



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Εφαρμογή βιοχημικών και ανοσοχημικών τεχνικών για τη
μελέτη πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε κυτταρικούς
μηχανισμούς σηματοδότησης (υποδοχέας ρυανοδίνης τύπου
2, καλμοδουλίνη)**

ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΒΥΡΩΝΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

M.Sc. Βιοχημείας

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2016

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εφαρμογή βιοχημικών και ανοσοχημικών τεχνικών για τη μελέτη πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε κυτταρικούς μηχανισμούς σηματοδότησης (υποδοχέας ρυανοδίνης τύπου 2, καλμοδουλίνη)

ΒΥΡΩΝΙΑ ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ

A.M.: 001017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ
Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ
Ευαγγελία Λιβανίου, Διευθύντρια Ερευνών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος-Ισίδωρος Κόκοτος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Κωσταντίνος Βοργιάς, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ

Αθανάσιος Γκιμήσης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Μαριάννα Αντωνέλου, Λέκτορας, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ

Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Ευαγγελία Λιβανίου, Διευθύντρια Ερευνών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλμοδουλίνη (CaM) αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή (αναστολέα) του καρδιακού υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου-2 (RyR2) που δρα ως δίαυλος απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ, διαδραματίζοντας κύριο ρόλο στον μηχανισμό της σύζευξης διέγερσης-συστολής. Παρόλο που ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης CaM/RyR2 δεν είναι πλήρως γνωστός, είναι κοινώς αποδεκτό ότι η κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2 αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 3583-3603, ενώ σειρά δεδομένων υποδεικνύει τη συμμετοχή και άλλων περιοχών του RyR2 στην πρόσδεση της CaM. Από την άλλη πλευρά, μεταλλαγμένες μορφές της CaM, με πιθανόν πλημμελή ικανότητα ρύθμισης του RyR2, εντοπίστηκαν πρόσφατα σε ασθενείς με καρδιακή δυσλειτουργία. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν αφενός η μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου CaM (CaM^{WT}) με τον RyR2 και αφετέρου η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταλλαγμένων μορφών της CaM με τον RyR2. Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης CaM^{WT} /RyR2 έγινε σύνθεση οκτώ πεπτιδικών τμημάτων του RyR2 καθώς και παραγώγων τους. Τα πεπτίδια αξιοποιήθηκαν κυρίως στη μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης με την CaM^{WT} , με πειράματα συγκατακρήμνισης, τύπου ELISA και θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης. Ορισμένα RyR2-πεπτίδια αξιοποιήθηκαν επίσης ως αντιγόνα για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων, ενώ αναπτύχθηκαν και αντι-πεπτιδικά αντισώματα ικανά να αναγνωρίζουν την CaM^{WT} , που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα τύπου ELISA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το C-τελικό άκρο του RyR2 είναι πιθανόν να περιέχει μία επιπλέον περιοχή πρόσδεσης της CaM^{WT} (4255-4277). Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταλλαγμένων μορφών της CaM με τον RyR2 έγινε παραγωγή έξι μεταλλαγμένων μορφών της CaM καθώς και παρασκευή βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιές χοίρων (ως πηγής RyR2). Στη συνέχεια, μελετήθηκε, σε σχέση με την CaM^{WT} , τόσο η επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της CaM στη λειτουργικότητα του RyR2, με πειράματα πρόσδεσης [3H]ρυανοδίνης στον RyR2, όσο και η ικανότητα πρόσδεσής τους στον RyR2, με πειράματα συγκατακρήμνισης. Όπως προέκυψε, συγκεκριμένες μεταλλάξεις της CaM (N54I, F90L, D96V, D130G) επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης στον RyR2 και, ταυτόχρονα, τη λειτουργικότητα του υποδοχέα. Περαιτέρω αξιοποίηση των μοριακών εργαλείων και των τεχνικών, που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή, θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την καρδιακή λειτουργία.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Υποδοχέας ρυανοδίνης τύπου 2 (RyR2), καλμοδουλίνη (CaM), ιόντα Ca^{2+} , μεταλλαγμένες μορφές CaM, περιοχές του RyR2 που δεσμεύουν την CaM (CaMBDs)

ABSTRACT

Calmodulin (CaM) is an important regulator (inhibitor) of the cardiac ryanodine receptor type-2 (RyR2) function as a calcium release channel of SR, playing a pivotal role in excitation-contraction coupling. Although the mechanism of CaM/RyR2 interaction is not fully understood, it is widely accepted that the main CaM binding domain is located within residues 3583–3603 of RyR2, while a series of data suggest that additional regions in RyR2 can act as potential CaM binding domains. On the other hand, a number of CaM mutants, with possibly impaired RyR2-regulatory capacity, have been recently characterized in patients with heart dysfunction. The goal of the present thesis was to study the mechanism of the interaction between wild type CaM (CaM^{WT}) and RyR2 as well as to study the interaction between certain CaM mutants and RyR2. In order to study the CaM^{WT}/RyR2 interaction, eight peptide fragments of RyR2 and derivatives thereof were synthesized. Potential binding of the above synthetic peptides to CaM^{WT} was studied by means of pull-down, ELISA-type and isothermal titration calorimetry experiments. Moreover, some of the RyR2-peptides were used as antigens for the development of polyclonal antibodies, while anti-peptide polyclonal antibodies for full-length CaM^{WT} were also developed and used in the ELISA-type experiments. According to the results obtained, the C-terminus of RyR2 seems to contain an additional CaM^{WT} binding domain (4255-4277). For studying the interaction between CaM mutants and RyR2, six CaM mutants were produced and heavy SR vesicles from pig hearts (as a source of RyR2) were prepared. Consequently, the effect of the CaM mutants on the RyR2 activity was tested, in comparison with CaM^{WT}, with the [³H]ryanodine binding assay, while binding of the CaM mutants to RyR2 was also evaluated, in comparison with CaM^{WT} too, with pull-down experiments. As revealed by the results obtained, specific CaM mutations (N54I, F90L, D96V, D130G) affect both, binding capacity to RyR2 and the channel activity. Further exploitation of the molecular tools and the techniques developed in the framework of this thesis will help us better understand and elucidate the mechanisms underlying cardiac function.

