IKER GAZTE
NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE
NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

Erretikulu endoplasmatikoaren eta Mitokondriaren arteko konexioek mtDNA-ren erreplikazioan duten inplikazioa

Amaia Lopez de Arbina,
Nerea Osinalde eta *Ian Holt*

265-272 or.
https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.35

ANTOLATZAILEA: LAGUNTZAILEAK:
ueu udako euskal unibertsitatea
eman ta zabal zazu UPV EHU
upna Universidad Pública de Navarra Nafarroako Unibertsitate Publikoa
Universidad de Navarra
Deusto Universidad de Deusto Deustuko Unibertsitatea
Mondragon Unibertsitatea
Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz Vitoria-Gasteizko Udala
araba álava foru aldundia diputación foral
EUSKO JAURLARITZA GOBIERNO VASCO HEZKUNTZA SAILA DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN
UDALBILTZA

Erretikulu endoplasmatikoaren eta Mitokondriaren arteko konexioek mtDNA-ren erreplikazioan duten inplikazioa

Lopez de Arbina, A.[1], Osinalde, N.[5] eta Holt, I.[1,2,3,4]

(1) *Neurozientziak arloa, OII Biododonostia, Donostia, Gipuzkoa., (2) Mugimendu-neurozientzien eta klinikoen departamentua, UCL Queen Square Neurologia Institutoa, Royal Free Kanpusa, Londres, Erresuma batua., (3) Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Espainia.,(4) Cibernet, Centro Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas, Zientzia eta Berrikuntza ministeritza, Carlos III osasun institutoa, Madril, Espainia., (5) Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU, Gasteiz, Araba*

amaia.lopezdearbina@biodonostia.org

Laburpena

Zelulako atal desberdinen arteko komunikazioa eta koordinazioa organuluen arteko konexio fisikoek gobernatzen dute. Mitokondria, elikagaietatik energia sortzen duen organulua, eta erretikulu endoplasmatikoa (EE), glukosaren metabolismoa erregulatzen duena, estuki erlazionatuta daude. EE-mitokondria lotuneek berebiziko garrantzia daukate zelularen ongizatean. Besteak beste, lotune horiei esker mitokondriako DNA (mtDNA) erreplikatu eta segregatu daiteke, mitokondriek energia ekoizteko ezinbestekoa dena. Ondorioz, lotuneak kaltetua daudenean, gaitz ezberdinak garatzen dira, esaterako neuroendekapenezko gaixotasunak. Artikulu honen helburua EE-mitokondria lotuneetan parte hartzen duten proteinak zeintzuk diren identifikatzea da, horren inguruan ikertzeak EE-mitokondria lotuneetako akatsek neuroendekapenean eta zahartzapenean duten eragina ulertzen lagunduko baitigu.

Hitz gakoak: Erretikulu endoplasmatikoa, mitokondria, mtDNA, lotuneko proteinak

Abstract

Communication and coordination between the different parts of the cell is dependent on physical connections between organelles. Mitochondria, the organelles that produce energy from food, and the endoplasmic reticulum (ER), which regulates glucose metabolism, are closely connected. Aberrant mitochondrial-ER contact sites have been detected in neurodegenerative disorders, thereby suggesting that these are medically as well as biologically important structures. A key function of the contact sites is to permit replication and segregation of the DNA in the mitochondria, without which mitochondria cannot produce energy. The aim of this article is to identify the proteins involved in EE-mitochondria junction, as it would help us understand how impairment of EE-mitochondria junctions contributes to neurodegeneration and aging.

