCML	Q9D6J6
1	QVCTTTPCMLRDSDS	Q9D6J6
1	GPRSGRFCCEPAGGL	Q9D6J6
1	PRSGRFCCEPAGGLT	Q9D6J6
1	DCYDRYLCRVEEMRQ	Q91WD5
1	SLRIEQCLNKMPPG	Q91WD5
1	FEKEWIECAHGIGGT	Q99LY9
1	EFDDFEECLLRYKTM	Q99LY9
1	VEHRIIACDGGGGAL	P52503
1	KETKTGTCGYCGLQF	P52503
1	KTGTCGYCGLQFKQH	P52503
1	YVVSMGSCANGGGYY	Q9DC70
1	VDIYVPGCPPTAEAL	Q9DC70
1	RCIACKLCEAICPAQ	Q8K3J1
1	CKLCEAICPAQAITI	Q8K3J1
1	GMQIPRFCYHERLSV	Q91VD9
1	RLSVAGNCRMCLVEI	Q91VD9
1	VAGNCRMCLVEIEKA	Q91VD9
1	APKVVAACAMPVMKG	Q91VD9
1	LANHPLDCPICDQGG	Q91VD9
1	HPLDCPICDQGGECD	Q91VD9
1	ICDQGGECDLQDQSM	Q91VD9
1	VKTIMTRCIQCTRCI	Q91VD9
1	IMTRCIQCTRCIRFA	Q91VD9
1	KVDSNLCTEEIIFT	Q91VD9
1	ASGRHSFCEVLKDAK	Q91VD9
1	LLGADGGCITRQDLP	Q91VD9
1	RQDLPKDCFIVYQGH	Q91VD9
1	AVEEPSIC	Q91VD9
1	EKANPYECGFDPTSS	P03899
1	FKAMLFMCSGSIHS	P03921
1	LGLGDLGCGYGMGIPV	Q8BMF3
1	AECTAEKCYRVTEGR	Q8BMF3

1	QTARSDRCAFQGNVV	Q61578
1	VNVPGLYCSGWVKRG	Q61578
1	LQGSCTSCPSSIITL	Q9QZ23
1	AAVLVPLCLVRGVPA	Q9CR24
1	GAVSQGHCHPKIIDA	P29758
1	VEAGETACKLARRWG	P29758
1	VMAAAKVCEITHESP	Q8VE38
1	AVWVHNKCTLDSEVA	Q8VE38
1	EFPEKISCSFHVTKQ	Q8VE38
1	TDEHGEVCPAGWKPG	Q61171
1	KLGLGLCNTLAIEG	P51660
1	GRKNNIHCNTIAPNA	P51660
1	QMFEPKSCTYTYLLG	Q9DCM0
1	LRSLLPGCQSVISRL	Q9DCM0
1	SMKYIALCGFGGVLS	Q8VEM8
1	GFGGVLSCGLTHTAV	Q8VEM8
1	VPLDLVKCRMQVDPQ	Q8VEM8
1	GYSMQGLCKFGFYEV	Q8VEM8
1	YTMMKFACFERTVEA	Q8VEM8
1	GYIAGVFCAIVSHPA	Q8VEM8
1	LNCNMRCSVNATPQ	Q8K411
1	Cys-736(Leu)	Q8K411
1	Cys-741(Ser)	Q8K411
1	ILTRVFGCNVVMAMS	Q8BYM8
1	SSTVTLRCVVDELVR	Q8BYM8
1	RQPLLEACDTRLQDL	Q8BYM8
1	ALALGGTCTGEHGIG	Q7TNG8
1	KMADEAVCVGPAPTS	Q91ZA3
1	ISGWAVECRVYAEDP	Q91ZA3
1	ISLIMGPCAGGAVYS	Q99MN9
1	DPAPIRECHDPSDRL	Q99MN9
1	QPNVASGCLDINSSV	Q99MN9
1	ATFEIKKCDLHRLEE	P35486
1	QKIIRGFC1HLCDGQE	P35486
1	IRGFCHLCDGQEACC	P35486
1	LCDGQEACCVGLEAG	P35486
1	CDGQEACCVGLEAGI	P35486
1	GAGIALACKYNGKDE	P35486
1	AALWKLPCIFICENN	P35486
1	KLPCIFICENNRYGM	P35486
1	VDGMDILCVREATKF	P35486
1	TKFAAAAYCRSGKGPI	P35486
1	VNGMDILCVREATKF	P35487
1	HSRPVGHCLEAAAVL	Q9D051
1	LSKEGIECEVINLRT	Q9D051
1	FGVGAEICARIMEGP	Q9D051
1	SPQPQIPCPARKEHK	Q8BKZ9
1	HAYATADC DLGAVLK	Q8BKZ9
1	YGQSQPSCFDRVKMG	P60603
1	AHKWYAICISDVGDY	Q9DCV4
1	VSGVVMCEGLDVKYF	Q924D0
1	TKDDIICEIGEVFK	Q8BGH2
1	FLNAGNLCNLNYGEG	Q8BGH2
1	ARLELNYCIPMGVQG	Q8BGH2
1	VQGGDRICDGVQFGA	Q8BGH2
1	EAGFNTACLTKLFPT	Q8K2B3
1	KGGQAHRCCCVADRT	Q8K2B3
1	GGQAHRCCCVADRTG	Q8K2B3

