



**Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία και βιοδραστικές ενώσεις
Διπλωματική εργασία
Μάιος 2026**

Τίτλος:

**Ανίχνευση και ταυτοποίηση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε βιολογικά
δείγματα με τεχνικές βασιζόμενες στην ανοσοσυγγένεια**

Επιβλέπων: Πασχάλης-Θωμάς Δούλιας, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ονοματεπώνυμο μεταπτυχιακής φοιτήτριας: Ελένη Ιορδανίδου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</u>	<u>5</u>
<u>ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....</u>	<u>6</u>
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</u>	<u>8</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>9</u>
<u>1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</u>	<u></u>
<u>1.1 Ακετυλίωση : τι είναι και ποιος ο λειτουργικός της ρόλος.....</u>	<u>11</u>
<u>1.2 Ενζυμικά καταλυόμενη ακετυλίωση και αποακετυλίωση λυσίνης.....</u>	<u>13</u>
<u>1.2.1 Σιρτουίνες (Sirtuins, SIRT5).....</u>	<u>18</u>
<u>1.3 Μη ενζυμική ακετυλίωση.....</u>	<u>22</u>
<u>1.4 Ακετυλίωση του αμινοτελικού άκρου (NT-ακετυλίωση) : τι είναι και ποιος ο ρόλος της.....</u>	<u>24</u>
<u>1.4.1 Ένζυμα ακετυλίωσης του αμινοτελικού άκρου.....</u>	<u>25</u>
<u>1.4.2 Οι επιπτώσεις της NT-ακετυλίωσης σε μοριακό επίπεδο.....</u>	<u>27</u>
<u>1.4.3 NT-ακετυλίωση και παθολογικές διαταραχές.....</u>	<u>27</u>
<u>1.5 Ο ρόλος της ακετυλίωσης στην εξέλιξη.....</u>	<u>30</u>
<u>1.6 Η ακετυλίωση ως ρυθμιστικός μηχανισμός της λειτουργίας των ιστονών.....</u>	<u>31</u>
<u>1.7 Ac-CoA ως δότης της ακετυλομάδας, μια επισκόπηση του μεταβολισμού.....</u>	<u>34</u>
<u>1.8 Ακετυλίωση και ασθένειες.....</u>	<u>35</u>
<u>1.8.1 Μεταβολικό σύνδρομο, διαβήτης και παχυσαρκία.....</u>	<u>36</u>
<u>1.8.2 Χρόνιες πνευμονικές παθήσεις.....</u>	<u>37</u>
<u>1.8.3 Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση.....</u>	<u>37</u>
<u>1.8.4 The Rubinstein – Taybi Syndrome.....</u>	<u>38</u>
<u>1.8.5 Καρκίνος.....</u>	<u>38</u>
<u>1.8.6 Νευρολογικές διαταραχές.....</u>	<u>39</u>

<u>1.9 Φασματομετρία μάζας για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών.....</u>	<u>40</u>
<u>1.10 Μελλοντικοί στόχοι.....</u>	<u>41</u>
<u>2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ.....</u>	<u></u>
<u>2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηχτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE electrophoresis).....</u>	<u>42</u>
<u>2.1.1 Υλικά - Συσκευές.....</u>	<u>43</u>
<u>2.1.2 Διαλύματα εργασίας.....</u>	<u>44</u>
<u>2.1.3 Πειραματική πορεία.....</u>	<u>47</u>
<u>2.2 Ανοσοαποτύπωση.....</u>	<u></u>
<u>2.2.1 Αρχή μεθόδου.....</u>	<u>48</u>
<u>2.2.2 Υλικά - Διαλύματα - Συσκευές.....</u>	<u>48</u>
<u>2.3 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών.....</u>	<u>50</u>
<u>2.4 Επώαση με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα και εμφάνιση της μεμβράνης.....</u>	<u>50</u>
<u>2.5 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA.....</u>	<u>51</u>
<u>2.6 Ανοσοκαταβύθιση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών.....</u>	<u>52</u>
<u>2.6.1 Υλικά - Διαλύματα εργασίας.....</u>	<u>53</u>
<u>2.6.2 Πειραματική διαδικασία.....</u>	<u>53</u>
<u>2.7 Χημική ακετυλίωση της αλβουμίνης βοός (BSA).....</u>	<u>54</u>
<u>2.8 Καλλιέργεια κυττάρων.....</u>	<u>54</u>
<u>2.9 Φαρμακολογική επαγωγή ακετυλίωσης με προσθήκη CH₃COONa σε κύτταρα Jurkat.....</u>	<u>55</u>
<u>2.10 Φαρμακολογική επαγωγή ακετυλίωσης με προσθήκη CH₃COONa σε κύτταρα HeLa.....</u>	<u>55</u>
<u>3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</u>	<u>56</u>

<i>4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</i>	<i>67</i>
---	-----------

<i>5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</i>	<i>76</i>
---	-----------

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο πλαίσιο πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Π.Θ. Δούλια για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και έρευνας. Με υπομονή, επιμονή και αγάπη για το αντικείμενο, στάθηκε δίπλα μου, δίνοντας μου έτσι κίνητρο να εμβαθύνω στην έρευνα, να εμπλουτίσω ακόμα περισσότερο τις γνώσεις μου και να εξετάζω κάθε πληροφορία πολύπλευρα. Το σημαντικότερο όμως είναι ότι κράτησε ζωντανό το ενδιαφέρον μου για τον τομέα της Βιοχημείας, αναθέτοντας μου σύγχρονα θέματα που απασχολούν την επιστημονική κοινότητα και που σχετίζονται με νέες μεθοδολογίες για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών. Φυσικό επακόλουθο αυτού ήταν πέραν της άριστης συνεργασίας μας, να εργαστώ με τον ίδιο ζήλο και να αγαπήσω ακόμα περισσότερο τον τομέα με τον οποίο επέλεξα να ασχοληθώ.

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, Μαργαρίτα Τενοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας και Ευστράτιο Μυλωνά, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας για τις παρατηρήσεις και προτάσεις που οδήγησαν στην τελική διαμόρφωση του κειμένου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

<u>Συντομογραφία</u>	<u>Πλήρης όρος</u>
Ac-CoA	Acetyl coenzyme A (Ακέτυλο-συνένζυμο A)
ACL	Citrate Lyase (Κιτρική λυάση)
Ac-Lys	Acetyl-Lysine (Ακετυλο-λυσίνη)
Ac-P	Acetyl-phosphate (Ακετυλο-φωσφορικό)
APS	Ammonium Persulfate (Υπερθειικό αμμώνιο)
ATP	Adenosine Triphosphate (Αδενοσινοτριφωσφορικό)
BCA	Bicinchoninic acid (Δικινχονινικό οξύ)
BSA	Bovine serum albumin (Αλβουμίνη ορού βοός)
CH ₃ COONa	Sodium Acetate (Οξικό νάτριο)
CR	Calorie Restriction (Θερμιδικός περιορισμός)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
FAO	Fatty Acids Oxidation (Β-οξειδωση λιπαρών οξέων)
FCS	Fetal Calf Serum (Εμβρυϊκός ορός μόσχου)
GDH	Glutamate Dehydrogenase (Γλουταμική αφυδρογονάση)
HCL	Hydrochloric Acid (Υδροχλωρικό οξύ)
HDACs	Histone De-Acetylases (Αποακετυλάσες ιστόνης)
His	Histidine (Ιστιδίνη)
iMet	Initiator Methionine (αρχικό κατάλοιπο μεθειονίνης)
IP	Immune Precipitation (Ανοσοκαταβύθιση)
KATs	Acetyltransferases (Ακετυλο-τρανσφεράσες)
KDACs	Lysine De-Acetylases (Αποακετυλάσες λυσίνης)
KO	Knock Out
LCAD	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase (Αφυδρογονάση των ακυλ-CoA μακράς αλυσίδας)
Lys	Lysine (Λυσίνη)
MCTs	Monocarboxylate Transporters (Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς)
MetAPs	Methionine aminopeptidases (Αμινοπεπτιδάσες μεθειονίνης)

MnSOD	Manganese Superoxide Dismutase (Μαγγανιακή δισμουτάση του υπεροξειδίου του οξυγόνου)
NAD ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο)
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (Λιπώδης ηπατική νόσος μη αλκοολικής προέλευσης)
NATs	N-acetyltransferases (Ακετυλοτρανσφεράσες του N-τελικού άκρου)
PTC	Papillary thyroid carcinoma (Θηλώδες καρκίνωμα του θυροειδούς)
PTMs	Post Translational Modifications (Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις)
ROS	Reactive oxygen species (Δραστικά είδη οξυγόνου)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο)
SIRTs	Sirtuins (Σιρτουίνες)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Τετραμέθυλο-αιθυλενοδιαμίνη)
Tyr	Tyrosine (Τυροσίνη)
Zn ²⁺	Zinc ion (Κατιόν ψευδαργύρου)
1,3-BPG	1,3-diphosphoglycerate (1,3 διφωσφογλυκερικό)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει την ακετυλίωση πρωτεϊνών, μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που επηρεάζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Η ακετυλίωση της λυσίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε ενζυμικά, μέσω ακετυλοτρανσφερασών, είτε μη ενζυμικά, ανάλογα με παράγοντες όπως το ακέτυλο-συνένζυμο Α (Ac-CoA) και το pH. Η αντίστροφη διαδικασία, η αποακετυλίωση, καταλύεται από ένζυμα όπως οι σιρτουίνες (SIRT3), με τη SIRT3 να έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο. Η τροποποίηση αυτή επηρεάζει τη δομή, τη σταθερότητα και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, καθώς και κρίσιμες διεργασίες όπως τη γονιδιακή έκφραση, το μεταβολισμό και την κυτταρική σηματοδότηση. Διαταραχές στην ακετυλίωση συνδέονται με σοβαρές ασθένειες, γεγονός που καθιστά σημαντική τη μελέτη των μηχανισμών της. Πειραματικά, η εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων ανίχνευσης και εμπλουτισμού ακετυλιωμένων πρωτεϊνών. Αρχικά, πραγματοποιείται ανίχνευση ακετυλίωσης σε δείγματα χημικά ακετυλιωμένης αλβουμίνης ορού βοός (bovine serum albumin, BSA) και σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων, τα οποία καλλιεργούνται παρουσία ή απουσία οξικού νατρίου (CH_3COONa). Στη συνέχεια, αναπτύσσεται και εφαρμόζεται πειραματικό πρωτόκολλο εμπλουτισμού ακετυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση αντισωμάτων έναντι της ακετυλιωμένης λυσίνης. Το πρωτόκολλο βελτιστοποιείται ώστε να επιτρέπει τον εμπλουτισμό (α) χημικά ακετυλιωμένης BSA, (β) ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε κυτταρικά εκχυλίσματα, (γ) ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε ηπατικό ιστό ποντικού αγρίου τύπου. Συνολικά, η μελέτη αναδεικνύει τη δυναμική φύση της ακετυλίωσης γεγονός που συνάδει με την ευρέως διαδεδομένη άποψη ότι η ρύθμιση της ακετυλίωσης συνδέεται άμεσα με τον κυτταρικό μεταβολισμό και την υγεία του οργανισμού.

Λέξεις κλειδιά: Ακετυλίωση λυσίνης, αποακετυλίωση, ακέτυλο-CoA, εμπλουτισμός ανοσοσυγγένειας, ενδογενής ακετυλίωση, μετα-μεταφραστική τροποποίηση, φαρμακολογική επαγωγή ακετυλίωσης

ABSTRACT

This thesis focuses on protein acetylation, an important post-translational modification that influences many cellular functions. Lysine acetylation can occur either enzymatically, via acetyltransferases, or non-enzymatically, depending on factors such as Ac-CoA and pH. The reverse process, deacetylation, is catalyzed by enzymes such as sirtuins, with SIRT3 playing a particularly important role. This modification affects the structure, stability, and function of proteins, as well as critical processes such as gene expression, metabolism, and cellular signaling. Disruptions in acetylation homeostasis are linked to serious diseases, making the study of its mechanisms important. Experimentally, this study focuses on the development and optimization of methods for the detection and enrichment of acetylated proteins. Initially, acetylation is detected in samples of chemically acetylated BSA and in protein extracts from cells cultured in the presence or absence of sodium acetate. Subsequently, an experimental protocol for the enrichment of acetylated proteins using antibodies against acetylated lysine is developed and applied. The protocol is optimized to allow the enrichment of (a) chemically acetylated BSA, (b) endogenous and stimulus-induced acetylated proteins in cell extracts, and (c) endogenously acetylated proteins in wild-type mouse liver tissue. Overall, the study highlights the dynamic nature of acetylation, a finding consistent

with the widely held view that the regulation of acetylation is directly linked to cellular metabolism and overall health.

Keywords: Acetyl-CoA, Affinity enrichment, Deacetylation, Endogenous acetylation, Lysine acetylation, Pharmacological induction of acetylation, Post-translational modification

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ακετυλίωση: τι είναι και ποιος ο λειτουργικός της ρόλος

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Post translational modifications, PTMS) είναι μηχανισμοί που ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η μεταγραφή, η επιδιόρθωση του DNA, η κυτταρική σηματοδότηση, η αναδίπλωση πρωτεϊνών, η αυτοφαγία, η απόπτωση, ο μεταβολισμός και η παραγωγή ενέργειας [1, 2]. Σε μοριακό επίπεδο θεωρούνται απαραίτητες για τη διατήρηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας, της σταθερότητας και του εντοπισμού των πρωτεϊνών [1, 3]. Μεταξύ των τροποποιήσεων αυτών, υπάρχει η ακετυλίωση της λυσίνης, η οποία είναι η δεύτερη πιο άφθονη PTM σε κύτταρα μετά τη φωσφορυλίωση [4].

Η ακετυλίωση, η προσθήκη μιας οξικής ομάδας (ακετυλομάδας) στη λυσίνη, αποτελεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, δηλαδή, μια αναστρέψιμη διαδικασία που ρυθμίζεται από ενζυμικούς ή χημικούς μηχανισμούς, οι οποίοι περιγράφονται λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα [1,4]. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα ακετυλοτρανσφεράσες (acetyltransferases, KATs) [5] μεταφέρουν μια ακετυλομάδα από το Ac-CoA στην ε-αμινομάδα των καταλοίπων λυσίνης [5]. Αν και η ακετυλίωση ανιχνεύεται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, οι περισσότερες ακετυλοτρανσφεράσες εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα [5], γεγονός που υπογραμμίζει ότι η χημικά διαμεσολαβούμενη ακετυλίωση είναι κυρίαρχη στα υπόλοιπα κυτταρικά διαμερίσματα.

Ένας εναλλακτικός ορισμός που περιγράφει τη βιολογική σημασία της ακετυλίωσης είναι ‘ο μηχανισμός με τον οποίο το πλεόνασμα άνθρακα αποθηκεύεται σε πρωτεΐνες’ [6]. Όπως και άλλες μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις της λυσίνης π.χ. βουτυρυλίωση, προπιονυλίωση, ηλεκτρυλίωση, γλουταρυλίωση, μηλονυλίωση, η ακετυλίωση απαντάται σε όλα τα βασίλεια της ζωής [1, 6]. Η ακετυλίωση ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά σε κατάλοιπα λυσίνης στην πρωτεΐνη ιστόνη. Η ακετυλίωση ιστόνης βρίσκεται υπό τον έλεγχο ανταγωνιστικών ενζυμικών δραστηριοτήτων : ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης και αποακετυλάσες ιστόνης [6, 7].

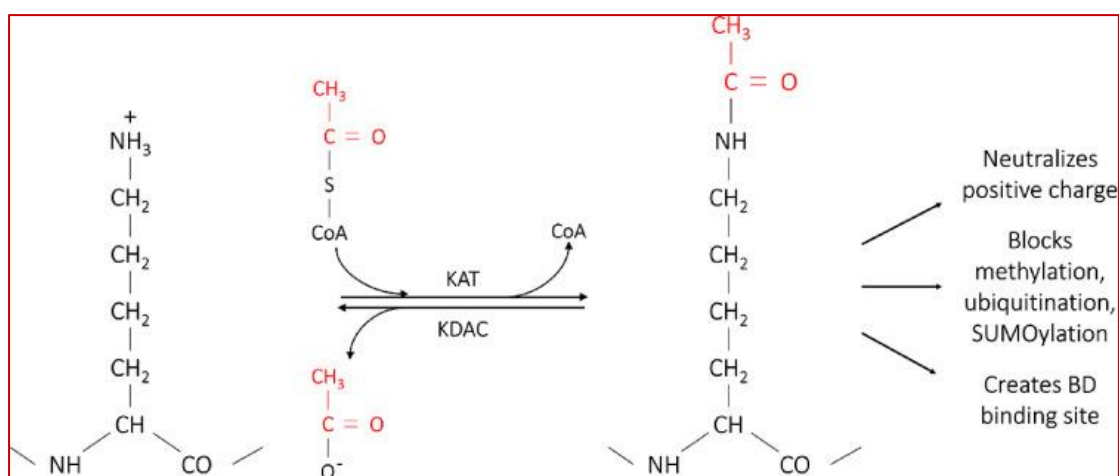
Από χημικής άποψης, η ακετυλίωση της λυσίνης εξουδετερώνει το θετικό φορτίο του αμινοξέος, διαταράσσει τους ιοντικούς δεσμούς και τους δεσμούς υδρογόνου και αυξάνει την υδροφοβικότητα των πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – πρωτεΐνης, τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, τον εντοπισμό και την ενζυμική δραστηριότητα. Για παράδειγμα, η ακετυλίωση των ιστονών, η οποία ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση και τη δυναμική της χρωματίνης, συμβαίνει στο ίδιο άκρο ιστόνης, σε διαφορετικά άκρα εντός του ίδιου νουκλεοσώματος ή σε γειτονικά νουκλεοσώματα, δημιουργώντας ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύνολο υποστρωμάτων για αναγνώριση από ένζυμα τροποποίησης των ιστονών και άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χρωματίνη. Πέρα από την ακετυλίωση των ιστονών, η ακετυλίωση της λυσίνης έχει ταυτοποιηθεί σε μεταγραφικούς παράγοντες, μεταβολικά ένζυμα, πρωτεΐνες συνοδούς και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού [8].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η άποψη ότι η ακετυλίωση συνδέεται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού, καθώς πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι βασικά ένζυμα του οξειδωτικού μεταβολισμού υφίστανται ακετυλίωση [9]. Ειδικά, η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (Fatty Acids Oxidation, FAO) είναι ένα βιοενεργειακό μονοπάτι που συμβάλλει στην ενεργειακή ομοιοστάση της καρδιάς, των μυών και του ήπατος. Έχει αναφερθεί ότι διαταραχές της β-οξείδωσης εμπλέκονται στους μηχανισμούς που οδηγούν

σε παχυσαρκία, διαβήτη και καρκίνο. Στο πλαίσιο αυτό, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις εμφανίζονται ως σημαντικοί παράγοντες της δραστηριότητας των ενζύμων της οξειδωσης λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας [10].

1.2 Ενζυμικά καταλυόμενη ακετυλίωση και αποακετυλίωση λυσίνης

Η ακετυλίωση καταλύεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες λυσίνης, που έχουν ως υπόστρωμα το Ac-CoA, το οποίο περιέχει έναν δραστικό θειοεστέρα που διευκολύνει τη μεταφορά ακετυλομάδας σε ε-αμινομάδες Lys. Ο γενικός μηχανισμός δράσης τους απεικονίζεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Ενζυμικά καταλυόμενη ακετυλίωση και αποακετυλίωση λυσίνης. Η εικόνα αναπαράγεται αυτούσια από το [11].

Διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών στόχων κυρίως στον πυρήνα αν και πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την παρουσία ακετυλοτρανσφερασών και σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα. Ομαδοποιούνται ανάλογα με τα υποστρώματα που στοχεύουν, την αλληλουχία και τη δομή τους, καθώς

και τη λειτουργικότητα τους. Συνήθως ενσωματώνονται ως καταλυτικές υπομονάδες σε πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι εξής:

P300/CBP: πρωτεΐνες που δεσμεύουν p300/CREB, αποτελούμενη από p300 και CBP στοχεύει κυρίως την ιστόνη H3 και κατάλοιπα H4. Ευρέως φάσματος ακετυλοτρανσφεράσες με πάνω από 1000 θέσεις τροποποίησης να έχουν ταυτοποιηθεί με φασματομετρία μάζας [12, 13]. Είναι επίσης τα κύρια ένζυμα για την ακετυλίωση των Lys18 και Lys27 στην ιστόνη H3 και έχουν συνδεθεί με ρυθμιστικά στοιχεία ενισχυτή στη μεταγραφή. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην παρουσία ενός καταλοίπου τυροσίνης, που προσανατολίζει την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης στόχου αυξάνοντας την πυρηνοφιλία της. Η λυσίνη είναι ικανή να "έπιτεθεί" στον καρβονυλ-άνθρακα του Ac-COA, ενώ το κατάλοιπο τυροσίνης δρα ως καταλυτικό οξύ που πρωτονιώνει τη σουλφυδρυλική ομάδα του Ac-CoA και τελικά καταλήγει στο σχηματισμό Ac-Lys και CoA.