SUBJECT AREA: Biochemistry

KEYWORDS: Ryanodine receptor type 2 (RyR2), calmodulin (CaM), Ca²⁺ ions, CaM mutants, CaM binding domains in RyR2 (CaMBDs)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	29
1.1 Γενικός ρόλος των RyRs	29
1.2 Ισομορφές των RyRs	30
1.3 Ο μηχανισμός σύζευξης διέγερσης-συστολής στον καρδιακό μυ και ο ρόλος του RyR2	31
1.4 Δομικές μελέτες των RyRs	33
1.4.1 Δομικές μελέτες περιοχών των RyRs με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ	33
1.4.2 Δομικές μελέτες του RyR1 με κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-EM)	36
1.4.3 Δομικές μεταβολές του RyR1 κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση του διαύλου.	39
1.5 Ρύθμιση των RyRs	43
1.5.1 Οι ρυθμιστές των RyRs	43
1.6 Η καλμοδουλίνη (CaM) ως ρυθμιστής των RyRs	48
1.6.1 Γενικά στοιχεία	48
1.6.2 Καλμοδουλίνη και ασβέστιο	50
1.6.3 Η CaM ως ρυθμιστής των RyR1 και RyR2	52
1.6.4 Οι περιοχές πρόσδεσης της CaM στους RyR1 και RyR2	54
1.6.4.1 Οι αλληλουχίες 3614-3643 και 3583-3603 ως η κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM (CaMBD) στον RyR1 και τον RyR2, αντίστοιχα	57
1.6.4.2 Αλληλουχίες που πιθανόν δρουν ως μια, επιπλέον της κύριας, περιοχή πρόσδεσης της CaM στους RyR1 και RyR2, μέσω του N-λοβού	62
1.6.4.3 Η αλληλουχία 4064-4210 του RyR1 ως περιοχή που μοιάζει δομικά με την CaM (CaM-like domain, CaMLD)	68
1.7 Παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με δυσλειτουργία του καρδιακού RyR2	70
1.7.1 Μεταλλάξεις στο μόριο της CaM που σχετίζονται με καρδιακές ασθένειες	74
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	85
2.1 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίων	85
2.1.1 Πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης (Solid-phase peptide synthesis, SPPS)	86
2.1.2 Καθαρισμός και ανάλυση πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)	99

2.2 Κλωνοποίηση και έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακό σύστημα	101
2.2.1 Συνένωση του πλασμιδίου με το ένθεμα ξένου DNA	103
2.2.2 Μετασχηματισμός	104
2.2.3 Ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων	104
2.2.4 Έκφραση πρωτεϊνών σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες	106
2.2.5 Καθαρισμός ενός σταδίου και αποκοπή της ιντεΐνης της 6xHis-SUMO2-intein-CaM και 6xHis-SUMO2-intein-GST-CaM με χρωματογραφία συγγενείας	107
2.3 Παρασκευή βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ χοίρου	110
2.4 Προσδιορισμός της πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2	112
2.5 Ανοσοποίηση πειραματοζώων	115
2.6 Μέθοδος ELISA	123
2.7 Ανοσοαποτύπωση	129
2.7.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	130
2.7.2 Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF	133
2.7.3 Ανάλυση κατά Western	134
2.8 Μέθοδος συγκατακρήμνισης	135
2.9 Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC)	140
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	145
3.1 Σύνθεση πεπτιδικών τμημάτων του RyR2 και της CaM και ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων εναντίον των συνθετικών πεπτιδίων	145
3.1.1 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίων του RyR2 και της CaM καθώς και παραγώγων τους	146
3.1.2 Ανάπτυξη αντισωμάτων εναντίον των συνθετικών πεπτιδίων και αξιολόγηση των αντισωμάτων με μέθοδο ELISA	151
3.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM	163
3.2.1 Παρασκευή βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ χοίρου και έλεγχος της περιεκτικότητάς τους σε λειτουργικό RyR2	164
3.2.2 Έκφραση και καθαρισμός των GST-CaM και CaM	166
3.2.3 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την CaM αγρίου τύπου με μέθοδο συγκατακρήμνισης	167
3.2.4 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM αγρίου τύπου με τροποποιημένη μέθοδο ELISA	169
3.2.5 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM αγρίου τύπου με μέθοδο ITC	173

3.2.6 Προσέγγιση της παραγωγής πρωτεϊνικών τμημάτων της C-τελικής περιοχής του RyR2 με μεθόδους μοριακής βιολογίας	182
3.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με μεταλλαγμένες μορφές της CaM, που συνδέονται με καρδιακή δυσλειτουργία	186
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	193
Δ. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	203
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	207

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1:	Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς των Ca^{2+} κατά την σύζευξη διέγερσης-συστολής σε ένα μυοκαρδιακό κύτταρο	32
Σχήμα 1.2:	Σχηματική απεικόνιση σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής των δομικών περιοχών του RyR1 του κουνελιού (rRyR1) και του RyR2 του ποντικού (mRyR2) των οποίων έχει λυθεί η κρυσταλλική δομή	35
Σχήμα 1.3:	Η αρχιτεκτονική του σκελετικού RyR1	37
Σχήμα 1.4:	Σχηματική απεικόνιση και όψεις του RyR1	41
Σχήμα 1.5:	A) Τρισδιάστατη απεικόνιση του RyR με τους προσδέτες του. B) Αναφορά στις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τους RyRs από την κυτταροπλασματική πλευρά και από την πλευρά του αυλού του ΣΔ	43
Σχήμα 1.6:	A) Το δομικό μοτίβο EF. B) Η θέση στα χρωμοσώματα του ανθρώπινου γονιδιώματος των γονιδίων της CaM	49
Σχήμα 1.7:	Ο τρόπος δέσμησης του Ca^{2+} στην CaM	50
Σχήμα 1.8:	Αλλαγές στερεοδιάταξης της CaM όπως επάγονται με τη δέσμηση του ασβεστίου	52
Σχήμα 1.9:	Η κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος CaM/πεπτιδίου RyR1	60
Σχήμα 1.10:	Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού ανάμεσα σε έναν δότη και έναν δέκτη σε επίπεδο στοιβάδων (A) και μορίων (B)	64
Σχήμα 1.11:	Απεικόνιση της τρισδιάστατης αναπαράστασης του συμπλέγματος CaM/RyR1 (A) και του RyR1 (απουσία CaM) (B) καθώς και ύστερα από αφαίρεση της αναπαράστασης του CaM/RyR1 από εκείνη του RyR1 (C)	65
Σχήμα 1.12:	Η αλληλουχία των τριών υπό εξέταση περιοχών πρόσδεσης της CaM στους RyR1, RyR2 και RyR3	67
Σχήμα 1.13:	Σχηματική απεικόνιση της θεωρίας που βασίζεται στην ύπαρξη της CaMLD στον RyR1	69
Σχήμα 1.14:	Ο κύκλος του Ca^{2+} σε ένα φυσιολογικό (A) και σε ένα μη φυσιολογικό μυοκαρδιακό κύτταρο (B)	71