Keywords: Endoplasmic reticulum, mitochondria, mtDNA, junction proteins

1. Sarrera eta motibazioa

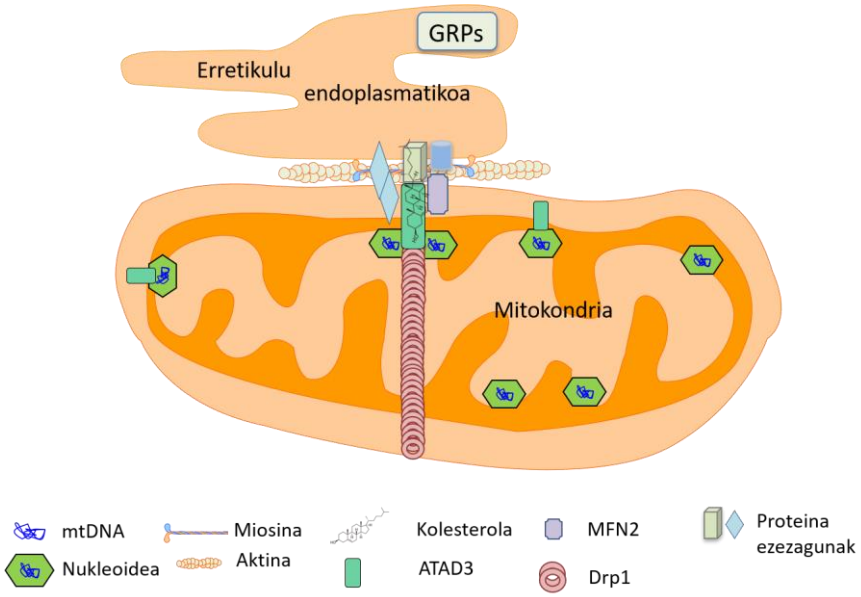
Zelulen funtzionamendu egokiak osasuna eta bizi-itxaropena bermatzen du. Hain zuzen ere, zelulako betebehar bakoitza ondo gauza dadin, zelulako konpartimentu edo organulu bakoitza funtzio multzo batean espezializatua dago. Zelulako funtzio guztiak koordinatuta egon behar direnez, konpartimentuen arteko komunikazioa eta seinaleztapena ezinbestekoa da zelularen biziraupenerako. Hori horrela, organuluen arteko konexio akatsdunek gaixotasunetan, batez ere neuroendekapenezkoetan duten eragina dela eta, biologiako arlo honetan interes handia piztu da azken hamarkadan (Mueller et al., 2016).

Konexio intrazelularren artean mitokondria (MT) eta erretikulu endoplasmatikoaren (EE) artekoa da momentuz gehien ezagutzen dena (Rowland et al., 2012; Gomez-Suaga et al., 2017; De Vos et al., 2012; Theurey et al., 2017). MTek ezinbesteko funtzio bat betetzen dute; zelula energiaz hornitzea. Horretarako, funtsean, elikagaietatik eskuratzen diren biomolekulak (batez

ere azukreak eta lipidoak) eta arnasten dugun oxigenoa erabiltzen dute. Era berean, EEak glukosa homeostasian ezinbesteko funtzioa dauka, eta ondorioz, glukosari erantzuten dioten proteinen (GRP, *glucose responsive proteins*) egoitza nagusia da. Hortaz, EE-MT arteko konexioek zelulako glukosaren metabolismoa koordinatua egotea ahalbidetzen dute (Theurey et al., 2017).

Mitokondria eta erretikulu endoplasmatikoaren arteko lotura fisikoak "mitokondriei asoziaturiko EE mintzak" bezala edo MAM (*mitochondria-associated ER membranes)* laburduraz ezagutzen dira. MAMak lipidoen trukean ezinbesteko funtzio betetzen dute (Vance, et al., 1990). Horrez gain, Ca^{2+}-aren garraioaeta mitokondriaren fusio eta fisio dinamikak erregulatzen dituzte *dynamin related protein 1* (Drp1) eta zitoeskeletoko aktina-miosina proteinen bitartez (Garrido et al., 2003; Iborra et al., 2004). Hain zuzen ere, fusio-fisio dinamikak erregulatzeak mtDNA segregazioa, hau da, mtDNA mitokondria guztietan egokiro sakabanatzea ahalbidetzen du. Testu liburu askotan agertzen denaren kontra, mtDNA ez dago mitokondriako matrizean solte, mitokondriaren barne mintzari atxikitua baizik (Nass et al., 1969). Atxikimendu hori gauza dadin kolesterola, ATAD3 proteina eta esfingolipidoak beharrezkoak dira (Gerhold, et al., 2015). Lotura horren arrazoia guztiz ulertzen ez bada ere, badakigu zahartzearekin batera atxikimendu hori galduz doala, eta neuroendekapenezko gaixotasunak garatzen direla (Mueller et al., 2016) (1. Irudia).

