



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μέτρηση ενζυμικής δραστηρότητας του
μιτοχονδριακού συμπλόκου I της
αναπνευστικής αλυσίδας σε υγιή άτομα**

**Measurement of enzymatic activity of the
mitochondrial complex I of the respiratory
chain in healthy individuals**

Ανδρέας Μουίκης

Λάρισα 2019

Τριμελής Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας
(Νευροβιολογίας), Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κ. Αιμιλία Ζίφα (Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας) στην οποία θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθειά της, το ενδιαφέρον της αλλά και το χρόνο που διέθεσε για τη διεκπεραίωσή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά (Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) και κ. Ζωή Δανιήλ (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας) για την αποτελεσματική συνεργασία και τη συμβολή τους στην παρούσα εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τις προπτυχιακές φοιτήτριες Κωνσταντίνα Ρότσι και Λία Ποζάτζη που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα είχε πραγματοποιηθεί η πειραματική διαδικασία της πτυχιακής.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη συνεχής τους υποστήριξη σε κάθε βήμα μου.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 4 |
| ABSTRACT..... | 5 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 6 |
| Αναπνευστική αλυσίδα..... | 6 |
| Μιτοχονδριακό σύμπλοκο I..... | 8 |
| Μιτοχονδριακό σύμπλοκο I και κυτταρική απόπτωση..... | 10 |
| Μιτοχονδριακό σύμπλοκο I και ανθρώπινες ασθένειες..... | 10 |
| Πιθανές θεραπείες..... | 12 |
| Σκοπός..... | 13 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ..... | 14 |
| Απομόνωση λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα..... | 14 |
| Μέθοδος Bradford για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών του δείγματος..... | 18 |
| Υπολογισμός ενεργότητας του ενζυμικού συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας με την χρήση NADH και φωτόμετρου..... | 21 |
| Υπολογισμός ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του μιτοχονδριακού συμπλόκου I..... | 25 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 26 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 46 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 47 |

Περίληψη

Τα κύτταρα όλων των ευκαριωτικών οργανισμών χρειάζονται ενέργεια έτσι ώστε να μπορούν να επιζήσουν, να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν βιομόρια που είναι απαραίτητα σε βιολογικές αποκρίσεις. Αυτή η ενέργεια προέρχεται από την διαδικασία του καταβολισμού οργανικών ενώσεων για την παραγωγή ATP από ADP κυρίως, μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Η αντίδραση στηρίζεται στην μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω τεσσάρων ενζυμικών συμπλόκων που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και συνολικά ονομάζονται αναπνευστική αλυσίδα.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία θα ασχοληθεί στοχευόμενα με το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν καθώς πολλαπλές έρευνες στον συγκεκριμένο τομέα έχουν αποδείξει ότι δυσλειτουργίες του ενζύμου επιπλέκονται σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες όπως Αλτσχάιμερ, Καρκίνος και Πάρκισον. Για αυτόν το λόγο η δημιουργία μίας βάσης δεδομένων που θα περιέχει τις τιμές δραστηριότητας του συμπλόκου I από υγιή άτομα (control) θα αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για μελλοντικές έρευνες πάνω στο σύμπλοκο και στις ασθένειες που επηρεάζονται από αυτό.

Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική δραστηριότητα του συμπλόκου I χρειάστηκε πρώτα να απομονώσουμε λεμφοκύτταρα από φλεβικό αίμα 16 υγιών ατόμων (10 άνδρες και 6 γυναίκες), με μέσο όρο ηλικίας να είναι τα 46 χρόνια. Στη συνέχεια αξιοποιήθηκε η τεχνική της φωτοφασματομετρίας (φωτομέτρηση) για να παρατηρήσουμε την μείωση της απορρόφησης του NADH στα 340 nm, καθώς αξιοποιείται από το σύμπλοκο I για την αντίδραση οξειδοαναγωγής. Το NADH όμως αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα και από άλλα ένζυμα και αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερη μεταβολή της απορρόφησης. Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιήθηκε η ροτερόνη που αποτελεί αναστολέα του συμπλόκου I έτσι ώστε να μπορέσουμε, αφαιρώντας τις δύο δραστηριότητες που προκύπτουν από τα δύο πειράματα, να βρούμε την ειδική δραστηριότητα του συμπλόκου I (μέσος όρος 35,29 (nmol / mg * mg)) την οποία θέλουμε και να καταχωρίσουμε στην βάση δεδομένων, ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί από μελλοντικούς ερευνητές.

Abstract

The cells of all eukaryotic organisms need energy so that they can survive, multiply and produce biomolecules that are necessary in biological responses. This action is derived from the process of catabolism of organic compounds for the production of ATP from ADP mainly through the oxidative phosphorylation process carried out in the mitochondria of the cells. The reaction is based on the transfer of electrons through four enzyme complexes found in the inner membrane of the mitochondria and are collectively known as the respiratory chain.

This thesis will exclusively deal with the complex I of mitochondrial respiratory chain. The experiments that we are about to present have been conducted because multiple studies in this field have shown that enzyme dysfunctions are involved in many human diseases such as Alzheimer's, Cancer and Parkinson's. For this reason, the creation of a database containing the activity values of complex I from healthy individuals (control) will be an important tool for future research on the complex and the diseases affected by it.

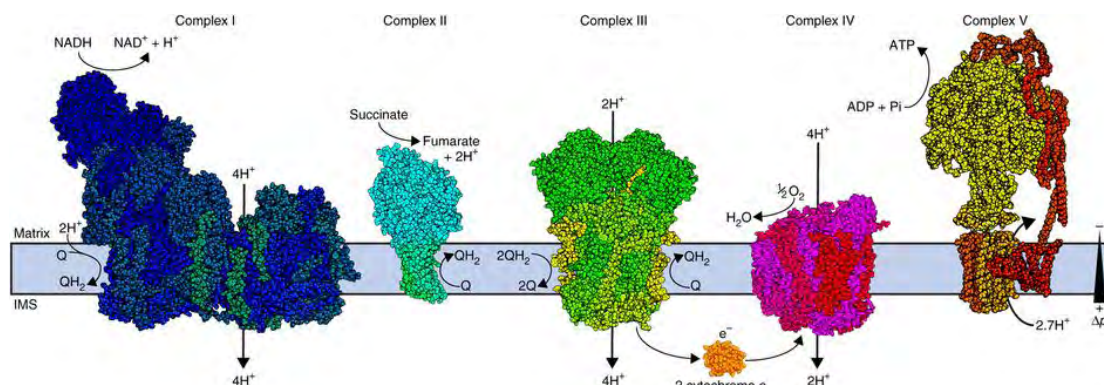
To assess the enzymatic activity of complex I we first need to isolate lymphocytes from venous blood of 16 healthy individuals (10 men and 6 women), with an average age of 46 years. The technique of photometry (photometry) was then used to observe the decrease in NADH absorption at 340 nm as it is utilized by complex I for the redox reaction. However, NADH is recognized as a substrate by other enzymes and this leads to a greater change in absorption. For this reason, rotenone which is an inhibitor of complex I was used so that by subtracting the two activities values resulting from the two experiments we can find the specific activity of complex I (an average of 35,29 (nmol / mg * mg)) that we want and register it in the database so that it can be used in the experiments of future researchers.

Εισαγωγή

Αναπνευστική αλυσίδα

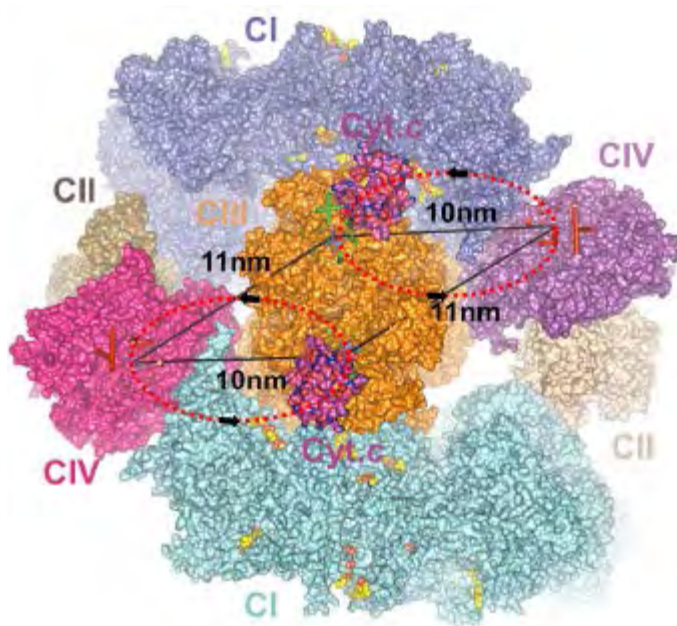
Η αναπνευστική αλυσίδα πραγματοποιεί την αντίδραση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και είναι υπεύθυνη για την παράγωγή του μεγαλύτερου ποσοστού του ATP στο κύτταρο. Η αλυσίδα αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά ένζυμα (σύμπλοκο I, II, III, IV) τα οποία τοποθετούνται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η ροή ηλεκτρονίων δια μέσου των τεσσάρων συμπλόκων οδηγεί σε άντληση πρωτονίων στον διαμεμβρανικό χώρο και στη συνέχεια η κίνησή τους μέσα από τη συνθάση του ATP έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ATP από ADP.

Μέχρι πριν από μερικά χρόνια το μεγαλύτερο ποσοστό ερευνητών είχαν την άποψη ότι η αναπνευστική αλυσίδα δεν έχει κάποια συγκεκριμένη σταθερή δομή αλλά αντιθέτως τα ένζυμα βρίσκονταν σε μία διάχυτη κατάσταση, όπου τα διάφορα ένζυμα τοποθετούνταν σε τυχαίες θέσεις στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων σύμφωνα με το μοντέλο τυχαίας διάχυσης του Hackenbrock ¹. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν έρθει στο φως νέα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η αναπνευστική αλυσίδα δεν τοποθετείται τυχαία στη μεμβράνη, αντιθέτως τα ένζυμα δημιουργούν συγκεκριμένα υπερσύμπλοκα με στοιχεία να υποστηρίζουν την ύπαρξη ακόμα μεγαλύτερων δομών οργάνωσης.



Εικόνα 1: Κλασική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας (I,II,III,IV) μαζί με την συνθάση του ATP. Σύμφωνα με το μοντέλο του Hackenbrock τα διάφορα ένζυμα τοποθετούνται τυχαία πάνω στη μεμβράνη ¹³.

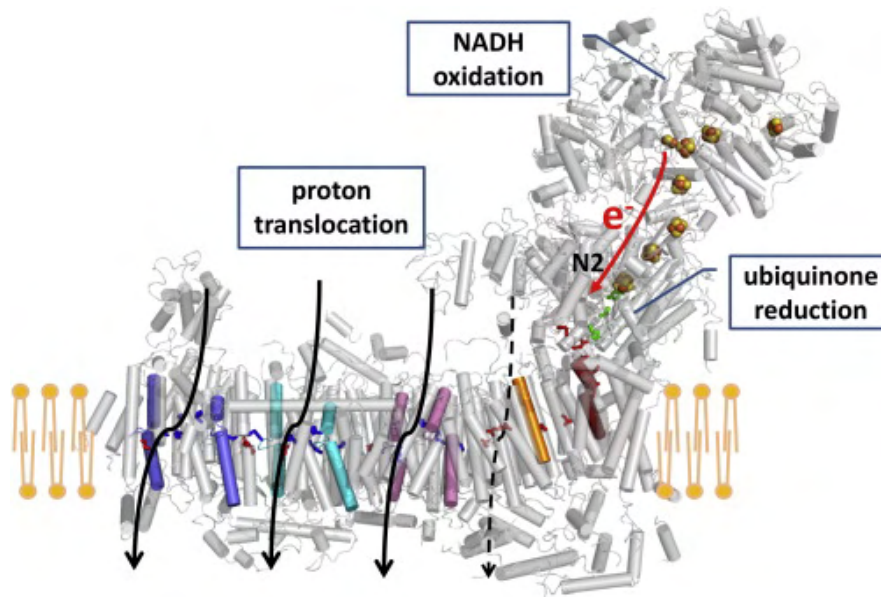
Το πιο κοινό είδος υπερσυμπλόκου είναι το ονομαζόμενο respirasome $I_1III_4IV_4$, το οποίο ονομάζεται έτσι καθώς είναι ο βασικός συνδυασμός ενζύμων που μπορεί να πραγματοποιήσει την οξειδωτική φωσφορυλίωση στο μιτοχόνδριο ². Εκτός από την πρωταρχική του λειτουργία το respirasome είναι απαραίτητο για τη σταθερότητα του συμπλόκου I, καθώς σε οργανισμούς που δεν είχαν την δυνατότητα να δημιουργήσουν το respirasome παρουσιάστηκε ανεπάρκεια δραστηριότητας του συμπλόκου I, όταν δοκιμάστηκε πείραμα δραστηριότητας με την χρήση NADH στα 340 nm. Αλληλούχιση των μεταλλαγμένων γονιδίων έδειξε ότι το σύμπλοκο III είναι υπεύθυνο για τη στρατολόγηση του συμπλόκου I στο respirasome ³. Οι ερευνητές υποθέτουν ότι μία ακόμα λειτουργία του υπερσυμπλόκου είναι η ρύθμιση της παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS) από το σύμπλοκο I μέσα από πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί (*Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes* Maria Luisa Genova, Giorgio Lenaz, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Alma Mater Studiorum—Università di Bologna, Italy). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει ακόμα ένα τελικό αποτέλεσμα που να είναι αποδεκτό από την ερευνητική κοινότητα.



Εικόνα 2: Σύγχρονη απεικόνιση της τοποθέτησης των ενζυμικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Τα ένζυμα δεν τοποθετούνται τυχαία στη μεμβράνη αντιθέτως δημιουργούν λειτουργικά υπερσύμπλοκα (στην εικόνα είναι το Megacomplex $I_2III_2IV_2$) τα οποία είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία καθώς και για τη ρύθμιση των ενζύμων ¹⁴.

Μιτοχονδριακό σύμπλοκο I

Το σύμπλοκο I είναι το πρώτο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας και το σημείο εισόδου ηλεκτρονίων που προέρχονται από το NADH στη διαδικασία παραγωγής ATP. Ως πρωτεΐνη το ενζυμικό σύμπλοκο I είναι το μεγαλύτερο και πολυπλοκότερο στην αναπνευστική αλυσίδα αποτελούμενο από 44 διαφορετικές υπομονάδες, με μόνο τις 7 να κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA (mt-DNA). Το σύμπλοκο I έχει μία χαρακτηριστική L μορφή που οφείλεται στους δύο βραχίονές του, με τον υδρόφοβο μεμβρανικό βραχίονα να κωδικοποιείται εξολοκλήρου από το μιτοχονδριακό DNA και τοποθετείται μέσα στην εσωτερική μεμβράνη. Ο υδρόφιλος βραχίονας αντιθέτως δομείται από υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA και βρίσκεται στο εσωτερικό της μήτρας. Οι δύο βραχίονες συνομολογούνται ανεξάρτητα και αυτό οδήγησε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι οι δύο δομές εξελίχθηκαν ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Όσον αφορά τις λειτουργίες του, το σύμπλοκο I μπορεί να χωριστεί σε τρεις διαφορετικές περιοχές: **αφυδρογονάση** (δέχεται ηλεκτρόνια από το NADH) ή αλλιώς N περιοχή, **υδρογονάση** (μεταφορά ηλεκτρονίων σε ουβικινόνη) ή αλλιώς Q περιοχή και την **αντλία πρωτονίων** ή αλλιώς P περιοχή που μεταφέρει πρωτόνια μεταξύ της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Οι περιοχές N και P βρίσκονται στο υδρόφιλο βραχίονα του συμπλόκου I ενώ η περιοχή Q στο υδρόφοβο άκρο.