Σχήμα 1.15:	Η πρωτοταγής δομή της ανθρώπινης CaM. Β) Η κρυσταλλική δομή της Ca ²⁺ /CaM	78
Σχήμα 2.1:	Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας παραγωγής πεπτιδίων	85
Σχήμα 2.2:	Σχηματική αναπαράσταση της μεθοδολογίας της SPPS	88
Σχήμα 2.3:	Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται η σύριγγα όπου επιτελείται η SPPS	90
Σχήμα 2.4:	Στάδιο αποπροστασίας της Fmoc-ρητίνης	92
Σχήμα 2.5:	A) Ενεργοποίηση του Fmoc αμινοξέος. Β) Στάδιο σύζευξης του 1 ^{ου} αμινοξέος στην ρητίνη	94
Σχήμα 2.6:	Το στάδιο της ακετυλίωσης (capping)	95
Σχήμα 2.7:	Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της κλωνοποίησης συμπεριλαμβανομένων των σταδίων της συνένωσης του πλασμιδίου με το ένθεμα (Α), του μετασχηματισμού (Β) και της ανάλυσης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (Γ)	106
Σχήμα 2.8:	Διαγραμματική απεικόνιση του καθαρισμού των πρωτεϊνών με ετικέτα 6xHis	110
Σχήμα 2.9:	Σχηματική απεικόνιση της παρασκευής βαρέων κυστιδίων- φορέων ΣΔ από τον καρδιακό μυ χοίρου	112
Σχήμα 2.10:	Απεικόνιση των σταδίων του προσδιορισμού πρόσδεσης της [³ H]ρυανοδίνης στον RyR2	115
Σχήμα 2.11:	Σύζευξη πεπτιδίου-μεγαλοπρωτεΐνης μέσω γλουταραλδεϋδης	117
Σχήμα 2.12:	Σύζευξη πεπτιδίου-μεγαλοπρωτεΐνης μέσω sSMCC	118
Σχήμα 2.13:	Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ELISA για την αξιολόγηση των αντισωμάτων	126
Σχήμα 2.14:	Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ELISA για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων του RyR2 με την CaM	127
Σχήμα 2.15:	Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου Western blotting	130

Σχήμα 2.16:	Η ενδεδειγμένη διάταξη της πηκτής πολυακρυλαμιδίου και της μεμβράνης PVDF στη συσκευή ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer)	133
Σχήμα 2.17:	Ο μηχανισμός της ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών με χημειοφωταύγεια	135
Σχήμα 2.18	Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου συγκατακρήμνισης Α) 1 ^{ου} τύπου και Β) 2 ^{ου} τύπου	137
Σχήμα 2.19	Η συσκευή ITC ₂₀₀ και σε σχηματική απεικόνιση το κελί που γίνεται η αντίδραση	141
Σχήμα 2.20:	Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της αλληλεπίδρασης μεταξύ προσδέτη και μακρομορίου κατά την διάρκεια ενός πειράματος ITC	143
Σχήμα 3.1:	Η πρωτοταγής δομή Α) ολόκληρου του μορίου της CaM και Β) της C-τελικής περιοχής του RyR2	145
Σχήμα 3.2:	Χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC (Α, Β) και φάσματα ESI-MS (Γ, Δ) για τα συνθετικά πεπτίδια P _B και P _F , αντίστοιχα	150
Σχήμα 3.3:	Α) Καμπύλες τίτλου των αντιορών 41N εναντίον του συνθετικού πεπτιδίου P _A . Β) Καμπύλη εκτόπισης του αντιορού 41(4) στην αραιώση του τίτλου (1:2.000), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του πεπτιδίου P _A , σε ελεύθερη μορφή	155
Σχήμα 3.4:	Α) Καμπύλες τίτλου των αντιορών 67N εναντίον του συνθετικού πεπτιδίου P _C . Β) Καμπύλη εκτόπισης του αντιορού 67(4) στην αραιώση του τίτλου (1:20.000), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του πεπτιδίου P _C , σε ελεύθερη μορφή	156
Σχήμα 3.5:	Καμπύλες τίτλου των αντιορών 72N ως προς τα συνθετικά πεπτίδια P _B (Α) και P _{B extended} (Β). Γ) Καμπύλες εκτόπισης του αντιορού 72(5) στην αραιώση του τίτλου (1:10.000), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πεπτιδίων P _B και P _{B extend} , σε ελεύθερη μορφή (επίστρωση φρεατίων με το πεπτίδιο P _B).	158

- Σχήμα 3.6: Α) Καμπύλες τίτλου του αντιορού 77(3) ως προς τα συνθετικά πεππίδια P_F και P_D. Β) Καμπύλες εκτόπισης του αντιορού 77(3) στην αραίωση του τίτλου (1:500) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πεπτιδίων P_F και P_D (επίστρωση φρεατίων με το πεππίδιο P_D) 159
- Σχήμα 3.7: Καμπύλες τίτλου του μονοκλωνικού αντι-CaM αντισώματος ως προς την εμπορικά διαθέσιμη CaM, διαφορετικής προέλευσης (CaM Acris και CaM Hytest) (Α) και ως προς τα συνθετικά πεππίδια P₁ και P₂ (Β) 160
- Σχήμα 3.8: Καμπύλες τίτλου των πολυκλωνικών αντι-CaM αντιορών 74N ως προς την εμπορικά διαθέσιμη CaM [CaM Acris (Α) και CaM Hytest (Β)]. Καμπύλη τίτλου του αντιορού 74(3) ως προς την παρασκευασμένη στο εργαστήριο CaM (in-house CaM) (Γ) 161
- Σχήμα 3.9: Α) Καμπύλες τίτλου των αντιορών 76(3) και 76(6) ως προς τα συνθετικά πεππίδια P₁ και P₂. Β) Καμπύλες τίτλου των αντιορών 76N ως προς την in-house CaM. Γ) Καμπύλη τίτλου του αντιορού 76(3) ως προς την CaM Hytest 162
- Σχήμα 3.10: Α) Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 4% με 0,5% αγαρόζη με δύο διαφορετικά παρασκευάσματα βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ χοίρων 5 και 10 φορές αραιωμένα, μετά από SDS-PAGE και χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue (αριστερό πλαίσιο) και το αντίστοιχο αποτύπωμα κατά Western με το αντι-RyR2 αντίσωμα Ab1093 σε αραίωση 1:1000 (δεξί πλαίσιο). Β) Καμπύλη πρόσδεσης της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2 εκφρασμένης ως % της μέγιστης πειραματικής τιμής (% max) συναρτήσει της συγκέντρωσης Ca²⁺ 165
- Σχήμα 3.11: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% με GST-CaM (Α) και CaM (Δ), μετά από SDS-PAGE και χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue. Η διαδρομή που υποδεικνύεται με το γράμμα Μ αντιστοιχεί σε μάρτυρα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών. Αποτύπωμα κατά Western της πηκτής πολυακρυλαμιδίου Α με το αντι-GST αντίσωμα (Β) και το αντι-CaM αντίσωμα (Γ) καθώς και της πηκτής πολυακρυλαμιδίου Δ με το αντι-CaM αντίσωμα (Ε) 166