GCN5/PCAF: N-τερματικές ακετυλοτρανσφεράσες που σχετίζονται με GCN5, αποτελείται από PCAF, GCN5, HAT1, HPA3, ELP3 που δρουν κυρίως στις ιστόνες [15]. Αποτελούν συστατικά του πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος SAGA. Το όνομα GNAT για τις N-τερματικές ακετυλοτρανσφεράσες προέρχεται από το ένζυμο GCN5 στη ζύμη, το οποίο βρέθηκε ότι είναι μια ακετυλοτρανσφεράση ιστόνης [14]. Μέχρι τώρα περισσότερα από 100.000 μέλη της οικογένειας GNAT ανακαλύφθηκαν σε ευκαρυώτες, προκαρυώτες και αρχαία. Όλες οι KAT που έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής στα βακτήρια ανήκουν στην οικογένεια GNAT. Επιπρόσθετα, όλες οι βακτηριακές ακετυλοτρανσφεράσες που ταυτοποιούνται στα βακτήρια παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τις GNAT των θηλαστικών. Αυτή η κατηγορία

περιλαμβάνει ένζυμα με εξειδίκευση σε α- και ε- αμινομάδες. Είναι επίσης εξαιρετικά εκλεκτικά για την ακετυλίωση της Lys14 της ιστόνης H3.

MYST: περιλαμβάνει Tip60, MOF, Esa1, Sas2, Sas3, HbO1, MORF τα οποία στοχεύουν κυρίως κατάλοιπα H4 και βρίσκονται σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα [15]. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες (GCNA & MYST) χρησιμοποιούν έναν καταλυτικό μηχανισμό που αρχικά αποσπάται ένα πρωτόνιο από την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης αυξάνοντας την πυρηνοφιλία της για προσβολή του άνθρακα καρβονυλίου του Ac-CoA. Σχηματίζεται ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, το οποίο στη συνέχεια σχηματίζει Ac-Lys και Ac-CoA [15]. Στα θηλαστικά, οι KAT αποδείχθηκε ότι χρησιμοποιούν διαφορετικά μόρια Acyl-CoA ως δότες για ακυλίωση πρωτεϊνών όπως προπιονυλ-CoA, βουτυρυλ-CoA, μηλονυλ-CoA, υδροξυϊσοβουτυρυλ-CoA και κροτονυλ-CoA. Φαίνεται ότι για τις KAT στα θηλαστικά η δραστηριότητα τους να μειώνεται ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας Acyl-CoA, κάτι που σημαίνει ότι το Ac-CoA είναι το προτιμότερο υπόστρωμα για τα ένζυμα αυτά όταν οι συγκεντρώσεις των Acyl-CoAs είναι ισομοριακές στα κύτταρα [15].

Όπως προαναφέρθηκε, η ακετυλίωση λυσίνης είναι αναστρέψιμη και η απομάκρυνση της ακετυλομάδας από τα κατάλοιπα λυσίνης καταλύεται από ένζυμα γνωστά ως αποακετυλάσες λυσίνης (KDACs) μέσω διάσπασης ενός δεσμού αμιδίου (Εικόνα 2). Τα ένζυμα αυτά, λοιπόν, αποακετυλιώνουν ιστόνες ή άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες, αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη και πάλι σε κατάσταση ετεροχρωματίνης και επομένως καταστέλλουν τη μεταγραφή [16]. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις αποακετυλάσες ιστόνης (HDACs) και τις σιρτουίνες (SIRTs), που ρυθμίζουν πολλά μονοπάτια του μεταβολισμού [17]. Η πρώτη κατηγορία ενζύμων, μια οικογένεια 18 ενζύμων με λειτουργίες αντίθετες από τις HAT [16]. Αρχικά ονομαζόταν αποακετυλάσες ιστόνης,

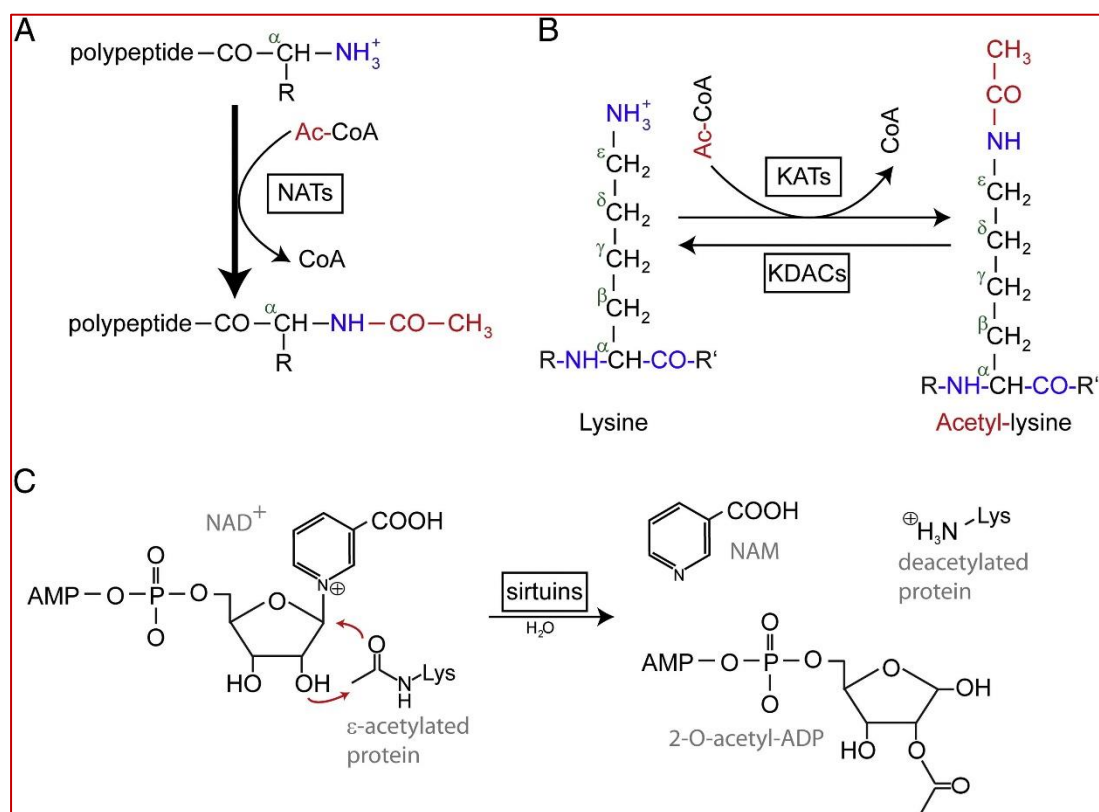
ωστόσο πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι αυτά τα ένζυμα έχουν διάφορα μη ιστονικά υποστρώματα σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα και έτσι η ονομασία αποακετυλάσες λυσίνης (Lysine De-Acetylases, KDACs) είναι πιο κατάλληλη.

Σε ότι αφορά το μηχανισμό απομάκρυνσης της ακετυλομάδας, το ένζυμο χρησιμοποιεί ένα κατιόν δισθενούς μετάλλου (γενικά Zn^{2+}) για να ενεργοποιήσει ένα πυρηνόφιλο μόριο νερού που υδρολύει το δεσμό αμιδίου της ακετυλιωμένης λυσίνης για να δώσει ελεύθερο οξικό άλας ως προϊόν. Τα ένζυμα της δεύτερης κατηγορίας είναι εξαρτώμενα από NAD^+ και αποδίδουν νικοτιναμίδιο και 2'/3-O-ακετυλο ADP-ριβόζη ως τελικά προϊόντα της αντίδρασης όπως φαίνεται στην Εικόνα 2C [16, 17].

Οι KDAC είναι μεταλλοένζυμα, δομικά διαφέρουν από τις SIRTs και ακολουθούν διαφορετική στρατηγική για την επίτευξη αποακυλίωσης των πλευρικών αλυσίδων λυσίνης. Όλες οι KDAC των θηλαστικών περιέχουν μια διατηρημένη καταλυτική περιοχή περίπου 300-400 αμινοξέων και ταξινομούνται με βάση τη δομή, τη λειτουργία και τον καταλυτικό μηχανισμό στις κατηγορίες I (πυρηνικός εντοπισμός και εξάρτηση από το κάλιο), II (μεταφορά μεταξύ του πυρήνα και του κυτοσολίου), IV (μόνο ένα ένζυμο που εντοπίζεται στον πυρήνα). Αυτές υπάρχουν σε σύμπλοκα πολυπρωτεϊνών-κατασταλτών που καθορίζουν την ειδικότητα του υποστρώματος και την ενζυμική δραστηριότητα.

Οι αναστολείς των KDAC χρησιμοποιούν το ενεργό ιόν Zn^{2+} και αντικαθιστούν το ενεργό μόριο νερού που απαιτείται για την πυρηνόφιλη προσβολή του ηλεκτρονιόφιλου καρβονυλ-άνθρακα της ακετυλομάδας. Κατά την κατάλυση των κλασικών KDAC ενεργοποιείται ένα μόριο νερού από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης (His). Το ένα από αυτά, δρα ως γενική βάση αφαιρώντας ένα πρωτόνιο από το καταλυτικό μόριο νερού, αυξάνοντας έτσι την πυρηνοφιλία του για επίθεση στον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλ-

άνθρακα της ακετυλομάδας. Το δεύτερο, είναι σημαντικό να προσανατολιστεί και να πολώσει το καταλυτικό μόριο του νερού που λειτουργεί ως ηλεκτροστατικός καταλύτης. Και τα δύο υπολείμματα His είναι πολωμένα και προσανατολισμένα με δύο κατάλοιπα ασπαρτικού / ένα ασπαργίνη και ένα ασπαρτικό αντίστοιχα. Μια άλλη His εμπλέκεται στον συντονισμό της ενεργής θέσης του ιόντος Zn^{2+} . Το ενεργό ιόν Zn^{2+} συντονίζει και πολώνει το επιτιθέμενο μόριο του νερού. Επιπλέον, το Zn^{2+} μαζί με μια Tyr που αντικαθίσταται από ένζυμα His, αυξάνει την ηλεκτροφιλικότητα του καρβονυλικού άνθρακα της ακετυλομάδας όντας σε επαφή με το καρβονυλικό οξυγόνο. Κατά την κατάλυση το ιόν Zn^{2+} και η Tyr σταθεροποιούν το ενδιάμεσο τετραεδρικό οξυανιόν [18].



Εικόνα 2: Α) Ενζυμική μεταφορά μιας ακετυλομάδας από το Ac-CoA στην N-τελική αμινομάδα ενός πολυπεπτιδίου, καταλύομενη από N-τελικές ακετυλοτρανσφεράσες (NATs). Η αντίδραση θεωρείται μη αντιστρεπτή. Β) Αντιστρεπτή ακετυλίωση της ε-αμινομάδας ενός καταλοίπου λυσίνης από ακετυλοτρανσφεράσες λυσίνης (KATs). Η

αποακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης καταλύεται από αποακετυλάσες λυσίνης (KDACs) και Γ) είναι εξαρτώμενη από NAD^+ στην περίπτωση των σιρτουινών. NAD^+ , νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο· NAM, νικοτιναμίδιο. Η Εικόνα αναπαράγεται αυτούσια από το [19].

1.2.1 Σιρτουίνες (Sirtuins, SIRTs)

Μέχρι σήμερα γνωρίζουμε επτά διαφορετικές σιρτουίνες (SIRT1-7), πρωτεϊνικές αποακετυλάσες εξαρτώμενες από NAD^+ που δρουν σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων [20]. Μεταξύ τους διαφέρουν ως προς τις ειδικότητες υποστρώματος, τον κυτταρικό εντοπισμό και τα εξαρτώμενα από τον κάθε ιστό επίπεδα έκφρασης. Ειδικότερα, αυτές της κατηγορίας I (SIRT1-3) έχουν εμπλακεί στην παθογένεση διαφορετικών ασθενειών και η αναστολή ή η ενεργοποίηση τους έχουν προταθεί ως πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές [4, 7, 20].

Η SIRT1 παρουσιάζει ισχυρή δράση αποακετυλάσης κυρίως στον πυρήνα, η SIRT2 είναι ενεργή στο κυτταρόπλασμα αλλά έχει βρεθεί ότι ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο δρώντας στον πυρήνα, ενώ οι SIRT3,4,5 δρουν στα μιτοχόνδρια. Η SIRT4, αξίζει να αναφερθεί, πως στα μιτοχόνδρια παρουσιάζει περιορισμένη δραστηριότητα αποακετυλάσης αλλά αφαιρεί μακρύτερες ακυλοαλυσίδες από τις πλευρικές αλυσίδες λυσίνης, μπορεί επίσης να ρυθμίσει την έκκριση ινσουλίνης στα μιτοχόνδρια παγκρεατικών β-κυττάρων [20]. Η SIRT5 στη μιτοχονδριακή μήτρα παρουσιάζει ισχυρή δράση αποακετυλάσης λυσίνης προς μηλονυλο-, γλουταρυλο-, και ηλεκτρυλο-ομάδες. Η SIRT6 εντοπίζεται στον πυρήνα με εξειδίκευση για μακρύτερα ακυλιωμένα υποστρώματα. Τέλος η SIRT7 εντοπίζεται στον πυρήνα με δράσεις αποακετυλάσης, δεσουκινυλάσης και δραστηριότητα προς μακρύτερες ακυλ-αλυσίδες, [7, 20].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια μελέτη στην οποία αναλύθηκε η δομή της SIRT5 προκειμένου να εξηγηθεί η έλλειψη της δραστηριότητας αποακετυλάσης και διαπιστώθηκε ότι ο θύλακας δέσμευσης του υποστρώματος περιέχει ένα κατάλοιπο αργινίνης, υποδηλώνοντας ότι η SIRT5 μπορεί να δεσμεύει και να στοχεύει μια ακετυλομάδα. Η εξαρτώμενη από το NAD^+ δραστηριότητα δεσουκινυλάσης της SIRT5 αποδείχθηκε στη συνέχεια *in vitro*, καθώς και εμμέσως *in vivo*, τεκμηριώνοντας αύξηση στην ηλεκτρουλίωση πρωτεϊνών σε ποντίκια με γενετική απαλοιφή της SIRT5. Στα ηπατοκύτταρα και στο πλάσμα αυτών των ποντικών, η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων μειώθηκαν όπως επίσης και τα επίπεδα β-υδροξυβουτυρικού. Μια άλλη μελέτη επιβεβαίωσε ότι η SIRT5 εκτός από την ηλεκτρουλίωση της λυσίνης ρυθμίζει και την μηλονυλίωση πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών και προκαρυωτικών οργανισμών [20, 21].

Όπως γίνεται κατανοητό, οι περισσότερες σιρτουίνες μπορεί να δρουν σε πολλαπλά ακυλικά υποστρώματα τουλάχιστον *in vitro* π.χ. προπιονυλίωση, βουτυρυλίωση, κροτονυλίωση, εξανοϋλίωση, οκτανοϋλίωση, δεκανο- και δωδεκανοϋλίωση, μυριστοϋλίωση, παλμιτοϋλίωση και λιποϋλίωση [21]. Εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό τους η ικανότητα όχι μόνο να αποακετυλιώνουν τα κατάλοιπα λυσίνης αλλά και να ενεργούν ως μονο-ADP-ριβοσυλτρανσφεράσες. Έτσι, μπορούν να τροποποιήσουν τη χρωματίνη, να επιδιορθώνουν το DNA και να διαμεσολαβήσουν επιπλέον βιολογικές διεργασίες [11]. Ειδικά η SIRT3 εμφανίζει μεγάλη επιρροή στον διάμεσο μεταβολισμό, αποακετυλιώνοντας αρκετά ένζυμα και ρυθμίζοντας τη δραστηριότητά τους. Οι μη μιτοχονδριακές σιρτουίνες, SIRT1, SIRT6, SIRT7 εμπλέκονται επίσης σε λειτουργίες του μεταβολισμού, ιδιαίτερα στο μεταβολισμό της γλυκόζης [11].

Σχετικά με το ρόλο της SIRT3 στο μεταβολισμό, το ένζυμο αποακετυλιώνει αρκετά βασικά ένζυμα, λειτουργεί δηλαδή σαν μεταβολικός αισθητήρας που ανταποκρίνεται στην αλλαγή της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου και συγκεκριμένα των επιπέδων του NAD^+ [22]. Με τον τρόπο αυτό επηρεάζει τη λειτουργία μεταβολικών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, του κύκλου Krebs, της β-οξείδωσης, της κετογένεσης. Επίσης, εμπλέκεται στην παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) επηρεάζοντας τη δραστικότητα της μαγγανιακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου του οξυγόνου (MnSOD) [23].

Πειράματα έδειξαν υπερακετυλίωση στα μιτοχόνδρια ποντικών που δεν εκφράζουν την SIRT3, υποδεικνύοντας ότι η SIRT3 ήταν η κύρια μιτοχονδριακή πρωτεϊνική αποακετυλάση. Είναι ενδιαφέρον ότι σε ποντίκια που δεν εκφράζονται οι πρωτεΐνες SIRT4 και SIRT5 δεν παρατηρήθηκε αυξημένη ακετυλίωση, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι πρωτεΐνες στόχευαν περιορισμένο αριθμό ακετυλιωμένων πρωτεϊνών ή εναλλακτικά άλλες τροποποιήσεις λυσίνης [21]. Φαινοτυπικά τα ποντίκια SIRT3^{-/-} είναι υγιή υπό κανονικές συνθήκες αλλά παρουσιάζουν μεταβολικούς φαινότυπους κατά τη διάρκεια της νηστείας, συμπεριλαμβανομένων των χαμηλών επιπέδων ATP και αδυναμία να διατηρήσουν τη θερμοκρασία τους κατά την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία. Ο Hirschey και οι συνεργάτες του συνέδεσαν την αύξηση ακετυλίωσης με τη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου και την επακόλουθη αδρανοποίηση της αφυδρογονάσης των ακυλ-CoA μακράς αλυσίδας (LCAD), ένα βασικό ένζυμο για τη β-οξείδωση στον ποντικό [10]. Σε συνέχεια αυτού διαπιστώθηκε ότι τα ποντίκια SIRT3^{-/-} παρουσίαζαν έλλειψη ευαισθησίας στην ινσουλίνη, παχυσαρκία, υπερλιπιδαιμία και ηπατική στεάτωση όταν λάμβαναν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Όταν νήστευαν, τα ποντίκια SIRT3^{-/-}

παρουσίαζαν μειωμένη ικανότητα να παράξουν ενέργεια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και είχαν αλλαγμένα προφίλ αμινοξέων στην κυκλοφορία του αίματος [10]. Ωστόσο, η στοχευμένη απαλοιφή της SIRT3 στο συκώτι ή στον σκελετικό μυ αυτών των ποντικών δεν οδήγησε σε τυχόν παρατηρήσιμους φαινότυπους, υποδηλώνοντας ότι ο μεταβολικός φαινότυπος της SIRT3 δεν διαμεσολαβείται μέσω του ήπατος ή του σκελετικού μυός [24]. Άλλες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια που δεν είχαν μία ή περισσότερες από τις μιτοχονδριακές σιρτουίνες (κυρίως SIRT3 και SIRT5), έδειξαν πως η ακετυλίωση λυσίνης είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο το πλεόνασμα άνθρακα διαταράσσει τη λειτουργία ή και την ποιότητα των πρωτεϊνών, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο το μεταβολικό και αναπνευστικό απόθεμα με τρόπο που αυξάνει την ευαισθησία των οργάνων στο ενεργειακό στρες [25].

Επιπρόσθετα, οι SIRTs συχνά εμπλέκονται στους μηχανισμούς που διέπουν τα φαινόμενα σχετιζόμενα με τον περιορισμό θερμίδων (Calorie Restriction, CR), φαινόμενα που συνολικά παρατείνουν τη ζωή ή/και καθυστερούν την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία στα θηλαστικά [26].