1. irudia. EE-MT lotura guneen adierazpen grafikoa



Mitokondrien energia ekoizpena zitoplasmako faktoreen mende badago ere, mitokondriako DNAk kodetzen dituen 13 proteinak ere ezinbestekoak dira. Horregatik, MT-EE loturen arteko desoreka edota organuluen arteko komunikazio akatsek mtDNAan duten eraginagatik gaixotasun desberdinak garatzen dira. Akats horiek edozein zelula edo ehunetan gerta badaitezke ere, batez ere gaixotasun neurologikoak eragiten dituzte. Izan ere, adinarekin batera mitokondrien gutxipena eta mtDNA-ren funtzio galera gertatzen dela ikusi da (Kraytsberg Et al., 2006), eta horrek adinarekin erlazionaturiko gaitzetan, bereziki neuroendekapenean eragina dauka (Bender et al., 2006; Gonzalez-Freire et al., 2015; Bubber et al., 2005).

2. Ikerketaren helburuak

Mitokondriak, zelulako energia ekoizle nagusiak, DNA zirkular txiki bat dauka, besteak beste energia ekoizteko ezinbestekoak diren entzimak kodetzen dituena. mtDNA-n atzemandako akatsak

zahartzapenarekin eta hainbat giza gaitzekin erlazionatu da, mtDNA-k zelularen homeostasian duen garrantzia azaleraziz. mtDNA-ren mantenu egokia bermatzeko, mtDNA erreplikatu egin behar da. Oso modu finean erregulatuta dagoen prozesu horretan zelulako beste organulu batzuk ere parte hartzen dute, adibidez erretikulu endoplasmatikoak.

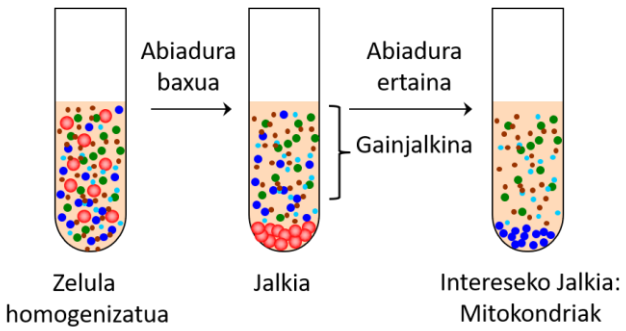
Badago proteina sorta jakin bat oso modu ordenatuan antolatzen dena, EE-MT konexioa bideratzen duen egitura osatzeko, "Mitokondriei Asoziaturiko EE Mintza" (MAM) hain zuzen. Erreplikatzen eta segregatzen den mtDNA egitura zehatz horren parte denez, EE-mitokondria konexio guneetako proteinetan asaldurak gertatzen direnean mtDNA-n anormaltasunak gertatzen dira, eta horrek gaixotasunen garapena bultzatzen duten zelula mailako akatsak eragiten ditu. Testuinguru horretan, hemen proposatzen den ikerketa lanaren **helburu nagusia** **EE-mtDNA kontaktu guneen egitura eta funtzioa zein den argitzea da.**