Σχήμα 3.12:	Αποτύπωμα κατά Western του συγκατακρημνισμένου με την GST-CaM RyR2 με χρήση ειδικού αντι-RyR2 αντισώματος (Ab1093)	167
Σχήμα 3.13:	Αποτύπωμα κατά Western του συγκατακρημνισμένου με την GST-CaM RyR2 με χρήση του αντι-RyR2 αντισώματος Ab1093 παρουσία των P _A , P _B και P _C	169
Σχήμα 3.14:	Παράσταση της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης των P _B , P _{B extended} και ProtA στο σύστημα ELISA που παρουσιάζεται σχηματικά στο A. Η επίστρωση των πλακιδίων έγινε με CaM Acris (B), CaM Hytest (Γ) και εργαστηριακά παρασκευασμένης CaM (Δ). Χρησιμοποιήθηκε ο αντιορός 72(5)	170
Σχήμα 3.15:	Παράσταση της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης της CaM στο σύστημα ELISA, που παρουσιάζεται σχηματικά στο A (B). Η επίστρωση των πλακιδίων έγινε με το αντίστοιχο συνθετικό πεπτιδίο (P _B , P _{B extended} , P _D και P _F). Χρησιμοποιήθηκε ο αντιορός 76(3) ή το εμπορικά διαθέσιμο μονοκλωνικό αντι-CaM αντίσωμα	172
Σχήμα 3.16:	Κρυσταλλική δομή της apoCaM (A), της Ca ²⁺ /CaM (B) και του συμπλέγματος της Ca ²⁺ /CaM με ένα πεπτιδίο-στόχο (Γ).	174
Σχήμα 3.17:	Κορυφές τιλοδότησης ITC, κανονικοποιημένες ως προς την συγκέντρωση πρωτεΐνης, για την αλληλεπίδραση των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM.	176
Σχήμα 3.18	Θερμότητες αλληλεπίδρασης κανονικοποιημένες ως προς την συγκέντρωση πεπτιδίου και καμπύλες προσαρμογής των δεδομένων αυτών σε θερμοδυναμικό μοντέλο σύνδεσης μίας θέσης	177
Σχήμα 3.19	Ραβδογράμματα σύγκρισης των θερμοδυναμικών παραμέτρων αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM	181
Σχήμα 3.20:	Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 βάσει του προγράμματος SA-HMM	182

- Σχήμα 3.21: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών τμημάτων της C-τελικής περιοχής του RyR2, των οποίων έγινε προσπάθεια παραγωγής με μεθόδους μοριακής βιολογίας 183
- Σχήμα 3.22: Α) Πηκτή αγαρόζης 1% με τα προϊόντα πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pETTM20 που περιέχουν τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις περιοχές 1, 2, 3, 4 και 5 του RyR2 με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Β) Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8 % με τα προϊόντα λύσης των βακτηριακών κυττάρων BL21, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις περιοχές 1, 2 και 3, μετά από χρώση με Coomassie Brilliant-Blue. Διαδρομή Un: δείγμα καλλιέργειας βακτηρίων πριν την προσθήκη IPTG, διαδρομή In: δείγμα καλλιέργειας βακτηρίων μετά την προσθήκη IPTG 184
- Σχήμα 3.23: Α) Πίνακας με χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων στο μόριο της CaM. Β) Θέση των μεταλλάξεων στην τριτοταγή δομή της CaM 186
- Σχήμα 3.24: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% με CaM αγρίου τύπου (CaM^{WT}) και με τις μεταλλαγμένες μορφές της CaM (CaM^{N54I}, CaM^{D96V}, CaM^{N98S}, CaM^{D130G}, CaM^{F142L} και CaM^{F90L}), μετά από χρώση με Coomassie Brilliant-Blue (αριστερό πλαίσιο). Τα αντίστοιχα αποτυπώματα κατά Western των CaM^{WT} και CaM^{F90L} με το αντι-CaM αντίσωμα (δεξιό πλαίσιο) 187
- Σχήμα 3.25 Α) Καμπύλη πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, εκφρασμένης ως % της μέγιστης δέσμευσης (% max), συναρτήσεως της συγκέντρωσης CaM παρουσία 100 μM Ca²⁺. Β) Καμπύλη πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2 εκφρασμένης ως % της μέγιστης δέσμευσης (% max), συναρτήσεως της συγκέντρωσης Ca²⁺, απουσία CaM (μπλε καμπύλη) και παρουσία 1 μM CaM (ροζ καμπύλη) 188
- Σχήμα 3.26: Καμπύλες πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, εκφρασμένης ως % της μέγιστης δέσμευσης (% max), συναρτήσεως της συγκέντρωσης Ca²⁺, παρουσία της CaM^{WT} και των μεταλλαγμένων μορφών της. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί σε απουσία της CaM 190

Σχήμα 3.27: Αποτύπωμα κατά Western της συγκατακρημισμένης με τον RyR2 CaM^{WT} καθώς και μεταλλαγμένων μορφών της με χρήση μονοκλωνικού αντι-CaM αντισώματος (αραίωση 1:7.500) τόσο απουσία όσο και παρουσία 10 και 100 μM Ca²⁺ (αριστερή στήλη). Παράσταση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με πυκνομετρία των αντίστοιχων αποτυπωμάτων κατά Western (δεξιά στήλη)

191

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1:	Περιοχές διαφοροποίησης στην πρωτοταγή δομή των RyR1 και RyR2	31
Πίνακας 1.2:	Πιθανές θέσεις πρόσδεσης της CaM στους RyR1 και RyR2 βάσει της ανάλυσης της πρωταταγούς δομής των RyRs	55
Πίνακας 1.3:	Αμινοξική αλληλουχία της CaMBD στους RyR1 και RyR2 του ανθρώπου	57
Πίνακας 1.4:	Μεταλλάξεις στο μόριο της CaM που σχετίζονται με καρδιακές παθήσεις	76
Πίνακας 2.1:	A) Πεπτιδία που αποτελούν τμήματα των RyR2 και hCaM, καθώς και B) παράγωγά τους	90
Πίνακας 2.2:	Συνοπτική παρουσίαση των σταδίων της επιμήκυνσης της αλυσίδας των υπό σύνθεση πεπτιδίων	96
Πίνακας 2.3:	Διαφοροποιήσεις στα στάδια προσθήκης ειδικών αμινοξέων/ενώσεων	97
Πίνακας 2.4:	Σύσταση των μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της αποκοπής	98
Πίνακας 2.5:	Σύσταση των δειγμάτων στην μέθοδο της πρόσδεσης [³ H]ρυανοδίνης στον RyR2	114
Πίνακας 2.6:	Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού	132
Πίνακας 2.7:	Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής επιστίβαξης	132
Πίνακας 2.8:	Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κατά Western	134
Πίνακας 2.9:	Ρύθμιση των παραμέτρων του πειράματος ITC	144
Πίνακας 3.1:	A) Η αμινοξική αλληλουχία, η σύσταση των μιγμάτων αποκοπής και η % απόδοση των καθαρών συνθετικών πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα των RyR και CaM, καθώς και B) παραγώγων τους	147