Η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών, νευροεκφυλιστικών παθήσεων και του καρκίνου αυξάνεται με την ηλικία. Ο περιορισμός θερμίδων, CR, καθυστερεί ισχυρά τις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία και παρατείνει τόσο την υγεία όσο και τη διάρκεια ζωής σε διαφορετικά είδη. Τα μιτοχόνδρια, το κέντρο του κυτταρικού οξειδωτικού μεταβολισμού, είναι ζωτικής σημασίας στην κυτταρική υγεία και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχει συσχετιστεί με την επιταχυνόμενη γήρανση. Ένα από τα χαρακτηριστικά του CR είναι η διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες. Προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει ότι η εξαρτώμενη από SIRT3

αποακετυλίωση μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των μιτοχονδρίων υπό συνθήκες CR [27, 28].

Συνοπτικά, οι σιρτουίνες είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας και στοχεύουν σε διαφορετικές ιστόνες αλλά και δομικές πρωτεΐνες, ένζυμα καθώς και μη ιστονικά συστήματα του ‘μηχανισμού’ χρωματίνης. Αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής, του μεταβολισμού, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στη φλεγμονή και βρέθηκε ότι καταστέλλουν αρκετές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των μεταβολικών παθολογιών [29].

1.3 Μη ενζυμική ακετυλίωση

Εκτός από την ενζυμικά καταλυόμενη ακετυλίωση, η τροποποίηση καταλοίπων λυσίνης πραγματοποιείται και χημικά μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης και του Ac-CoA. Αυτή η αντίδραση ευνοείται από υψηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις Ac-CoA, συνθήκες που σίγουρα υπάρχουν στα μιτοχόνδρια [30].

Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία ότι οι ιστόνες αντιδρούν χημικά με το Ac-CoA, ιδιαίτερα σε υψηλό pH. Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το μεγαλύτερο μέρος της ακυλίωσης στα μιτοχόνδρια καθοδηγείται από μη ενζυμικές διαδικασίες. Στοιχεία που συνηγορούν υπέρ αυτής της άποψης είναι: α) ο πολύ μεγάλος αριθμός των ταυτοποιημένων θέσεων ακυλίωσης και η εμφανής έλλειψη ειδικής αλληλουχίας που περιβάλλει τις θέσεις της ακυλίωσης β) το υψηλότερο pH της μιτοχονδριακής μήτρας που σχετίζεται με την αποπρωτονίωση των ε-αμινομάδων της λυσίνης τις καθιστά πιο ευαίσθητες σε ακυλίωση γ) η

υψηλή τοπική συγκέντρωση ακυλ-CoA εντός της μιτοχονδριακής μήτρας [31].

Από διάφορες μελέτες προέκυψε ότι η μη ενζυμική ακετυλίωση πρωτεϊνών είναι ημιαλεκτική. Για συγκεκριμένο ιστότοπο, οι ρυθμοί μη ενζυμικής ακετυλίωσης μετρήθηκαν για 90 θέσεις σε 8 φυσικές καθορισμένες πρωτεΐνες. Η αντιδραστικότητα της λυσίνης είτε στο Ac-CoA είτε στο ακετυλοφωσφορικό (Ac-P) κυμαινόταν πάνω από 3 τάξεις μεγέθους, με τις τοποθεσίες με τη μεγαλύτερη αντιδραστικότητα να βρίσκεται εντός συστάδων βασικών καταλοίπων, ενώ οι λυσίνες χαμηλής αντιδραστικότητας εμπλέκονταν σε ισχυρές ελκυστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με όξινα κατάλοιπα. Ac-P, το οποίο οδηγεί την ακετυλίωση υπό συνθήκες διακοπής της ανάπτυξης και άφθονης γλυκόζης στα βακτήρια, είναι μια εναλλακτική πηγή ακυλίωσης (επί του παρόντος άγνωστη στα θηλαστικά). Ενώ η οξική κινάση βρίσκεται σε ορισμένα ευκαρυωτικά μικρόβια, η οδός που οδηγεί στη σύνθεση Ac-P προφανώς απουσιάζει από υψηλότερους οργανισμούς. Ένα αντιδραστικό είδος φωσφοακυλίου μεγαλύτερης σημασίας για τα συστήματα θηλαστικών είναι το 1,3 διφωσφογλυκερικό (1,3-BPG), ένα κυτοσολικό ενδιάμεσο στη γλυκόλυση που πρόσφατα αναφέρθηκε ότι δεν τροποποιεί ενζυμικά τα κατάλοιπα λυσίνης, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται σε θέσεις δέσμευσης ενζύμων και αναστέλλουν τη λειτουργία των ενζύμων. Αν και ούτε το 1,3-BPG ούτε το Ac-P βρίσκονται στο μιτοχονδριακό περιβάλλον, παρέχουν επιπλέον στοιχεία για την ιδέα ότι τα μεταβολικά ενδιάμεσα είδη ακυλίου μπορούν να είναι εγγενώς αντιδραστικά με πιθανές φυσιολογικές συνέπειες και ότι η μεταφορά των ακετυλομάδων στις λυσίνες μπορεί να εμφανίζονται εύκολα απουσία ακυλοτρανσφερασών λυσίνης [21].

Το περιβάλλον της μιτοχονδριακής μήτρας, το οποίο έχει αλκαλικό pH και άφθονο Ac-CoA, ευνοεί τη μη ενζυμική ακετυλίωση. In vitro

μελέτες έδειξαν ότι οι παραπάνω συνθήκες είναι επαρκείς για την πρόκληση χημικής ακετυλίωσης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας Ac-CoA ως υπόστρωμα [8]. Μελέτες σε διάφορους ιστούς ποντικού έχουν δείξει ότι η ακετυλίωση πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια συμβαίνει σε πολύ χαμηλή στοιχειομετρία σε αντίθεση με τη φωσφορυλίωση και την NT-ακετυλίωση (ακετυλίωση του N-τελικού άκρου). Αυτό υποδηλώνει ότι η ακετυλίωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών συμβαίνει λόγω της υψηλής συγκέντρωσης Ac-CoA και του υψηλού pH στα μιτοχόνδρια. Σύμφωνα με το παραπάνω σενάριο, ο ρόλος της SIRT3 είναι η αποακετυλίωση αυτών των πρωτεϊνών. Σε περιπτώσεις όπου η χαμηλή διαθεσιμότητα ενέργειας αυξάνει την ανάγκη για παραγωγή ATP μέσω της β-οξείδωσης, η δράση της SIRT3, οδηγεί σε αποακετυλίωση των συγκεκριμένων ενζύμων [32].

1.4 Ακετυλίωση του αμινοτελικού άκρου (NT-ακετυλίωση) : τι είναι και ποιος ο ρόλος της

Η NT-ακετυλίωση αποτελεί μια άφθονη μετα ή συν-μεταφραστική τροποποίηση (co- and post-translational modification), η οποία διατηρείται σε όλα τα είδη, με την συχνότητα των ακετυλιωμένων πρωτεϊνών να αυξάνεται με την πολυπλοκότητα του οργανισμού. Αρχικά, στα αρχαία και τα βακτήρια θεωρήθηκε σπάνιο γεγονός και φαινόταν ότι δεν υπήρχε σε όλα τα είδη. Στο βακτήριο E.Coli μόνο 5 πρωτεΐνες, κυρίως ριβοσωμικές υπομονάδες, έχουν ταυτοποιηθεί να φέρουν μια ακέτυλομάδα στο N-άκρο τους. Ωστόσο μια πρόσφατη μελέτη πρωτεομικής με χρήση φασματομετρίας μάζας ταυτοποίησε 31 NT-ακετυλιωμένες πρωτεΐνες. Επιπλέον, πρόσφατα έχουν ταυτοποιηθεί νέες NT-ακετυλιωμένες πρωτεΐνες σε διαφορετικά βακτηριακά είδη που δείχνουν ότι η NT-

ακετυλίωση συμβαίνει περισσότερο συχνά από ότι αναμενόταν αρχικά, παίζοντας σημαντικούς ρόλους στους οργανισμούς [33].

1.4.1 Ένζυμα ακετυλίωσης του αμινοτελικού άκρου

Αυτή η τροποποίηση καταλύεται από ακετυλοτρανσφεράσες του N-τελικού άκρου (NATs) που υπάρχουν ως 7 κύρια πρωτεϊνικά σύμπλοκα NatA-NatF και NatH στα κύτταρα θηλαστικών. Η τροποποίηση περιλαμβάνει τη μη αντιστρεπτή ομοιοπολική προσθήκη μιας ακετυλομάδας από το Ac-CoA στην α-αμινομάδα της πρωτεΐνης [34].

Συγκεκριμένα, το ένζυμο NatA είναι υπεύθυνο για την N-τερματική ακετυλίωση μετά την αφαίρεση του καταλοίπου μεθειονίνης (iMet) [34]. Οι NAT μεταφέρουν ακετυλομάδα από το Ac-CoA στη θετικά φορτισμένη ελεύθερη α-αμινομάδα μιας νεοσυντιθέμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η συνδεδεμένη ακετυλομάδα εξουδετερώνει αυτό το θετικό φορτίο και κανονικά αποκλείει το N-άκρο από περαιτέρω τροποποιήσεις. Ανάλογα με τη NAT, η ακετυλομάδα μεταφέρεται στο μη διασπασμένο αρχικό iMet της εκκολαπτόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή η αντίδραση λαμβάνει χώρα μετά την εκτομή του iMet με δεσμευμένες σε ριβοσώματα αμινοπεπτιδάσες μεθειονίνης (MetAPs). Το N-άκρο υπόκειται επίσης σε άλλες PTM, όπως προπιονυλίωση ή αργινυλίωση. Δεν είναι όλα τα πιθανά υποστρώματα NAT πλήρως NT-ακετυλιωμένα. Επομένως μπορεί να υπάρχει και μη ακετυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης και ακετυλιωμένη μορφή ταυτόχρονα στο κύτταρο.

Μία N-ακετυλοτρανσφεράση που έχει μελετηθεί αρκετά είναι η GCN5, μέλος της υπερικογένειας GNAT, καταλυτικός μηχανισμός της οποίας είναι κυρίως η μεταφορά ακετυλομάδας από το CoA σε έναν

πυρηνόφιλο δέκτη με στόχο την ε-αμινομάδα της λυσίνης κυρίως στις ιστόνες. Ιδιαίτερα, ο μηχανισμός χαρακτηρίζεται ως διαδοχικός στον οποίο το Ac-CoA, ακολουθούμενο από το υπόστρωμα της λυσίνης, συνδέεται με την ενεργή θέση για να σχηματίσει ένα τριμερές σύμπλεγμα. Ένα βασικό αμινοξύ βοηθά στην αποπρωτονίωση της ε-αμινομάδας στο υπόστρωμα λυσίνης για να αυξηθεί η πυρηνοφιλία της. Στη συνέχεια, η αφόρτιστη λυσίνη ‘επιτίθεται’ στο ακετυλικό τμήμα σχηματίζοντας ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο (περιοριστικό ρυθμιστικό βήμα) και την ίδια στιγμή καταρρέει το ενδιάμεσο, με αποτέλεσμα να ακετυλιώνεται η λυσίνη και να σχηματίζονται προϊόντα Ac-CoA. Σχετικά με την κινητική του μηχανισμού, το pKa της ελεύθερης λυσίνης σε υδατικό περιβάλλον είναι περίπου 9,5, δηλαδή η λυσίνη είναι σχεδόν πλήρως πρωτονιωμένη σε φυσιολογικό pH. Κατά συνέπεια, δεν ευνοείται η δράση της ως πυρηνόφιλο έναντι της καρβονυλικής ομάδας του Ac-CoA. Στην περίπτωση αυτή, η ακετυλοτρανσφεράση δημιουργεί ένα ευνοϊκό περιβάλλον που μειώνει το pKa της λυσίνης έτσι ώστε να ευνοείται η αποπρωτονιωμένη της μορφή [35].

Κάτι που παρατηρείται σε πολλές HAT είναι η αυτοακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης εντός της καταλυτικής ή βοηθητικής υπομονάδας του συμπλέγματος HAT. Η αυτοακετυλίωση του GCN5 είναι μοναδική στο ότι αυτή η τροποποίηση μειώνει τη δραστηριότητα της HAT, ενώ γενικά το αντίθετο συμβαίνει με άλλα μέλη της οικογένειας HAT, και μπορεί να συμβεί με μηχανισμό *cis* / ενδομοριακό (μέσα στο ίδιο μόριο) ή *trans* / ενδομοριακό (μεταξύ διαφορετικών μορίων).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η GCN5 είναι σπουδαίας σημασίας στην ανθρώπινη ανάπτυξη και νόσο και πλέον σχεδιάζονται φάρμακα που μπορούν να αναστείλουν τόσο την ίδια όσο και άλλες HAT ως νέα επιγενετική θεραπευτική προσέγγιση. Ως αναστολείς χρησιμοποιούνται

μόρια που συνδέονται με μεγαλύτερη συγγένεια από το CoA καθώς και ακετυλιωμένα πεπτίδια. Όμως, αυτοί οι αναστολείς έχουν περιορισμένη κυτταρική διαπερατότητα [35].

1.4.2 Οι επιπτώσεις της NT-ακετυλίωσης σε μοριακό επίπεδο

Οι βασικοί ρόλοι της NT-ακετυλίωσης συνοψίζονται στα ακόλουθα.

- (Α) καθορίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό ορισμένων πρωτεϊνών.
- (Β) περιορίζει τις πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα αναστέλλοντας τη μετανάστευση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και το εκκριτικό μονοπάτι.
- (Γ) μεταβάλλει τις ιδιότητες του N-άκρου, άρα οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης ευνοούνται.
- (Δ) είναι κρίσιμη για την αναδίπλωση πρωτεΐνης σταθεροποιώντας δομικά τα εύκαμπτα N-άκρα [36].

1.4.3 NT-ακετυλίωση και παθολογικές διαταραχές

Νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer, η ασθένεια Πάρκινσον και η άνοια που συνδέεται με τα Lewy bodies, χαρακτηρίζονται από σχηματισμό παθογόνων ινιδίων που αποτελούνται από αδιάλυτες πρωτεΐνες στον εγκέφαλο. Οι δυσλειτουργίες των NAT και η έλλειψη NT-ακετυλίωσης σχετίζονται με αρκετές από αυτές τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Ιδιαίτερα, στη νόσο Πάρκινσον, η ασυνουκλεΐνη (a-synuclein) συσσωματώνεται σε αδιάλυτα ινίδια που

ονομάζονται σώματα Lewy. Η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται στη δέσμευση των λιπιδίων, στη διακίνηση συναπτικών κυστιδίων, καθώς και στη νευρωνική κυτταρική επιβίωση, με τον ακριβή μηχανισμό, βέβαια, να παραμένει άγνωστος. Ωστόσο, η μεσολαβούμενη από NATb NT-ακετυλίωση της α-συνουκλεΐνης παίζει ουσιαστικό ρόλο στην αναδίπλωση του σταθερού α-ελικοειδούς τετραμερούς και καθιστά την πρωτεΐνη ανθεκτική για συσσωμάτωση αμυλοειδούς. Η NT-ακετυλίωση είναι ένας γενικός μηχανισμός για τη σταθεροποίηση των α-ελικοειδών δομών στις πρωτεΐνες και την ενίσχυση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης - πρωτεΐνης όσο και της αλληλεπίδρασης της πρωτεϊνικής μεμβράνης – α-συνουκλεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, η NT-ακετυλίωση μεσολαβεί στην εξειδίκευση και την ενισχυμένη αλληλεπίδραση μεταξύ της α-συνουκλεΐνης και της νευρωνικής γαγγλιοσίνης GM1. Αυτό προάγει τη σύνδεση της μεμβράνης και τη σταθεροποίηση του ελικοειδούς σχηματισμού της α-συνουκλεΐνης. Έτσι, η NT-ακετυλίωση μπορεί να έχει προστατευτική λειτουργία και δυνητικά παίζει ρόλο στην πρόληψη της πρόιμης ανάπτυξης της συγκεκριμένης νόσου [37, 38].

Επιπρόσθετα, παθολογικές καταστάσεις προκαλούνται από δυσλειτουργικό μηχανισμό των NAT, αποδεικνύοντας ότι οι NAT είναι απαραίτητες κατά την πρόιμη εμβρυογένεση και έχουν σημαντικές ρυθμιστικές λειτουργίες κατά την ανάπτυξη των ιστών και οργάνων. Τα τελευταία πέντε χρόνια, αρκετές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες NAT έχουν ανακαλυφθεί και μερικά κοινά κλινικά χαρακτηριστικά είναι τα εξής: αναπτυξιακές καθυστερήσεις (που κυμαίνονται από ήπιες έως σοβαρές), υποτονία, σκολίωση και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Άλλο ένα σύνδρομο, το Ogden που επηρεάζει μόνο αρσενικά βρέφη (αφορά μετάλλαξη στο γονίδιο Naa10), χαρακτηρίζεται από σοβαρή αναπτυξιακή καθυστέρηση, ένα συνδυασμό

κρανιοπροσωπικών ανωμαλιών, ηλικίας, εμφάνισης, υποτονίας, καρδιακής αρρυθμίας ακολουθούμενη από μυοκαρδιοπάθεια (θανατηφόρα κατά την βρεφική ηλικία) [39].

Τέλος, το πιο αξιοσημείωτο εύρημα σχετικά με την παθολογία αφορά τη σύνδεση NAT με τον καρκίνο και ειδικότερα το NATa εμπλέκεται στην ανάπτυξη του όγκου και στην επιβίωση του καρκινικού κυττάρου. Προτείνεται ότι το Naa10 δρα τόσο ως ογκοπρωτεΐνη όσο και ως ογκοκατασταλτικό. Το Naa15, βοηθητική υπομονάδα του NATa, εντοπίστηκε αρχικά σε εκφραζόμενα γονίδια στο θηλώδες καρκίνωμα του θυροειδούς (PTC) όπου εμφάνισε αυξημένα επίπεδα mRNA. Αργότερα, η υπερέκφραση του Naa15 βρέθηκε στον καρκίνο του στομάχου, στην προμυελοειδή και μυελοειδή λευχαιμία αλλά και να είναι μειωμένο κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που σημαίνει πως το γονίδιο αυτό συνδέεται με την κατάσταση διαφοροποίησης και την επιθετικότητα των όγκων. Το Naa10 συν-ρυθμίζεται με το Naa15 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και έτσι εμφανίζονται διάφοροι τύποι καρκίνου. Επίσης, αυξημένα επίπεδα έκφρασης Naa10 εμφανίζονται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του μαστού, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του τραχήλου της μήτρας. Τέλος, παρόμοια με το Naa15, υψηλή έκφραση του Naa10 σχετίζεται με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης και επιθετικότητα των όγκων [19].

Συνοψίζοντας, οι NAT εμπλέκονται σε ένα πλήθος μονοπατιών σηματοδότησης και έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση, την απόπτωση και ότι έχουν σημαντικό ρόλο στο χρωμοσωμικό διαχωρισμό. Ο αναδυόμενος ρόλος και η συμμετοχή και των 6 ανθρώπινων NAT σε καρκίνους ή άλλες παθολογίες δεν αποτελεί έκπληξη, εάν ληφθεί υπόψη

ότι το 80% όλων των πρωτεϊνών τροποποιούνται από αυτά τα ένζυμα. Τέλος, επηρεάζουν και άλλες πρωτεΐνες, είτε μέσω άμεσης NT-ακετυλίωσης των πρωτεϊνών του υποστρώματος στόχου είτε με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης και επακόλουθη καταστολή ή ενεργοποίηση [40].