1	GQAHRCVVADRTGH	Q8K2B3
1	CRGVIALCIEDGSIH	Q8K2B3
1	YGRTYFSCTSAHTST	Q8K2B3
1	VTRAGLPCQDLEFVQ	Q8K2B3
1	EIREGRGCGPEKDHV	Q8K2B3
1	YACGEAACASVHGAN	Q8K2B3
1	LVVFGRACALSIAES	Q8K2B3
1	ALSIAESCRPGDKVP	Q8K2B3
1	GSVLQEGCEKISQLY	Q8K2B3
1	KTLNEADCATVPPAI	Q8K2B3
1	YEVDLNKCGPMVLDA	Q9CQA3
1	RSCREGICGSCAMNI	Q9CQA3
1	REGICGSCAMNINGG	Q9CQA3
1	NGGNTLACTRRIDTD	Q9CQA3
1	DPFSVYRCHTIMNCT	Q9CQA3
1	RCHTIMNCTQTCPKG	Q9CQA3
1	IMNCTQTCPKG LNPG	Q9CQA3
1	LPMALSVCHRGSIA	Q9CZB0
1	LMFVKSLCLGPTLIY	Q9CZB0
1	DKNTKIICQGFTGKQ	Q9WUM5
1	TRLIGPNC PGVINPG	Q9WUM5
1	GVINPGECKIGIMPG	Q9WUM5
1	TGEKGRICNQVLVCE	Q9Z2I9
1	ICNQVLVCERKYPRR	Q9Z2I9
1	DSDGKVL CMDAKINF	Q9Z2I9
1	GLDGSIGCLVNGAGL	Q9Z2I9
1	IFGGIMRCDVIAQGI	Q9Z2I9
1	SGLKILACDDLDEAA	Q9Z2I9
1	KLGTVADCGVPEARA	Q8BWF0
1	KEVGEVLCTDPLVSK	Q8BWF0
1	FRNAGQTCVCSNRFL	Q8BWF0
1	NAGQTCVCSNRFLVQ	Q8BWF0
1	RNENLPMCKAAETTV	P55809
1	AHKIMEKCTLPLTGK	P55809
1	DVQKSTGCDFAVSPK	P55809
1	ELNPDENCIRTD SGK	Q9R112
1	AQAGHRLCDSEAHVC	Q8R086
1	CDSEAHVCFEGLDSD	Q8R086
1	GRLQIAACSNQDPLQ	P09671
1	VTERYTACKK	P09671
1	HAQWCGPCKILGPRL	P97493
1	SFFDIEECRD TTSPY	P52196
1	SQPLIATCRKGVTAC	P52196
1	LANILELCRSKNMPK	Q8K0Z7
1	LISSKPGCFVAGADI	Q8BMS1
1	DINMLSSCTTPQEAT	Q8BMS1
1	VAAISGSCLGGGLEL	Q8BMS1
1	GLELAIAACQYRIATK	Q8BMS1
1	LYNGQVLCKKNKFGA	Q8BMS1
1	ESVTPEHCIFASNTS	Q8BMS1
1	PGFYTTTRCLAPMMSE	Q8BMS1
1	YGTQFTPCQLLDHA	Q8BMS1
1	HPFGATGCRLVMAAA	Q99JY0
1	QYALVAACAAGGQGH	Q99JY0
1	DTASVDLCIKPKTVH	Q91ZE0
1	MKILDVGC GGGLLTE	Q8BMS4
1	YDYLAKT CEDWVDGI	Q8R164
1	GQALAAFLTEPSSG	P50544