Πίνακας 3.2:	Συνθήκες καθαρισμού και χαρακτηρισμού των πεπτιδίων με ημιπαρασκευαστική και αναλυτική RP-HPLC	149
Πίνακας 3.3:	Πειραματική και θεωρητική μοριακή μάζα των συνθετικών πεπτιδίων	151
Πίνακας 3.4:	Συγκεντρωτικός πίνακας των αντιορών που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής	152
Πίνακας 3.5:	Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM όπως προκύπτουν από την προσαρμογή με ελαχιστοποίηση τετραγώνων των πειραματικών δεδομένων στο θερμοδυναμικό μοντέλο μίας θέσης σύνδεσης	180

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Υποδοχείς ρυανοδίνης (Ryanodine receptors, RyRs)

1.1 Γενικός ρόλος των RyRs

Οι υποδοχείς ρυανοδίνης αποτελούν διαύλους απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) του σαρκοπλασματικού/ενδοπλασματικού δικτύου (ΣΔ/ΕΔ) των περισσότερων κυττάρων, και είναι απαραίτητοι για την αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) που εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων της μυϊκής συστολής και της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών [1]. Οι RyRs όπως και οι υποδοχείς της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3Rs) αποτελούν ενδοκυτταρικούς διαμεμβρανικούς διαύλους απελευθέρωσης Ca^{2+} του ΣΔ/ΕΔ και διαφέρουν από εκείνους της πλασματικής μεμβράνης λόγω του μεγάλου μεγέθους τους και της ιδιότητας της μερικώς επιλεκτικής μεταφοράς κατιόντων (αποκλεισμός μεν των ανιόντων, αλλά όχι αποκλειστική επιλογή κατιόντων) η οποία επιτρέπει την ταχεία απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΣΔ/ΕΔ στο κυτταρόπλασμα. Οι RyRs ρυθμίζουν άμεσα την απελευθέρωση των Ca^{2+} στον σκελετικό και τον καρδιακό μυ, ενεργοποιώντας την συστολή των μυών μέσω της σύζευξης διέγερσης-συστολής (excitation-contraction coupling, ECC), μηχανισμός που θα αναλυθεί στην συνέχεια, ενώ ρυθμίζονται από μια πληθώρα πρωτεϊνών, μικρών μορίων και ιόντων.

Οι RyRs πήραν το όνομα τους από την ρυανοδίνη, ένα δηλητηριώδες αλκαλοειδές που εντοπίζεται στο φυτό *Ryania speciosa*, η οποία χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως εντομοκτόνο. Η ρυανοδίνη προσδένεται στους RyRs με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση με προτίμηση στην ανοιχτή διαμόρφωση του διαύλου επιτρέποντας την χρήση της στην απομόνωση και την αξιολόγηση της λειτουργικότητας του διαύλου [2]. Συγκεκριμένα, η ρυανοδίνη σε συγκεντρώσεις της τάξης των nM ενεργοποιεί τον δίαυλο ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις (>100 μM) παρεμποδίζει μη αντιστρεπτά την λειτουργία του [3, 4].

1.2 Ισομορφές των RyRs

Οι RyRs εμφανίζονται στα θηλαστικά σε τρεις ισομορφές· RyR1, RyR2 και RyR3. Η ισομορφή τύπου 1 (RyR1) εντοπίζεται κυρίως στον σκελετικό μυ [5] ενώ εκφράζεται σε μικρό ποσοστό και σε άλλους ιστούς και όργανα όπως ο καρδιακός μυς [6, 7], το στομάχι, το ήπαρ, ο θύμος αδένας, οι ωθήκες [8] κ.α. Η ισομορφή τύπου 2 (RyR2) αποτελεί την επικρατούσα ισομορφή στον καρδιακό μυ [9] ενώ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας και του εγκεφαλικού φλοιού [10] και σε χαμηλά επίπεδα στο στομάχι, στο ήπαρ, στα επινεφρίδια, στον θύμο αδένα, στις ωθήκες και στους πνεύμονες [7]. Η ισομορφή τύπου 3 (RyR3) ανακαλύφθηκε αρχικά στον εγκέφαλο [11] ενώ εντοπίζεται και σε άλλους ιστούς και όργανα όπως στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στον σπλήνα, στο έντερο [7, 11] κ.α. Στα μη θηλαστικά σπονδυλωτά εκφράζονται δύο ισομορφές των RyRs και συγκεκριμένα οι α και β ισομορφές [12]. Ο RyRα είναι άφθονος στον σκελετικό μυ ενώ εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, ενώ ο RyRβ εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και όργανα συμπεριλαμβανομένων των σκελετικού και καρδιακού μυός, της παρεγκεφαλίδας, του πνεύμονα και του στομάχου [13].

Και οι τρεις ισομορφές (RyR1, 2 και 3) κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια του ανθρώπινου γονιδιώματος, που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Η πρωτοταγής αλληλούχηση των RyRs προβλέπει μόρια αποτελούμενα από μονομερή ~ 5.000 αμινοξέων και μοριακού βάρους ~565 kDa [11, 14]. Η ομολογία μεταξύ των τριών ισομορφών ανέρχεται σε ποσοστό ~65% με τρεις κύριες περιοχές διαφοροποίησης [11], όπως φαίνεται πιο συγκεκριμένα στον Πίνακα 1.1 για τις ισομορφές RyR1 και RyR2. Πιθανόν η ύπαρξη αυτών των περιοχών διαφοροποίησης να συνδέεται με την έκφραση των διαφορετικών ισομορφών σε συγκεκριμένους, κυρίως, ιστούς καθώς και με την εξειδικευμένη λειτουργία της κάθε ισομορφής.