1.5 Ο ρόλος της ακετυλίωσης στην εξέλιξη

Η ακετυλίωση της λυσίνης διατηρείται εξελικτικά. Μελέτες σε επίπεδο πρωτεώματος σε *E.Coli* και *S.Cerevisiae* έδειξαν τη σημασία αυτής της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης σε αυτούς τους οργανισμούς. Πολλές από τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν αφορούσαν μεταβολισμό, μεταφραστική ρύθμιση ή απόκριση στο στρες. Ο αριθμός των θέσεων ακετυλίωσης αυξάνεται με την πολυπλοκότητα του οργανισμού. Στο βακτήριο *E.Coli* μόνο 138 θέσεις ακετυλίωσης σε 91 πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί [41], ενώ στο *S.Cerevisiae* ταυτοποιήθηκαν 2.878 θέσεις σε 1.059 πρωτεΐνες [42]. Μια ανάλυση αρουραίου σε επίπεδο οργάνου έδειξε ότι στους ιστούς εντοπίστηκαν 15.474 ιστοειδικές θέσεις τροποποιήσεων σε 4.541 πρωτεΐνες που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η γονιδιακή έκφραση, ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού, των αμινοξέων και της γλυκόζης, η απόπτωση και μεμβρανική μεταφορά [43]. Ωστόσο, η ακετυλίωση της λυσίνης εμφανίζεται πιο συχνά από τη φωσφορυλίωση στα βακτήρια. Με βάση την ενδοσυμβιωτική θεωρία δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ακετυλίωση λυσίνης είναι επίσης πιο άφθονη στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων από άλλες PTMs. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι όταν συγκριθεί περαιτέρω η ακετυλίωση της λυσίνης με τη

φωσφορυλίωση, συχνά εντοπίζονται θέσεις ακετυλίωσης λυσίνης σε εξαιρετικά δομημένες περιοχές (α-έλικες καθώς και β-φύλλα), ενώ οι φωσφορυλιώσεις συμβαίνουν κυρίως σε εύκαμπτες πρωτεϊνικές περιοχές [44].

1.6 Η ακετυλίωση ως ρυθμιστικός μηχανισμός της λειτουργίας των ιστονών

Όπως προαναφέρθηκε, οι πρώτες ακετυλιωμένες πρωτεΐνες που ανακαλύφθηκαν ήταν οι ιστόνες. Και οι τέσσερις τύποι ιστόνης H2A, H2B, H3, H4 ακετυλιώνονται από διαφορετικές HAT. Μαζί με το DNA οι πρωτεΐνες ιστόνης σχηματίζουν τα λεγόμενα νουκλεοσώματα. Ένα νουκλεόσωμα αποτελείται από περίπου 15-200 bps DNA, το οποίο περιτυλίγεται σχεδόν δύο φορές γύρω από έναν πυρήνα πρωτεϊνών που σχηματίζεται από δύο αντίγραφα καθενός από τα τέσσερα μόρια ιστόνης. Οι αλυσίδες νουκλεοσωμάτων συναρμολογούνται σε καθορισμένες δομές χρωματίνης, οι οποίες μπορεί να είναι μεταγραφικά ενεργές ή ανενεργές. Τα μόρια ιστόνης τροποποιούνται από διάφορες PTM, εκ των οποίων η φωσφορυλίωση, η μεθυλίωση και η ακετυλίωση παίζουν τους πιο κρίσιμους ρόλους για την προσβασιμότητα στο DNA και τη μεταγραφική ρύθμιση. Μετά τη σύνθεση, οι πρωτεΐνες ιστόνης ακετυλιώνονται παροδικά γεγονός που επηρεάζει τη μετατόπιση τους στον πυρήνα. Μετά τη δέσμευση στο DNA, οι ιστόνες αποακετυλιώνονται ξανά με διαφορετικό μοτίβο, το οποίο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της χρωματίνης [45].

Γενικά, ένας υψηλός βαθμός ακετυλίωσης συσχετίζεται με αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα. Η ακετυλίωση ιστόνης

αποσταθεροποιεί την αλληλεπίδραση DNA-ιστόνης επειδή μια πλευρική αλυσίδα ακετυλιωμένης λυσίνης χάνει το θετικό της φορτίο και έτσι την ικανότητα να σχηματίζει ‘γέφυρες (αλατιού)’ με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό του DNA. Αυτό οδηγεί σε μια ανοιχτή, ελαφρά συσκευασμένη δομή χρωματίνης και κατά συνέπεια σε αύξηση της γονιδιακής μεταγραφής. Η πυκνά συσκευασμένη μορφή της χρωματίνης ονομάζεται ετεροχρωματίνη. Η ακετυλίωση ιστόνης επιτρέπει τη δέσμευση bromodomains που περιέχουν πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες, διευρύνοντας τον αριθμό των ρυθμιστικών παραγόντων. Στους ανθρώπους, η οικογένεια των bromodomains αποτελείται συνολικά από 46 διαφορετικές πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με τη γονιδιακή μεταγραφική ενεργοποίηση από KAT, οι KDAC καταστέλλουν τη μεταγραφή, λόγω της αποακετυλίωσης ιστονών. Συνολικά, οι δράσεις των KAT και KDAC στο νουκλεόσωμα και η γονιδιακή μεταγραφή εξαρτώνται από τη θέση που δρουν καθώς και τα διάφορα σύμπλοκα που σχηματίζουν. Αρκετά σύμπλοκα ρύθμισης της μεταγραφής μοιράζονται τις ίδιες KAT και KDAC αλλά διαφέρουν τελείως στις λειτουργίες τους [45].

Εκτός από τις ιστόνες, οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες είναι άλλη μια οικογένεια που στοχεύει τις KAT. Τα κυτταροσκελετικά συμπλέγματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχήμα των κυττάρων, στην ενδοκυτταρική μεταφορά φορτίου, στην κυτταρική διαίρεση και κινητικότητα. Οι μονομερείς κυτταροσκελετικές G πρωτεΐνες ακτίνης, για παράδειγμα, μπορούν να πολυμεριστούν σε νηματώδη f ακτίνη και να σχηματίσουν τα ευέλικτα μικρονημάτια στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές της G-ακτίνης, α-, β- και γ-ακτίνη και αποδείχθηκε ότι και οι τρεις ισομορφές μπορούν να είναι ακετυλιωμένες. Δείχθηκε ότι η ακετυλίωση λυσίνης της γ-ακτίνης στη θέση 61 αυξάνει τη σταθερότητα της ίνας [46].

Η στοχευμένη ακετυλίωση πρωτεϊνών σηματοδότησης - ιστονών και σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες ιστόνης σε συγκεκριμένους γονιδιωματικούς τόπους συνδέονται με μια αυστηρή ρύθμιση όλων των τύπων διεργασιών που προέρχονται από το DNA ως μεταγραφή, αντιγραφή, ανασυνδυασμός, επιδιόρθωση, μετάφραση και σχηματισμός ειδικών δομών χρωματίνης. Ως εκ τούτου, οι συνέπειες της ακετυλίωσης είναι σημαντικές και επηρεάζουν ένα εύρος μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η ακετυλίωση ιστόνης συνδέεται με τη ρύθμιση του ενδοκυτταρικού pH. Ακετυλίωση και αποακετυλίωση ιστόνης εμφανίζεται γρήγορα και συνεχώς σε όλο το γονιδίωμα καταναλώνοντας έτσι Ac-CoA και δημιουργώντας αρνητικά φορτισμένα οξικά ανιόντα. Καθώς το pH μειώνεται οι ιστόνες υποακετυλιώνονται με τρόπο που εξαρτάται από HDAC και τα οξικά ανιόντα που ελευθερώνονται απομακρύνονται από το κύτταρο από τους συζευγμένους με πρωτόνια (H^+) μονοκαρβοξυλικούς μεταφορείς (MCTs) αποτρέποντας περαιτέρω μείωση του pH. Αντίστροφα, οι ιστόνες υπερακετυλιώνονται καθώς αυξάνεται το pH, ένας τυπικός μηχανισμός σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ταχέως. Επιπλέον, διαφορετικές θέσεις ακετυλίωσης ιστόνης ανταποκρίνονται διαφορετικά στις μεταβολές του pH [47].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως κατ' επανάληψη, η διαταραχή των επιπέδων ακετυλίωσης συνδέεται με νευροαναπτυξιακές διαταραχές, νευροεκφυλισμό και γήρανση. Η ακετυλίωση ιστόνης ενεργοποιείται από διάφορες μορφές νευρωνικής δραστηριότητας. Ένας εγκέφαλος που γερνάει συνήθως σχετίζεται με γνωστική έκπτωση. Μελέτες σε γερασμένους εγκεφάλους ποντικών και αρουραίων έχουν δείξει μειωμένο επίπεδο ακετυλίωσης. Άλλη μελέτη σε μεσήλικες μύγες έδειξε ότι η απορρύθμιση του μεταβολισμού με αυξημένα επίπεδα Ac-CoA και

επακόλουθα αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης σε ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας ζωής [45-47].

1.7 Ac-CoA ως δότης ακετυλομάδας, μια επισκόπηση του μεταβολισμού

Το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού ATP προέρχεται από το Ac-CoA το οποίο παράγεται από διάφορες πηγές: α) γλυκόλυση (πυροσταφυλικό από πυροσταφυλική αφυδρογονάση) β) β-οξείδωση λιπαρών οξέων γ) από κιτρικό από Ac-CoA κιτρική λυάση (ACL) και δ) από οξικό που καταλύεται από συνθετάση Ac-CoA. Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση, τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος και τα ένζυμα της β-οξείδωσης βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Η ACL δρα στο κυτοσολικό κιτρικό που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια. Οι συνθετάσες του Ac-CoA ρυθμίζονται με ανατροφοδότηση μέσω αντιστρεπτής ακετυλίωσης που αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα. Υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές της συνθετάσης του Ac-CoA (AceCS1, AceCS2). Τα ένζυμα βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια και αποακετυλιώνονται από τις SIRT1 και SIRT3 αντίστοιχα. Οι κυτταροπλασματικές και πυρηνικές δεξαμενές του Ac-CoA επικοινωνούν και διαμεσολαβούν την ακετυλίωση ιστονών και άλλων ιστονικών πρωτεϊνών καθώς και στη σύνθεση λιπιδίων, χοληστερόλης και αμινοξέων.

Στον πυρήνα, αρκετά ένζυμα είναι γνωστό ότι ακετυλιώνουν τις ιστόνες και τις μη ιστονικές πρωτεΐνες, χρησιμοποιώντας Ac-CoA από την κυτταροπλασματική δεξαμενή ως δότη της ακετυλομάδα. Η συγκέντρωση του Ac-CoA μεταβάλλεται με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου

και οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης φαίνεται να εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του δότη. Έτσι, ρυθμίζονται διαφορετικά από τις περισσότερες κινάσες, οι οποίες έχουν δραστηριότητες ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση του συμπαράγοντα τους, ATP.

Δεδομένου ότι τα περισσότερα ενδιάμεσα μεταβολικά ένζυμα βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, υπάρχουν πολλές ευκαιρίες για ρύθμιση του μεταβολισμού μέσω ακετυλίωσης. Στην πραγματικότητα, τα ένζυμα που συμμετέχουν στις μεταβολικές οδούς στα μιτοχόνδρια είναι ακετυλιωμένα, σε κάποιες περιπτώσεις εκτεταμένα. Τα γενικά επίπεδα ακετυλίωσης στα μιτοχόνδρια αυξάνονται με τη συγκέντρωση του Ac-CoA, η οποία εξαρτάται από το ρυθμό σύνθεσης του.

Δεδομένου ότι το Ac-CoA εμπλέκεται σε διάφορα αναβολικά και καταβολικά μονοπάτια είναι εύλογο να υποτεθεί ότι η διαθεσιμότητα του Ac-CoA επηρεάζει τα επίπεδα της ακετυλίωσης. Η παραπάνω υπόθεση φαίνεται ότι ισχύει στην περίπτωση της μιτοχονδριακής ακετυλίωσης. Ωστόσο, οι KAT που τροποποιούν τη χρωματίνη εξαρτώνται από τα επίπεδα πυρηνικού Ac-CoA για τη δραστηριότητα τους.

1.8 Ακετυλίωση και ασθένειες

Η αυστηρή ισορροπία μεταξύ ακετυλίωσης και αποακετυλίωσης παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, επηρεάζοντας μια σειρά κυτταρικών διεργασιών. Διαταραχές στην ισορροπία KAT-KDAC σχετίζονται με μια ποικιλία ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η καρδιακή υπερτροφία, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, τα αυτοάνοσα, το άσθμα και η ρετροϊκή παθολογία.

1.8.1 Μεταβολικό σύνδρομο, διαβήτης και παχυσαρκία

Η υπερφαγία και οι συναφείς ασθένειες όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου II, χαρακτηρίζονται από αυξημένη διαθεσιμότητα άκυλο-CoA. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του NAD^+ με συμπληρώματα διατροφής έχειδειχθεί ότι υπό προϋποθέσεις προστατεύει από την παχυσαρκία, εν μέρει με περιορισμό της μιτοχονδριακής ακετυλίωσης. Τα ποντίκια SIRT3 KO παρουσιάζουν μεταβολικές αλλαγές παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στο ανθρώπινο μεταβολικό σύνδρομο. Ένας ανθρώπινος πολυμορφισμός του γονιδίου της SIRT3 στον άνθρωπο που οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα αποακετυλάσης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο μεταβολικού συνδρόμου [48].

Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη παίζουν ουσιαστικούς ρόλους στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι KDAC παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε αυτή τη σηματοδότηση ινσουλίνης. Η HDAC μπορεί να συνδεθεί με τον υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS-1) στα ηπατικά κύτταρα, να μειώσει την ακετυλίωση και έτσι να μειώσει τη φωσφορυλίωση τυροσίνης που προκαλείται από τον IRS-1. Ο μεταφορέας γλυκόζης, GLUT4, περιέχει περιοχή δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα MEF2 και τη δομή I. Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικές HDAC κατηγορίας II ρυθμίζουν την έκφραση και τη δραστηριότητα των GLUT4 και MEF2 ιδιαίτερα των KDAC και HDAC που παρουσιάζονται ως βασικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης της ινσουλίνης. Η SIRT1 από την άλλη πλευρά βελτιώνει την επαγόμενη από τη γλυκόζη έκκριση παγκρεατικής ινσουλίνης και είναι σημαντική στη λειτουργία των β-κυττάρων. Ως εκ τούτου μπορεί να είναι ένας πιθανός στόχος για θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [48].

1.8.2 Χρόνιες πνευμονικές παθήσεις

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται ασθένειες όπως άσθμα, κυστική ίνωση, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, διάμεση πνευμονοπάθεια και το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας χαρακτηρίζονται από φλεγμονή και συντονισμένη έκφραση πολλαπλών φλεγμονωδών γονιδίων. Προφλεγμονώδεις μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NF-kb και η πρωτεΐνη ενεργοποιητής 1 (AP-1) ρυθμίζουν πολλά από αυτά τα φλεγμονώδη/άνοσα γονίδια. Ασθενείς με αυτές τις πνευμονικές παθήσεις έχουν συνήθως αυξημένη έκφραση KAT και αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης και μια επακόλουθη μειωμένη δραστηριότητα KDAC, ευνοώντας την αυξημένη έκφραση του φλεγμονώδους γονιδίου. Συνήθως ανιχνεύεται η αυξημένη ακετυλίωση των H3 και H4 ιδιαίτερα των H3K18, H4K8 και H4K12 ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες [49].

1.8.3 Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση

Η ιδιοπαθής πνευμονική υπέρταση χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια οξυγόνωσης αίματος λόγω αυξημένης αρτηριακής πίεσης και ίνωσης των αρτηριών που παρέχουν αίμα στους πνεύμονες. Η SIRT3 παρουσιάζεται ως πιθανή αιτία αυτής της ασθένειας, μέσω της ταυτοποίησης ενός πολυμορφισμού του γονιδίου της σε μελέτη 162 ασθενών. Αυξημένη ακετυλίωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στον προσβεβλημένο λείο μυ οδηγεί σε μιτοχονδριακή υπερπόλωση, αυξημένο πολλαπλασιασμό, καταστέλλεται η απόπτωση και τελικά σε προοδευτική αρτηριακή πάχυνση. Σε άλλους τύπους κυττάρων, η απώλεια της λειτουργίας SIRT3 οδηγεί σε μιτοχονδριακή εκπόλωση μέσω μειωμένης οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και επακόλουθη σύνδεση NAD⁺ [50, 51].

1.8.4 The Rubinstein-Taybi Syndrome

Το συγκεκριμένο σύνδρομο αποτελεί σπάνια νευροαναπτυξιακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από καθυστέρηση στην ανάπτυξη, σκελετικές ανωμαλίες, δυσμορφικά χαρακτηριστικά και νοητική στέρωση. Ένα ορισμένο επίπεδο της CBP είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη καθώς η αδρανοποίηση ενός αλληλόμορφου CBP προκαλεί αυτή τη νόσο αλλά προκαλείται και από de novo μεταλλάξεις στο p300. Οι μεταλλάξεις ποικίλουν από σχετικά μεγάλες διαγραφές εξονίων που αφαιρούν ολόκληρο το γονίδιο για να σημειωθούν μεταλλάξεις, μετατοπίσεις ή αναστροφές που διαταράσσουν το γονίδιο. Και οι 2 CBP και το p300 ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω της δραστηριότητας της ιστόνης ακετυλομεταφοράς και ρυθμίζουν πολλαπλές οδούς που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, τον έλεγχο, την επιδιόρθωση DNA, τη διαφοροποίηση και την καταστολή των όγκων. Το 2004 ο Alarcon και οι συνεργάτες του βρήκαν ακετυλίωση χρωματίνης και μακροπρόθεσμη πιθανότητα εξασθένησης του ιππόκαμπου σε ποντίκια με ένα μόνο αλληλόμορφο CBP [52]. Μελέτες του Wang και συνεργατών απέδειξαν ότι η CBP είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των νευρώνων και των νευρογλοιακών κυττάρων του εμβρυϊκού φλοιού. Τέλος, είναι ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς με αυτό το σύνδρομο έχουν αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο [53].

1.8.5 Καρκίνος

Η SIRT3 μπορεί να παίζει διάφορους ρόλους στην ογκογένεση, την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο η ακετυλίωση προάγει την ογκογένεση είναι η έναρξη του

φαινομένου Warburg ή η στροφή στη γλυκόλυση ως βασική πηγή ενέργειας του κυττάρου. Η μείωση της παραγωγής ROS εξαιτίας της δράσης της SIRT3 φαίνεται να αναστέλλει τη στροφή στη γλυκόλυση. Η SIRT4 φαίνεται ότι μπορεί να προκαλεί εξάρτηση από τη γλυκόζη λόγω της αναστολής της β-οξειδωσης και του καταβολισμού γλουταμίνης. Όμως, η δράση της μειώνει συνολικά το μεταβολισμό και δεν ενεργοποιεί το φαινόμενο Warburg. Η SIRT3 έχει αναφερθεί ως προαποπτωτική πρωτεΐνη και η απώλεια της σχετίζεται με ένα περιβάλλον ευνοϊκό της ανάπτυξης όγκων λόγω της αναστολής της παραγωγής ROS. Επιπρόσθετα, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων σε ορισμένους τύπους καρκίνου έχει επιπτώσεις στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τον αναβολισμό λόγω της ικανότητας της SIRT3 να αποτρέπει την υπερακετυλίωση. Η SIRT4 φαίνεται επίσης να ελέγχει την ογκογένεση μέσω της αναστολής του μεταβολισμού της γλουταμίνης, ο οποίος σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου [54].

Μια σειρά από βιολογικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης της επισκευής βλαβών στο DNA, η ανοσολογική απόκριση και η διακοπή του κυτταρικού κύκλου απαιτούν ακετυλίωση / αποακετυλίωση. Δυσλειτουργία των ανωτέρων βλαβών στο επίπεδο των ρυθμιστικών ενζύμων έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του καρκίνου. Μη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης ή / και μεταλλάξεις των ρυθμιστών ακετυλίωσης / αποακετυλίωσης επηρεάζουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου [55].

1.8.6 Νευρολογικές διαταραχές

Η μιτοχονδριακή ακετυλίωση επηρεάζει τη νευρωνική λειτουργία και η αφαίρεση από τις SIRTs μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της

υγείας. Η λειτουργία SIRT3 έχει αποδειχθεί ότι μετριάζει τον κυτταρικό θάνατο μετά από τοξικό στρες. Τα υπάρχοντα θεραπευτικά μόρια που στοχεύουν την ενεργοποίηση των SIRTs ώστε να διατηρήσουν χαμηλά επίπεδα μιτοχονδριακής ακετυλίωσης στον εγκέφαλο είναι περιορισμένα. Ο αιματεγκεφαλικός φραγμός αποκλείει μεγάλο αριθμό ενώσεων. Πρόσφατα, συμπληρώματα NAD⁺ μέσω των προδρόμων της ριβοσιδονικοτιναμίδης και του μονονουκλεοτιδίου νικοτιναμίδιου έχει αποδειχθεί ότι ενισχύουν τη λειτουργία της SIRT3 σε ιστούς όπως οι σκελετικοί μύες και η χορήγηση μακροπρόθεσμης και υψηλότερης δόσης συμβάλλει στη λειτουργία της SIRT3 σε νευρώνες [56].