Εικόνα 3: Απεικόνιση του ενζυμικού συμπλόκου I που βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Όπως βλέπουμε ο υδρόφιλος βραχίονας φέρει τη θέση οξείδωσης του NADH καθώς και τη θέση αναστολής από ροτενόνη, η οποία θα αξιοποιηθεί στο πείραμα. Το σύμπλοκο I χρησιμοποιεί την οξείδωση του NADH για να προκαλέσει τη μετακίνηση πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης, τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή ATP ¹⁵.

Λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας του συμπλόκου I, η διαδικασία με την οποία πραγματοποιείται η συναρμολόγησή του παραμένει άγνωστη. Παρόλα αυτά οι ερευνητές έχουν καταφέρει να προσδιορίσουν διάφορα χαρακτηριστικά εξετάζοντας ευκαριωτικούς οργανισμούς που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια του πυρηνικού ή μιτοχονδριακού DNA. Αναλύσεις αυτών των μεταλλάξεων έχουν οδηγήσει τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι οι υπομονάδες ND4 και ND6 που κωδικοποιούνται από το mt-DNA είναι απαραίτητες για τη σωστή δημιουργία του υδρόφοβου βραχίονα του ενζύμου, καθώς μία από τις λειτουργίες τους είναι σύνδεση των υπομονάδων μεταξύ τους. Οι ερευνητές όμως παρατήρησαν ότι η απουσία των υπομονάδων αυτών δεν επηρέασε καθόλου τη σταθερότητα και τη λειτουργία του υδρόφιλου βραχίονα επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την άποψη ότι οι δύο βραχίονες συναρμολογούνται ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο ⁴. Βέβαια αυτό δεν σημαίνει ότι όλες οι υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το mt-DNA είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση και λειτουργία του υδρόφοβου βραχίονα. Για παράδειγμα όταν δημιουργήθηκαν οργανισμοί με μη λειτουργικό γονίδιο ND5, όλες οι υπόλοιπες υπομονάδες συναρμολογήθηκαν επιτυχώς επιδεικνύοντας μία ικανότητα προσαρμογής του ενζύμου. Ακόμα και σε περιπτώσεις που υπάρχει μετάλλαξη σε ένα από τα δύο απαραίτητα γονίδια (ND4, ND6), το σύμπλοκο I έχει την ικανότητα συναρμολόγησης και πλήρους λειτουργία ωθώντας τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι χρειάζεται μόνο ένα από τα δύο γονίδια για να γίνει σωστή συναρμολόγηση του ενζύμου ⁵.

Εκτός της κύριας λειτουργίας του ενζύμου που είναι η έναρξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης με την είσοδο ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, το σύμπλοκο I έχει την ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS) που παράγονται από τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου σε ένα οξυγόνο. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι σημαντική για ένα κύτταρο καθώς λειτουργούν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι ενός μηνύματος. Τα περισσότερα είδη σήματος στον οργανισμό στηρίζονται στην παροδική σύνδεση μεταξύ ενός προσδέτη και του υποδοχέα του. Αντιθέτως, οι ROS αντιδρούν χημικά στοχεύοντας συνήθως πρωτεΐνες με σουλφιδριλικές ομάδες. Στην συνέχεια αυτές οι πρωτεΐνες ολοκληρώνουν την κυτταρική απόκριση στρατολογώντας, συγχρονίζοντας και ρυθμίζοντας αυξητικούς παράγοντες ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου. Η απορρύθμιση της παραγωγής των ROS είναι ένα συχνό φαινόμενο σε πολλές διαφορετικές ασθένειες του ανθρώπινου οργανισμού καθώς το σύμπλοκο I είναι ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες. Περαιτέρω ανάλυση των επιπτώσεων που μπορεί να επιφέρει η απορρύθμιση θα γίνει στην συνέχεια αυτής της εργασίας.

Μιτοχονδριακό σύμπλοκο I και κυτταρική απόπτωση

Τα μιτοχόνδρια παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης ενός κυττάρου. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι καρκινικά κύτταρα μπορούν και αποτρέπουν την απόπτωσή τους λόγω μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό σύμπλοκο I. Η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται σε έναν μεγάλο βαθμό από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt, που προάγει την επιβίωση και αύξηση του κυττάρου. Η απώλεια λειτουργίας του συμπλόκου I οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας του NADH, καθώς δεν καταναλώνεται από το ένζυμο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης Akt ενεργοποιείται καθώς η αυξημένη ποσότητα του NADH μειώνει την συγκέντρωση και τη φωσφορυλίωση της PTEN ⁶. Αυτό συμβαίνει καθώς η PTEN είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην οξειδωση και η αυξημένη ποσότητα του NADH έχει ως αποτέλεσμα να μειώσει την συγκέντρωση της λειτουργικής στερεοδιαμόρφωσης της φωσφατάσης, η οποία φυσιολογικά αποφωσφορυλιώνει τα PIP₃ σε PIP₂ και αναστέλλει την κινάση Akt.

Ο ρόλος του συμπλόκου I στην απόπτωση των κυττάρων έγινε ακόμα πιο εμφανής όταν μια από της πυρηνικές υπομονάδες, η NDUFA13 αναγνωρίστηκε από τους ερευνητές από ως παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης ⁷. Η NDUFA13 ή αλλιώς GRIM-19 αλληλεπιδρά με την μιτοχονδριακή πρωτεάση HtrA2, που στη συνέχεια στοχεύει τον παράγοντα XIAP. Ο ρόλος του παράγοντα XIAP είναι η αναστολή του αποπτωτικού παράγοντα caspase-9, με την πρωτεόλυσή του όμως η αναστολή αίρεται. Τότε η caspase-9 ενεργοποιεί το μονοπάτι απόπτωσης του κυττάρου. Σε συνδυασμό με το σύστημα που αναφέρθηκε, ερευνητές ανακάλυψαν ότι μία άλλη πυρηνική υπομονάδα NDUF51 είναι υπόστρωμα της caspase-9. Η υπομονάδα τώρα πια είναι γνωστή ως παράγοντας p75 και η κοπή του οδηγεί στην αναστολή μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγή ROS.

Μιτοχονδριακό σύμπλοκο I και ανθρώπινες ασθένειες

Καθώς το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται εξολοκλήρου από τη μητέρα στον απόγονο δεν υπάρχει ικανότητα των κυττάρων του οργανισμού να εξισορροπήσουν τα μη λειτουργικά γονίδια με φυσιολογικά. Παρόλα αυτά, μιτοχονδριακές επιλοκές δεν εμφανίζονται σε τόση μεγάλη συχνότητα όσο θα περίμεναν οι ερευνητές και αυτό συμβαίνει λόγω της ύπαρξης πολλαπλών αντιγράφων του mt-DNA σε ένα μιτοχόνδριο. Αυτό ονομάζεται **ετεροπλασμία** και λειτουργεί ως ένα όριο που πρέπει να ξεπεραστεί για να υπάρχει εκδήλωση κάποιας μιτοχονδριακής ασθένειας. Συνολικά το μιτοχονδριακό σύμπλοκο I ευθύνεται για το 1/3 των μιτοχονδριακών ασθενειών και ως σήμερα υπάρχει ένας μικρός αριθμός μοριακών τεχνικών που να μας επιτρέπει τη διάγνωσή τους σε ασθενείς ⁸.

Δύο τύποι μεταλλάξεων επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το μιτοχονδριακό DNA, οι αλλαγές ενός νουκλεοτιδίου (αντικατάσταση) και η αναδιάταξη που περιλαμβάνουν

τη διαγραφή και την προσθήκη βάσεων DNA. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις εμφανίζονται στις υπομονάδες ND1, ND4, ND6 και μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση ασθενειών καθώς αποτρέπουν την σωστή συναρμολόγηση, άρα και λειτουργία του μιτοχονδριακού συμπλόκου I. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να εμφανιστούν σε διαφορετικές ασθένειες όπως LHON, MELAS, MERRF, σύνδρομο Leigh και επιληψία ⁴. Τα συμπτώματα πασχόντων ατόμων όμως δεν είναι πάντοτε τα ίδια μεταξύ τους και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η έκφραση των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον. Αυτό οδηγεί σε δυσκολία αναγνώρισης της ασθένειας από κλινικούς γιατρούς χωρίς τη χρήση κατάλληλων μοριακών διαγνωστικών μεθόδων ⁸.

Η σαρκοείδωση και πνευμονική ίνωση είναι δύο ασθένειες που οι ερευνητές πρόσφατα συσχέτισαν με τις μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA ¹⁰. Αναλυτικότερα η πνευμονική ίνωση είναι μία θανατηφόρα ασθένεια που εμφανίζεται σε άτομα μεγάλης ηλικίας (συνήθως πάνω από 60) και η έναρξή της οφείλεται στη καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα, που στη συνέχεια ακολουθείται από υπερπαραγωγή κολλαγόνου ⁹. Αυτό οδηγεί στην παραμόρφωση του εξωκυττάριου χώρου αλλάζοντας την αρχιτεκτονική του πνεύμονα και μειώνοντας την ικανότητά του να ανταλλάζει αέρια. Σαν αποτέλεσμα υπάρχει δυσκολία αναπνοής και με το πέρασμα του χρόνου το άτομο οδηγείται στον θάνατο καθώς δεν έχει την ικανότητα να αναπνεύσει. Ο συνδετικός κρίκος που σχετίζει την ασθένεια με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι ο παράγοντας TGF-β που επάγεται από την αυξημένη συγκέντρωση NADH καθώς αυτό δεν καταναλώνεται από το σύμπλοκο I όταν δυσλειτουργεί και στη συνέχεια επάγει την πνευμονική ίνωση στους ασθενείς ⁹. Παρόμοια, η σαρκοείδωση χαρακτηρίζεται από την αυξημένη συγκέντρωση κυττάρων φλεγμονής στον πνεύμονα τα οποία σχηματίζουν εξογκώματα στο εσωτερικό του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δυσκολία αναπνοής και σταδιακά επιφέρει το θάνατο, χωρίς την κατάλληλη θεραπεία. Άγνωστη παραμένει η αιτία που οδηγεί στην έναρξη της νόσου, παρόλ' αυτά οι ερευνητές πιστεύουν ότι η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS) παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας ¹⁰.

Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις εμφανίζονται και στον καρκίνο, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εργασία, αν και πολλοί ερευνητές εκφράζουν αντιθέσεις ως προς τη συχνότητά τους ⁴. Αυτές οι μεταλλάξεις παρατηρούνται σε όλα τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας, με το σύμπλοκο I να φέρει τις περισσότερες. Τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις που οδηγούν για παράδειγμα σε μη λειτουργική αναπνευστική αλυσίδα και την αύξηση παραγωγής ROS. Αποτέλεσμα αυτών έχουμε την δημιουργία νέων μεταλλάξεων τόσο σε μιτοχονδριακό όσο και σε πυρηνικό DNA, με τον 'ρόλο' των περισσότερων μεταλλάξεων στο φαινότυπο των διάφορων καρκίνων ακόμα άγνωστο.

Πιθανές Θεραπείες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί μεταλλάξεις που οδηγούν σε μη λειτουργικό σύμπλοκο I επηρεάζουν όχι μόνο την παραγωγή ενέργειας αλλά και πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια στο κύτταρο. Οι ερευνητές οπότε προσπάθησαν να παρατηρήσουν αν η επαναφορά αυτών των μονοπατιών, με την χρήση φαρμακευτικών ουσιών μπορούν να λειτουργήσουν θεραπευτικά.

Ένας μεγάλος αριθμός επιστημονικών εργασιών αναφέρουν ότι τα αρνητικά συμπτώματα της μιτοχondριακής δυσλειτουργίας μπορούν να αποφευχθούν. Παρόλα αυτά, τα πείραμα πραγματοποιούταν σε ένα μόνο άτομο ή μια μικρή ομάδα ασθενών, χωρίς να έχουν υπάρξει ακόμα κλινικές δοκιμές. Η χρήση ουσιών που προστατεύουν το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες φαίνεται να επιφέρουν θετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση της ουσίας idebenone σε άτομα που έπασχαν από LHON, κατάφερε να προστατεύσει τα οπτικά νεύρα του ματιού και να αποτρέψει περαιτέρω μείωση της όρασης ¹¹ λόγω οξειδωτικού στρες.

Στα καρκινικά κύτταρα η δυσλειτουργία του συμπλόκου I έχει σημαντικό ρόλο καθώς επάγει μονοπάτια όπως το μονοπάτι της κινάσης Akt και του παράγοντα XIAP που αποτρέπουν την απόπτωση του κυττάρου.

Πειραματικά οι ερευνητές χορήγησαν σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων τη φαρμακευτική ουσία Metformin, ένα φάρμακο που φυσιολογικά χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 (μη ινσουλοεξαρτόμενος διαβήτης). Όταν τα καρκινικά κύτταρα ήρθαν σε επαφή με την ουσία παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης του όγκου. Η ακριβής διαδικασία με την οποία δρα η Metformin δεν είναι γνωστή αλλά το φάρμακο έχει κύριο στόχο το σύμπλοκο I, το οποίο αναστέλλει και αποτρέπει την οξειδωτική δράση του ενζύμου. Επιπλέον όταν τα καρκινικά κύτταρα ερχόταν σε επαφή με τη γλυκόζη, η Metformin οδηγούσε στην ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών ¹² επιφέροντας το θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας του μιτοχονδριακού συμπλόκου I σε υγιή άτομα. Όπως αναφέρθηκε στην εργασία μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό σύμπλοκο I εμφανίζονται σε πάρα πολλές ασθένειες του ανθρώπου και συνήθως συνοδεύονται με μείωση της ενζυμικής δραστηριότητάς του.

Απώτερος στόχος του πειράματος που ακολουθεί ήταν η δημιουργία μίας βάσης δεδομένων η οποία να μπορεί να αξιοποιηθεί από μελλοντικούς φοιτητές ή ερευνητές για σύγκριση με σύμπλοκα I που φέρουν μεταλλάξεις. Τα μιτοχόνδρια πάρθηκαν από λεμφοκύτταρα που τα ίδια προήλθαν από φλεβικό αίμα υγιών ατόμων. Χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες τιμές του πειράματος και τα συμπεράσματα της εργασίας μελλοντικοί ερευνητές θα μπορέσουν σε μικρό χρονικό διάστημα να ανακαλύψουν τυχόν δυσλειτουργία του μιτοχονδριακού συμπλόκου I και να αποτρέψουν την εμφάνιση νέων και παλιών ασθενειών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Απομόνωση λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομόνωση λεμφοκυττάρων από αίμα ασθενούς ή φυσιολογικού ατόμου. Να σημειωθεί ότι το αίμα πρέπει να ληφθεί με ηπαρινισμένη σύριγγα και στη συνέχεια να μεταφερθεί σε σωλήνες που χρησιμοποιούνται για γενική αίματος (μοβ καπάκι περιέχει EDTA). Έτσι δεν θα δημιουργηθούν θρόμβοι που θα καταστρέψουν το δείγμα.