Στην παρούσα διατριβή θα μας απασχολήσει ο υποδοχέας ρυανοδίνης τύπου 2 (RyR2) του καρδιακού μυός καθώς και η ρύθμισή του από την καλμοδουλίνη (calmodulin, CaM), μια πανταχού παρούσα πρωτεΐνη σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Πίνακας 1.1: Περιοχές διαφοροποίησης στην πρωτοταγή δομή των RyR1 και RyR2

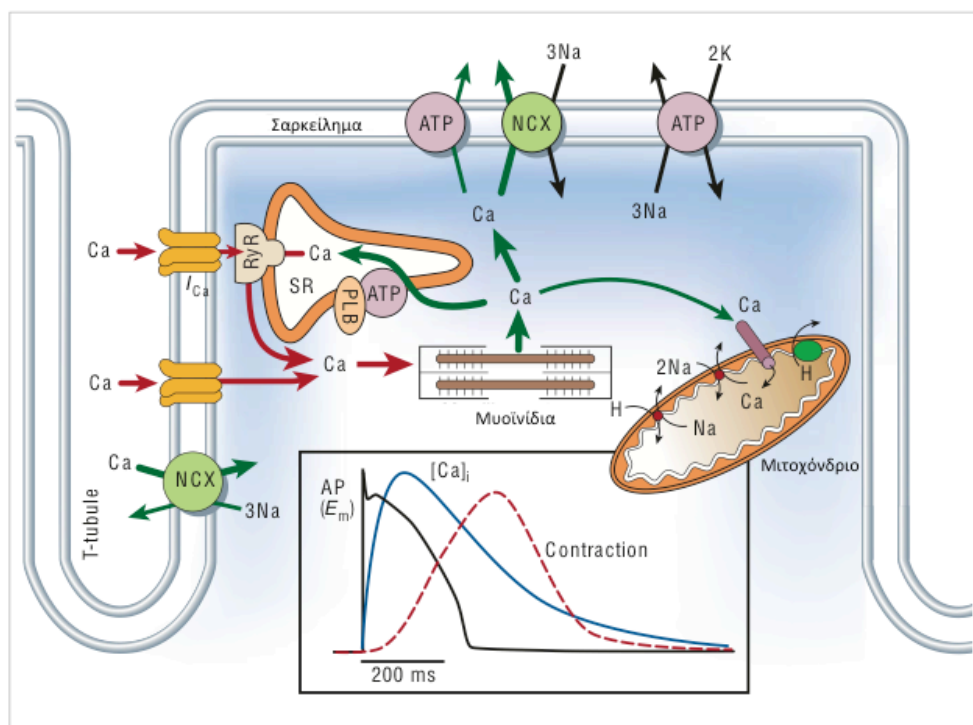
Περιοχή διαφοροποίησης	Αμινοξική αλληλουχία του RyR1	Αμινοξική αλληλουχία του RyR2
DR1	[4254-4631]	[4210-4562]
DR2	[1342-1403]	[1353-1397]
DR3	[1872-1923]	[1852-1890]

1.3 Ο μηχανισμός σύζευξης διέγερσης-συστολής στον καρδιακό μυ και ο ρόλος του RyR2

Η σύζευξη διέγερσης-συστολής (ECC) αποτελεί τον μηχανισμό εκείνο όπου ένα ηλεκτρικό σήμα, προερχόμενο εξωτερικά του μυοκαρδιακού κυττάρου, μετατρέπεται, μέσω μιας σειράς διεργασιών μέσα στο κύτταρο, σε μηχανική απόκριση· την συστολή του καρδιακού μυός. Το Ca^{2+} ως δεύτερος αγγελιοφόρος είναι το κύριο εργαλείο για την σωστή λειτουργία της καρδιάς, αποτελώντας το νόμισμα της καρδιακής συστολής. Κατά την διάρκεια ενός καρδιακού παλμού, απελευθερώνεται ένα σχετικά μεγάλο ποσό Ca^{2+} από το ΣΔ των μυοκαρδιακών κυττάρων, το οποίο αποτελεί κύρια ενδοκυτταρική αποθήκη Ca^{2+} , μέσω του RyR2 στο κυτταρόπλασμα, αυξάνοντας μέχρι και 10 φορές την συγκέντρωση των ελεύθερων ενδοκυτταρικών ιόντων ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$). Το γεγονός αυτό πυροδοτεί την μυϊκή συστολή της καρδιάς μέσω του συμπλέγματος ακτίνης-μυοσίνης των μυοϊνιδίων. Επόμενο στάδιο αποτελεί η χάλαση του καρδιακού μυός, η οποία επιτυγχάνεται με την απομάκρυνση των Ca^{2+} από τα μυοϊνίδια και με την μείωση της $[Ca^{2+}]_i$. Η απομάκρυνση των Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα περιλαμβάνει μονοπάτια μεταφοράς των ιόντων τόσο πίσω στο ΣΔ όσο και εξωτερικά του κυττάρου [15].

Σε μοριακό επίπεδο, η σύζευξη διέγερσης-συστολής είναι μία πολύπλοκη διεργασία στην οποία συμμετέχουν μια σειρά πρωτεϊνών, μικρών μορίων και ιόντων. Στην Σχήμα 1.1 παρουσιάζεται η δομή ενός μυοκαρδιακού κυττάρου καθώς και τα μόρια/ιόντα που συμμετέχουν στο μηχανισμό ECC. Πιο συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια του δυναμικού ενεργείας της καρδιάς, τα Ca^{2+} εισέρχονται στο κύτταρο μέσω των τασεοελεγχόμενων διαύλων Ca^{2+}

τύπου L (LTCCs ή υποδοχείς διυδροπυριδίνης, dihydropyridine receptors, DHPRs), οι οποίοι ενεργοποιούνται από την εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης. Η εισαγωγή Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα πυροδοτεί την απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα μέσω των RyR2, μηχανισμός γνωστός ως Ca^{2+} -επαγόμενη απελευθέρωση Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) [16]. Ο συνδυασμός εισροής Ca^{2+} από το εξωτερικό του κυττάρου και της απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα, έχει σαν αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$, με την μορφή σπινθήρων Ca^{2+} (Ca^{2+} sparks), οδηγώντας στην πρόσδεση των Ca^{2+} στην τροπονίνη C των μυοϊνιδίων. Με την πρόσδεση των Ca^{2+} στην τροπονίνη C ενεργοποιείται ο μηχανισμός συστολής του μυός μέσω του συμπλέγματος ακτίνης-μυοσίνης [17]. Για να επέλθει η χάλαση του μυός απαιτείται η αντίστροφη πορεία, αυτή της μείωσης της $[Ca^{2+}]_i$. Την αποδέσμευση των Ca^{2+} από την τροπονίνη C των μυοϊνιδίων ακολουθεί η απομάκρυνση των Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα.



*D.M. Bers. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, 415 (2002) 198-206.

Σχήμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς των Ca^{2+} κατά την σύζευξη διέγερσης-συστολής σε ένα μυοκαρδιακό κύτταρο.

Το μεγαλύτερο μέρος των Ca^{2+} θα μεταφερθεί πίσω στο ΣΔ μέσω της ΑΤΡασης Ca^{2+} του ΣΔ (Sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase, SERCA), ένα μέρος των Ca^{2+} θα απομακρυνθεί από το κύτταρο μέσω του ιονανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) και της ΑΤΡασης Ca^{2+} του σαρκειλήματος (πλασματική μεμβράνη του μυϊκού κυττάρου) και, τέλος, ένα μέρος Ca^{2+} θα μεταφερθεί στα μιτοχόνδρια μέσω του μηχανισμού μιτοχονδριακής μονο-μεταφοράς Ca^{2+} [15].