1.9 Φασματομετρία μάζας για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών

Η φασματομετρία μάζας παρουσιάζεται ως μια πολύ σημαντική τεχνική για την ταυτοποίηση θέσεων ακετυλίωσης και αυτό λόγω του δυναμικού της εύρους, της ευαισθησίας και της συμβατότητας με μεθόδους εμπλουτισμού που στηρίζονται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι ακετυλιωμένης λυσίνης και άλλων άκυλο παραγώγων της λυσίνης [57].

Λόγω των σχετικά χαμηλών επιπέδων ενδογενούς ακετυλίωσης και του χαμηλού ποσοστού τροποποίησης ανά θέση ακετυλίωσης, έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές εμπλουτισμού με χρήση αντισωμάτων. Αυτές βασίζονται σε πολύ ειδικές, αναστρέψιμες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και εκμεταλλεύονται υψηλή συγγένεια μεταξύ αντισώματος και συνδέτη καθώς και υψηλή εκλεκτικότητα έναντι άλλων μορίων του μείγματος. Παρόλο που προσφέρουν υψηλή απόδοση και καλή

αναπαραγωγιμότητα, τα πολλαπλά βήματα που απαιτούνται επηρεάζουν σημαντικά την επαναληψιμότητα των μεθόδων αυτών. Επιπρόσθετα, τα πρωτόκολλα εμπλουτισμού συγγένειας απαιτούν υψηλή ποσότητα βιολογικού υλικού που αποτελεί πρόκληση όταν το αρχικό υλικό είναι διαθέσιμο σε περιορισμένη ποσότητα [58].

1.10 Μελλοντικοί στόχοι

Στο επίκεντρο ερευνητικών δράσεων βρίσκεται η πλήρης αποσαφήνιση των μηχανισμών που διέπουν την ακετυλίωση σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Οι κυρίαρχοι λόγοι που επιβάλλουν την μελέτη των μηχανισμών συνοψίζονται στα παρακάτω.

A) υψηλά επίπεδα έκφρασης διαφορετικών NAT συχνά συσχετίζονται με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης και επιθετικότητας διαφορετικών τύπων όγκων ενώ μελέτες απαλοιφής των NAT καταδεικνύουν ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε φάρμακα. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι NAT είναι απαραίτητες για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, επομένως αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους στη θεραπεία του καρκίνου. Πράγματι, οι αναστολείς NAT βρίσκονται στο στάδιο ανάπτυξης με απώτερο στόχο τη χρήση τους στην κλινική θεραπεία.

B) φαίνεται ότι τα περισσότερα μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά ένζυμα του μεταβολισμού είναι ακετυλιωμένα και ότι η ακετυλίωση γενικά μειώνει την καταλυτική δράση των ακετυλιωμένων ενζύμων αν και σε ορισμένες περιπτώσεις ισχύει το αντίθετο. Παρόλου που έχουν ταυτοποιηθεί δύο ένζυμα με πιθανή δράση ακετυλοτρανσφερασών, το μεγαλύτερο ποσοστό ακετυλιωμένων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια τροποποιούνται μη ενζυμικά. Το γεγονός αυτό θέτει υπό αμφισβήτηση τον

ρυθμιστικό ρόλο που έχει αποδοθεί στην ακετυλίωση σε ότι αφορά την λειτουργία των ενζύμων. Υπό το πρίσμα αυτό, η βασική λειτουργία της SIRT3, της κύριας μιτοχονδριακής αποακετυλάσης, θα ήταν η προστασία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών από την "εναπόθεση" της περίσσειας Ac-CoA. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να αποσαφηνίσουν εάν η ακετυλίωση επηρεάζει το μεταβολισμό ως ρυθμιστικός μηχανισμός ή μέσω του στρες του άνθρακα (carbon stress). Η ταυτοποίηση των ενδογενών στόχων των δύο μιτοχονδριακών ακετυλοτρανσφερασών θα παρέχει πληροφορίες για τις μεταβολικές διαδικασίες που επηρεάζονται από την ακετυλίωση.

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ

2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού μείγματος πρωτεϊνών στα επιμέρους συστατικά του δείγματος, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται δια μέσου των πόρων ενός πηγματος πολυμερούς (gel). Για χαμηλό αριθμό Reynolds (τιμή τριβής) και μέτριας έντασης ηλεκτρικό πεδίο, η ταχύτητα (v) των επιμέρους πολυπεπτιδίων στο πήγμα εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης q : $v = E (q / F)$.

Τεχνικά, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία περίσσειας αρνητικού φορτίου, που εξασφαλίζεται από το SDS, το οποίο έχει και επιφανειοδραστικές ιδιότητες (δρα ως ανιοντικό απορρυπαντικό, αποδιατακτικό μέσο), καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης. Εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, δεσμεύεται πάνω σε αυτές με εντελώς

καθορισμένη κατά βάρος αναλογία ή σε αναλογία μορίων SDS προς αμινοξέων (1:2). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Πέραν του SDS για την ολοκλήρωση της μετουσίωσης γίνεται κατεργασία με ουσίες που ανάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς (β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη) και βρασμό οπότε διαχωρίζονται και οι υπομονάδες μιας πρωτεΐνης. Ο διαχωρισμός γίνεται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο σχηματίζεται κατά τον συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα με πόρους, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού και από τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού των ελεύθερων ριζών με προσθήκη υπερθεϊκού αμμωνίου για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού διαλύτη TEMED (τετραμέθυλο-αιθυλενοδιαμίνη) για τη διάδοση του. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό (λόγω του SDS) και οι υδροδυναμικές ιδιότητες κάθε μορίου είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος.

2.1.1 Υλικά-Συσκευές

1. Ακρυλαμίδιο (Acrylamide)
2. Απόλυτη Αιθανόλη
3. Γλυκερόλη (Glycerol)
4. Γλυκίνη (Glycine)
5. Δις-ακρυλαμίδιο (Bis N, N'-Methylene-bis acrylamide)
6. Δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (Sodium dodecyl sulphate, SDS)

7. Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue Sodium Salt)
8. Μεθανόλη
9. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol)
10. Οξικό Οξύ παγόμορφο
11. Πρότυπα μοριακά βάρη πρωτεϊνών
12. Συσκευή ηλεκτροφόρησης
13. Υδροχλωρικό οξύ 4N (για ρύθμιση pH)
14. Υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium Persulfate, APS)
15. 2,2,2-Τριχλωροαιθανόλη
16. 6x διάλυμα φόρτωσης με SDS και μερκαπτοαιθανόλη
17. Coomassie Brilliant Blue R-250
18. TEMED
19. Trizma Base

2.1.2 Διαλύματα εργασίας

1. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode Buffer ή Running Buffer) Διάλυμα 10x : 0.025M Tris-base, 0.192M γλυκίνης, 0.1% SDS, pH=8.3

Διαλύονται 30,3g Tris-base (ρυθμίζει το pH), 144,4g γλυκίνης (δίνει τα φορτία, την ηλεκτροφορητική ικανότητα) και 10g SDS σε νερό και ρυθμίζεται το pH=8.3. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1000mL. Για την ηλεκτροφόρηση όμως απαιτείται διάλυμα Running Buffer 1x οπότε το 10x αραιώνεται (100ml διάλυμα 10x + 900ml νερό). Φυλάσσεται στους 4°C.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Trizma base pH 6.8

Διαλύονται 6.0g Trizma base σε 100mL νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

3. Διάλυμα 10 % SDS

Διαλύονται 10g SDS σε 100mL νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4. Διάλυμα 10 % υπερθειϊκού αμμωνίου (APS)

Διαλύονται 0.1g υπερθειϊκού αμμωνίου σε 1mL νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

5. Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0.05 % (w/v)

2.5mg κυανού της βρωμοφαινόλης διαλύονται σε 5mL νερού.

6. Διάλυμα Coomassie R-250

2g κυανού του Coomassie R-250 διαλύονται σε 200mL νερού. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

7. Διάλυμα χρώσης πηκτής ακρυλαμιδίου

Αναμιγνύονται 250mL μεθανόλης, 50mL οξικού οξέος και 62.5mL διαλύματος 1 % κυανού του Coomassie R-250. Ο όγκος ρυθμίζεται στα 500mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναχρησιμοποιείται δύο φορές.

8. Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Buffer)

Αναμιγνύονται 30mL μεθανόλης, 5mL οξικού οξέος και 65mL νερού.

9. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (Loading Buffer) 6x

0.5M Tris, 0.14M SDS, 20 % γλυκερόλη, 2 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.03mM κυανού της βρωμοφαινόλης.

Αναμιγνύονται 2.5mL ρυθμιστικού διαλύματος 0.5M Tris, pH = 6.8, 4ml διαλύματος 10 % SDS, 2mL γλυκερόλης, 0.2mL β-μερκαπτοαιθανόλης

και 0.2mg κυανούν της βρωμοφαινόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 10mL με δις απεσταγμένο H₂O. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε μικρούς όγκους και φυλάσσεται στους -80 °C.

10. Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)

Διάλυμα 1x: 3,03g Tris-base, 14,4g γλυκίνη και 200mL μεθανόλη, αραιώνονται μέχρι τα 1000mL με νερό.

2.1.3 Πειραματική πορεία

Παρασκευή δύο gel, διαφορετικής σύστασης και pH, το πήγμα επιστοίβασης (stacking gel), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και το πήγμα διαχωρισμού (running gel), το οποίο είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνηση τους μέσα σε αυτό. Παρασκευάζονται με τη σειρά και αφού πήξει το ένα (απαιτείται παραμονή σε θερμοκρασία 37°C για μισή ώρα συν προσθήκη νερού στο πάνω μέρος), τοποθετείται και το δεύτερο στη συσκευή και αφήνεται και αυτό για ανάλογο χρονικό διάστημα για πήξη.

Πηκτή διαχωρισμού (running gel) 12 %

- 1,35mL dH₂O, 1mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1.5M, pH=8.8, 40μL 10 % SDS, 1,6mL (bis) Ακρυλαμίδιο, 40μL 10 % APS και 4μL TEMED.
- Το μίγμα του πηγματος τοποθετείται ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες της συσκευής σταθεροποίησης των πηγμάτων. Προστίθεται H₂O στο πάνω μέρος του gel για την προστασία του από τον αέρα. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C).

Πηκτή επιστοίβασης (stacking gel)

- 3mL dH₂O, 1,25mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.5M, pH=6.8, 50μL 10% SDS, 0,7mL (bis) Ακρυλαμίδιο, 50μL 10 % APS και 5μL TEMED.
- Απορρίπτεται το H₂O με διηθητικό χαρτί. Μεταξύ των γυάλινων πλακών και πάνω από το πήγμα διαδρομής τοποθετείται το πήγμα επιστοίβασης και τοποθετούνται χτενάκια ώστε μόλις το πήγμα επιστοίβασης πολυμεριστεί να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων.

Προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναμειγνύεται με το διάλυμα φόρτωσης (sample buffer) σε όγκο ίσο με το 1/5 του όγκου του δείγματος. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά για να γίνει η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Ο χώρος μεταξύ των 2 πηγμάτων και ο χώρος της συσκευής πληρώνονται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1x). Τα δείγματα παραλαμβάνονται και τοποθετούνται αργά με αυτόματη πιπέτα, κατά προτίμηση με μακρύ ρύγχος, στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί από τα χτενάκια, οι οποίες είναι γεμάτες με διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Σε μία από τις θέσεις τοποθετείται διάλυμα πρότυπων μοριακών βαρών (molecular weight markers). Εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 150-200V (Εικόνα 3). Το πέρας της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται όταν η κυανή χρωστική που περιέχεται σε όλα τα δείγματα φτάσει στο τέλος του πηκτώματος διαδρομής (περίπου σε 75 λεπτά). Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης ακολουθούμενη από αποχρωματισμό ή προετοιμάζεται για μεταφορά σε μεμβράνη όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

2.2 Ανοσοαποτύπωση

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western ή αλλιώς western blotting ή immunoblotting είναι μέθοδος ανίχνευσης και ημιποσοτικού προσδιορισμού μιας πρωτεΐνης σε άγνωστο βιολογικό δείγμα. Εφαρμόζεται σε μίγμα πρωτεϊνών που έχουν διαχωρισθεί με SDS-PAGE. Στηρίζεται στην ειδική σύνδεση της πρωτεΐνης με «πρωτεύον» αντίσωμα. Η ανίχνευση γίνεται μετά από σύνδεση του πρωτεύοντος αντισώματος με ένα δευτερεύον. Το δευτερογενές αντίσωμα περιέχει στο μόριο του συζευγμένο κάποιο ένζυμο-δείκτη το οποίο αντιδρά με εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα (αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας) οπότε και επιτυγχάνεται η εμφάνιση των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών σε ψηφιακή κάμερα.

2.2.2 Υλικά-Διαλύματα-Συσκευές

Υλικά

1. Διαλύματα χημειοφωταύγειας (ECL)
2. Διηθητικό χαρτί
3. Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Bio-Rad)
4. Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου
5. Blotter paper
6. Trizma Base
7. Tween-20

Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)

7.2g γλυκίνης, 1.5g Tris-base και 5mL 10 % SDS προστίθενται σε 400mL νερού και αναδεύονται. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500mL με την προσθήκη 100mL μεθανόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

2. Διάλυμα έκπλυσης TBS (10x)

24.2g Tris-base και 80g NaCl προστίθενται σε νερό συνολικού όγκου 1L και ρυθμίζεται το pH = 7.6. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

3. Διάλυμα έκπλυσης εργασίας TBS-Tween 20

100mL του διαλύματος έκπλυσης 10x αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 1L. Στη συνέχεια προστίθεται 1mL Tween-20. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. Το διάλυμα χρησιμοποιείται ως αναστολέας πρωτεασών.

4. Αντισώματα

Πρωτεύοντα αντισώματα

Pan Acetyl-Lysine Rabbit polyclonal Antibody, 0.5mg/mL, Origene (TA379598)

Δευτερεύοντα αντισώματα

Goat Anti-Rabbit IgG (HRP), 2mg/mL, Abcam (ab6721)

Συσκευές

Συσκευή ανοσοαποτύπωσης (Amersham Biosciences Corp)

2.3 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Αρχικά κόβεται μεμβράνη PVDF διαστάσεων 6x9cm. Η μεμβράνη διαβρέχεται με μεθανόλη, ξεπλένεται με νερό και μετά τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για περίπου 15 λεπτά.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το gel εμβαπτίζεται στο διάλυμα μεταφοράς όπου απομακρύνεται προσεκτικά από το τζάμι. Ακολούθως, προετοιμάζεται το “σάντουιτς” τοποθετώντας με την ακόλουθη σειρά: σφουγγάρι, διηθητικό χαρτί, μεμβράνη PVDF, το gel, διηθητικό χαρτί, σφουγγάρι. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ αυτών. Η PVDF τοποθετείται πάντα προς τη μεριά του θετικού πόλου (κόκκινος πόλος). Η μεταφορά επιτυγχάνεται στα 200mA για ένα gel για χρονικό διάστημα μεταξύ μίας και μιάμισης ώρας.

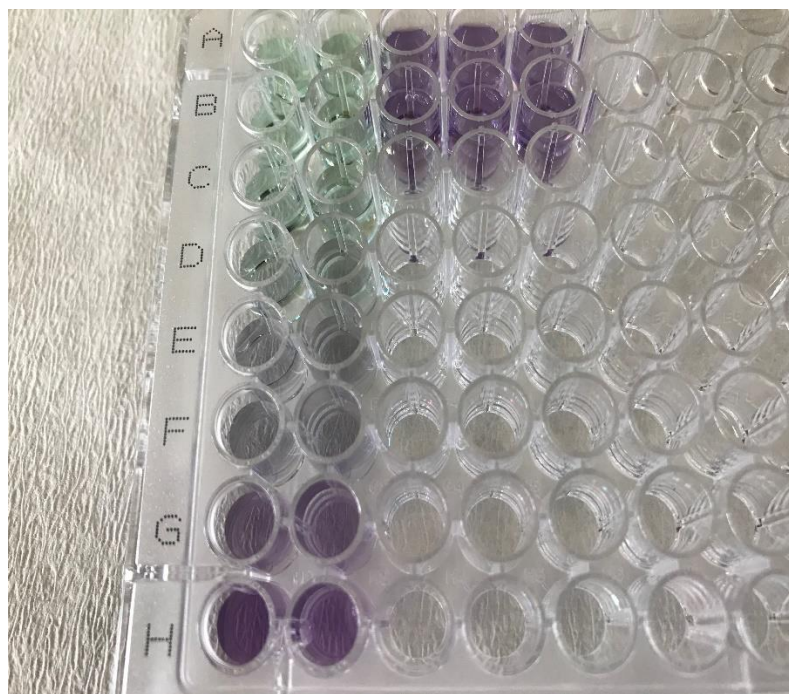
2.4 Επώαση με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα και εμφάνιση της μεμβράνης

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται για τουλάχιστον μία ώρα με διάλυμα blocking για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες. Στη συνέχεια προστίθεται το πρωτεύον αντίσωμα σε διάλυμα TBS-Tween 20 σε κατάλληλη συγκέντρωση και η μεμβράνη επωάζεται όλη τη νύχτα (overnight) σε αναδευτήρα στους 4°C. Ακολουθούν 3 πεντάλεπτες εκπλύσεις με TBS-Tween 20 και μιάμιση ώρα επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα σε διάλυμα TBS-Tween 20. Το δευτερεύον αντίσωμα είναι συζευγμένο ένζυμο που επάγει τη χημειοφωταύγεια σε κατάλληλες συνθήκες. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές από 5 λεπτά με TBS-

Tween 20. Η μεμβράνη επωάζεται για 5 λεπτά με το μίγμα (1:1) χημειοφωταύγειας (ECL) και εμφανίζεται σε ψηφιακή κάμερα Biorad εφοδιασμένη με το λογισμικό ChemiDoc.

2.5 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη με τη μέθοδο BCA βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου της πρωτεΐνης με τη χρωστική δικινχονινικό οξύ (bicinchoninic acid, BCA) και στη μέτρηση της απορρόφησης του συμπλόκου αυτού σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Με βάση την απορρόφηση αυτή προσδιορίζεται η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς.



Εικόνα 3: Παρουσιάζεται το πλακίδιο 96-θέσεων που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε πρωτεΐνη. Στο συγκεκριμένο

πλακίδιο τα δείγματα της πρότυπης καμπύλης τοποθετήθηκαν κατά αύξουσα συγκέντρωση στις θέσεις A1-H1 και A2-H2, ενώ τα άγνωστα δείγματα στις θέσεις A3-A5 και B3-B5.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται BSA γνωστής συγκέντρωσης 2mg/ml. Λαμβάνονται 15μL και προστίθενται 45μL νερό (τελική συγκέντρωση BSA 0,5mg/ml). Εν συνεχεία, από αυτή την ποσότητα θα ληφθούν 30μL που θα αναμειχθούν με 30μL νερού ($c=0,25\text{mg/ml}$) και οι διαδοχικές αραιώσεις θα συνεχιστούν μέχρι να παραχθεί τελική $c=0,008\text{mg/ml}$. Σε κάθε φρεάτιο του πλακιδίου 96 θέσεων τοποθετούνται 25μL προτύπου δείγματος και προστίθενται 200μL διαλύματος χρώσης. Η χρωστική αποτελείται από 3920μL οξύ και 80μL Cu^{2+} και συμβάλλει στον σχηματισμό συμπλόκου που δίνει το χρώμα. Το πλακίδιο τοποθετείται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα, προκειμένου να αναπτυχθεί το χρώμα (Εικόνα 12). Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 562 nm.

2.6 Ανοσοκαταβύθιση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών

Χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης ανοσοκαταβύθισης (reverse Immune Precipitation). Η συγκεκριμένη διαδικασία πλεονεκτεί στο ότι επιτρέπει την κατακρήμνιση πολλών ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε ένα μεμονωμένο πείραμα καθώς επίσης παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης της ακετυλίωσης σε πρωτεΐνες των οποίων τα πρωτεύοντα αντισώματα δεν είναι κατάλληλα για ανοσοκατακρήμνιση. Η τεχνική βασίζεται στην υψηλή συγγένεια αντιγόνου-αντισώματος που επιτρέπει τον σχηματισμό συμπλόκου και την

κατακρήμνιση του σε διαλύματα αλάτων. Για την κατακρήμνιση των συμπλόκων χρησιμοποιούνται σφαιρίδια πρωτεΐνης G ή πρωτεΐνης A.