Υλικά για την μέθοδο:

1. Balanced solution
2. PBS 10X
3. Falcon 50 και 15 ml
4. Πιπέτα Pasteur
5. Φυγόκεντρος

Διαδικασία:

Αρχικά θα πρέπει να παρασκευαστεί το PBS 10X ακολουθώντας τον παρακάτω πίνακα με τελικό όγκο 100 ml :

| PBS 10X | |
|----------------------------------|--------------------|
| Αντιδραστήριο | Τελική συγκέντρωση |
| Na ₂ HPO ₄ | 1M |
| KH ₂ PO ₄ | 20mM |
| NaCl | 1.37M |
| KCl | 20mM |

Πίνακας 1

Ξεκινώντας θα αναφέρουμε πώς γίνονται οι υπολογισμοί για το NaCl , με τις υπόλοιπες μάζες να υπολογίζονται με παρόμοιο τρόπο. Το NaCl βρίσκεται σε στερεή μορφή σε δοχείο οπότε πρέπει να υπολογίσουμε την μάζα που χρειαζόμαστε και αυτό γίνεται μέσω του τύπου $C = m/Mr$:

$$1,37 \text{ M} = m / 58,44 \text{ (g/mol)} \Leftrightarrow 1,37 = m / 58,44 \text{ (g)} \Leftrightarrow m = 80,062 \text{ gr}$$

Άρα χρειαζόμαστε 80,062 gr για να έχουμε συγκέντρωση 1,37 M σε 1 λίτρο διαλύματος.

Εμείς όμως θέλουμε τελικό όγκο 100 ml οπότε κάνουμε:

$$\left. \begin{array}{l} \text{NaCl : 80,062 gr σε 1000 ml} \\ X \quad \quad \quad \text{σε 100 ml} \end{array} \right\} \boxed{X = 8,0062\text{gr}}$$

Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο υπολογίζουμε τις μάζες των αντιδραστηρίων που χρειαζόμαστε για την παραγωγή 100 ml PBS 10X. Να σημειωθεί ότι λόγω της πυκνότητας του διαλύματος χρειάζεται συνεχής ανάδευση κατά την παραγωγή και ανακίνηση κάθε μερικές μέρες αξιοποιώντας και θέρμανση.

Ακολουθεί η παραγωγή του SHE-PIM, που ουσιαστικά αποτελεί το διάλυμα αποθήκευσης των λεμφοκυττάρων όταν αυτά θα βρίσκονται στη βαθιά κατάψυξη (-80 °C). Αυτό γίνεται ακολουθώντας την παραπάνω μεθοδολογία και τον Πίνακα 2 για τελικό όγκο 100 ml. Όλα τα υλικά βρίσκονται σε στερεή μορφή, άρα με την χρήση του ζυγού μπορούμε να πάρουμε γρήγορα τις κατάλληλες μάζες (HEPES 0,2383 gr και EDTA 1,8612 gr για τη δημιουργία 10 ml διαλύματος) μέσω του τύπου που ήδη έχουμε αναφέρει. Για την παρασκευή του HEPES δεν πρέπει να βάλουμε απευθείας των τελικό όγκο καθώς θα πρέπει πρώτα να ρυθμίσουμε το pH. Αυτό γίνεται με την χρήση υδατικού διαλύματος NaOH και συνεχής μέτρηση του pH υπό ανάδευση με την χρήση πεχάμετρου. Τα στοκ αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου μακριά από τον ήλιο και το EDTA χρειάζεται ανακίνηση κάθε δύο ημέρες.

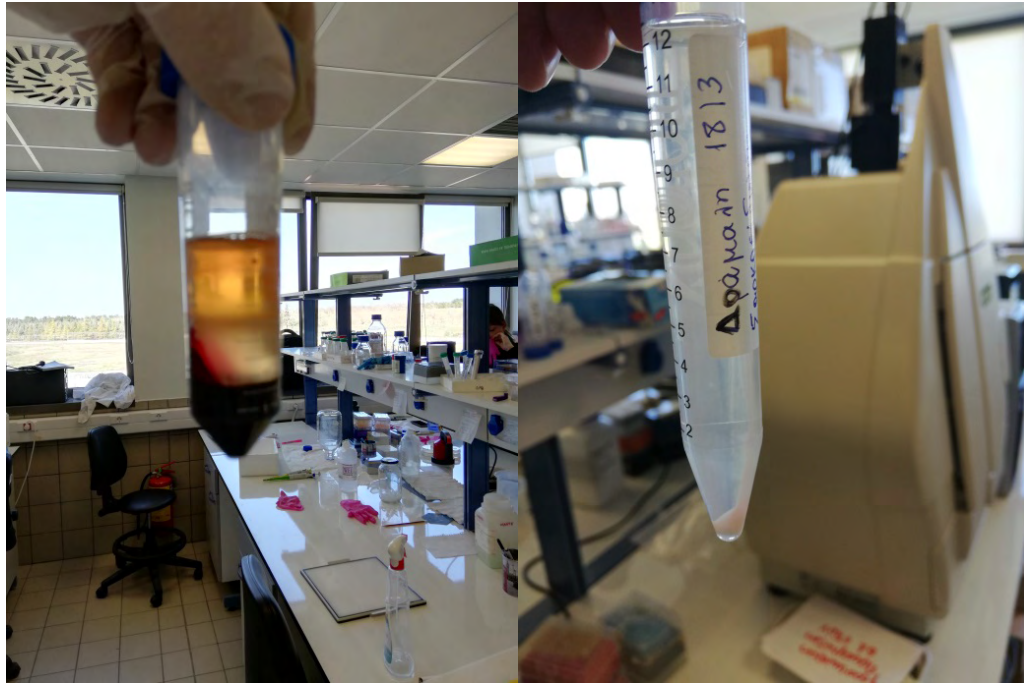
| SHE-PIM (100 ml) | | |
|------------------------|--------------------|-------------------------|
| Αντιδραστήριο | Τελική συγκέντρωση | Από stock |
| Σουκρόζη | 250 mM | 8,5 gr |
| HEPES pH = 7,4 | 10 mM | (από 0,1 M) 10 ml |
| EDTA | 1 mM | (από 0,5 M) 200 μ l |
| Πρωτεϊνικοί αναστολείς | - | 4 |

Πίνακας 2

Να σημειωθεί πως οι αναστολείς είναι σε μορφή ταμπλέτας και χρησιμοποιούνται σε αναλογία 1/25 ml SHE-PIM σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας και είναι εξαιρετικά τοξικές αν έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή τα μάτια. Συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 ml με 89,8 ml ddH₂O.

Τώρα μπορούμε να ξεκινήσουμε την απομόνωση των λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα:

1. Σε falcon 50 ml προσθέτουμε 10 ml φικόλης που έχουμε συλλέξει με σύριγγα και στην συνέχεια με μία πιπέτα Pasteur αποχύνουμε 20 ml αίματος ώστε να δημιουργηθούν δύο στρώσεις.
2. Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά στα 1800 rpm σε 20°C.
3. Ύστερα από τη φυγοκέντρωση προκύπτουν 4 ορατές στρώσεις που από πάνω προς τα κάτω είναι: πλάσμα, λεμφοκύτταρα, φικόλη, ερυθροκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα έχουν τη μορφή μίας λεπτής λευκής/γκρίζας στρώσης πάνω από το στρώμα της φικόλης (φαίνονται καλύτερα στο φως).
4. Με μία πιπέτα Pasteur αφαιρούμε πρώτα το πλάσμα και στη συνέχεια τα λεμφοκύτταρα τα οποία και τοποθετούμε σε ένα νέο falcon 15 ml.
5. Προστίθεται τριπλάσια ποσότητα PBS 1X σε σχέση με το υγρό που συλλέχθηκε με τα λεμφοκύτταρα και ακολουθεί φυγοκέντρωση 5 λεπτά, 2200 rpm, 20°C για να απομακρύνουμε την φικόλη που είναι τοξική. Αφαιρούμε το υπερκείμενο με χρήση πιπέτας και τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε μορφή ίζηματος στον πάτο του falcon.
6. Αραιώνουμε τα λεμφοκύτταρα σε SHE-PIM, με αναλογία 3:1 αν υπάρχει ακόμα υγρό στο ίζημα και στη συνέχεια τοποθετούμε το διάλυμα σε πολλαπλά erpendorf και αποθηκεύουμε στους -80°C.



Εικόνα 4: Στα αριστερά μπορούμε να δούμε το αποτέλεσμα της πρώτης φυγοκέντρησης του ολικού αίματος. Χάρη τη φικόλη δημιουργήθηκαν τέσσερις διακριτές στιβάδες που από κάτω προς τα πάνω είναι: ερυθρά αιμοσφαίρια, φικόλη, λεμφοκύτταρα και πλάσμα. Οι στιβάδες είναι πιο διακριτές στο φως και αυτό επιτρέπει την ασφαλή αφαίρεση του πλάσματος με πιπέτα pastuer χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αφαίρεσης και της στιβάδας με τα λεμφοκύτταρα. Στα δεξιά μπορούμε να δούμε το αποτέλεσμα της δεύτερης φυγοκέντρησης όπου τα λεμφοκύτταρα έχουν σχηματίσει ίζημα στον πάτο του falcon κάνοντας την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού εύκολη με την χρήση πιπέτας pastuer.

Μέθοδος Bradford για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών του δείγματος

Για την αξιοποίηση της μεθόδου χρειάζεται να δημιουργήσουμε πρώτα την πρότυπη καμπύλη έτσι ώστε να έχουμε την ικανότητα να βρούμε την συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα μέσω της εξίσωσης: $y = ax + b$.

Υλικά για την πραγματοποίηση της μεθόδου:

1. Φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο στα 595 nm
2. Bradford 1X (ανίχνευση από 1 – 1500 µg/ml)
3. Απλή κυψελίδα
4. BSA σε στερεή μορφή

Διαδικασία:

Αρχικά θα δημιουργήσουμε ένα στοκ διαλύματος BSA για να γίνει πιο εύκολη η πρόσθεσή της στα διαλύματα που θα δημιουργήσουμε, καθώς οι ποσότητες είναι εξαιρετικά μικρές. Η συγκέντρωση που θέλουμε να έχει το διάλυμα είναι **1 µg/µl** έτσι ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί σε όλα τα διαλύματα που χρειάζονται για την πρότυπη καμπύλη χωρίς αλλαγές στην συγκέντρωση. Ο μέγιστος όγκος διαλύματος BSA που χρειαζόμαστε για την καμπύλη είναι **51 µl**, άρα θα ζυγίσουμε **51 µg BSA** χρησιμοποιώντας τον ζυγό του εργαστηρίου και τα διαλύουμε σε απιονισμένο νερό. Αυτή όμως είναι μια πολύ μικρή ποσότητα (πιθανότητα λάθος μέτρησης λόγω σφάλματος του ζυγού) και η δημιουργία νέου διαλύματος κάθε φορά που θέλαμε να κατασκευάσουμε μία νέα πρότυπη καμπύλη είναι μία χρονοβόρος διαδικασία. Για αυτόν τον λόγο αποφασίστηκε ότι θα δημιουργηθεί **1 ml** στοκ δηλαδή **1000 µg BSA** (υπολογίστηκε με μέθοδο των τριών).

Εφόσον έχει δημιουργηθεί το στοκ BSA στην συνέχεια παρασκευάζουμε τα απαραίτητα διαλύματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3). Να σημειωθεί ότι το Bradford δεν το παίρνουμε απευθείας από το μπουκάλι του, αντιθέτως γεμίζουμε 1 falcon των 50 ml και παίρνουμε αντιδραστήριο από αυτό. Όταν τελειώσει πρέπει να δημιουργήσουμε μία νέα πρότυπη καμπύλη καθώς το Bradford με την πάροδο του χρόνου υπόκειται αλλαγές που επηρεάζουν την απορρόφηση. Για την παρασκευή του Tris-HCl ξεκινάμε χρησιμοποιώντας το Tris-base που υπάρχει στο εργαστήριο. Υπολογίζουμε την μάζα που χρειαζόμαστε για συγκέντρωση 1 M στα 500 ml και ακολουθεί ανάδευση. Τώρα με την χρήση του πεχάμετρου προσθέτουμε προσεκτικά με πιπέτα Pasteur HCl ως ότου το pH φτάσει στην τιμή 7,6.

| | | | | | | |
|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| mBSA (μg) | 0 | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| V_{Tris 10mM} (μl) | 20 | 19 | 15 | 10 | 5 | 0 |
| V_{Bradford 1X} (μl) | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 | 980 |

Πίνακας 3

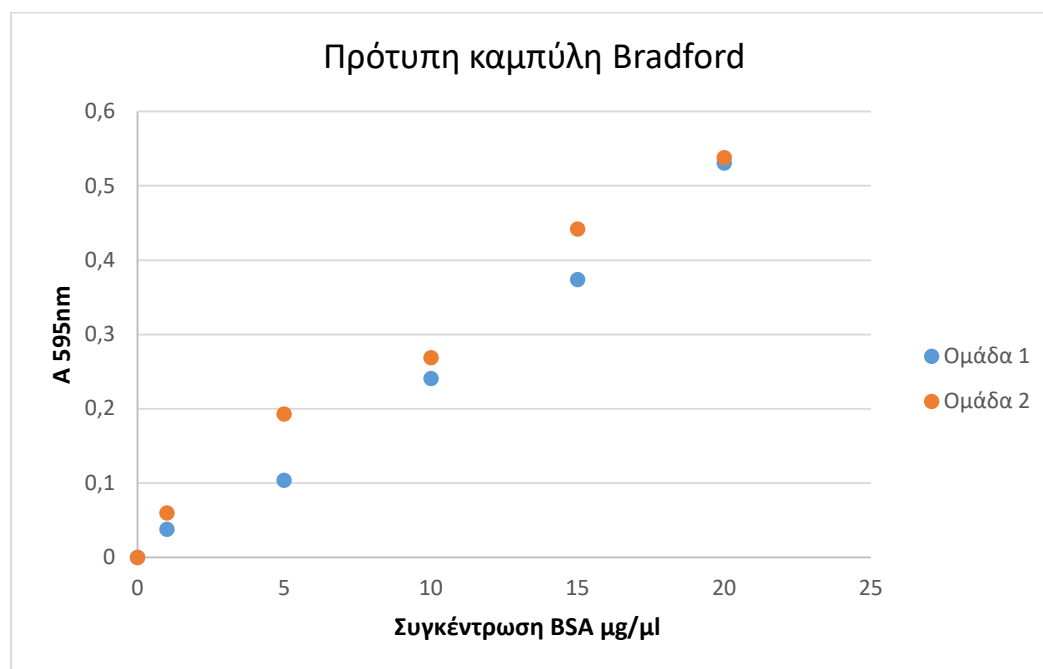
Δημιουργούμε δύο από το κάθε διάλυμα έτσι ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα στη μέτρηση της απορρόφησης. Στη συνέχεια επωάζουμε τα διαλύματα για 10 λεπτά και μετά το πέρας του χρόνου φωτομετρούμε στα 595 nm.