1	SSAIPSPCGKYYTL	P50544
1	AAISKIFCSEAAWKV	P50544
1	AWKVADECIQIMGGM	P50544
1	LFVALQGCMDKGKEL	P50544
1	AQHEKMLCDSWCIEA	P50544
1	KMLCDSWCIEAATRI	P50544
1	REHINLGCDVDFDIA	Q60932
1	YQVDPDACFSAKVNN	Q60932
1	LDVKTKSCSGVEFST	Q60930
1	LETKYKWCEYGLTFT	Q60930
1	IAIEDQICQGLKLTF	Q60930
1	MCNTPTYCD	Q60931
1	MCNTPTYCDLGKAAK	Q60931
1	LETKYKVCNYGLTFT	Q60931
1	AAKYKLCRTSLSAK	Q60931
1	AVTLRRDCPVPLPGD	Q8BGC4
1	YARGDLVCEVDLGHL	Q8BGC4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Moncada S, Palmer RM, Higgs (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43(2): 109-142.
2. Furchgott RF, Zawadzki (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-376
3. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524-6.
4. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(24):9265-9269.
5. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(8): 3203-3207.
6. Lundberg JO, Weitzberg E. (2022). Nitric oxide signaling in health and disease' 185, *Cell* 185(16):2853-2878.
7. Nobel Prize in Physiology or Medicine for 1998 jointly to Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro and Ferid Murad for their discoveries concerning “nitric oxide as a signalling molecule in the cardiovascular system”.
8. Andrabi SM, Sharma NS, Karan A, Shahriar SMS, Cordon B, Ma B, Xie J. (2023). Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Adv Sci (Weinh)* 10(30): e2303259
9. Förstermann U, Sessa WC. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33(7): 829-837, 837a-837d.
10. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357(Pt 3):593-615.
11. Roman LJ, Martásek P, Masters BS. (2002). Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem Rev.* 102(4): 1179-1190.
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. *Genes* 575(2 Pt 3):584-599.

13. Ludwig ML, Marletta MA. (1999). A new decoration for nitric oxide synthase - a Zn(Cys)₄ site. 7. Structure. 7(4): R73-79.
14. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 7(2):156-167.
15. Lundberg JO, Govoni M. (2004). Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 37(3): 395-400.
16. Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, Smith L, Golden M, Benjamin N. (1995). Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat. Med.* 1(6):546-551.
17. Michael A. Marletta, John W. Denninger. 'Guanylate cyclase and the cNO/cGMP signaling pathway', 1999, 334–50.
18. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. (2004). Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J Biomed Biotechnol* 2004(4):227-237.
19. Denninger JW, Marletta MA. (1999). Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1411(2-3): 334-350.
20. Fernhoff NB, Derbyshire ER, Marletta MA. (2009). A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(51): 21602-21607.
21. Hollas MA, Ben Aissa M, Lee SH, Gordon-Blake JM, Thatcher GRJ. (2019). Pharmacological manipulation of cGMP and NO/cGMP in CNS drug discovery. *Nitric Oxide* 82: 59-74.
22. Abrams J. (1985). Hemodynamic effects of nitroglycerin and long-acting nitrates. *Am Heart J.* 110(1 Pt 2):216-224.
23. Tenopoulou M, Doulias PT (2020). Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Res.* 9: F1000 Faculty Rev-1190.
24. Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S. (2019). S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants (Basel).* 8(9):404.
25. Foster MW, Hess DT, Stamler JS. (2009). Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med.* 15(9):391-404.

26. Dent MR, DeMartino AW. (2023). Nitric oxide and thiols: Chemical biology, signalling paradigms and vascular therapeutic potential. *Br J Pharmacol*. 10.1111
27. Broniowska KA, Hogg N. (2012). The Chemical Biology of S-Nitrosothiols. *Antioxid Redox Signal*. 17(7): 969-980.
28. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(1):444-448.
29. Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*. 410(6827):490-494.
30. Anand P, Hausladen A, Wang YJ, Zhang GF, Stomberski C, Brunengraber H, Hess DT, Stamler JS. (2014). Identification of S-nitroso-CoA reductases that regulate protein S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(52):18572-18577.
31. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 298(2):431-437.
32. Bartsaghi S, Radi R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol*. 14:618-625.
33. Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JR, Singel DJ, Stamler JS. (1999). The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(16):9027-9032.
34. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(2):150-66.
35. Arnette DR, Stamler JS. (1995). NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys*. 318(2):279-285.
36. 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(7):665-674.