3. Ikerketaren muina

3.1. EE-mtDNA lotura guneetako proteinen purifikazioa

mtDNA-ri loturiko proteinak identifikatzeko, lehenik eta behin purifikatu egin behar dira. mtDNA-ri loturiko proteinak saguen bihotzeko eta gibeleko ehunetik purifikatu dira aurretiaz laborategian diseinaturiko zentrifugazio diferentzialeko protokolo bat erabiliz (Reyes et al., 2011) (2. irudia). Zentrifugazio diferentziala eraginkorra izan dadin, lehenik eta behin ehuna xehetu behar da soluzio homogeneizatua lortu arte, eta ondoren, abiadura baxuan (600g) zentrifugatu. Horrela, pisu handiena duten zelulako organuluak (nukleoa eta zitoeskeletoa) jalkiko dira, eta gainjalkinean pisu baxuko organuluak (besteak beste mitokondriak) geratuko dira. Azkenik, gainjalkin hori abiadura ertaina erabiliz (9000g) zentrifugatzen da mitokondriak jalki daitezen. Jalkin horretan mitokondriak ez ezik, peroxisomak eta lisosomak ere egongo dira.

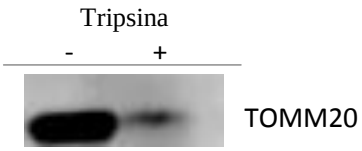
2. Irudia. Ehunetik abiatuta, zentrifugazio diferentzialaren bitartez, mitokondrietan aberatsa den frakzioa lortzen da.



Purifikazio prozesu ororen helburu nagusienetako bat proteina kutsatzaileen purifikazioa ekiditea da. Ikerlan honen helburua EE-MT konexiotako proteinak identifikatzea denez, esaterako mitokondrietako kanpo mintzean dauden proteinak ez dira interesgarriak. Horren arira, berriki frogatu da mitokondriak tripsina proteasarekin tratatuz gero, mitokondrien kanpo mintzeko proteinak (adb. TOMM20), eta ohiko proteina kutsatzaileak (adb. histonak) oso modu eraginkorrean deuseztatzen direla. Horregatik, behin zentrifugazio diferentzial bidez mitokondrietan aberatsa den frakzioa lortuta, lagin hori tripsinarekin tratatu da.

Tratamenduaren eraginkortasuna frogatzeko, mitokondrien kanpokaldean kokatzen den TOMM20 proteina detektatzen da TOMM20 ezagutzen duen antigorputz espezifiko bat erabiliz. 3. irudian ikus daitekeen bezala, tripsinarekin tratatu gabeko laginean TOMM20ren presentzia oso nabarmena da eta, aitzitik, tripsinarekin tratatutako laginean bere seinalea askoz ere apalagoa da. Horrek erakusten du tripsina bidezko tratamendua egokia dela ikerketa honetan interesatzen ez zaizkigun proteinak, besteak beste mitokondrietako kanpo mintzekoak deuseztatzeko.

3. Irudia. TOMM20 proteinaren detekzioa mitokondrietan aberatsak diren laginetan.

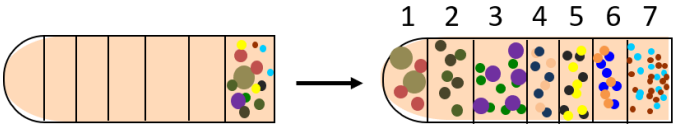


Behin kutsatzailerik gabeko mitokondrietan aberatsa den frakzioa lortuta, mitokondriak DDM detergentearekin lisatzen dira barruko proteinak kanporatzeko.

Mitokondriak bi mintz ditu: kanpo mintza eta barne mintza. Detergenteen presentzian, mintzen gehiengoa lisatzea lortzen da. Halere, MT-EE konexio guneetako MAMak lipidotan, eta zehazki kolesterol eta esfingolipidotan aberatsak direnez, detergenteekiko erresistentea dira, eta ez dira lisatzen.