Αποτελέσματα φωτομέτρησης

Διάγραμμα όλων των τιμών απορρόφησης

| C_{BSA} (μg/μl) | A_{595nm} Ομάδα 1 | A_{595nm} Ομάδα 2 |
|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0,444 | 0,45 |
| 1 | 0,482 | 0,51 |
| 5 | 0,548 | 0,643 |
| 10 | 0,685 | 0,719 |
| 15 | 0,818 | 0,892 |
| 20 | 0,975 | 0,988 |

Πίνακας 4

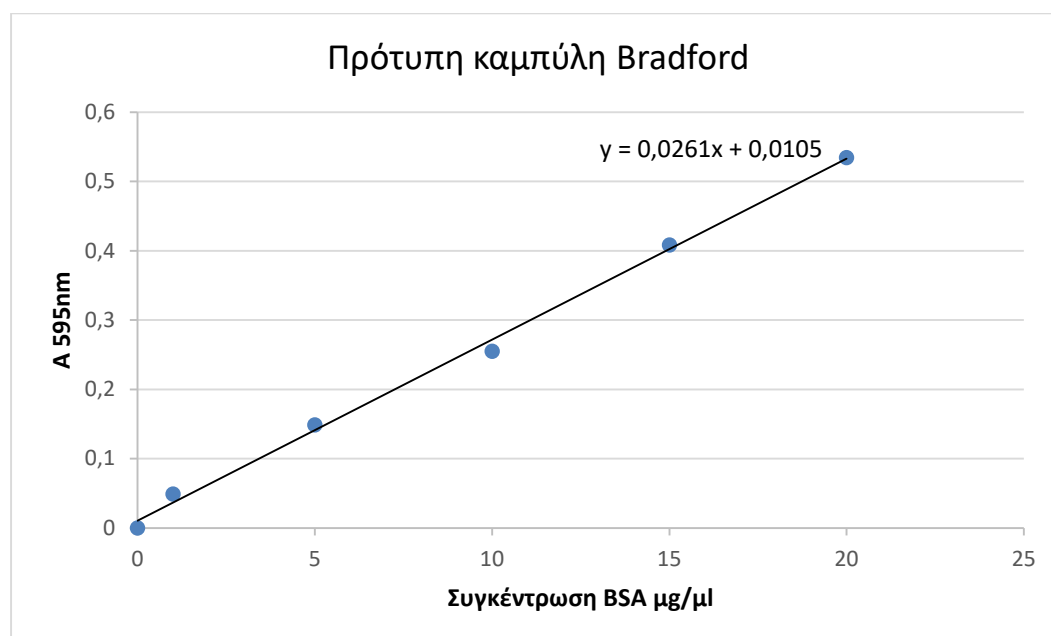


Διάγραμμα 1

Διάγραμμα των μέσων τιμών απορρόφησης

| C_{BSA} (μg/μl) | A_{595nm} |
|-------------------|-------------|
| 0 | 0 |
| 1 | 0,049 |
| 5 | 0,1485 |
| 10 | 0,255 |
| 15 | 0,408 |
| 20 | 0,5345 |

Πίνακας 5



Διάγραμμα 2

Υπολογισμός ενεργότητας του ενζυμικού συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας με την χρήση NADH και φωτόμετρου

Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζυμικού συμπλόκου I γίνεται με την χρήση του NADH και ενός φωτόμετρου το οποίο είναι ρυθμισμένο στα 340nm. Με την έναρξη της αντίδρασης του υπόστρωμα καταναλώνεται (NADH) και αυτό οδηγεί στη μείωση της απορρόφησης του διαλύματος στα 340nm και έτσι παρατηρούμε τη λειτουργία του ενζύμου. Η μείωση όμως που παρατηρούμε δεν οφείλεται μόνο στο σύμπλοκο I καθώς μέσα στο κύτταρο υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων που πραγματοποιούν οξείδωση του NADH. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούμε ροτενόνη η οποία παρεμποδίζει τη λειτουργία του συμπλόκου I. Χρησιμοποιώντας έτσι μία αντίδραση με ροτενόνη και μία χωρίς μπορούμε να βρούμε τη δραστηριότητα του συμπλόκου I. Το KCN χρησιμοποιείται στην αντίδραση καθώς είναι εξειδικευμένος αναστολέας το συμπλόκου III και αποτρέπει τη μεταφορά ηλεκτρονίων και άρα την οξειδωτική ικανότητα των υπόλοιπων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας.

Υλικά για την πραγματοποίηση της μεθόδου:

1. Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C
2. Φασματοφωτόμετρο UV στα 340nm
3. Κυψελίδα χαλαζία
4. CoQ1 Stock solution 2 mM διαλυμένο σε DMSO, αποθηκεύεται στους -20 °C
5. Ροτενόνη Stock solution 2 mM διαλυμένη σε DMSO, αποθηκεύεται στους -20 °C
6. Αντιμυκίνη-α Stock solution 3 mM διαλυμένη σε DMSO, αποθηκεύεται στους -20 °C
7. NADH, υδατικό δ/μα Stock solution 5,7 mM, **πάντα φρέσκο**
8. BSA, 5% w/v
9. MgCl₂, υδατικό δ/μα Stock solution 0,5 M στους 4 °C
10. KCN, υδατικό δ/μα Stock solution 0,2 M, **φρέσκο κάθε φορά**
11. K₂HPO₄, υδατικό δ/μα, PH=7,8 στους 4 °C

Πειραματική διαδικασία:

Πριν ξεκινήσουμε το πείραμα θα πρέπει να δημιουργηθεί το ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄ με pH=7,8 καθώς και το Premix (διάλυμα αντίδρασης). Ξεκινώντας από το ρυθμιστικό διάλυμα έχουμε:

Για τη δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος ακολουθήθηκε ανάμιξη K_2HPO_4 και KH_2PO_4 σε συγκεκριμένους όγκους για την παραγωγή διαλύματος με pH 7,8. Το K_2HPO_4 βρίσκεται σε στερεή μορφή σε δοχείο οπότε πρέπει να υπολογίσουμε την μάζα που χρειαζόμαστε. Μέσω του τύπου $C = m/Mr$ έχουμε:

$$1 \text{ M} = m / 174,2 \text{ (g/mol)} \Leftrightarrow 1 = m / 174,2 \text{ (g)} \Leftrightarrow m = 174,18 \text{ gr}$$

Άρα χρειαζόμαστε 174,18 gr για να έχουμε συγκέντρωση 1 M σε 1 λίτρο διαλύματος.

Εμείς όμως θέλουμε τελικό όγκο 90 ml οπότε κάνουμε:

$$\left. \begin{array}{l} \text{K}_2\text{HPO}_4 : 174,18 \text{ gr σε } 1000 \text{ ml} \\ X \quad \text{σε} \quad 90 \text{ ml} \end{array} \right\} \boxed{X = 15,67 \text{ gr}}$$

Το ίδιο κάνουμε και για το KH_2PO_4 :

$$1 \text{ M} = m / 136,08 \text{ (g/mol)} \Leftrightarrow 1 = m / 136,08 \text{ (g)} \Leftrightarrow m = 136,08 \text{ gr}$$

Άρα χρειαζόμαστε 136,08 gr για να έχουμε συγκέντρωση 1 M σε 1 λίτρο διαλύματος.

$$\left. \begin{array}{l} \text{KH}_2\text{PO}_4 : 136,08 \text{ gr σε } 1000 \text{ ml} \\ X \quad \text{σε} \quad 20 \text{ ml} \end{array} \right\} \boxed{X = 2,72 \text{ gr}}$$

Ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων: K_2HPO_4 80,2 ml και KH_2PO_4 19,8 ml.

Μετά το πέρας της δημιουργίας του ρυθμιστικού διαλύματος θα πρέπει να παρασκευάσουμε το διάλυμα αντίδρασης (Premix) με τελικό όγκο 1 ml. Αυτό γίνεται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

| Αντιδραστήριο | Συγκεντρώσεις |
|--------------------------|---------------|
| K_2HPO_4 | 20mM |
| BSA | 5% w/v |
| MgCl_2 | 4mM |
| KCN | 1.7mM |
| Αντιμυκίνη-α | 3μM |
| Ροτενόνη | 15μM |
| NADH | 200μM |
| CoQ_1 | 100μM |

Πίνακας 6

Οι συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων υπολογίζονται με την μέθοδο που ήδη χρησιμοποιήσαμε και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω πίνακα (να σημειωθεί ότι οι παρακάτω μάζες και όγκοι είναι για την παραγωγή των Stock solution):

| Αντιδραστήριο | Μάζα (gr) | Όγκος Διαλύματος (ml) | Συγκέντρωση (M) |
|-------------------|-----------|-----------------------|------------------------|
| BSA | 0,5 | 10 | - |
| MgCl ₂ | 4,76 | 100 | 0,5 |
| KCN | 0,6512 | 1 | 1 |
| Αντιμυκίνη-α | 0,0164 | 10 | 3 * 10 ⁻³ |
| Ροτενόνη | 0,007 | 10 | 2 * 10 ⁻³ |
| NADH | 0,002 | 0,5 | 5,7 * 10 ⁻³ |
| CoQ ₁ | 0,002 | 4 | 2 * 10 ⁻³ |

Πίνακας 7

Στην συνέχεια πρέπει να υπολογίσουμε τον όγκο του κάθε διαλύματος που χρειαζόμαστε για να έχουμε τις συγκεντρώσεις του πίνακα 6 στο διάλυμά μας. Αυτό γίνεται με τον τύπο:

$$C_{αρχ} * V_{αρχ} = C_{τελ} * V_{τελ}$$

$$\text{MgCl}_2: C_{αρχ} * V_{αρχ} = C_{τελ} * V_{τελ} \Leftrightarrow$$

$$0,5 \text{ M} * 100 \text{ ml} = 4 * 10^{-3} \text{ M} * X \Leftrightarrow$$

$$X = 8 * 10^{-3} \text{ ml} \text{ ή } X = 8 \text{ } \mu\text{l}$$

| Αντιδραστήριο | Όγκος (μl) |
|---------------------------------|------------|
| K ₂ HPO ₄ | 200 |
| MgCl ₂ | 8 |
| KCN | 1,7 |
| Αντιμυκίνη-α | 1 |
| Ροτενόνη/DMSO | 7,5 |
| NADH | 35,1 |
| CoQ ₁ | 50 |
| BSA | 60 |

Πίνακας 8

Εφόσον έχει παρασκευαστεί το Premix, το οποίο μέχρι να το χρειαστούμε φυλάσσεται στο ψυγείο, μπορούμε να ξεκινήσουμε το πείραμα για τον υπολογισμό τον δραστηριότητας του ενζυμικού συμπλόκου I με παρουσία ή απουσία ροτενόνης. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο στους 37°C και το φωτόμετρο στα 340nm και ανοίγουμε την λάμπα UV.
2. Πραγματοποιούμε τους 3 κύκλους ψύξης/απόψυξης (-80°C και 37°C αντίστοιχα) , κάθε κατάσταση διαρκεί 20 λεπτά.
3. Από το δείγμα παίρνουμε τον κατάλληλο όγκο έτσι ώστε να έχουμε συνολική ποσότητα πρωτεϊνών 70 µg μέσα στο νέο tube (υπολογίζεται με Bradford, αν δεν έχετε κάνει τότε σταματάμε το πείραμα). Προσθέτουμε στη συνέχεια νερό έτσι ώστε ο όγκος να είναι ίσως με 100 µl.
4. Αναδεύουμε το Premix (**χωρίς ροτενόνη**) και προσθέτουμε 536,7 µl ddH₂O
5. Συμπληρώνουμε με 7,5 µl ροτενόνης ή DMSO ανάλογα με ποιο κομμάτι του πειράματος κάνουμε.
6. Αναμειγνύουμε το Premix με το δείγμα και επωάζουμε για 1 λεπτό στο υδατόλουτρο.
7. Ύστερα προσθέτουμε το CoQ1 (50 µl) για την εκκίνηση της αντίδρασης, ανακινούμε με την πιπέτα και μεταφέρουμε το δ/μα στην κυψελίδα χαλαζία
8. Παρακολουθούμε φασματοφωτομετρικά την μείωση της απορροφητικότητας του NADH καθώς αυτό οξειδώνεται στα 340nm, σημειώνοντας την τιμή του φωτόμετρου κάθε 15 δευτερόλεπτα και η αντίδραση διαρκεί 4 λεπτά.

Υπολογισμός ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του μιτοχονδριακού συμπλόκου I

Μόλις ολοκληρωθούν οι μετρήσεις της μείωσης της απορρόφησης του NADH με και χωρίς ροτενόνη μπορούμε να υπολογίσουμε την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του συμπλόκου I. Αυτό πραγματοποιείται αξιοποιώντας τους παρακάτω τύπους και τις τιμές από τις μετρήσεις δραστηριότητας (ροτενόνη, χωρίς ροτενόνη) που πήραμε για το κάθε άτομο.

Τύπος ενζυμικής δραστηριότητας

$$E(mU) = (\Delta A * Vt) / (t * \epsilon * b)$$

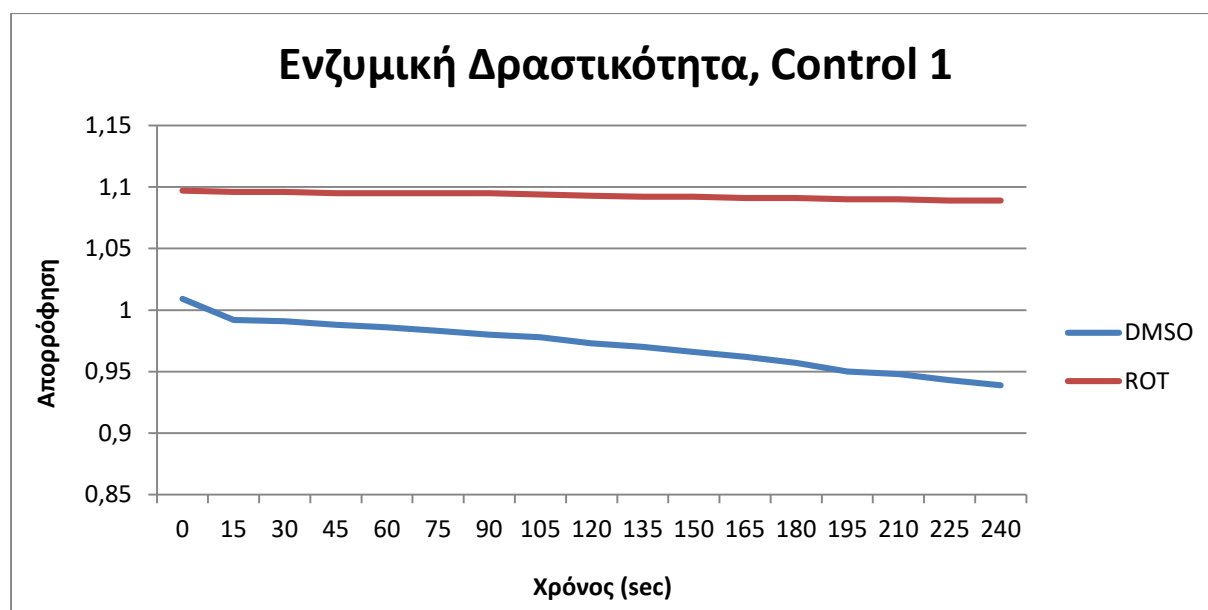
- ΔA : η μεταβολή της απορρόφησης του NADH που μετρήσαμε στο δείγμα για μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο (t) σε min
- ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του NADH, που είναι ίσος με $6,22 * 10^{-3} \text{ (cm}^{-1} * \text{M}^{-1}\text{)}$
- b: το μήκος της οπτικής διαδρομής (μήκος κυψελίδας) σε cm
- Vt: ο συνολικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης σε ml

Τύπος ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας

$$SA = E / mg \text{ (πρωτεΐνη)}$$

Στις επόμενες σελίδες θα παρουσιαστούν οι τιμές της απορρόφησης από τα άτομα control καθώς και τα διαγράμματα της μειωμένης απορρόφησης του NADH. Επίσης μαζί με τα δεδομένα του Control 1 θα παρουσιαστεί ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιούνται οι υπολογισμοί.