Οι RyRs εντοπίζονται στην περιοχή του ΣΔ που γειτνιάζει με τις μεμβράνες του συστήματος σωληνίσκων T, εκεί όπου βρίσκονται οι DHPRs, και για τον λόγο αυτό η τοπική αύξηση της $[\text{Ca}^{2+}]$ γύρω από τους DHPRs μπορεί και προκαλεί την ενεργοποίηση των RyRs μέσω του μηχανισμού της Ca^{2+} -επαγόμενης απελευθέρωσης Ca^{2+} [18].

1.4 Δομικές μελέτες των RyRs

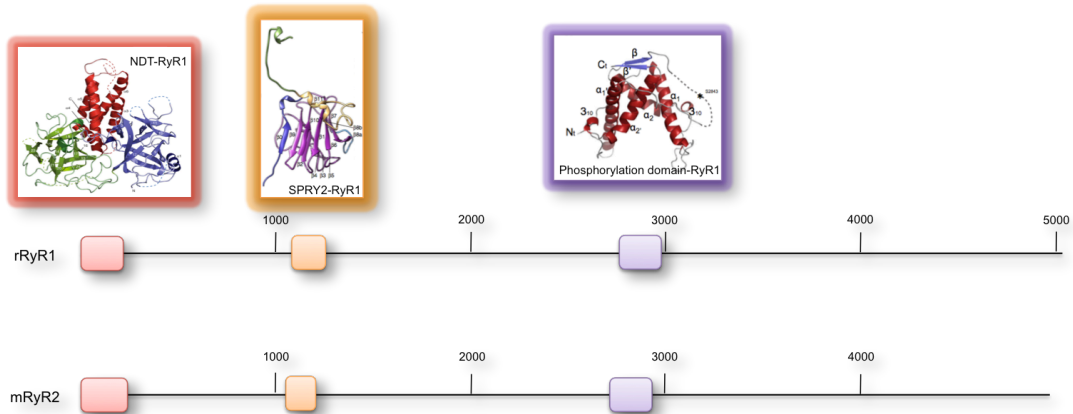
Οι RyRs αποτελούν ίσως τους μεγαλύτερους σε μέγεθος ιοντικούς διαύλους, μοριακού βάρους ~ 2.2 MDa με την μορφή ομοτετραμερών συμπλεγμάτων. Το ασυνήθιστα μεγάλο μέγεθός τους σε συνδυασμό με την πληθώρα ρυθμιστών και την δυναμική τους φύση, καθιστά την δομική ανάλυση των RyRs μια πρόκληση. Η δομή με κρυσταλλογραφία ακτίνων X ολόκληρου του μορίου των RyRs δεν είναι ακόμη γνωστή, πράγμα που δυσχεραίνει την μελέτη τους. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκαν οι κρυσταλλικές δομές περιοχών του αμινο-τελικού άκρου των RyRs (N-terminal domains, NTD), της δομικής περιοχής SPRY2 (βλ. 1.4.1) και μίας κεντρικής περιοχής όπου εντοπίζονται διάφορες θέσεις φωσφορυλίωσης των υποδοχέων (Σχήμα 1.2).

1.4.1 Δομικές μελέτες περιοχών των RyRs με κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Μέχρι στιγμής, έχουν κρυσταλλωθεί με υψηλή διακριτική ικανότητα (2,5 Å) τα 599 πρώτα αμινοξέα του RyR1 του κουνελιού [19] και δύο μικρότερες NTD περιοχές με αμινοξικές αλληλουχίες (αα) 1-210 και 9-205 [20, 21] καθώς και μία NTD περιοχή του RyR2 του ποντικού με αα 1-217 [21]. Βάσει της κρυσταλλικής δομής της αλληλουχίας 1-559, η περιοχή αποτελείται από τρεις διακριτές δομές (A, B και C), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω μιας κύριας υδροφοβικής διεπιφάνειας. Η δομική περιοχή A (αα 1-205) αποτελείται

από επαναλήψεις τρίκλωνων β-πτυχωτών επιφανειών οι οποίες επιστοιβαδεύονται μέσω ισχυρών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (β-τρίλοβη δομή) καθώς και από μία εύκαμπτη α-έλικα, η οποία επικαλύπτει πλευρικά τον υδρόφοβο πυρήνα. Η δομική περιοχή B (αα 206-394), σχηματίζει επίσης μια β-τρίλοβη δομή, ενώ η περιοχή C (αα 395-532) σχηματίζει ένα δέμα 5 α-ελίκων [19]. Στο αμινο-τελικό άκρο των RyRs εντοπίζεται μια πληθώρα σημειακών μεταλλάξεων (33 σε αριθμό για τον RyR1 και 23 για τον RyR2) που σχετίζονται με ασθένειες. Ανάλογα σε ποια θέση βρίσκονται στην τριτοταγή δομή του μορίου χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μεταλλάξεις που βρίσκονται σε περιοχές ολότελα θαμμένες στο εσωτερικό του μορίου και που πιθανόν να προκαλούν λανθασμένη αναδίπλωση των περιοχών αυτών, στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν μεταλλάξεις που βρίσκονται σε υπομονάδες των διεπιφανειών μεταξύ των περιοχών A, B και C με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούν την αλληλεπίδραση των περιοχών αυτών και τέλος, στην τρίτη κατηγορία ανήκουν μεταλλάξεις που βρίσκονται σε διεπιφάνειες άλλων περιοχών του RyR, συμπεριλαμβανομένων διεπιφανειών κατά μήκος των υπομονάδων [19].

Μια άλλη περιοχή της οποίας γνωρίζουμε την κρυσταλλική δομή με υψηλή διακριτική ικανότητα είναι αυτή της SPRY2 των RyR1 και RyR2 (1,84 και 1,34 Å, αντίστοιχα) [22]. Οι SPRY είναι δομές κοινές σε πολλές πρωτεΐνες, είναι συντηρημένες μεταξύ των ειδών και αναφέρονται σε ένα επαναλαμβανόμενο πρωτεϊνικό τμήμα που έχει ανακαλυφθεί στην κινάση *srcA* και στους υποδοχείς RyR. Στο μονομερές των RyRs, οι δομές SPRY εμφανίζονται τρεις φορές (SPRY1, 2 και 3). Λόγω της θέσης της SPRY2 στο τετραμερές των RyRs, δηλ. αυτής ανάμεσα σε δύο περιοχές (ανάμεσα στις γωνίες του τετραμερούς και στις παρυφές της κεντρικής περιοχής) που αλληλεπιδρούν και υπόκεινται σε μεγάλες δομικές αλλαγές κατά την μετάβαση από την ανοιχτή στην κλειστή διαμόρφωση του διαύλου, η περιοχή SPRY2 πιθανόν να εμπλέκεται στην σύζευξη των δύο αυτών περιοχών [23]. Βάσει της κρυσταλλικής δομής της SPRY2 των RyR1 και RyR2 (αα 1070-1246 και 1080-1253, αντίστοιχα), ο πυρήνας της αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα (10 β-αλυσίδες)



Σχήμα 1.2: Σχηματική απεικόνιση σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής των δομικών περιοχών του RyR1 του κουνελιού (rRyR1) και του RyR2 του ποντικού (mRyR2) των οποίων έχει λυθεί η κρυσταλλική δομή.