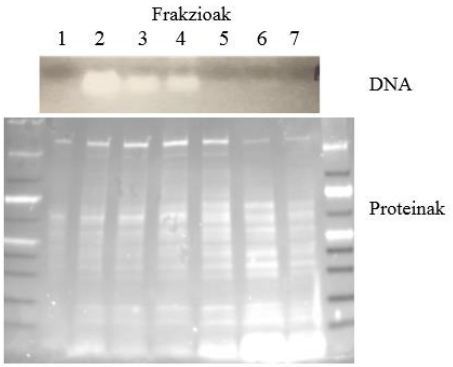
MAM osatzen duten proteinen identitatea ezagutu nahi denez, mitokondrietan aberastutako laginean proteinak MAMetatik banandu behar dira. Helburu hori lortzeko, dentsitatezko gradiente baten zentrifugazioa egin da. Hasteko, dentsitate desberdineko geruzak sortu dira Iodixanol dentsitate handiko soluzioaren disoluzio ezberdinak prestatuz (%37,5 saiodiaren behealdean - %25 saiodiaren goialdean). Gradiente hori abiadura handian ultrazentrifugatzerakoan (100.000g), tamaina desberdineko makromolekulak abiadura desberdinetan jalkitzen dira gradientearen puntu desberdinetan. Jalkitze abiadura, indar zentrifugoaz gain, makromolekulen tamaina, forma eta gradientearen dentsitatearen mendekoa da. Horregatik, teknika horren bidez, makromolekulak tamainaren arabera banatzen dira; handienak saiodiaren behealdean, eta txikienak goialdean (4.irudia).

4. Irudia. Zentrifugazio diferentzialaren ostean jalki den lagina dentsitate desberdinetan banatzeko prozesu eskematikoa.



Zentrifugazio diferentzialaren ostean, bereiztutako 7 frakzioetatik mtDNA zeinetan edo zeintzutan dagoen detektatzeko, frakzio bakoitzeko lagin bana hartu, eta argi ultramorepean behatu da. 6. Irudian ikus daitekeen bezala, mtDNA 2-4 frakzioetan dago. Bestalde, proteinen tindatzaile ez-espezifiko bat erabiliz ikus daiteke, proteinak frakzio guztietan daudela (5. Irudia).

5.irudia. mtDNA eta proteinen detekzioa Iodixanol gradientetik lorturiko frakzioetan



Lan honen helburu nagusia mtDNA-EE proteinak identifikatzea denez, mtDNA gehien duen frakzioa (2. frakzioa) EE-mtDNA konexioko proteinak (*EEproteinak*) analizatzeko erabili da, eta aldiz, mtDNA-rik ez edo gutxi duen frakzioa (7. frakzioa) *kontrol* moduan.

3.2. EE-mtDNA lotura guneetako proteinen identifikazioa

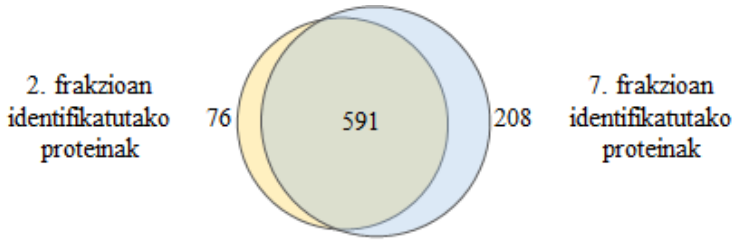
CIC bioGUNE-ko proteomikako zerbitzuarekin kolaborazioan, masa espektrometria bidez, EE-mtDNA lotura guneetako proteinak identifikatzeko lehen saiakera egin da. Zehazki bi lagin aztertu dira; iodixanol gradientetik lortutako 2. eta 7. frakzioak.

2. frakzioan mtDNA-EE lotura guneetako proteinak egon beharko lirateke, eta 7.frakzioan berriz ez. Hori dela eta, 7. Frakzioa kontrol gisa erabili da. Bi laginetako proteinak FASP metodoa jarraituz digeritu dira, eta lortutako peptido-nahasketa alderantzizko kromatografia likido bidez banatu ahala, TIMS masa espektrometroan analizatu dira. Masa espektrometroak peptido-ioien masa-karga (m/z) neurtzen du, eta horren arabera banatzen ditu (MS espektroa). Peptido ugarienak gainerakoetatik isolatzen ditu, eta zatikatu egiten ditu fragmentazio-espektroak osatzeko. Konputazio-erraminta bereziak erabiliz, masa espektrometroek bildutako datu guztiak (peptidoen m/z eta fragmentazio-espektroetan gordetako informazioa) datubase baten aurka konparatzen dira, eta horrela jakiten da zeintzuk diren aztertutako laginean dauden proteinen identitatea (6. Irudia).