Control 1



Διάγραμμα 3

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 1,009 | 1,097 |
| 15 | 0,992 | 1,096 |
| 30 | 0,991 | 1,096 |
| 45 | 0,988 | 1,095 |
| 60 | 0,986 | 1,095 |
| 75 | 0,983 | 1,095 |
| 90 | 0,98 | 1,095 |
| 105 | 0,978 | 1,094 |
| 120 | 0,973 | 1,093 |
| 135 | 0,97 | 1,092 |
| 150 | 0,966 | 1,092 |
| 165 | 0,962 | 1,091 |
| 180 | 0,957 | 1,091 |
| 195 | 0,95 | 1,09 |
| 210 | 0,948 | 1,09 |
| 225 | 0,943 | 1,089 |
| 240 | 0,939 | 1,089 |

Πίνακας 9

Ο υπολογισμός της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας γίνεται με τον εξής τρόπο:

Control 1 (DMSO)

$$\begin{aligned} E(\text{mU}) &= (\Delta A * V_t) / (t * \epsilon * b) = \\ &= [(1,009 - 0,939) * 1 (\text{ml})] / [4 (\text{min}) * 6,22 * 10^3 (\text{cm}^{-1} * \text{M}^{-1}) * 1 (\text{cm})] = \\ &= 0,07 (\text{ml}) / 24,88 * 10^3 (\text{min} / \text{M}) = 0,07 (\text{ml} * \text{M}) / 24,88 * 10^3 (\text{min}) = \\ &= 2,81 * 10^{-3} (\text{ml} * \text{M}) / 10^{-3} (\text{min}) = 2,81 * 10^{-6} (\text{ml} * \text{M} / \text{min}) = \\ &= 2,81 * 10^{-6} (\text{ml} * \text{mol} / \text{min} * \text{ml} * 10^3) = 2,81 * 10^{-9} (\text{mol} / \text{min}) = \\ &= 28,1 * 10^{-10} (\text{mol} / \text{min}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} SA &= E / \text{mg} = 28,1 * 10^{-10} (\text{mol} / \text{min}) / 70 * 10^{-3} (\text{mg}) = \\ &= 28,1 * 10^{-10} * 10^9 (\text{nmol} / \text{min}) / 70 * 10^{-3} (\text{mg}) = \\ &= 28,1 * 10^2 (\text{nmol} / \text{min}) / 70 (\text{mg}) = 40,14 (\text{nmol} / \text{mg} * \text{min}) \end{aligned}$$

Control 1 (Rotenone)

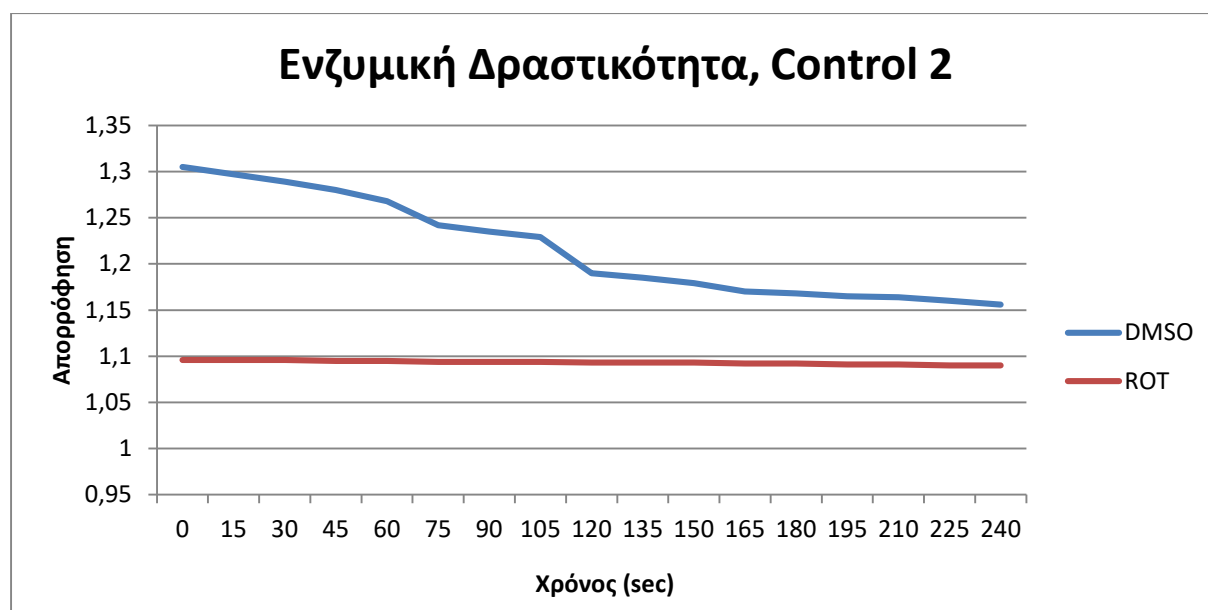
$$E(\text{mU}) = (\Delta A * V_t) / (t * \epsilon * b) = 3,2 * 10^{-10} (\text{mol} / \text{min})$$

$$SA = E / \text{mg} = 4,57 (\text{nmol} / \text{mg} * \text{min})$$

Control 1 (Δραστηριότητα συμπλόκου I)

$$SA_{\text{DMSO}} - SA_{\text{Rot}} = (40,14 - 4,57) (\text{nmol} / \text{mg} * \text{min}) = 35,57 (\text{nmol} / \text{mg} * \text{min})$$

Control 2

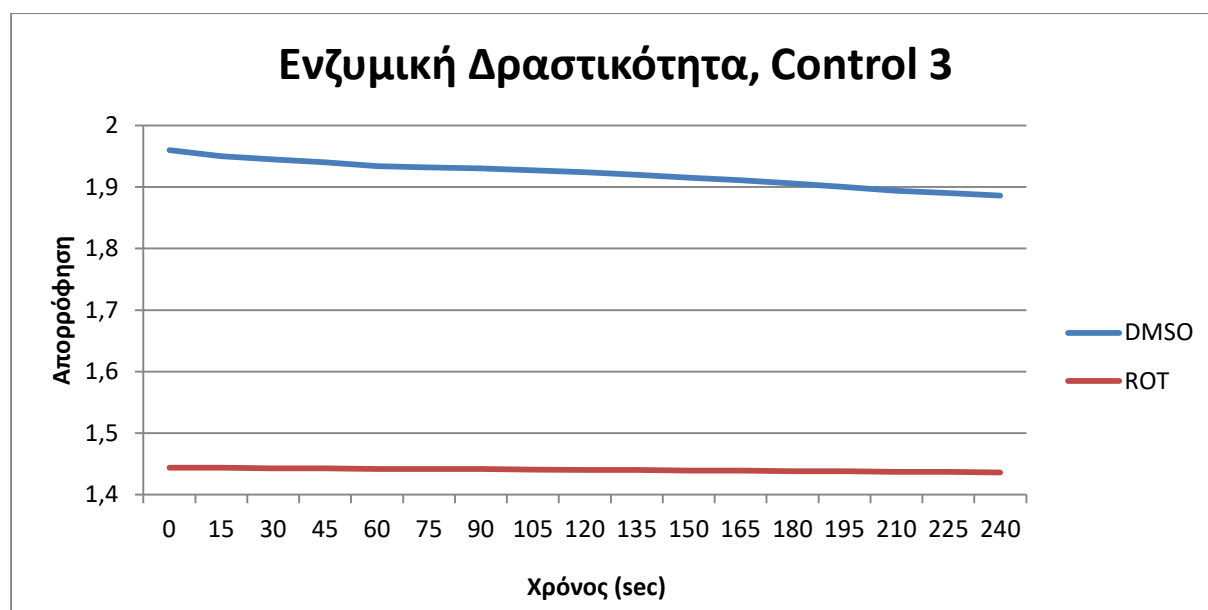


Διάγραμμα 4

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 1,305 | 1,096 |
| 15 | 1,297 | 1,096 |
| 30 | 1,289 | 1,096 |
| 45 | 1,28 | 1,095 |
| 60 | 1,268 | 1,095 |
| 75 | 1,242 | 1,094 |
| 90 | 1,235 | 1,094 |
| 105 | 1,229 | 1,094 |
| 120 | 1,19 | 1,093 |
| 135 | 1,185 | 1,093 |
| 150 | 1,179 | 1,093 |
| 165 | 1,17 | 1,092 |
| 180 | 1,168 | 1,092 |
| 195 | 1,165 | 1,091 |
| 210 | 1,164 | 1,091 |
| 225 | 1 | 1,09 |
| 240 | 1,156 | 1,09 |

Πίνακας 10

Control 3

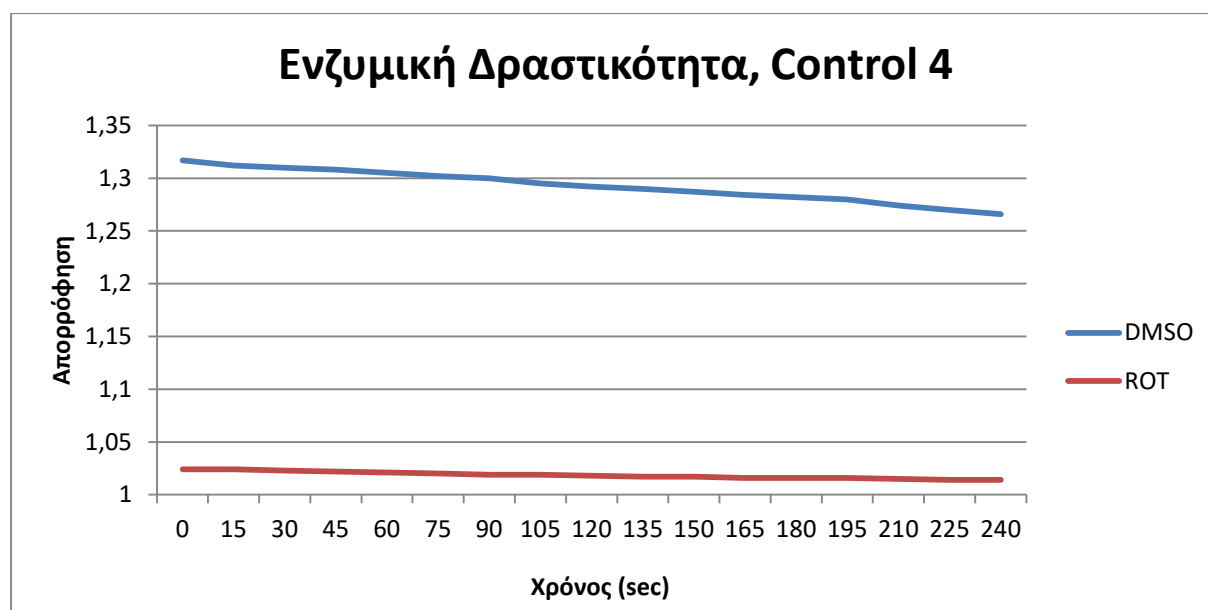


Διάγραμμα 5

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 1,96 | 1,444 |
| 15 | 1,95 | 1,444 |
| 30 | 1,945 | 1,443 |
| 45 | 1,94 | 1,443 |
| 60 | 1,934 | 1,442 |
| 75 | 1,932 | 1,442 |
| 90 | 1,93 | 1,442 |
| 105 | 1,927 | 1,441 |
| 120 | 1,924 | 1,44 |
| 135 | 1,92 | 1,44 |
| 150 | 1,915 | 1,439 |
| 165 | 1,911 | 1,439 |
| 180 | 1,906 | 1,438 |
| 195 | 1,9 | 1,438 |
| 210 | 1,894 | 1,437 |
| 225 | 1,89 | 1,437 |
| 240 | 1,886 | 1,436 |

Πίνακας 11

Control 4

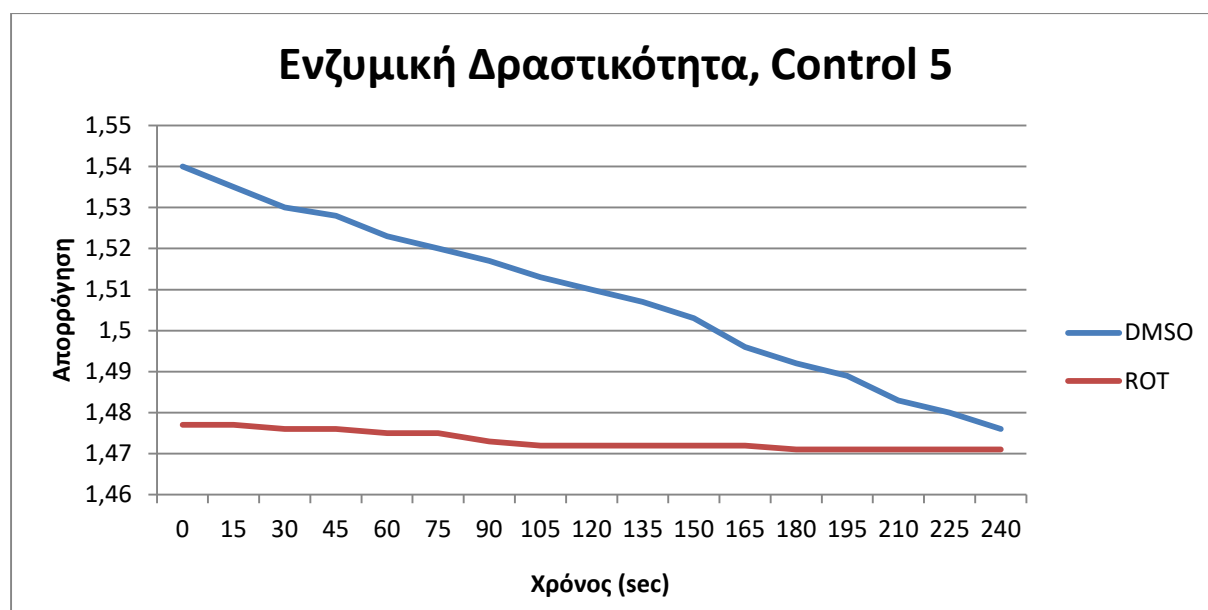


Διάγραμμα 6

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 1,317 | 1,024 |
| 15 | 1,312 | 1,024 |
| 30 | 1,31 | 1,023 |
| 45 | 1,308 | 1,022 |
| 60 | 1,305 | 1,021 |
| 75 | 1,302 | 1,02 |
| 90 | 1,3 | 1,019 |
| 105 | 1,295 | 1,019 |
| 120 | 1,292 | 1,018 |
| 135 | 1,29 | 1,017 |
| 150 | 1,287 | 1,017 |
| 165 | 1,284 | 1,016 |
| 180 | 1,282 | 1,016 |
| 195 | 1,28 | 1,016 |
| 210 | 1,274 | 1,015 |
| 225 | 1,27 | 1,014 |
| 240 | 1,266 | 1,014 |