37. Zhang R, Hess DT, Qian Z, Hausladen A, Fonseca F, Chaube R, Reynolds JD, Stamler JS. (2015). Hemoglobin betaCys93 is essential for cardiovascular function and integrated response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(20):6425-6430.
38. Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A (2008). Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*. 10(7):866-73
39. Mitchell DA, Marletta MA. (2005). Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat Chem Biol*. 1(3):154-158.
40. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS. (2009). Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(10):721-732.
41. Stomberski CT, Hess DT, Stamler JS. (2019). Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 30(10):1331-1351.
42. Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. (2009). Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* 320(5879):1050-1054.
43. Ben-Lulu S, Ziv T, Admon A, Weisman-Shomer P, Benhar M. (2014). A substrate trapping approach identifies proteins regulated by reversible S-nitrosylation. *Mol Cell Proteomics* 13(10):2573-2583.
44. Grimmer ZW, Venetos NM, Premont RT, Stamler JS. (2021). GSNOR regulates cardiomyocyte differentiation and maturation through protein S-nitrosylation. *J Cardiovasc Aging*. 1:16.
45. Naseem KM. (2005). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*. 26(1-2):33-65.
46. 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(1): 56.
47. 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(3):671-680.
48. 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):342-5.
49. 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.
 50. Csiszar A, Tarantini S, Yabluchanskiy A, Balasubramanian P, Kiss T, Farkas E, Baur JA, Ungvari Z. (2019). Role of endothelial NAD⁺ deficiency in age-related vascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 316(6):H1253-H1266.
 51. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. (2010). S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res* 106(4):633-646.
 52. Doulias PT, Tenopoulou M, Greene JL, Raju K, Ischiropoulos H. (2013). Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation. *Sci Signal* 6(256):rs1.
 53. Aranda E, López-Pedrerá C, De La Haba-Rodríguez JR, Rodríguez-Ariza A. (2012). Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation. *Curr Mol Med*. 12(1):50-67.
 54. Jaffrey SR, Snyder SH. (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001(86):p11.
 55. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19):7420-7425.
 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 U S A* 107(39):16958-16963.
 57. 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(2):165-170.
 58. Doulias PT, Tenopoulou M, Raju K, Spruce LA, Seeholzer SH, Ischiropoulos H. (2013). Site specific identification of endogenous S-nitrosocysteine proteomes. *J Proteomics* 92:195-203.

59. 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.
60. Kohr MJ, Aponte A, Sun J, Gucek M, Steenbergen C, Murphy E. (2012). Measurement of S-nitrosylation occupancy in the myocardium with cysteine-reactive tandem mass tags: short communication. *Circ Res* 111(10):1308-1312.
61. Chouchani ET, James AM, Methner C, Pell VR, Prime TA, Erickson BK, Forkink M, Lau GY, Bright TP, Menger KE, Fearnley IM, Krieg T, Murphy MP. (2017). *J Biol Chem*. 292(35): 14486-14495.
62. Chung HS, Murray CI, Venkatraman V, Crowgey EL, Rainer PP, Cole RN, Bomgarden RD, Rogers JC, Balkan W, Hare JM, Kass DA, Van Eyk JE. (2015). Dual Labeling Biotin Switch Assay to Reduce Bias Derived From Different Cysteine Subpopulations: A Method to Maximize S-Nitrosylation Detection. *Circ Res* 117(10):846-57.
63. Davies MN, Toseland CP, Moss DS, Flower DR. (2006). Benchmarking pK(a) prediction. *BMC Biochem*. 7:18.
64. Manfredi M, Savojardo C, Martelli PL, Casadio R. (2024). E-pRSA: Embeddings Improve the Prediction of Residue Relative Solvent Accessibility in Protein Sequence. *J Mol Biol* 436(17):168494.
65. Smith TG, Uzozie AC, Chen S, Lange PF. (2021). Robust unsupervised deconvolution of linear motifs characterizes 68 protein modifications at proteome scale. *Sci Rep*. 2021 11(1):22490.
66. Mnatsakanyan R, Markoutsas S, Walbrunn K, Roos A, Verhelst SHL, Zahedi RP. (2019). Proteome-wide detection of S-nitrosylation targets and motifs using bioorthogonal cleavable-linker-based enrichment and switch technique. *Nat Commun*. 10(1):2195.
67. Radi R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(23):5839-5848.