6. irudia. mtDNA-EE lotura guneko proteinen identifikaziorako prozedura

Gaur gaurkoz, frakzio bakoitzeko bana lagin aztertu dira 7. irudian adierazitako prozedura erabiliz, baina gure hurbileko helburua kopuru hori handitzea da. Egindako analisian, 667 proteina identifikatu dira 2. frakzioan, eta 799 proteina 7. frakzioan. Bi laginetan identifikatutako proteinak konparatuz, proteina gehienak (591) bi frakziotan detektatu direla ikus daiteke (7. Irudia). Halere, nabarmentzekoa da 2. frakzioan 7. frakzioan detektatu ez diren 76 proteina atzeman direla. Kontuan izanda 2. frakzio horretan mtDNA-EE lotura guneetako proteinak daudela eta 7. frakzioan ez, soilik 2. frakzioan identifikatutako proteina horiek aztertuko dira.

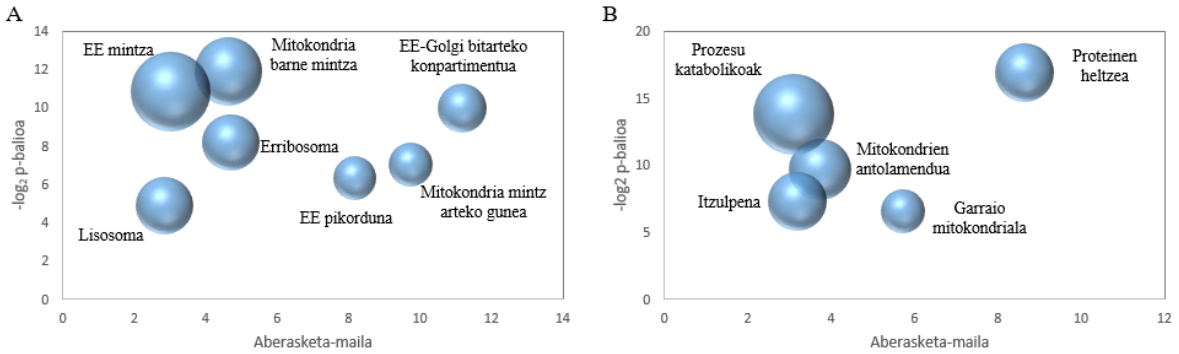
7. irudia. 2. Eta 7. Frakziotan identifikatutako proteinen konparaketa erakusten duen Venn diagrama



Bakarrik 2. frakzioan identifikatutako proteinen izaera zehazteko, gene-ontologiaren analisia egin da DAVID deituriko programa erabiliz (He J. et al., 2012). Horrela finkatu dira zeintzuk diren genoma osoarekin alderatuz, esklusiboki 2. frakzioan detektaturiko proteinen artean aberastutako zelula-osagaiak eta biologia-prozesuak. 8a irudian ikus daitekeen bezala, identifikaturiko proteina gehienak EEko eta mitokondriako proteinak dira, besteak beste EEko mintzekoak, EE pikordunekoak,

mitokondriako barne mintzekoak eta mitokondriako mintz arteko gunekoak. Izan ere, 8b irudian ikus daiteke intereseko proteinek mitokondria eta EEko prozesu garrantzitsuetan hartzen dutela parte, hala nola prozesu katabolikotan, mitokondrien garraio eta antolamenduan, proteinen itzulpenean eta heltze-prozesuan.

8. irudia. Esklusiboki 2. Frakzioan identifikaturiko proteinen artean modu esanguratsuan (p-balioa<0.05) aberastuta dauden hainbat (A) zelula-osagai eta (B) biologia-prozesu.