2.6.1 Υλικά-διαλύματα εργασίας

IP Buffer (Mitochondrial IP buffer)

150mM NaCl (0,44g)

50mM Tris-HCl (pH=7,4) (0,30g)

0,5mM EDTA (0,009g)

0,1% Triton-X

Pan Acetyl-Lysine Rabbit polyclonal Antibody, 0.5mg/mL, Origene (TA379598)

Protein G plus agarose-suspension, Calbiochem, IP04-1.5mL

2.6.2 Πειραματική διαδικασία:

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα αραιώνεται με IP buffer σε τελικό όγκο 500μL. Προστίθεται 1.0μL αντισώματος (2.5μg) ανά mg πρωτεΐνης και τα δείγματα αναδεύονται για 12 ώρες στους 4°C. Η ρητίνη αгарόζης / protein A αναδεύεται και 50μL ανά mg πρωτεΐνης μεταφέρονται σε σωληνάρια ependorf. Ακολουθεί ενεργοποίηση των σφαιριδίων πλένοντας τα δύο φορές με 20 όγκους IP buffer τη φορά. Προστίθενται τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και ακολουθεί ανάδευση για τουλάχιστον δύο ώρες στους 4°C. Τα σφαιρίδια πλένονται τρεις φορές με 40 όγκους IP buffer τη φορά και οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούνται με βρασμό αφού προστεθεί ίσος όγκος 1x διαλύματος φόρτωσης.

2.7 Χημική Ακετυλίωση της αλβουμίνης βοός (BSA)

Η χημική ακετυλίωση της BSA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο [59]. Αναλυτικότερα, η πρωτεΐνη ακετυλιώθηκε με οξικό ανυδρίτη σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου. Για την παρασκευή διαλύματος οξικού νατρίου προστέθηκαν 80g άνυδρου CH_3COONa σε 15mL θερμού H_2O . Το διάλυμα καθίσταται κορεσμένο με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας. Από το διάλυμα αυτό ελήφθησαν 2mL και προστέθηκαν 2mL BSA (1 mg/mL). Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια στους 4°C. Προστέθηκαν 25 μL οξικού ανυδρίτη σε δόσεις των 5 μL ανά 15 λεπτά και το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 30 λεπτά ακόμη. Ακολούθησε διαπίδυση στους 4°C με δύο αλλαγές 5L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) που περιείχε 0,05% EDTA σε pH 7,4 για 24 ώρες. Η συγκέντρωση της BSA στο τελικό διάλυμα προσδιορίστηκε σε 2.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ με την μέθοδο της BCA και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Η ακετυλίωση της BSA ταυτοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα κατά της ακετυλιωμένης λυσίνης.

2.8 Καλλιέργεια κυττάρων

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά Jurkat, η οποία προέρχεται από T-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σαν εναιώρημα σε RPMI-1640 το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/mL πενικιλίνη και 100 ng/mL στρεπτομυκίνη. Ο χειρισμός των κυττάρων γίνεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο στον οποίο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37 °C, επικρατούν συνθήκες

υγρασίας και η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με 5% CO₂ ώστε να ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντριση και επανακαλλιεργούνται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο κάθε δύο ημέρες.

2.9 Φαρμακολογική επαγωγή ακετυλίωσης με προσθήκη CH₃COONa σε κύτταρα Jurkat

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 1.5×10^6 κύτταρα/mL σε πλήρες καλλιεργητικό μέσο στο οποίο προστέθηκαν συγκεντρώσεις CH₃COONa από 0.1 mM έως 20mM για 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση, ξεπλύθηκαν με 5mL PBS και ακολούθησε η λύση τους. Στο κυτταρικό ίζημα προστέθηκαν 500μL διαλύματος λύσης (homogenization buffer) ακολούθησε έντονη ανάδευση ώστε να διαλυτοποιηθεί το ίζημα και παραμονή στον πάγο για 20 λεπτά με ενδιάμεση ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 11.000 x g για 15 λεπτά, τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου ependorf και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.10 Φαρμακολογική επαγωγή ακετυλίωσης με προσθήκη CH₃COONa σε κύτταρα HeLa

Τα κύτταρα HeLa προέρχονται από ασθενή με καρκίνωμα μήτρας και έχουν μορφολογία επιθηλίου. Αναπτύσσονται προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα και καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS, 2 mM L- γλουταμίνη, 100 U/mL πενικιλίνη και 100 ng/mL στρεπτομυκίνη. Δέκα mL ελαιώδη κυττάρων (1.33×10^5 κύτταρα ανά mL) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm και

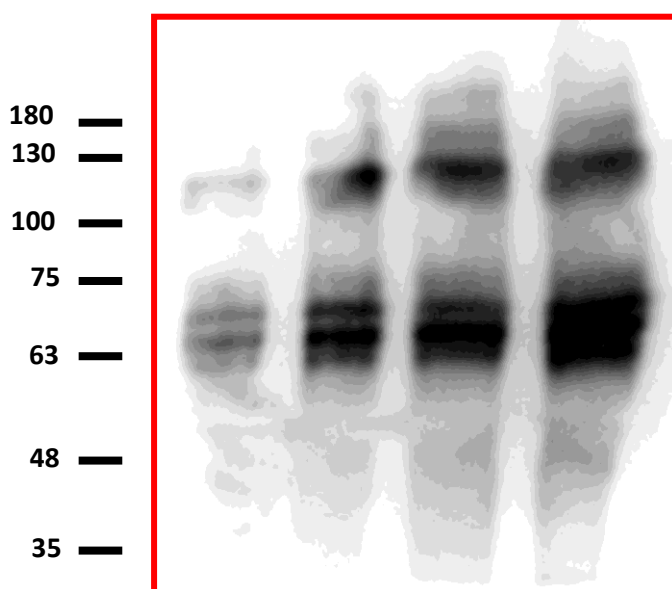
καλλιεργήθηκαν για 24 περίπου ώρες στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων (37°C, 5% CO₂) προκειμένου να προσκολληθούν σταθερά στον πυθμένα του πλακιδίου. Ακολούθως, το καλλιεργητικό υλικό αντικαταστάθηκε από φρέσκο που περιείχε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις CH₃COONa για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 5mL PBS και αποκολλήθηκαν από το ταπήτιο με 1.0mL θρυψίνης, φυγοκεντρήθηκαν και ακολούθησε λύση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.9.

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανίχνευση χημικά ακετυλιωμένης BSA

Το πειραματικό μέρος ξεκίνησε με τη χημική ακετυλίωση της αλβουμίνης βοός, η οποία περιέχει 60 κατάλοιπα λυσίνης στο μόριο της και έχει τροποποιηθεί επιτυχώς στο παρελθόν [59]. Η χρήση της αλβουμίνης ως «πρωτεΐνη μοντέλο» θα εξυπηρετούσε τα ακόλουθα: (1) προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου, (2) αποτελεί θετικό μάρτυρα στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα και ιστό. Η χημική ακετυλίωση πραγματοποιήθηκε με CH₃COONa παρουσία οξικού ανυδρίτη ως καταλύτη. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται μια ανοσοαποτύπωση κατά Western χημικά ακετυλιωμένης BSA η οποία ανιχνεύεται με αντισώματα έναντι ακετυλιωμένων πρωτεϊνών. Παρατηρούνται πολλαπλές ζώνες κατά μήκος της μεμβράνης με δοσοεξαρτώμενη αύξηση της έντασης της χημειοφωταύγειας καθώς και διάχυτη χημειοφωταύγεια. Σε όλα τα δείγματα, παρατηρούνται δύο ζώνες μοριακού βάρους μεταξύ 63-75 kDa. Το μονομερές της BSA έχει μοριακό βάρος 69 kDa κατά συνέπεια μία ή και οι δύο παραπάνω ζώνες αντιστοιχούν στο μονομερές της BSA το οποίο παρουσιάζει διαφορετικό

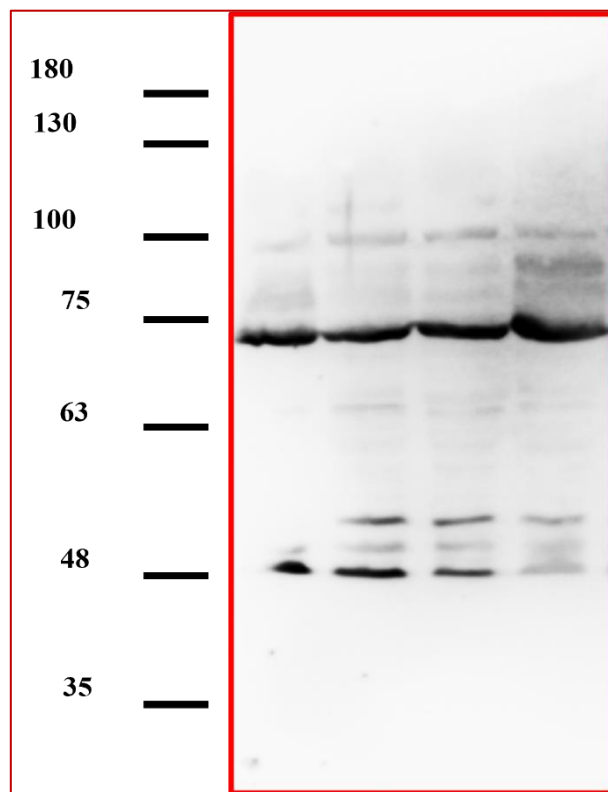
ποσοστό ακετυλίωσης. Επιπλέον, οι ζώνες που εμφανίζονται σε υψηλότερα μοριακά βάρη πιθανά αντιστοιχούν σε υψηλού βαθμού ακετυλίωση ή σε διασυνδεδεμένα (cross linked) μόρια της BSA. Συμπερασματικά, η χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία επιτρέπει την ανίχνευση χημικά ακετυλιωμένης BSA με ελάχιστο όριο ανιχνευσιμότητας 2.5 μg πρωτεΐνης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε το ποσοστό της BSA που ακετυλιώνεται μετά την χημική επεξεργασία της. Επομένως, το όριο ανιχνευσιμότητας εκφράζεται με όρους πρωτεΐνης και όχι ακετυλιωμένης πρωτεΐνης.



Εικόνα 4. Ανίχνευση χημικά ακετυλιωμένης BSA. Αυξανόμενες ποσότητες BSA (2.5, 5.0, 10 και 20 μg) ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες σε 10% SDS gel. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε χημειοφωτάγεια. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό τριών πειραμάτων με ουσιαστικά ίδια αποτελέσματα.

Φαρμακολογική επαγωγή ακετυλίωσης σε κύτταρα με προσθήκη CH_3COONa

Στη συνέχεια, η τεχνική χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανιχνευθούν ακετυλιωμένες πρωτεΐνες σε κύτταρα που αποτελούν ένα πιο σύνθετο βιολογικό σύστημα. Χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά T-λεμφοκυττάρων, Jurkat, που προέρχονται από ασθενή με οξεία λευχαιμία. Στα κύτταρα προστέθηκε CH_3COONa στη λογική ότι ενδοκυττάρια θα μετατραπεί σε Ac-CoA, το οποίο είτε χημικά είτε ενζυμικά θα αυξήσει την ενδοκυττάρια ακετυλίωση. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται μια ανοσοαποτύπωση κατά Western, κυττάρων Jurkat, τα οποία εκτέθηκαν σε 5-20mM CH_3COONa για 24 ώρες. Δεν παρατηρήθηκε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή κυτταρικός θάνατος. Παρατηρούνται πρωτεϊνικές ζώνες κατά μήκος του gel, υποδηλώνοντας ότι η ακετυλίωση συμβαίνει σε πρωτεΐνες με μεγάλο εύρος μοριακών βαρών και η παρούσα μεθοδολογία είναι ικανή για να τις ανιχνεύει. Οι πιο έντονες ζώνες παρατηρούνται μεταξύ 63-75 kDa, υποδηλώνοντας την παρουσία αρκετών ακετυλιωμένων πρωτεϊνών στην περιοχή αυτή. Είναι αξιοσημείωτο ότι ανιχνεύονται ακετυλιωμένες πρωτεΐνες σε κύτταρα που δεν εκτέθηκαν σε CH_3COONa , γεγονός που σημαίνει ότι υφίσταται ενδογενής ακετυλίωση στα κύτταρα Jurkat. Επιπρόσθετα, παρατηρείται αύξηση στην ένταση των υπαρχουσών ζωνών καθώς και η εμφάνιση νέων ζωνών σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα που επιδράστηκαν με CH_3COONa , γεγονός που υποδηλώνει ότι η χορήγηση του συγκεκριμένου παράγοντα επάγει φαρμακολογικά την ακετυλίωση σε κύτταρα Jurkat.

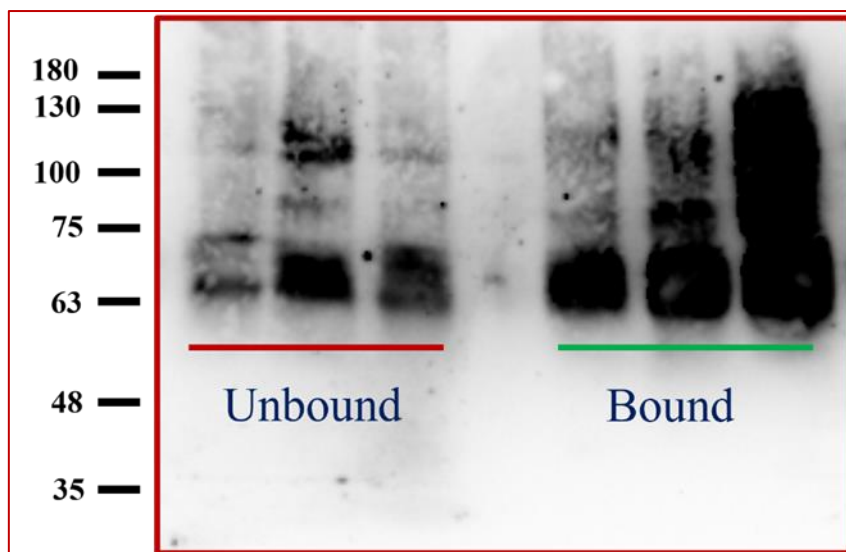


Εικόνα 5. Φαρμακολογική επαγωγή ακετυλίωσης κυττάρων Jurkat. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 1.5×10^6 κύτταρα/mL. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στα κύτταρα control και οι επόμενες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις CH_3COONa που προστέθηκαν (5mM, 10mM και 20mM αντίστοιχα) και ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες σε 10% SDS gel. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε χημειοφωταύγεια. Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές με ουσιαστικά ίδια αποτελέσματα.

Ανοσοκαταβύθιση (Immunoprecipitation, IP) και ανίχνευση χημικά ακετυλιωμένης BSA

Η ακετυλίωση, όπως και οι περισσότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμβαίνει με χαμηλή στοιχειομετρία, επομένως, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου και κατά συνέπεια οι πιθανότητες ταυτοποίησης θέσεων ακετυλίωσης αποφασίστηκε να αναπτυχθεί πρωτόκολλο εμπλουτισμού ακετυλιωμένων πρωτεϊνών.

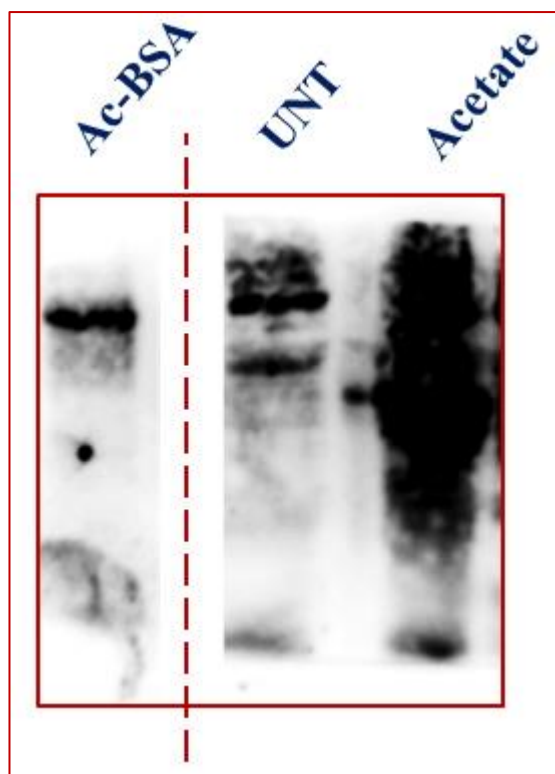
Αρχικά, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε χημικά τροποποιημένη BSA. Διαφορετικές ποσότητες BSA επωάστηκαν με αντίσωμα έναντι ακετυλιωμένης λυσίνης, τα σύμπλοκα καταβυθίστηκαν με Protein G συνδεδεμένη σε σφαιρίδια αгарόζης και οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλούσθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης μετά από βρασμό. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται ανοσοαποτύπωση του αδέσμευτου και δεσμευμένου κλάσματος χημικά ακετυλιωμένης BSA μετά από ανοσοκαταβύθιση. Παρατηρείται χαμηλής έντασης χημειοφωταύγεια στο αδέσμευτο κλάσμα γεγονός που υποδηλώνει ότι η καταβύθιση της BSA δεν είναι απόλυτα ποσοτική. Σε ότι αφορά το δεσμευμένο κλάσμα, παρατηρείται αυξανόμενης έντασης σήμα σε συνάρτηση με την ποσότητα BSA που χρησιμοποιήθηκε αρχικά. Μάλιστα, σε ποσότητα BSA ίση με 10 μg το σήμα είναι κορεσμένο. Το παραπάνω πείραμα υποδηλώνει ότι το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι αποτελεσματικό για την ανοσοκαταβύθιση χημικά ακετυλιωμένης BSA. Στη συνέχεια, το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε - τροποποιήθηκε - βελτιώθηκε για την ανοσοκαταβύθιση πρωτεϊνών σε κύτταρα και ιστό.



Εικόνα 6. Ανίχνευση ακετυλιωμένης BSA μετά από ανοσοκαταβύθιση. Χημικά ακετυλιωμένη BSA (1, 5 και 10 μ g) επωάστηκε με αντίσωμα έναντι ακετυλιωμένης λυσίνης και τα σύμπλοκα αντισώματος-πρωτεΐνης καταβυθίστηκαν με Protein G. Όγκος 20% του αδέσμευτου κλάσματος και δεσμευμένου κλάσματος χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοαποτύπωση. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό τριών πειραμάτων με ουσιαστικά ίδια αποτελέσματα.

Ανοσοκαταβύθιση και ανίχνευση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα Jurkat

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκαταβύθισης ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα Jurkat. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται ανοσοαποτύπωση έναντι ακετυλιωμένων πρωτεϊνών που ανοσοκαταβυθίστηκαν από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων Jurkat, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία 10mM CH_3COONa για 24 ώρες. Παρατηρείται έντονη χημειοφωταύγεια στην ζώνη που αντιστοιχεί στη χημικά ακετυλιωμένη BSA η οποία χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας. Χημειοφωταύγεια παρατηρείται σε κύτταρα που δεν εκτέθηκαν σε CH_3COONa γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενδογενούς ακετυλίωσης στα κύτταρα Jurkat. Η ένταση του σήματος αυξάνεται σημαντικά παρουσία CH_3COONa , μάλιστα το σήμα είναι κορεσμένο στο μεγαλύτερο μήκος της διαδρομής, γεγονός που υποδηλώνει τον εμπλουτισμό του δείγματος σε ακετυλιωμένες πρωτεΐνες.