Πίνακας 12

Control 5

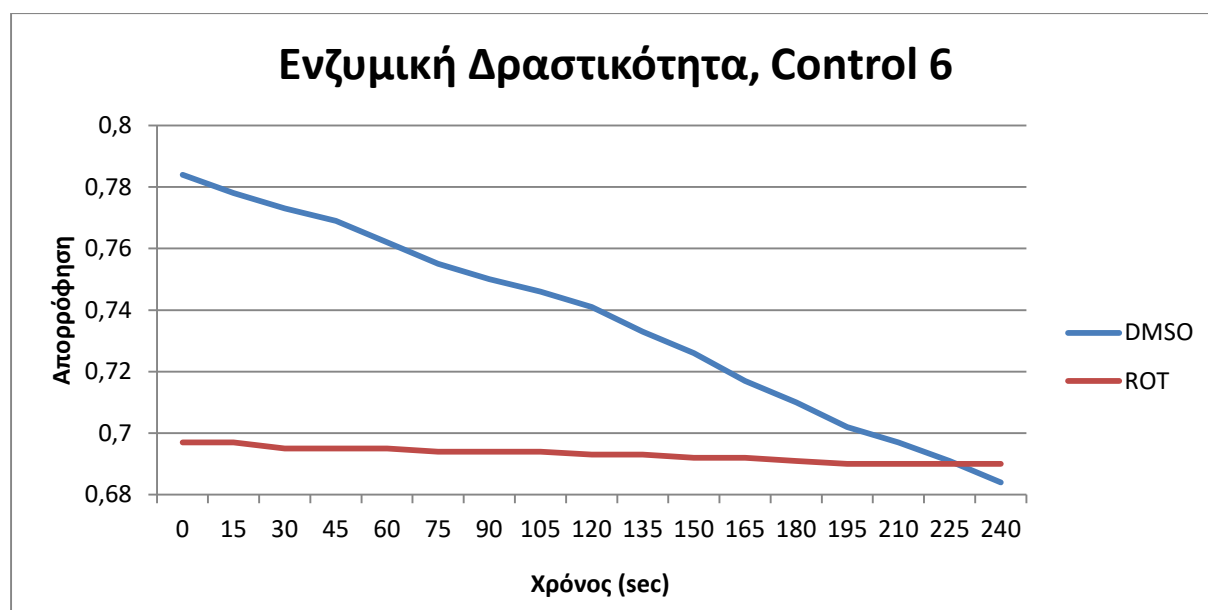


Διάγραμμα 7

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 1,54 | 1,477 |
| 15 | 1,535 | 1,477 |
| 30 | 1,53 | 1,476 |
| 45 | 1,528 | 1,476 |
| 60 | 1,523 | 1,475 |
| 75 | 1,52 | 1,475 |
| 90 | 1,517 | 1,473 |
| 105 | 1,513 | 1,472 |
| 120 | 1,51 | 1,472 |
| 135 | 1,507 | 1,472 |
| 150 | 1,503 | 1,472 |
| 165 | 1,496 | 1,472 |
| 180 | 1,492 | 1,471 |
| 195 | 1,489 | 1,471 |
| 210 | 1,483 | 1,471 |
| 225 | 1,48 | 1,471 |
| 240 | 1,476 | 1,471 |

Πίνακας 13

Control 6

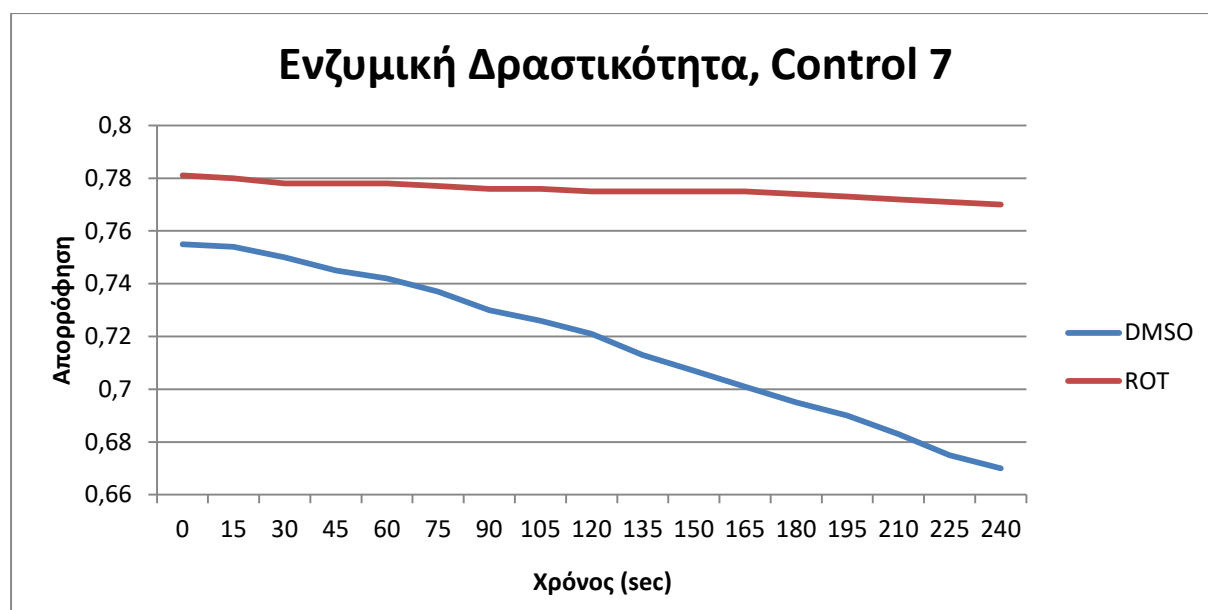


Διάγραμμα 8

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,784 | 0,697 |
| 15 | 0,778 | 0,697 |
| 30 | 0,773 | 0,695 |
| 45 | 0,769 | 0,695 |
| 60 | 0,762 | 0,695 |
| 75 | 0,755 | 0,694 |
| 90 | 0,75 | 0,694 |
| 105 | 0,746 | 0,694 |
| 120 | 0,741 | 0,693 |
| 135 | 0,733 | 0,693 |
| 150 | 0,726 | 0,692 |
| 165 | 0,717 | 0,692 |
| 180 | 0,71 | 0,691 |
| 195 | 0,702 | 0,69 |
| 210 | 0,697 | 0,69 |
| 225 | 0,691 | 0,69 |
| 240 | 0,684 | 0,69 |

Πίνακας 14

Control 7

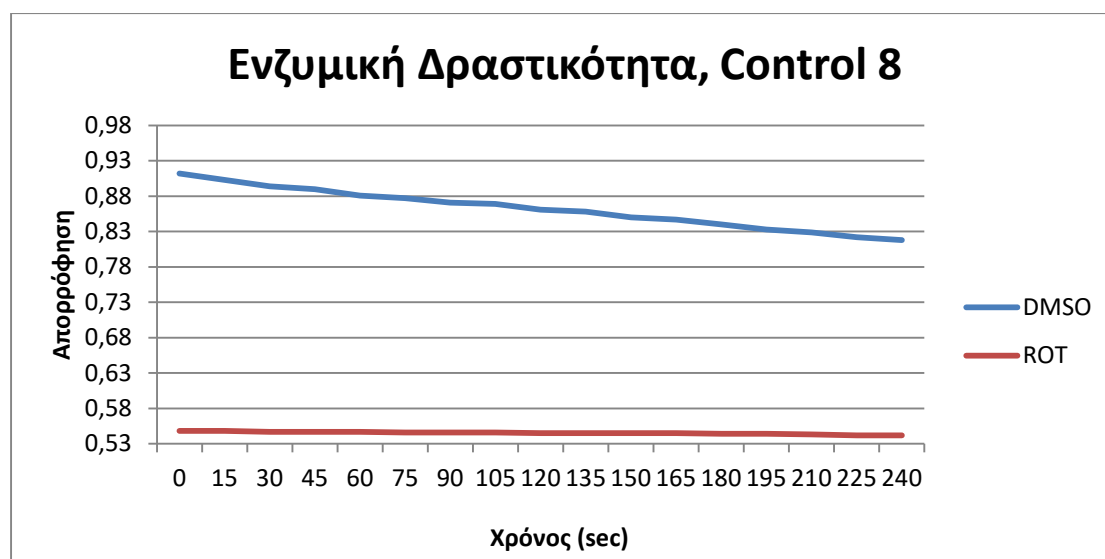


Διάγραμμα 9

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,755 | 0,781 |
| 15 | 0,754 | 0,78 |
| 30 | 0,75 | 0,778 |
| 45 | 0,745 | 0,778 |
| 60 | 0,742 | 0,778 |
| 75 | 0,737 | 0,777 |
| 90 | 0,73 | 0,776 |
| 105 | 0,726 | 0,776 |
| 120 | 0,721 | 0,775 |
| 135 | 0,713 | 0,775 |
| 150 | 0,707 | 0,775 |
| 165 | 0,701 | 0,775 |
| 180 | 0,695 | 0,774 |
| 195 | 0,69 | 0,773 |
| 210 | 0,683 | 0,772 |
| 225 | 0,675 | 0,771 |
| 240 | 0,67 | 0,77 |

Πίνακας 15

Control 8

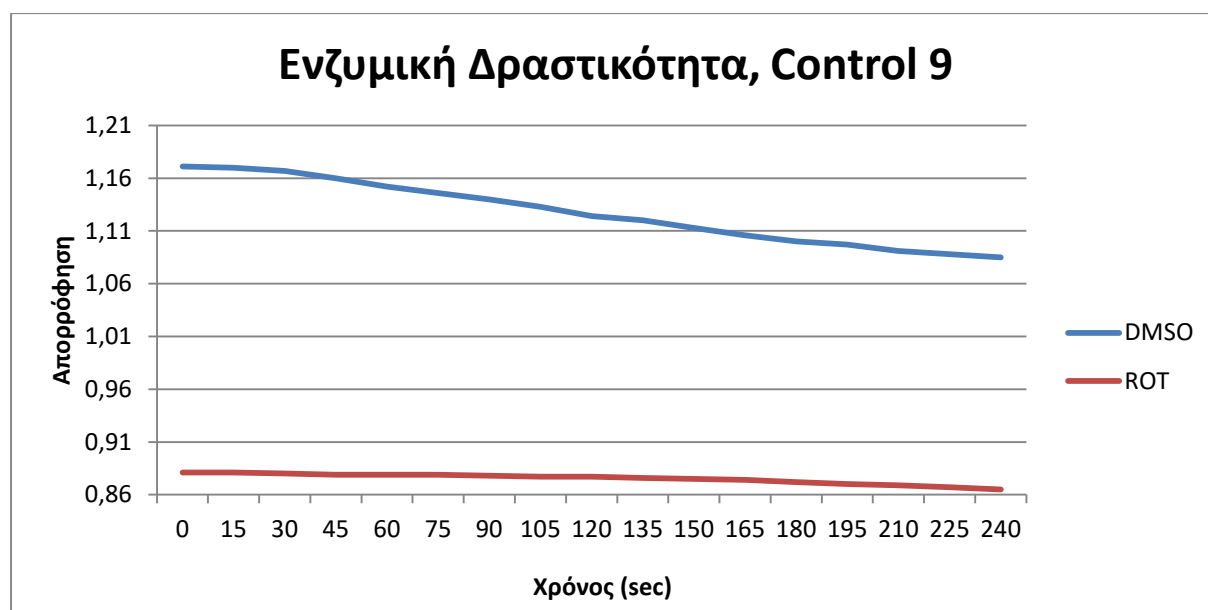


Διάγραμμα 10

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,912 | 0,548 |
| 15 | 0,903 | 0,548 |
| 30 | 0,894 | 0,547 |
| 45 | 0,89 | 0,547 |
| 60 | 0,881 | 0,547 |
| 75 | 0,877 | 0,546 |
| 90 | 0,871 | 0,546 |
| 105 | 0,869 | 0,546 |
| 120 | 0,861 | 0,545 |
| 135 | 0,858 | 0,545 |
| 150 | 0,85 | 0,545 |
| 165 | 0,847 | 0,545 |
| 180 | 0,84 | 0,544 |
| 195 | 0,833 | 0,544 |
| 210 | 0,829 | 0,543 |
| 225 | 0,822 | 0,542 |
| 240 | 0,818 | 0,542 |

Πίνακας 16

Control 9

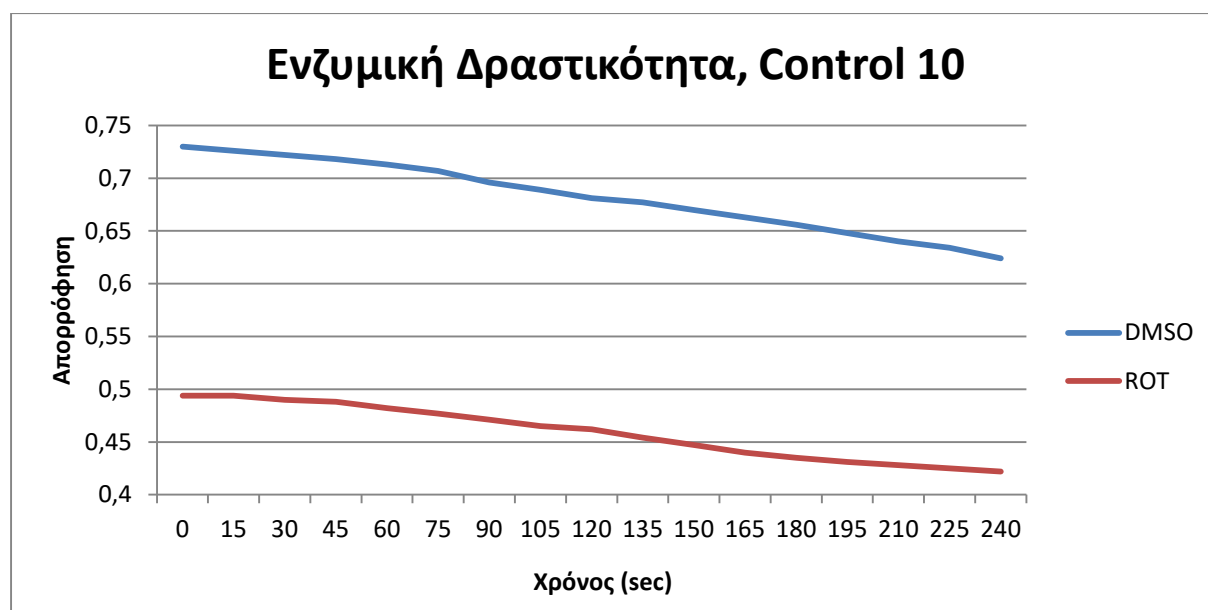


Διάγραμμα 11

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 1,171 | 0,881 |
| 15 | 1,17 | 0,881 |
| 30 | 1,167 | 0,88 |
| 45 | 1,16 | 0,879 |
| 60 | 1,152 | 0,879 |
| 75 | 1,146 | 0,879 |
| 90 | 1,14 | 0,878 |
| 105 | 1,133 | 0,877 |
| 120 | 1,124 | 0,877 |
| 135 | 1,12 | 0,876 |
| 150 | 1,113 | 0,875 |
| 165 | 1,106 | 0,874 |
| 180 | 1,1 | 0,872 |
| 195 | 1,097 | 0,87 |
| 210 | 1,091 | 0,869 |
| 225 | 1,088 | 0,867 |
| 240 | 1,085 | 0,865 |