4. Ondorioak

Mitokondriaren DNA erreplikatzeko eta segregatzeko mitokondriei asoziaturiko EE mintza (MAM) osatzen duten proteinak identifikatze-prozesuan aurrera pauso handiak eman dira proiektu honetan. Ehun biologikotatik abiatuta mitokondriak purifikatzeko pausuak optimizatu ditugu. Horri esker, behin mitokondriak isolatuta, proteina kutsatzaileak ekiditeko tripsinaren erabilera oso modu eraginkorrean erabili da, eta besteak beste, mitokondrien kanpo mintzeko TOMM20 proteina deuseztatzea lortu da.

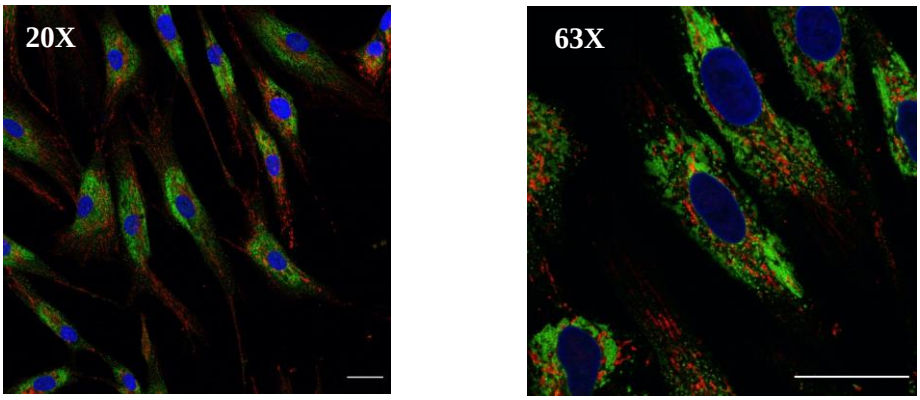
Masa espektrometriako emaitzak, nahiz eta behin behinekoak izan, oso itxaropentsuak dira. Izan ere, mtDNA-dun iodixanolezko frakzioan kontrolean identifikatu ez diren hainbat proteina interesgarri identifikatu dira. Gene ontologiako analisiak erakusten du proteina horietako asko mitokondria eta EEkoak direla, eta ondorioz, bi organulu horietako prozesu gakotan parte hartzen dutela.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

EE-MT lotura guneetako proteinen identitatea analizatzen jarraituko dugu masa espektrometria (MS) bidez erreplika gehiago aztertuz. Horrez gain, MS bidez lortutako emaitzak antigorputz bidezko detekzio teknikak erabiliz berretsiko ditugu, eta intereseko proteinaren bat detektatzeko antigorputzik existitzen ez bada, proteomika ituratura joko dugu balidazioa gauzatzeko.

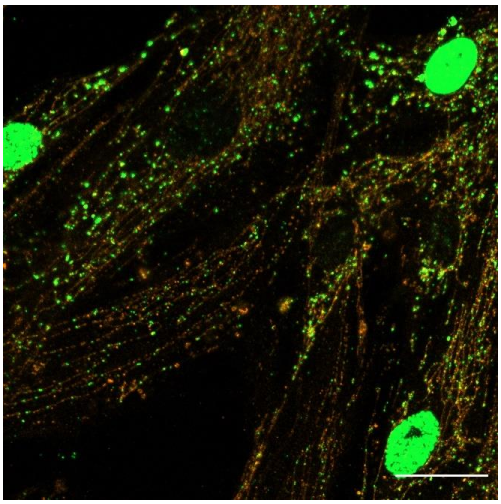
Behin EE-MT lotura guneetako proteinak identifikatu eta balidatu ostean, proteina horien gehiegizko presentziak edo ausentziak zeluletan, eta bereziki EE-MT konexio guneetan daukaten eragina aztertuko da inmunozitokimika bidez (9.irudia). Zehazki, zelulen nukleoak, EE, eta MTak kolore ezberdinekin markatuko dira, organuluen morfologia bereiztu ahal izateko.