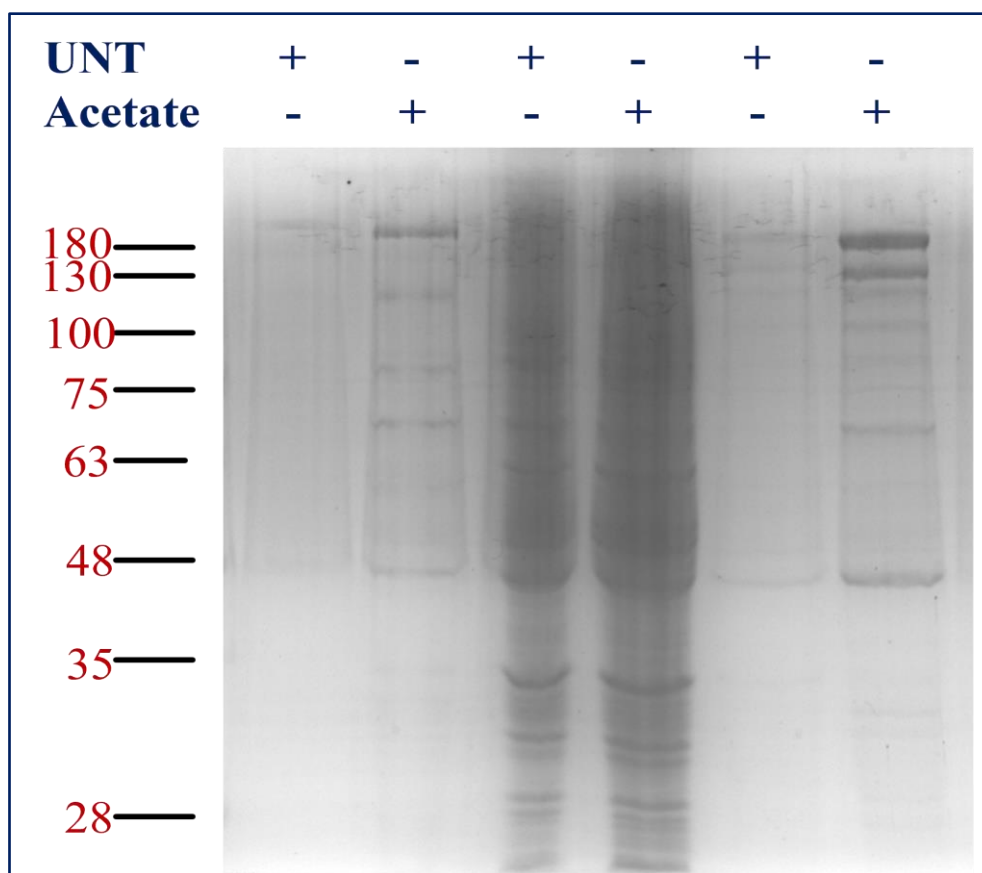
Εικόνα 7. Ανοσοκαταβύθιση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών από κύτταρα Jurkat. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 1.5×10^6 κύτταρα/mL για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται φρέσκο καλλιεργητικό υλικό που περιέχει ή δεν περιέχει 10mM CH_3COONa . Εικοσιτέσσερις ώρες αργότερα τα κύτταρα συλλέγονται και οι ακετυλιωμένες πρωτεΐνες καταβυθίζονται. Τα δεσμευμένα κλάσματα ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες σε 10% SDS gel. Για την ανίχνευση τους χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι ακετυλιωμένων πρωτεϊνών και το σήμα εμφανίστηκε με χημειοφωταύγεια. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές με τα ίδια αποτελέσματα.

Ανοσοκαταβύθιση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα HeLa, σε αντίθεση με τα Jurkat που καλλιεργούνται σε ελαιώρημα, αναπτύσσονται προσκολλημένα σε ταπήτιο. Τα κύτταρα

εκτέθηκαν σε 10mM CH₃COONa για 24 ώρες (επισημαίνονται ως acetate) είτε παρέμειναν χωρίς επεξεργασία (επισημαίνονται ως UNT) (Εικόνα 8). Οι ακετυλιωμένες πρωτεΐνες καταβυθίστηκαν και τα δεσμευμένα κλάσματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηχτή ακρυλαμιδίου, το οποίο εμφανίστηκε σε ψηφιακή κάμερα. Παρατηρείται ενδογενής ακετυλίωση πρωτεϊνών με μεγάλο εύρος μοριακών βαρών. Η έκθεση των κυττάρων σε CH₃COONa οδηγεί σε αύξηση της έντασης φθορισμού των ζωνών που υπάρχουν στα κύτταρα μάρτυρες καθώς και στην εμφάνιση νέων ζωνών γεγονός που υποδηλώνει την ακετυλίωση νέων πρωτεϊνών (Εικόνα 8). Στην περίπτωση των κυττάρων HeLa δεν παρουσιάζονται πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης για τους ακόλουθους λόγους. (Α) Η προσθήκη τριχλωροαιθανόλης κατά την παρασκευή του gel επιτρέπει την εμφάνιση του σήματος ως φθορισμό γεγονός που αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της ανίχνευσης. Η τριχλωροαιθανόλη αντιδρά με τον δακτύλιο ινδόλης της τρυπτοφάνης. Η έκθεση του gel σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) οδηγεί σε φωτοχημική τροποποίηση (ακυλίωση του δακτύλου) της ινδόλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μετατοπίζεται η εκπομπή φθορισμού από το φυσικό εύρος του UV προς το ορατό φως. (β) το σήμα όπως φαίνεται στην εικόνα 8 ήταν

κορεσμένο ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες του δεσμευμένου κλάσματος.

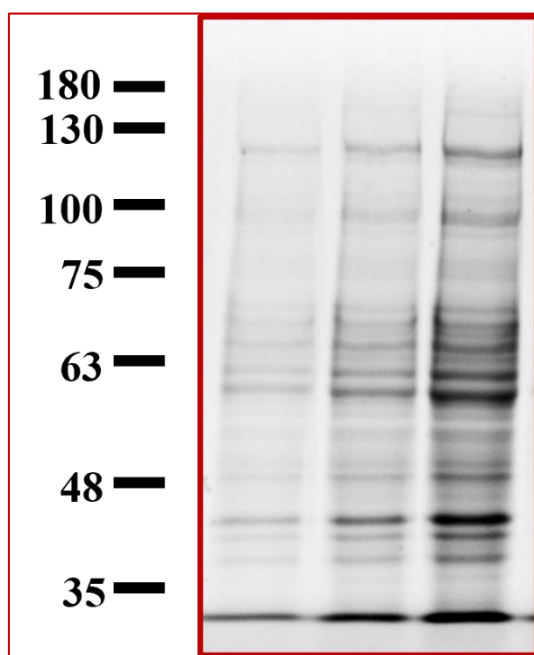


Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έπειτα από ανοσοκαταβύθιση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών κυττάρων HeLa. Τα δεσμευμένα κλάσματα διαχωρίστηκαν σε gel ακρυλαμίδιου και η εμφάνιση έγινε με ψηφιακή κάμερα.

Ανοσοκαταβύθιση και ανίχνευση ενδογενώς ακετυλιωμένων πρωτεϊνών

Ακολουθώς, το πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανιχνευθούν ενδογενώς ακετυλιωμένες πρωτεΐνες. Χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το ήπαρ ποντικού αγρίου

τύπου ηλικίας 12 μηνών και η καταβύθιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο που περιεγράφηκε προηγουμένως. Τα δεσμευμένα κλάσματα, διαχωρίστηκαν σε πηχτή ακρυλαμιδίου, μάλιστα για να διαπιστωθούν τα όρια κορεσμού του σήματος, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αραιώσεις του δεσμευμένου κλάσματος. Στην Εικόνα 9 παρατηρείται φθορισμός σε ολόκληρο το μήκος του gel γεγονός που υποδηλώνει ότι ο χημικός εμπλουτισμός περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μεγάλο φάσμα μοριακών βαρών. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται όσο αυξάνει η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία των ίδιων πρωτεϊνών σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ή την ανίχνευση νέων ακετυλιωμένων πρωτεϊνών.

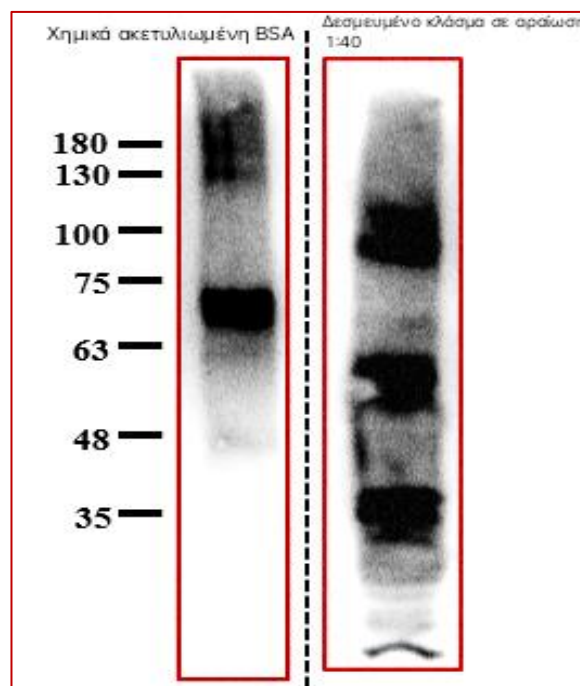


Εικόνα 9. Ανίχνευση ενδογενώς ακετυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση εμπλουτισμού συγγενείας. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από ήπαρ ποντικού επεξεργάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανοσοκαταβύθισης ακετυλιωμένων πρωτεϊνών. Το δεσμευμένο κλάσμα αραιώθηκε (από αριστερά προς τα δεξιά 1:40, 1:20 και 1:10 αντίστοιχα) και διαχωρίστηκε

με ηλεκτροφόρηση. Το σήμα εμφανίστηκε με ψηφιακή κάμερα. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό δύο πειραμάτων με τα ίδια αποτελέσματα.

Ανίχνευση ενδογενούς ακετυλίωσης με ανοσοαποτύπωση

Το δεσμευμένο κλάσμα που συλλέχθηκε από το προηγούμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανιχνευθεί η ακετυλίωση με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη αραίωση του δεσμευμένου κλάσματος (1:40) προκειμένου να αποφύγουμε τον κορεσμό του σήματος. Χημικά ακετυλιωμένη BSA χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και όπως ήταν αναμενόμενο παρατηρήθηκε έντονη χημειοφωταύγεια σε περιοχή που αντιστοιχεί στη μοριακή μάζα της αλβουμίνης, δηλαδή περίπου στα 70 kDa (Εικόνα 10). Επιπλέον, ζώνες παρατηρήθηκαν σε υψηλότερες μοριακές μάζες που πιθανά αντιστοιχούν σε διμερή της πρωτεΐνης. Σε ότι αφορά το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, παρατηρείται έντονη χημειοφωταύγεια σε περιοχές που αντιστοιχούν σε μάζες 35, 50-60 και 100 kDa αντίστοιχα καθώς και διάχυτη χημειοφωταύγεια κατά μήκος της διαδρομής, γεγονός που υποδηλώνει την ακετυλίωση πρωτεϊνών με μεγάλο εύρος μοριακών μαζών (Εικόνα 10).



***Εικόνα 10.** Ανίχνευση ενδογενώς ακετυλιωμένων πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση. Το δεσμευμένο κλάσμα που προέρχεται μετά από εμπλουτισμό ακετυλιωμένων πρωτεϊνών με χρήση ειδικών αντισωμάτων χρησιμοποιείται για ανοσοαποτύπωση. Η μεμβράνη εμφανίζεται με χημειοφωταύγεια και φωτογραφίζεται σε ψηφιακή κάμερα. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές με τα ίδια αποτελέσματα.*

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων εμπλουτισμού με βάση την ανοσοσυγγένεια για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε σύνθετα βιολογικά δείγματα. Η ακετυλίωση της λυσίνης των πρωτεϊνών είναι η δεύτερη πιο συχνή μετα-μεταφραστική τροποποίηση (PTM) στα ευκαρυωτικά κύτταρα, και ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της μεταγραφής, της επιδιόρθωσης του DNA, της κυτταρικής σηματοδότησης, της αναδίπλωσης πρωτεϊνών, της αυτοφαγίας, της απόπτωσης και του ενεργειακού μεταβολισμού. Δεδομένου του κεντρικού ρόλου της στην κυτταρική βιολογία και της σύνδεσής της με έναν αυξανόμενο αριθμό παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, το μεταβολικό σύνδρομο, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και οι χρόνιες πνευμονικές διαταραχές, η καθιέρωση αξιόπιστων, αναπαραγωγίμων και ευαίσθητων μεθόδων για τη μελέτη της ακετυλίωσης έχει σημαντική επιστημονική και μεταφραστική σημασία. Η πειραματική στρατηγική που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία – συνδυάζοντας την ανάλυση Western blot με την ανοσοκατακρήμνιση (IP) – επέτρεψε τόσο την ποιοτική ανίχνευση όσο και τον εμπλουτισμό με βάση την συγγένεια των

ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε πολλαπλά βιολογικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένων κυτταρικών σειρών και ιστού ποντικού.

4.1 Επικύρωση της μεθοδολογίας ανίχνευσης με χρήση χημικά ακετυλιωμένης BSA

Η χημικά ακετυλιωμένη BSA εξυπηρέτησε διπλό σκοπό. Παρείχε ένα πρότυπο υπόστρωμα για την αρχική επικύρωση της μεθόδου και αποτέλεσε θετικό μάρτυρα στα επόμενα πειράματα που αφορούσαν κυτταρικά εκχυλίσματα και δείγματα ιστών. Η χρήση χημικά ακετυλιωμένης πρωτεΐνης ως μοντέλο αποτελεί μια καθιερωμένη προσέγγιση, καθώς επιβεβαιώνει την ειδικότητα του αντισώματος και την ευαισθησία της μεθόδου υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η ανίχνευση της χημικά ακετυλιωμένης BSA με χρήση αντισώματος έναντι της ακετυλολυσίνης αποκάλυψε πολλαπλές ζώνες με κυρίαρχες μοριακού βάρους 63–75 kDa, το οποίο συνάδει με το γνωστό μοριακό βάρος του μονομερούς BSA (~69 kDa). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χημική ακετυλίωση με ανυδρίτη οξικού οξέος είναι μια στοχαστική διαδικασία που δεν τροποποιεί όλα τα διαθέσιμα κατάλοιπα λυσίνης εξίσου, επομένως η ανίχνευση ζωνών πολύ κοντά μεταξύ τους πιθανώς αντανακλά την παρουσία μορίων BSA με διαφορετικούς βαθμούς ακετυλίωσης. Ομοίως εξηγούνται οι πρόσθετες ζώνες σε υψηλότερα μοριακά βάρη, οι οποίες συνάδουν είτε με διμερή BSA ή μόρια πρωτεΐνης που εμφανίζουν εκτεταμένη ακετυλίωση σε πολλαπλές θέσεις. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν προσδιορίστηκε η ακριβής αναλογία της ακετυλιωμένης BSA στο χημικά επεξεργασμένο παρασκεύασμα. Ως εκ τούτου τέθηκε ως ελάχιστο όριο ανίχνευσης 2,5μg χημικά τροποποιημένης BSA.

4.2 Φαρμακολογική πρόκληση ακετυλίωσης σε κύτταρα Jurkat

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν η χορήγηση ενός προδρόμου του Ac-CoA θα μπορούσε να επηρεάσει το ενδοκυτταρικό προφίλ ακετυλίωσης κυττάρων. Το CH_3COONa επιλέχθηκε ως παράγοντας επαγωγής ακετυλίωσης με βάση το σκεπτικό ότι, κατά την κυτταρική πρόσληψη, μετατρέπεται σε Ac-CoA από τις συνθετάσες του Ac-CoA (AceCS1 στο κυτταρόπλασμα, AceCS2 στα μιτοχόνδρια). Η αυξημένη ενδοκυτταρική διαθεσιμότητα Ac-CoA αναμενόταν να οδηγήσει τόσο σε ενζυμική όσο και σε μη ενζυμική ακετυλίωση πρωτεϊνών. Αυτή η υπόθεση βασίστηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του Ac-CoA αποτελεί καθοριστικό παράγοντα των επιπέδων ακετυλίωσης [1-4]. Για παράδειγμα, στο αλκαλικό pH της μιτοχονδριακής μήτρας η υψηλή τοπική συγκέντρωση Ac-CoA εντός των μιτοχονδρίων ευνοούν τη μη ενζυμική ακετυλίωση των πρωτεϊνών, μια διαδικασία που αναγνωρίζεται πλέον ως σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στο ακετυλο-πρωτεϊνικό προφίλ των μιτοχονδρίων. Η ανάλυση εκχυλισμάτων κυττάρων Jurkat που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 5–20 mM CH_3COONa για 24 ώρες κατέδειξε την παρουσία ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε ένα ευρύ φάσμα μοριακών βαρών. Σημαντική παρατήρηση ήταν η εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αύξηση τόσο της έντασης των υπαρχουσών ζωνών ακετυλίωσης όσο και της εμφάνισης νέων ζωνών, υποδεικνύοντας ότι η φαρμακολογική αύξηση του ενδοκυτταρικού Ac-CoA προκαλεί ακετυλίωση πρωτεϊνών που δεν είναι αισθητά ακετυλιωμένες υπό βασικές συνθήκες. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν με την έννοια της μη ενζυμικής ακετυλίωσης που καθοδηγείται από τη συγκέντρωση Ac-CoA και συμφωνούν με μελέτες που δείχνουν ότι οι μεταβολικές διαταραχές που οδηγούν σε αυξημένο Ac-CoA προάγουν τη συνολική υπερακετυλίωση των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα στα μιτοχόνδρια.

Μια δεύτερη σημαντική παρατήρηση ήταν η ανίχνευση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα Jurkat απουσία CH_3COONa . Αυτό το εύρημα αποτελεί άμεση απόδειξη για ενδογενή ακετυλίωση σε βασικό επίπεδο σε αυτή την κυτταρική σειρά που συνάδει με την τρέχουσα αντίληψη ότι τα κύτταρα διατηρούν ενεργούς κύκλους ακετυλίωσης-αποακετυλίωσης που ρυθμίζονται από ακετυλοτρανσφεράσες της λυσίνης και αποακετυλάσες της λυσίνης, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας των σιρτουινών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα Jurkat προέρχονται από ασθενή με οξεία λευχαιμία, ένα βιολογικό σύστημα στο οποίο η επιγενετική δυσλειτουργία και η διαταραχή του μοτίβου ακετυλίωσης είναι καλά τεκμηριωμένη. Η ανίχνευση ενδογενούς ακετυλίωσης επιβεβαιώνει επίσης τη δυναμική ισορροπία μεταξύ των ακετυλοτρανσφερασών και των αποακετυλασών (ιδιαίτερα των σιρτουινών όπως οι SIRT1 και SIRT3, οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση τόσο της κυτταροπλασματικής όσο και της μιτοχονδριακής ακετυλίωσης) που λειτουργεί συνεχώς στα ζωντανά κύτταρα.

4.3 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου ανοσοκατακρήμνισης για τον εμπλουτισμό ακετυλιωμένων πρωτεϊνών

Ένας σημαντικός περιορισμός της άμεσης ανίχνευσης ακετυλιωμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο Western blot είναι η χαμηλή στοιχειομετρία αυτής της τροποποίησης. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης συμβαίνει συνήθως σε υπο-στοιχειομετρικά επίπεδα, πράγμα που σημαίνει ότι ο ακετυλιωμένος πληθυσμός μιας πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει συχνά μόνο ένα μικρό κλάσμα του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της πρωτεΐνης. Το μειονέκτημα αυτό αντιμετωπίζεται με χρήση στρατηγικών εμπλουτισμού πριν από την ανάλυση. Επομένως, αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης

(IP) χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα κατά της ακετυλιωμένης λυσίνης συζευγμένο με σφαιρίδια αгарόζης που φέρουν πρωτεΐνη G. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την ταυτόχρονη συν-κατακρήμνιση όλων των ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε ένα μόνο πείραμα. Η αρχική επικύρωση του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκε με χρήση χημικά ακετυλιωμένης BSA και δείχθηκε ότι στο δεσμευμένο κλάσμα υπήρχε δοσοεξαρτώμενη αύξηση του σήματος. Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε την αποτελεσματικότητα του πειραματικού πρωτοκόλλου υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν. Η παρουσία σήματος στο μη δεσμευμένο κλάσμα έδειξε ότι η καταβύθιση δεν ήταν πλήρως ποσοτική, κάτι που αποτελεί κοινό περιορισμό των προσεγγίσεων εμπλουτισμού που βασίζονται στην συγγένεια. Σε γενικές γραμμές, το πειραματικό πρωτόκολλο προσαρμόστηκε ώστε να εφαρμοσθεί σε κυτταρικά εκχυλίσματα και σε ηπατικό εκχύλισμα ποντικού. Αυτή η ευελιξία αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα και διευρύνει σημαντικά τις πιθανές εφαρμογές της μεθόδου.