Πίνακας 17

Control 10

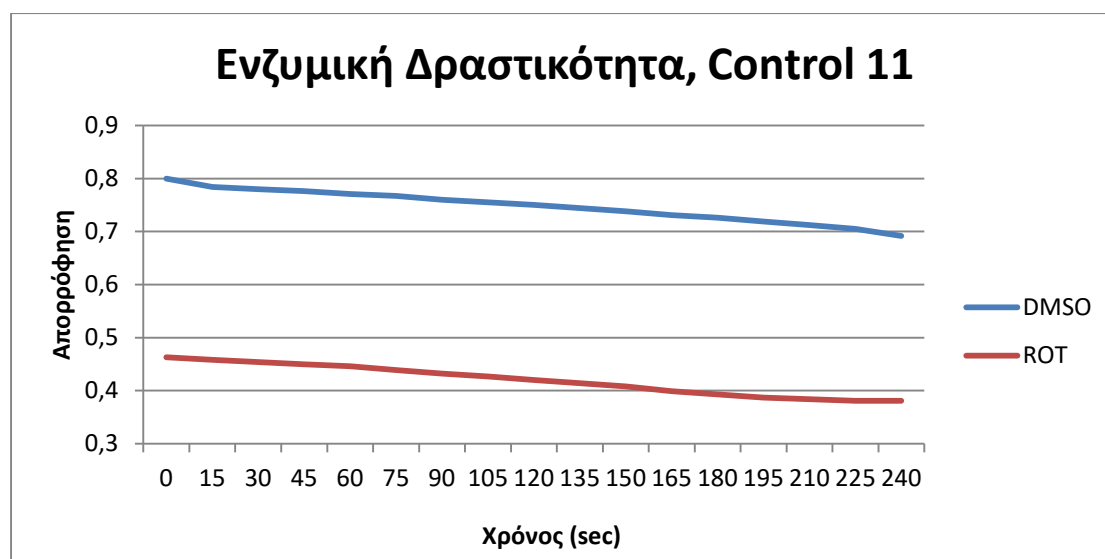


Διάγραμμα 12

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,73 | 0,494 |
| 15 | 0,726 | 0,494 |
| 30 | 0,722 | 0,49 |
| 45 | 0,718 | 0,488 |
| 60 | 0,713 | 0,482 |
| 75 | 0,707 | 0,477 |
| 90 | 0,696 | 0,471 |
| 105 | 0,689 | 0,465 |
| 120 | 0,681 | 0,462 |
| 135 | 0,677 | 0,454 |
| 150 | 0,67 | 0,447 |
| 165 | 0,663 | 0,44 |
| 180 | 0,656 | 0,435 |
| 195 | 0,648 | 0,431 |
| 210 | 0,64 | 0,428 |
| 225 | 0,634 | 0,425 |
| 240 | 0,624 | 0,422 |

Πίνακας 18

Control 11

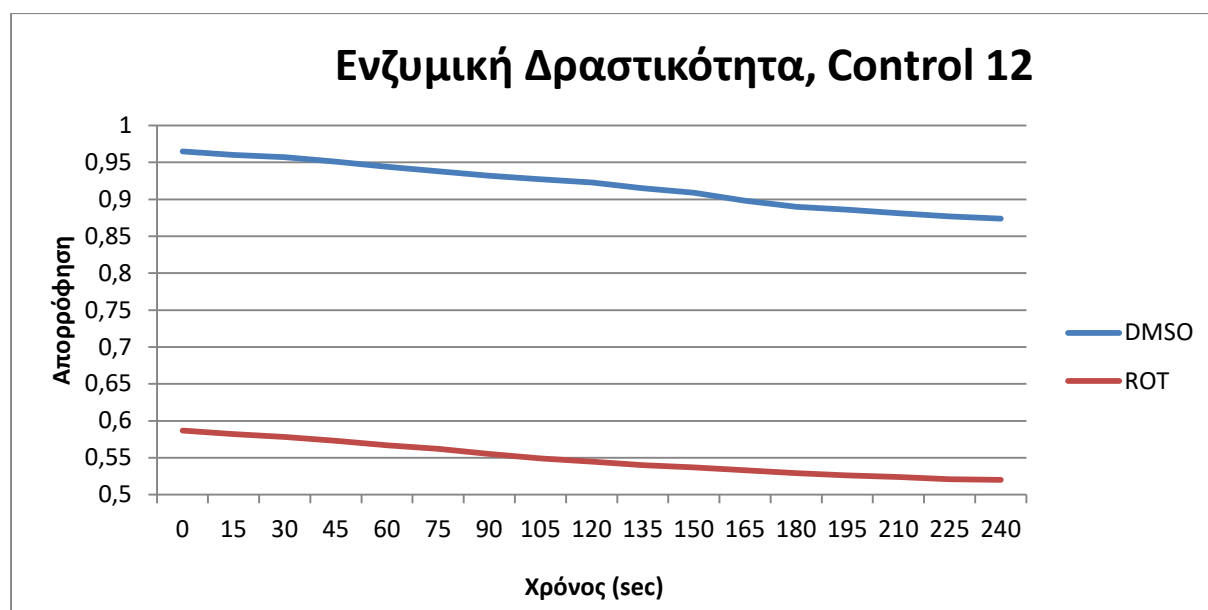


Διάγραμμα 13

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,8 | 0,463 |
| 15 | 0,784 | 0,458 |
| 30 | 0,78 | 0,454 |
| 45 | 0,776 | 0,45 |
| 60 | 0,771 | 0,446 |
| 75 | 0,767 | 0,439 |
| 90 | 0,76 | 0,432 |
| 105 | 0,755 | 0,427 |
| 120 | 0,75 | 0,42 |
| 135 | 0,744 | 0,414 |
| 150 | 0,738 | 0,408 |
| 165 | 0,731 | 0,399 |
| 180 | 0,726 | 0,393 |
| 195 | 0,719 | 0,387 |
| 210 | 0,712 | 0,384 |
| 225 | 0,705 | 0,381 |
| 240 | 0,692 | 0,381 |

Πίνακας 19

Control 12

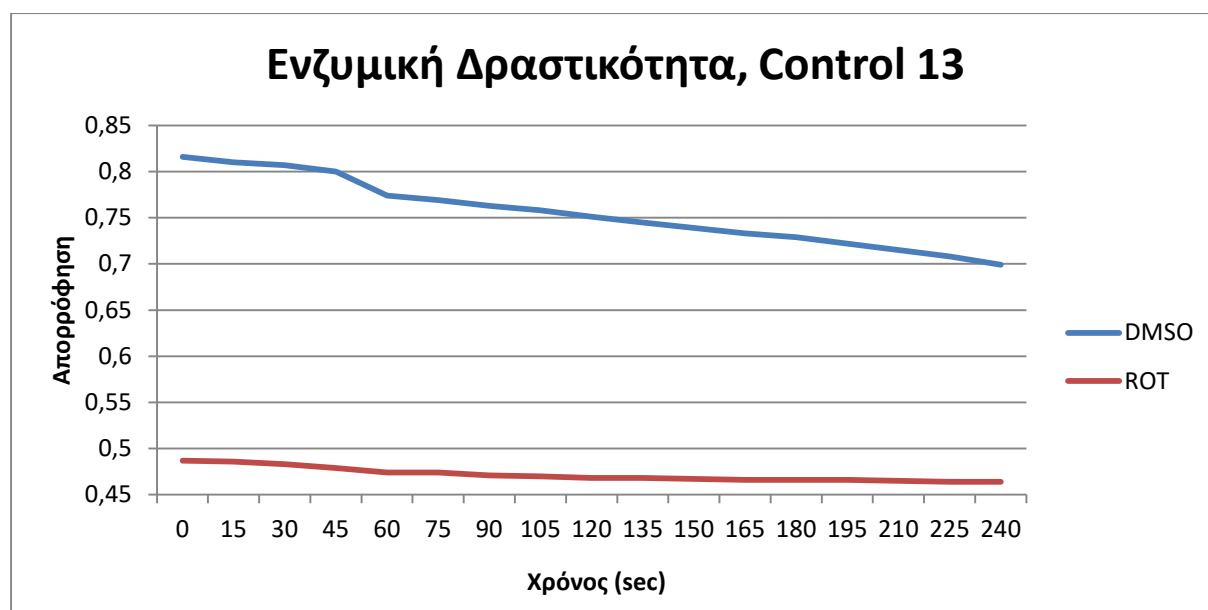


Διάγραμμα 14

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,965 | 0,587 |
| 15 | 0,96 | 0,582 |
| 30 | 0,957 | 0,578 |
| 45 | 0,951 | 0,573 |
| 60 | 0,944 | 0,567 |
| 75 | 0,938 | 0,562 |
| 90 | 0,932 | 0,555 |
| 105 | 0,927 | 0,549 |
| 120 | 0,923 | 0,545 |
| 135 | 0,915 | 0,54 |
| 150 | 0,909 | 0,537 |
| 165 | 0,898 | 0,533 |
| 180 | 0,89 | 0,529 |
| 195 | 0,886 | 0,526 |
| 210 | 0,881 | 0,524 |
| 225 | 0,877 | 0,521 |
| 240 | 0,874 | 0,52 |

Πίνακας 20

Control 13

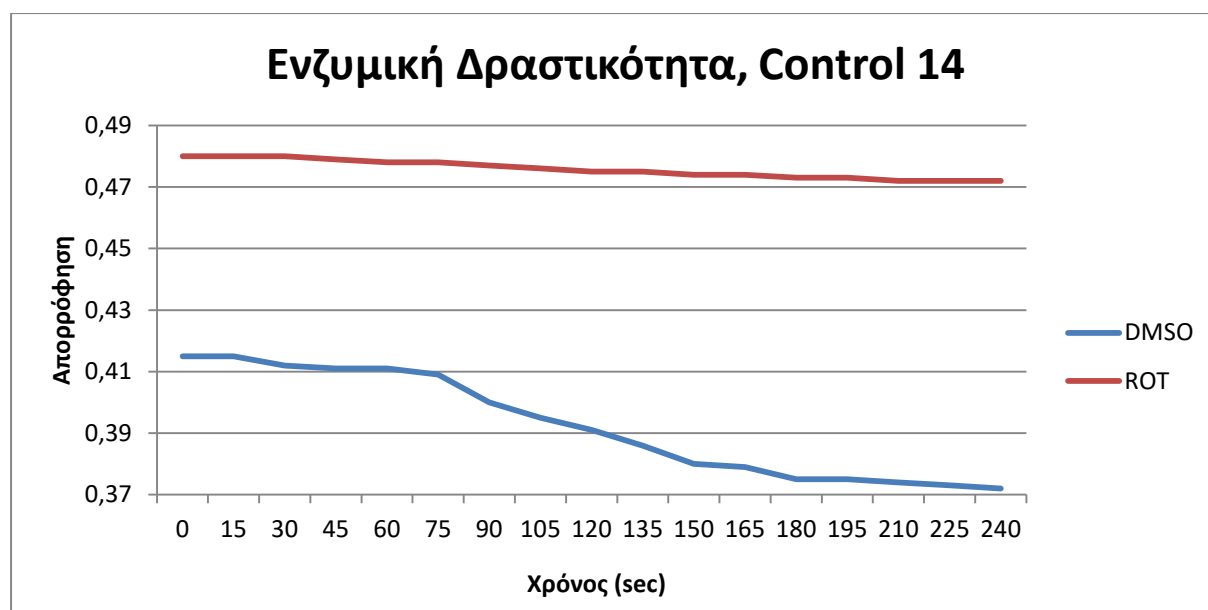


Διάγραμμα 15

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,816 | 0,487 |
| 15 | 0,81 | 0,486 |
| 30 | 0,807 | 0,483 |
| 45 | 0,8 | 0,479 |
| 60 | 0,774 | 0,474 |
| 75 | 0,769 | 0,474 |
| 90 | 0,763 | 0,471 |
| 105 | 0,758 | 0,47 |
| 120 | 0,751 | 0,468 |
| 135 | 0,745 | 0,468 |
| 150 | 0,739 | 0,467 |
| 165 | 0,733 | 0,466 |
| 180 | 0,729 | 0,466 |
| 195 | 0,722 | 0,466 |
| 210 | 0,715 | 0,465 |
| 225 | 0,708 | 0,464 |
| 240 | 0,699 | 0,464 |

Πίνακας 21

Control 14

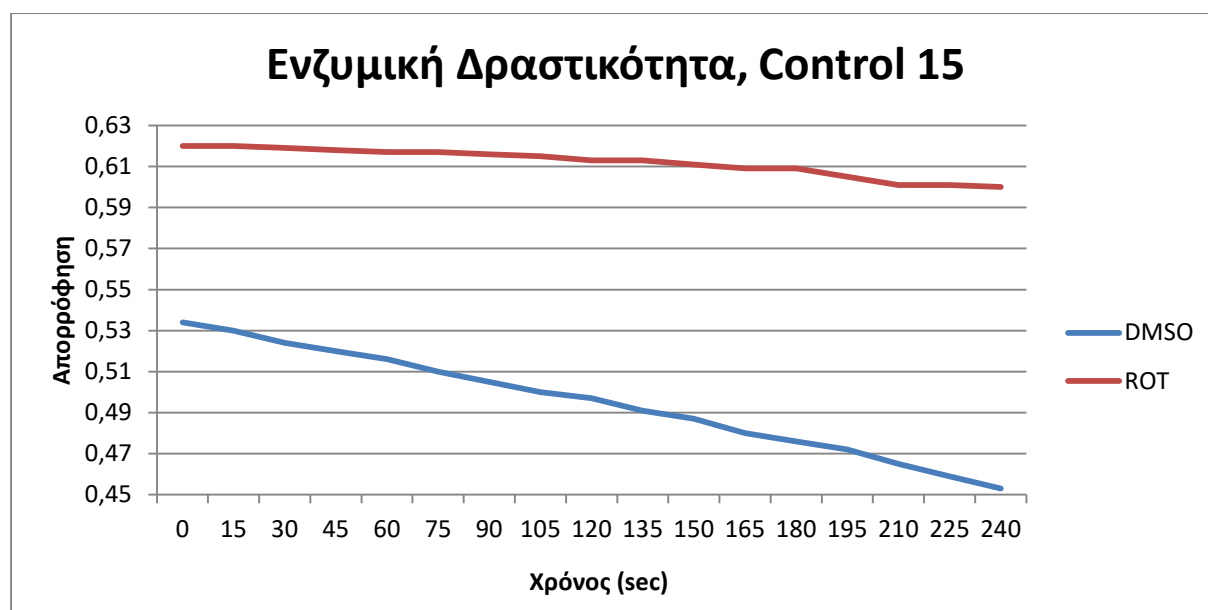


Διάγραμμα 16

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,415 | 0,48 |
| 15 | 0,415 | 0,48 |
| 30 | 0,412 | 0,48 |
| 45 | 0,411 | 0,479 |
| 60 | 0,411 | 0,478 |
| 75 | 0,409 | 0,478 |
| 90 | 0,4 | 0,477 |
| 105 | 0,395 | 0,476 |
| 120 | 0,391 | 0,475 |
| 135 | 0,386 | 0,475 |
| 150 | 0,38 | 0,474 |
| 165 | 0,379 | 0,474 |
| 180 | 0,375 | 0,473 |
| 195 | 0,375 | 0,473 |
| 210 | 0,374 | 0,472 |
| 225 | 0,373 | 0,472 |
| 240 | 0,372 | 0,472 |