9.irudia. Fibroblastoen markaketa DAPI (nukleo markatzailea, urdina), KDEL (EE markatzailea, berdea) eta TOMM20 (MT markatzailea, gorria) erabiliz.



Arestian esan bezala, mtDNAren erreplikazioa egokia izan dadin, MAM konplexua ezinbestekoa da (Bubber et al., 2005). Hori dela eta, MAMen osagaiak mtDNAren biologian daukaten eragina ere aztertuko da. Horretarako, aurrez MS bidez identifikatutako MAM osagaiak gainadierazi edo isilarazi egingo dira zeluletan, eta mtDNA markatu egingo da, adibidez bromo- deoxiuridina (BrdU) antigorputzarekin. DNA erreplikatu ahala BrdU DNAn inkorporatzen denez, oso teknika erabilgarria da DNAren sintesia kuantifikatzeko. Zelulako DNAren %99 nukleoan dago, eta horregatik nukleoko seinalea oso intentsoa da (10. Irudia). Aldiz, mtDNA DNA guztiaren %1 baina gutxiago da, eta mitokondrien sarean zehar ikusten diren puntu berdeak dira (10.irudia).

10.irudia. Fibroblastoen markaketa BrdU (DNA, berdea) eta TOMM20 (MT, gorria) antigorputzak erabiliz.



6. Erreferentziak

Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H. eta Turnbull, D. M. (2006), High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics*, *38*(5), 515-517.

Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P., & Gibson, G. E. (2005), Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *57*(5), 695-703.

De Vos, K. J., Morotz, G. M., Stoica, R., Tudor, E. L., Lau, K. F., Ackerley, S. eta Miller, C. C. (2012), VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Human molecular genetics*, *21*(6), 1299-1311.

Paillusson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D. H., Mueller, S., Miller, T., & Miller, C. C. (2016), There's something wrong with my MAM; the ER–mitochondria axis and neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*, *39*(3), 146-157.

Gerhold, J. M., Cansiz-Arda, Ş., Lõhmus, M., Engberg, O., Reyes, A., Van Rennes, H., eta Spelbrink, J. N. (2015), Human mitochondrial DNA-protein complexes attach to a cholesterol-rich membrane structure. *Scientific reports*, *5*(1), 1-15.

Gonzalez-Freire, M., De Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S. J., Fabbri, E., Navas, P., eta Ferrucci, L. (2015), Reconsidering the role of mitochondria in aging. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, *70*(11), 1334-1342.

He, J., Cooper, H. M., Reyes, A., Di Re, M., Sembongi, H., Litwin, T. R., ... & Holt, I. J. (2012), Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic acids research*, *40*(13), 6109-6121.

Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009), Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, *4*(1), 44.

Iborra, F. J., Kimura, H., & Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology*, *2*(1), 1-14.

Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A. C., Geula, C., Kowall, N. W., eta Khrapko, K. (2006), Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature genetics*, *38*(5), 518-520.

Nass, M. M. (1969), Mitochondrial DNA: I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single-and double-length circular DNA. *Journal of molecular biology*, *42*(3), 521-528.

Rowland, A. A., eta Voeltz, G. K. (2012), Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(10), 607-615.

Theurey, P., eta Rieusset, J. (2017), Mitochondria-associated membranes response to nutrient availability and role in metabolic diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *28*(1), 32-45.

Vance, J. E. (1990), Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(13), 7248-7256.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak nire lankidei lan honetan emandako laguntza guztiagatik. Eskerrik asko Hanss eta Antonella mitokodriak isolatzeko protokoloa erakusteagatik eta zuen aholku guztiengatik. Azkenik, eskertu baita OII Biodonostia, Euskal Herriko Unibertsitatea eta Eusko Jaurlaritza, lan hau gauzatzeko diru laguntzagatik.