4.4 Ανοσοκατακρήμνιση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών από κύτταρα Jurkat και HeLa

Η εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλλου σε εκχυλίσματα κυττάρων Jurkat και HeLa επιβεβαίωσε τόσο την αποτελεσματικότητα του εμπλουτισμού όσο και, για άλλη μια φορά, την ύπαρξη ενδογενούς ακετυλίωσης. Η ανάλυση των δεσμευμένων κλασμάτων κυττάρων Jurkat που καλλιιεργήθηκαν παρουσία 10 mM CH_3COONa παρουσίαζε έντονο σήμα κατανεμημένο σε όλο το μήκος της πηχτής πλησιάζοντας τον κορεσμό, γεγονός που υποδηλώνει ένα εξαιρετικά εμπλουτισμένο δείγμα. Εξαρτώμενη από το CH_3COONa ακετυλίωση παρατηρήθηκε και σε κύτταρα HeLa. Συνολικά, τα παραπάνω πειράματα δείχνουν ότι η φαρμακολογική αύξηση του Ac-CoA οδηγεί σε ακετυλίωση επιπλέον

πρωτεϊνικών υποστρωμάτων πέραν εκείνων που τροποποιούνται υπό βασικές συνθήκες. Η εμφάνιση νέων θέσεων ακετυλίωσης μετά από επίδραση με CH_3COONa είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα στο πλαίσιο της θεωρίας της μη ενζυμικής ακετυλίωσης, η οποία προβλέπει ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις Ac-CoA ακετυλιώνουν αυθόρμητα κατάλοιπα λυσίνης που διαφορετικά δεν θα ακετυλιώνονταν, ιδιαίτερα εκείνα που βρίσκονται σε παράπλευρες αλυσίδες βασικών αμινοξέων ή με μειωμένες τιμές pKa [30]. Εναλλακτικά, με αυξημένη διαθεσιμότητα υποστρωμάτων μπορεί να κορεστεί η ικανότητα αποακετυλίωσης (π.χ. αποακετυλίωση των μιτοχονδρίων που μεσολαβείται από SIRT3), μετατοπίζοντας την ισορροπία προς όφελος της υπερακετυλίωσης.

4.5 Ανίχνευση ενδογενούς ακετυλίωσης σε ιστό ήπατος ποντικού

Η εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλλου σε ηπατικό ιστό ποντικού αγρίου τύπου αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα προς την μελλοντική χρήση του προκειμένου να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν θέσεις ενδογενούς ακετυλίωσης. Το ήπαρ επιλέχθηκε ως μοντέλο ιστού, καθώς αποτελεί την κύρια θέση ρύθμισης του μεταβολισμού, της οξείδωσης των λιπιδίων και της ομοιόστασης της γλυκόζης, μέσω διαδικασιών στις οποίες η ακετυλίωση διαδραματίζει έναν καλά τεκμηριωμένο ρυθμιστικό ρόλο. Συγκεκριμένα, οι ηπατικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, στον κύκλο του Krebs και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι γνωστό ότι ακετυλιώνονται εκτενώς, και αυτή η ακετυλίωση ρυθμίζεται κυρίως από την SIRT3, την κύρια μιτοχονδριακή αποακετυλάση [11, 22]. Οι μεταβολές στο προφίλ της ηπατικής ακετυλίωσης έχουν συνδεθεί με μεταβολικές διαταραχές όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2 και η λιπώδης ηπατική νόσος μη αλκοολικής προέλευσης (Non Alcoholic Fatty

Liver Disease, NAFLD). Η εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλλου αποκάλυψε ανοσοαντιδραστικότητα που εκτεινόταν σε όλο το μήκος του gel. Αυτή η ευρεία κατανομή μοριακού βάρους συνάδει με τη γνωστή ποικιλομορφία του ηπατικού ακετυλο-πρωτεώματος, στο οποίο ακετυλιώνονται εκατοντάδες πρωτεΐνες σε όλα τα εύρη μοριακού βάρους και τα υποκυτταρικά διαμερίσματα [6, 9]. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η ένταση του σήματος αυξανόταν με την αύξηση της πρωτεΐνης που υπήρχε σε κάθε διαδρομή της πηχτής, υποδηλώνοντας είτε μεγαλύτερη αφθονία των ίδιων ακετυλιωμένων πρωτεϊνών είτε την ανίχνευση επιπλέον ακετυλιωμένων πρωτεϊνών χαμηλής αφθονίας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτή η δοσοεξαρτώμενη σχέση επιβεβαίωσε ότι το πρωτόκολλο εμπλουτισμού λειτουργούσε εντός ενός γραμμικού (μη κορεσμένου) εύρους κάτι που είναι σημαντικό για μελλοντικές ποσοτικές μελέτες. Συνολικά, τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν στο ήπαρ ποντικού επιβεβαιώνουν ότι το πρωτόκολλο εμπλουτισμού με ανοσοσυγγένεια που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι συμβατό με σύνθετα βιολογικά δείγματα και είναι ικανό να εμπλουτίσει ενδογενώς ακετυλιωμένες πρωτεΐνες.

4.6 Περιορισμοί της προσέγγισης που βασίζεται στην ανοσοσυγγένεια και μελλοντικές προοπτικές

Παρόλο που τα πειραματικά πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι αποτελεσματικά για την ποιοτική ανίχνευση και τον εμπλουτισμό με βάση τη συγγένεια ακετυλιωμένων πρωτεϊνών, πρέπει να αναγνωριστούν ορισμένοι εγγενείς περιορισμοί. Πρώτον, οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την απόλυτη ποσότητα μιας δεδομένης ακετυλιωμένης πρωτεΐνης ή τη στοιχειομετρία της ακετυλίωσης σε ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο λυσίνης.

Αυτός είναι ένας γνωστός περιορισμός της ανίχνευσης μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με χρήση αντισωμάτων διότι επηρεάζεται από την προσβασιμότητα του επιτόπου, τη μεταβλητότητα της συγγένειας των αντισωμάτων και τη μη γραμμική κινητική της χημειοφωταύγειας. Μελλοντικές προσαρμογές του πρωτοκόλλου θα μπορούσαν να ενσωματώσουν προσεγγίσεις σήμανσης με σταθερά ισότοπα (π.χ. SILAC, iTRAQ) ή label free φασματομετρία μάζας χωρίς σήμανση, ώστε να καταστεί δυνατή η στοιχειομετρική ποσοτικοποίηση των αλλαγών στην ακετυλίωση. Δεύτερον, και ίσως το πιο κρίσιμο, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν επιτρέπουν τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου ή των συγκεκριμένων καταλοίπων λυσίνης που υφίστανται ακετυλίωση σε μια δεδομένη πρωτεΐνη. Δεδομένου ότι μια πρωτεΐνη μπορεί να περιέχει πολλαπλά κατάλοιπα λυσίνης με διακριτές ρυθμιστικές λειτουργίες και ότι η ακετυλίωση σε συγκεκριμένη θέση μπορεί να έχει δραματικά διαφορετικές λειτουργικές συνέπειες, η αδυναμία εντοπισμού της τροποποιημένης θέσης αποτελεί σημαντικό περιορισμό. Για παράδειγμα, η αποακετυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων λυσίνης που μεσολαβείται από τη SIRT3 σε ένζυμα όπως η LCAD (αφυδρογονάση των ακυλο-CoA μακράς αλυσίδας) ή η GDH (γλουταμινική αφυδρογονάση) έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί αυτά τα ένζυμα υπό θερμιδικό περιορισμό, ενώ η γενική υπερακετυλίωση των ίδιων πρωτεϊνών σε μοντέλα ποντικών που διατρέφονται με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, συνδέεται με μεταβολική δυσλειτουργία. Οι πληροφορίες σχετικά με τη θέση ακετυλίωσης είναι επομένως απαραίτητες για μηχανιστικές μελέτες. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, το επόμενο βήμα είναι να συνδυαστεί το πρωτόκολλο εμπλουτισμού με βάση την συγγένεια με υγρή χρωματογραφία και δίδυμη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Πιο συγκεκριμένα, πριν τον εμπλουτισμό, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα υφίσταται πέψη με θρυψίνη ή με

συνδυασμό πρωτεασών και ακολουθεί η επώαση με τα αντισώματα έναντι της ακετυλιωμένης λυσίνης. Το δεσμευμένο κλάσμα αναλύεται με φασματογραφία μάζας και ταυτοποιούνται οι θέσεις ακετυλίωσης που φέρουν επιπρόσθετη μάζα +42,01 Da. Αυτή η πρωτεομική προσέγγιση επιτρέπει την ολοκληρωμένη χαρτογράφηση του ακετυλο-πρωτεώματος υπό διαφορετικές συνθήκες (π.χ. άγριου τύπου έναντι SIRT3 knockout).

4.7 Βιολογική σημασία και ευρύτερες επιπτώσεις

Η βιολογική σημασία των φαινομένων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία εκτείνεται πολύ πέρα από τη μεθοδολογία. Η ύπαρξη ενδογενούς ακετυλίωσης σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και στο ήπαρ ποντικών συνάδουν με την αναδυόμενη άποψη ότι η ακετυλίωση πρωτεϊνών αποτελεί μια διαδεδομένη και δυναμικά ρυθμιζόμενη τροποποίηση που συνδέεται στενά με τον κυτταρικό μεταβολισμό. Η εξάρτηση των επιπέδων ακετυλίωσης από τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις Ac-CoA, όπως αποδείχθηκε από τα πειράματα με CH₃COONa, συνδέει άμεσα την ενεργειακή κατάσταση των κυττάρων με το επιγονιδίωμα. Αυτή η μεταβολική-επιγενετική σύζευξη έχει σημαντικές επιπτώσεις. Για παράδειγμα, υπό συνθήκες υπερβολικής πρόσληψης θρεπτικών ουσιών (διατροφή πλούσια σε υδατάνθρακες ή λίπη), η διαθεσιμότητα του Ac-CoA αυξάνεται, οδηγώντας σε υπερακετυλίωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και παρεμποδίζοντας τη λειτουργία των μεταβολικών ενζύμων, ένας μηχανισμός που προτείνεται ως βάση της ινσουλινοαντίστασης και του μεταβολικού συνδρόμου. Η διαπίστωση ότι η χορήγηση CH₃COONa ενισχύει την ακετυλίωση υφιστάμενων ακετυλιωμένων πρωτεϊνών όσο και την εμφάνιση νέων ακετυλιωμένων ζωνών υποστηρίζει την υπόθεση της μη ενζυμικής ακετυλίωσης και συνάδει με την άποψη ότι η ακετυλίωση αποτελεί χημική απόκριση στο στρες του άνθρακα.

5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mann M., Jensen O. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21, 255–261 (2003). doi.org/10.1038/nbt0303-255
2. Jensen O. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 391–403 (2006). doi.org/10.1038/nrm1939
3. Beltrao P., Bork P., Krogan N.J. et al. Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol Syst Biol* 9, MSB134521 (2013). doi.org/10.1002/msb.201304521
4. Kim SC, Sprung R., Chen Y., et al. Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey, *Molecular Cell*, 4, 607-618, (2006). doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.026
5. Kuo MH., Brownell J., Sobel R. *et al.* Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269–272 (1996). doi.org/10.1038/383269a0
6. Choudhary C., Weinert B., Nishida Y. *et al.* The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 536–550 (2014). doi.org/10.1038/nrm3841
7. Verdin E., Ott M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 258–264 (2015). doi.org/10.1038/nrm3931
8. Choudhary C., Kumar C., Gnad F., *et al.* Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science* **325**, 834-840(2009). doi:10.1126/science.1175371

9. Zhao S., Xu W., Jiang W., et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*. 2010 327(5968):1000-1004 (2009). doi: 10.1126/science.1179689.
10. Hirschey M.D., Shimazu T., Goetzman E., et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464:121-125, 2010. doi: 10.1038/nature08778.
11. Mu A., Latario C.J., Pickrell L.E., Higgs H.N. Lysine acetylation of cytoskeletal proteins: Emergence of an actin code. *J Cell Biol*. 219: e202006151, 2020. doi: 10.1083/jcb.202006151.
12. Ding P., Ma Z., Liu D., et al. Lysine Acetylation/Deacetylation Modification of Immune-Related Molecules in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol*. 13:865975, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.865975
13. Ogryzko V.V., Schiltz R.L., Russanova V., Howard BH., Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87: 953-959, (1996). doi: 10.1016/s0092-8674(00)82001-2.
14. Kuo M.H., Brownell J., Sobel R. *et al.* Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269–272 (1996). doi.org/10.1038/383269a0
15. Sengupta R., Brodsky O., Bingham P., et al. Modulation of the substrate preference of a MYST acetyltransferase by a scaffold protein. *Journal of Biological Chemistry*, 301: 108262, (2025).
16. Park S.Y., Kim J.S. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med* **52**, 204–212 (2020). doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4

17. Haberland M., Montgomery R.L., Olson E.N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 10:32-42, (2009). doi: 10.1038/nrg2485.
18. Lammers M. Post-translational Lysine Ac(et)ylation in Bacteria: A Biochemical, Structural, and Synthetic Biological Perspective. *Front. Microbiol.* 12:757179, (2021). doi: 10.3389/fmicb.2021.757179
19. Drazic A., Myklebust A.M., Ree R., et al. The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1864: 1372-1401, (2016). doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.007.
20. Houtkooper R.H., Pirinen E., Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13: 225-238, (2012). doi: 10.1038/nrm3293.
21. Carrico C., Meyer J.G., He W., et al. The Mitochondrial Acylome Emerges: Proteomics, Regulation by Sirtuins, and Metabolic and Disease Implications. *Cell Metabolism*, 27: 497-512, (2018). doi.org/10.1016/j.cmet.2018.01.016.
22. Hirschey M.D., Shimazu T., Huang J.Y., et al. Acetylation of Mitochondrial Proteins, *Methods in Enzymology*, 457: 137-147, (2009). doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05008-3.
23. Troelsen K.S., Bæk M., Nielsen A.L., et al. Mitochondria-targeted inhibitors of the human SIRT3 lysine deacetylase. *RSC Chemical Biology*, 2: 627-635, (2021). doi.org/10.1039/D0CB00216
24. Fernandez-Marcos P.J., Jeninga E.H., Canto C., et al. Muscle or liver-specific Sirt3 deficiency induces hyperacetylation of mitochondrial proteins without affecting global metabolic homeostasis. *Sci Rep.* 2: 425, (2012). doi: 10.1038/srep00425.

25. Fisher-Wellman K.H., Draper J.A, Davidson M.T., et al. Respiratory Phenomics across Multiple Models of Protein Hyperacetylation in Cardiac Mitochondria Reveals a Marginal Impact on Bioenergetics. *Cell Reports*, 26: 1557-1572.e8, (2019). doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.057.
26. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.* 27: 2072-2085, (2013). doi: 10.1101/gad.227439.113.
27. Someya S., Yu W., Hallows W.C., et al. Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction. *Cell* 143: 802-812, (2010). doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.002.
28. Qiu X, Brown K, Hirschey M.D, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* 12: 662-667, (2010). doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.015.
29. Houtkooper R.H, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13: 225-238, (2012). doi: 10.1038/nrm3293.
30. Wagner G.R, Payne R.M. Widespread and enzyme-independent N ϵ -acetylation and N ϵ -succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J Biol Chem.* 288: 29036-29045, (2013). doi: 10.1074/jbc.M113.486753.
31. Baeza J., Smallegan M.J., Denu J. Site-Specific Reactivity of Nonenzymatic Lysine Acetylation. *ACS Chem. Biol.* 10: 122–128, (2015). doi:10.1021/cb500848p
32. Weinert B.T, Moustafa T., Iesmantavicius V., et al. Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT3 repairs nonenzymatic acetylation lesions. *EMBO J.* 34: 2620-2632, (2015). doi: 10.15252/emboj.201591271.

33. Bonissone S., Gupta N., Romine M., et al. N-terminal protein processing: a comparative proteogenomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 12: 14-28, (2013). doi: 10.1074/mcp.M112.019075.
34. Aksnes H., Ree R., Arnesen T. Co-translational, Post-translational, and Non-catalytic Roles of N-Terminal Acetyltransferases. *Molecular Cell*, 73: 1097-1114, (2019). doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.007.
35. Albaugh B.N, Denu J.M. Catalysis by protein acetyltransferase Gcn5. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 1864:194627, (2021). doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194627.
36. Forte G.M.A., Pool M.R., Stirling, C.J. N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum. *PLoS Biology*, 9:1-13, (2013). doi.org/10.1371/journal.pbio.1001073
37. Bartels T., Kim N.C., Luth E.S., et al. N-alpha-acetylation of α -synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation. *PLoS One*. 9: e103727, (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0103727.
38. Calis S. and Gevaert K. The role of N α -terminal acetylation in protein conformation. *FEBS J*, 292: 453-467, (2025). doi.org/10.1111/febs.17209
39. Myklebust L.M., Van Damme P., Støve SI. Biochemical and cellular analysis of Ogden syndrome reveals downstream Nt-acetylation defects. *Hum Mol Genet.* 24: 1956-1976, (2015). doi: 10.1093/hmg/ddu611.
40. Kalvik T.V., Arnesen T. Protein N-terminal acetyltransferases in cancer. *Oncogene*. 32: 269-276, (2013). doi: 10.1038/onc.2012.82.
41. Zhang J., Sprung R., Pei J., et al. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8:215-225, (2009). doi.org/10.1074/mcp.M800187-MCP200
42. Henriksen P., Wagner S.A., Weinert B.T., et al. Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*. 11: 1510-1522, (2012). doi: 10.1074/mcp.M112.017251.
43. Lundby A., Lage K., Weinert B.T., et al. Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep*. 2: 419-431, (2012). doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.006.
44. Okanishi H., Kim K., Masui R., et al. Acetylome with structural mapping reveals the significance of lysine acetylation in *Thermus thermophilus*. *J Proteome Res*. 12: 3952-3968, (2013). doi: 10.1021/pr400245k.
45. Bowman G.D., Poirier M.G. Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. *Chemical Reviews* 115: 2274-2295, (2014). dx.doi.org/10.1021/cr500350x
46. Mu A., Latario C.J., Pickrell L.E., et al. Lysine acetylation of cytoskeletal proteins: Emergence of an actin code. *J Cell Biol* 219: e202006151, (2020). doi.org/10.1083/jcb.202006151
47. McBrien M.A., Behbahan I.S., Ferrari R., et al. Histone acetylation regulates intracellular pH. *Mol Cell*. 49: 310-321, (2012). doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.025
48. Hirschey M.D., Shimazu T., Jing E., et al. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell*. 44:177-190, (2011). doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.019.
49. Sundar I.K, Yao H., Rahman I. Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. *Antioxid Redox Signal*. 18: 1956-1971, (2013). doi: 10.1089/ars.2012.4863.
50. Paulin R., Dromparis P., Sutendra G., et al. Sirtuin 3 Deficiency Is Associated with Inhibited Mitochondrial Function and Pulmonary Arterial

Hypertension in Rodents and Humans. *Cell Metabolism*, 20: 827-839, (2014).

51. Li M., Plecíť-Hlavatá L., Dobrinskikh E., et al. SIRT3 Is a Critical Regulator of Mitochondrial Function of Fibroblasts in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 69: 570-583, (2023). doi: 10.1165/rcmb.2022-0360OC.

52. Alarcón J.M., Malleret G., Touzani K., et al. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42: 947-959, (2004). doi: 10.1016/j.neuron.2004.05.021.

53. Wang J., Weaver I.C.G., Gauthier-Fisher A. et al. CBP Histone Acetyltransferase Activity Regulates Embryonic Neural Differentiation in the Normal and Rubinstein-Taybi Syndrome Brain. *Developmental Cell* 18: 114-125, (2010). doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.023.

54. Finley L. W., Carracedo A., Lee J., et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization. *Cancer Cell*. 19: 416-28, (2011). doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.014.

55. Kim H.S., Patel K., Muldoon-Jacobs K., et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*. 17: 41-52, (2010). doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.023.

56. Klimova N., Long A., Kristian T. Nicotinamide mononucleotide alters mitochondrial dynamics by SIRT3-dependent mechanism in male mice. *J Neurosci Res*. 97: 975-990, (2019). doi: 10.1002/jnr.24397.

57. Schilling B., Meyer J.G., Wei L., et al. High-Resolution Mass Spectrometry to Identify and Quantify Acetylation Protein Targets. *Methods Mol Biol*. 1983: 3-16, (2019). doi: 10.1007/978-1-4939-9434-2_1.

58. Gritsenko M.A., Tsai C.F., Kim H., et al. Automated Immunoprecipitation Workflow for Comprehensive Acetylome Analysis. *Methods Mol Biol.* 2823: 173-191, (2024). doi: 10.1007/978-1-0716-3922-1_12.
59. Thanou P.G., Tsoukatos D.C. Non-enzymatic platelet-activating factor formation by acetylated proteins. *FEBS Lett* 573:11-14, (2004). doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.037.