Πίνακας 22

Control 15

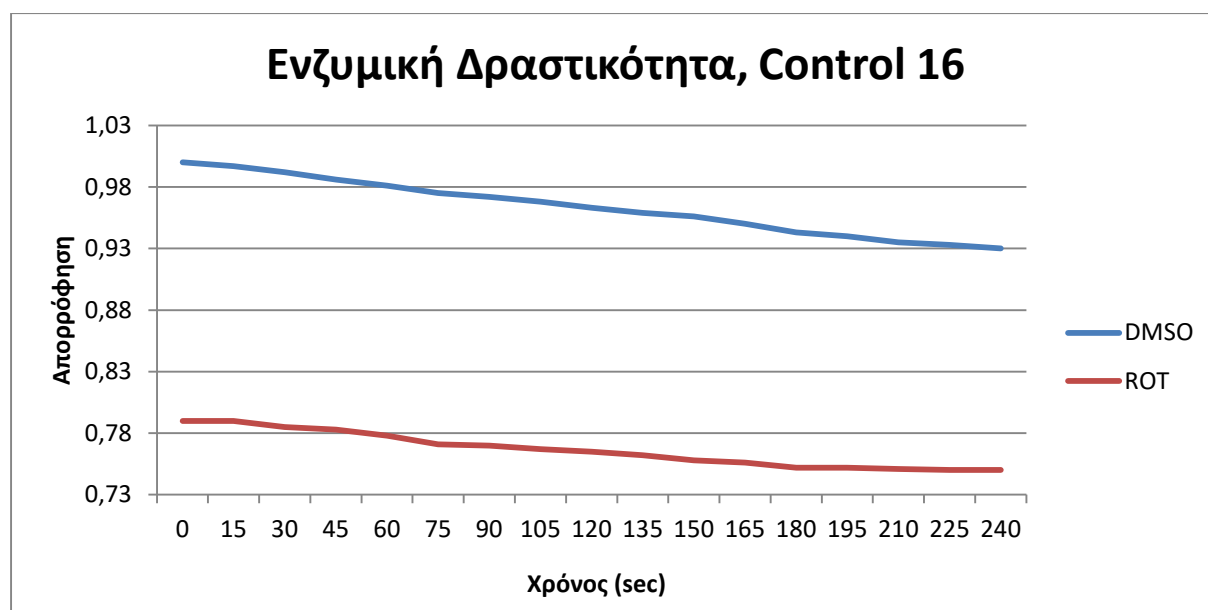


Διάγραμμα 17

| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 0,534 | 0,62 |
| 15 | 0,53 | 0,62 |
| 30 | 0,524 | 0,619 |
| 45 | 0,52 | 0,618 |
| 60 | 0,516 | 0,617 |
| 75 | 0,51 | 0,617 |
| 90 | 0,505 | 0,616 |
| 105 | 0,5 | 0,615 |
| 120 | 0,497 | 0,613 |
| 135 | 0,491 | 0,613 |
| 150 | 0,487 | 0,611 |
| 165 | 0,48 | 0,609 |
| 180 | 0,476 | 0,609 |
| 195 | 0,472 | 0,605 |
| 210 | 0,465 | 0,601 |
| 225 | 0,459 | 0,601 |
| 240 | 0,453 | 0,6 |

Πίνακας 23

Control 16



Διάγραμμα 18

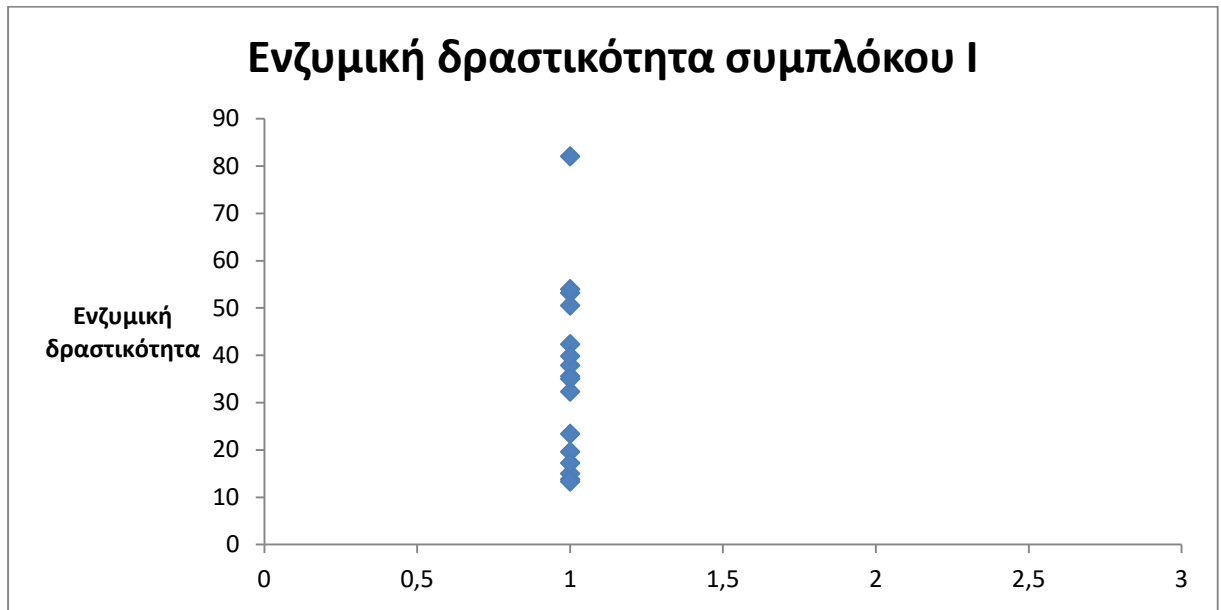
| Χρόνος (sec) | Κυψελίδα DMSO | Κυψελίδα Rot |
|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 1 | 0,79 |
| 15 | 0,997 | 0,79 |
| 30 | 0,992 | 0,785 |
| 45 | 0,986 | 0,783 |
| 60 | 0,981 | 0,778 |
| 75 | 0,975 | 0,771 |
| 90 | 0,972 | 0,77 |
| 105 | 0,968 | 0,767 |
| 120 | 0,963 | 0,765 |
| 135 | 0,959 | 0,762 |
| 150 | 0,956 | 0,758 |
| 165 | 0,95 | 0,756 |
| 180 | 0,943 | 0,752 |
| 195 | 0,94 | 0,752 |
| 210 | 0,935 | 0,751 |
| 225 | 0,933 | 0,75 |
| 240 | 0,93 | 0,75 |

Πίνακας 24

Ενζυμική δραστηριότητα

| Δείγμα | Ειδική δραστηριότητα με DMSO (mU) | Ειδική δραστηριότητα με ροτενόνη (mU) | Δραστηριότητα σύμπλοκου I |
|--------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| C1 | 40,14 | 4,57 | 35,57 |
| C2 | 85,42 | 3,42 | 82 |
| C3 | 42,4 | 4,57 | 37,83 |
| C4 | 29,1 | 5,71 | 23,39 |
| C5 | 35,71 | 3,44 | 32,27 |
| C6 | 57,14 | 4 | 53,14 |
| C7 | 48,57 | 6,28 | 42,29 |
| C8 | 53,97 | 3,44 | 50,53 |
| C9 | 49 | 9,18 | 39,82 |
| C10 | 60,85 | 41,28 | 19,57 |
| C11 | 62 | 47 | 15 |
| C12 | 52,24 | 38,45 | 13,79 |
| C13 | 67,17 | 13,2 | 53,97 |
| C14 | 24,68 | 11,24 | 13,26 |
| C15 | 46,5 | 11,47 | 35,03 |
| C16 | 40,18 | 22,95 | 17,23 |

Πίνακας 25



Διάγραμμα 19

| Δείγμα | Ηλικία | Φύλο |
|---------------|---------------|----------------|
| C1 | 58 | Γυναίκα |
| C2 | 42 | Άνδρας |
| C3 | 37 | Άνδρας |
| C4 | 60 | Άνδρας |
| C5 | 34 | Άνδρας |
| C6 | 21 | Άνδρας |
| C7 | 27 | Άνδρας |
| C8 | 22 | Άνδρας |
| C9 | 22 | Άνδρας |
| C10 | 60 | Άνδρας |
| C11 | 55 | Γυναίκα |
| C12 | 57 | Άνδρας |
| C13 | 77 | Γυναίκα |
| C14 | 58 | Γυναίκα |
| C15 | 63 | Γυναίκα |
| C16 | 66 | Γυναίκα |

Πίνακας 26

Συζήτηση

Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του μεγαλύτερου ποσοστού ενέργειας στα κύτταρα του οργανισμού. Η παραγωγή ενέργειας στηρίζεται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, κατά την οποία η αναπνευστική αλυσίδα αξιοποιώντας το NADH μπορεί να οδηγήσει στη μετακίνηση πρωτονίων διαμέσου της συνθάσης του ATP και έτσι έχουμε την δημιουργία του ενεργειακού νομίσματος ATP από ADP. Στην εργασία ασχοληθήκαμε με το σύμπλοκο I το οποίο αποτελεί το πρώτο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας αλλά και το σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων στο σύστημα. Εκτός από τον σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, το σύμπλοκο I είναι ακόμα υπεύθυνο για την παραγωγή των ελεύθερων ριζών στο κύτταρα (ROS) που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια.

Αποτελέσματα από έρευνες έχουν δείξει ότι σε πολλές ασθένειες όπως είναι το Alzheimer και η επιληψία, το μιτοχονδριακό σύμπλοκο I όταν δυσλειτουργεί οδηγεί τόσο σε μείωση της παραγωγής ενέργειας στο κύτταρο αλλά και σε ανεξέλεγκτη παράγωγή ROS. Οι ελεύθερες ρίζες στη συνέχεια ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου ή οδηγούν σε βλάβες στα συστατικά του κυττάρου όπως η λιπιδιακή διπλοστιβάδα και το πυρηνικό/μιτοχονδριακό γενετικό υλικό.

Η δυσλειτουργία του ενζυμικού συμπλόκου I εμφανίζεται πειραματικά ως μείωση στην ενζυμική του δραστηριότητα, δηλαδή η ταχύτητα κατανάλωσης του NADH σε σχέση με τον χρόνο μειώνεται. Παρόλα αυτά, οι ερευνητές δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουν αν μία τιμή δραστηριότητας είναι μέσα σε φυσιολογικά όρια χωρίς κάποιο σημείο αναφοράς. Αυτό αποσκοπεί να κάνει η συγκεκριμένη πτυχιακή.

Συνολικά 16 δείγματα φλεβικού αίματος πάρθηκαν από υγιής άτομα και μέσω πειραματικής διαδικασίας μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα το συμπλόκου I σε αυτά τα άτομα. Σκοπός του πειράματος ήταν η δημιουργία μίας βάσης δεδομένων πάνω στην οποία μπορούν να βασιστούν μελλοντικές έρευνες μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I σε άτομα που πάσχουν από ασθένειες όπου το σύμπλοκο I έχει σημαντικό ρόλο. Επίσης, μία τέτοια βάση δεδομένων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ακόμα για την εύρεση προκλινικών ατόμων, δηλαδή άτομα που δεν έχουν εμφανίσει ακόμα συμπτώματα. Αυτό βέβαια χρειάζεται μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για να μπορούν να αποφευχθούν ψευδώς θετικά λόγω ορίων που δεν αντικατοπτρίζουν το φυσιολογικό εύρος τιμών, κάτι που θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί από μελλοντικούς φοιτητές.

Βιβλιογραφία

- [1] Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. & Gupte, S.S. *J Bioenerg Biomembr* (1986) 18: 331
- [2] Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr; 1837(4):427-43. doi:10.1016/j.bbabi.2013.11.002. Epub 2013 Nov 15. Review. PubMed PMID: 24246637.
- [3] Mitochondrial respiratory chain super-complex I–III in physiology and pathology Giorgio Lenaz, Alessandra Baracca, Giovanna Barbero, Christian Bergamini, Maria Elena Dalmonte, Marianna Del Sole, Marco Faccioli, Anna Falasca, Romana Fato, Maria Luisa Genova, Gianluca Sgarbi, Giancarlo Solaini
- [4] Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases Lokendra K. Sharma¹, Jianxin Lu², and Yidong Bai
- [5] McFarland R, Kirby DM, Fowler KJ, Ohtake A, Ryan MT, Amor DJ, Fletcher JM, Dixon JW, Collins FA, Turnbull DM, Taylor RW, Thorburn DR. De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. *Ann Neurol*. 2004; 55:58–64. [PubMed: 14705112]
- [6] Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism Huiθne Pelicano, Rui-hua Xu, Min Du, Li Feng, Ryohei Sasaki, Jennifer S. Carew, Yumin Hu, Latha Ramdas, Limei Hu, Michael J. Keating, Wei Zhang, William Plunkett, and Peng Huang
- [7] GRIM-19 associates with the serine protease HtrA2 for promoting cell death X Ma, S Kalakonda¹, SM Srinivasula, SP Reddy, LC Platanius and DV Kalvakolanu¹
- [8] Ghezzi D, Zeviani M. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. *Essays Biochem*. 2018;62(3):271–286. Published 2018 Jul 20. doi:10.1042/EBC20170099
- [9] Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, Swigris JJ, Taniguchi H, Wells AU, Idiopathic pulmonary fibrosis, *Nat Rev Dis Primers*. 2017 3: 17074
- [10] Ivanišević J, Kotur-Stevuljević J, Stefanović A, Jelić-Ivanović Z, Spasić S, Videnović-Ivanov J, Vučinić-Mihailović V, Ilić J. Dyslipidemia and oxidativestress in sarcoidosis patients. *Clin Biochem*. 2012 Jun;45(9):677-82. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.03.009. Epub 2012 Mar 16. PubMed PMID: 22449334.
- [11] Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Bailie M, Atawan A, Chattopadhyay S, Schubert M, Garip A, Kernt M, Petraki D, Rummey C,

Leinonen M, Metz G, Griffiths PG, Meier T, Chinnery PF. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2677-86. doi: 10.1093/brain/awr170. Epub 2011 Jul 25. PubMed PMID: 21788663; PubMed Central PMCID: PMC3170530.

[12] Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis William W Wheaton, Samuel E Weinberg, Robert B Hamanaka, Saul Soberanes, Lucas B Sullivan, Elena Anso, Andrea Glasauer, Eric Dufour, Gokhan M Mutlu¹, GR Scott Budigner¹, Navdeep S Chandell¹ (Department of Medicine, The Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, United States; Institute of Biomedical Technology, University of Tampere, Tampere, Finland)

[13] Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain, James A Letts & Leonid A Sazanov *Nature Structural & Molecular Biology* volume24, pages800–808 (2017)

[14] Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I₂III₂IV₂ Runyu Guo, Shuai Zong, Meng Wu, Jinke Gu, Maojun Yang

[15] Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul; 1857(7):902-14. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.013. Epub 2016 Feb 24. Review. PubMed PMID: 26921811.