ενώ το αμινο-τελικό άκρο παρουσιάζεται σαν μια εκτεταμένη δομή αποτελούμενη από μια β-αλυσίδα και μία βραχεία α-έλικα.

Το καρβοξυ-τελικό άκρο της SPRY2 που συνδέεται με την τελευταία β-αλυσίδα του πυρήνα, είναι δύο α-έλικες και μια βραχεία β-αλυσίδα που σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις β-φύλλου με την πρώτη β-αλυσίδα του πυρήνα (Σχήμα 1.2). Σημειακές μεταλλάξεις που συνδέονται με ασθένειες στην SPRY2 περιοχή προκαλούν σημαντική θερμική αποσταθεροποίηση και τοπικό ξεδίπλωμα σε σχέση με την αγρίου τύπου δομή [22].

Τέλος, είναι γνωστή η κρυσταλλική δομή μιας κεντρικής περιοχής των RyRs και συγκεκριμένα της αα 2734-2940 του RyR1, της αα 2699-2904 του RyR2 και της αα 2597-2800 του RyR3 όπου έχουν βρεθεί θέσεις φωσφορυλίωσης των RyRs καθώς οι υποδοχείς βρίσκονται υπό τον έλεγχο κινασών και φωσφατασών. Οι περιοχές αυτές αποτελούνται από δύο ομόλογες μονάδες, γνωστές ως επαναλήψεις 3-4 (repeat 3-4), με δομή διπλής συμμετρίας. Το κάθε μισό αποτελείται από δύο α-έλικες και μία β-αλυσίδα ενώ οι δύο ομόλογες μονάδες συνδέονται μέσω μίας εύκαμπτης και μεγάλου μήκους θηλιάς. Η κεντρική αυτή περιοχή των RyRs στην οποία εντοπίζεται μια σειρά σημειακών μεταλλάξεων που έχουν συσχετιστεί με ασθένειες καθώς και θέσεων φωσφορυλίωσης είναι πιθανόν να συνδέεται αλλοστερικά με την περιοχή του πόρου μεταφοράς ιόντων των υποδοχέων και επομένως να εμπλέκεται στον μηχανισμό λειτουργίας τους [24].

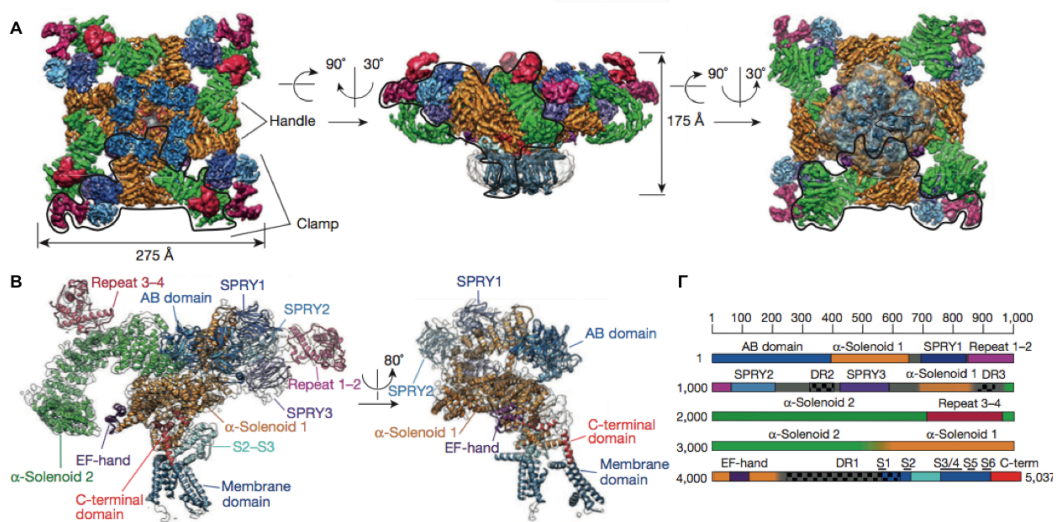
1.4.2 Δομικές μελέτες του RyR1 με κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-EM)

Το γεγονός ότι δεν είναι γνωστή η κρυσταλλική δομή ολόκληρου του μορίου των RyRs, σημαντικές δομικές μελέτες των RyRs έχουν επιτευχθεί με κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-electron microscopy, cryo-EM) υψηλής ανάλυσης και τεχνικές τρισδιάστατης αναπαράστασης (3D reconstruction) [25-27]. Η καλύτερα μελετημένη ισομορφή είναι η τύπου 1 (RyR1) του σκελετικού μυός, της οποίας η απεικόνιση (Σχήμα 1.3) αποκαλύπτει ένα ομοτετραμερές, σχήματος τετραγωνικού πρίσματος διαμεμβρανικά του σαρκοπλασματικού δικτύου [28]. Ο RyR αποτελείται από δύο ευκρινώς διακριτές περιοχές, την κυτταροπλασματική περιοχή (Cytoplasmic, CY) και την διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane, TM).

Η κυτταροπλασματική περιοχή, η οποία αποκαλείται και “πόδι” (the foot), αποτελεί μια μεγάλη περιοχή με κοιλότητες και μικρο-δομές που διευκολύνουν την αλληλεπίδραση με διαλύτες, μικρά μόρια και πρωτεΐνες-ρυθμιστές. Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελεί περίπου το 1/5 του διαύλου και εντοπίζεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης σχηματίζοντας τον πόρο μεταφοράς ιόντων, ο οποίος συμπίπτει με τον άξονα συμμετρίας τάξεως 4 του τετραμερούς.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.3A, η CY περιοχή του τετραμερούς RyR1 διακρίνεται στις περιοχές που αποτελούν τις γωνίες του τετραμερούς, γνωστές ως σφιγκτήρες (clamps), ενώ μεγαλύτερες δομές σχηματίζουν τις πλευρικές περιοχές της CY γνωστές ως λαβές (handles). Η CY περαιτέρω υποδιαιρείται στον πυρήνα και τις περιφερειακές περιοχές. Ο πυρήνας σχηματίζεται από την αμινο-τελική περιοχή AB, η οποία όπως έχουμε ήδη αναφέρει, αναδιπλώνεται σχηματίζοντας δύο β-τρίλοβες υποδομές [19], ενώ ακολουθεί μια μεγάλη δομική περιοχή με την μορφή α-πηνίου (α-Solenoid), η οποία στο εξής θα αναφέρεται ως α-πηνίο 1, που σχηματίζεται από 30 α-έλικες οι οποίες επιστοιβαδεύονται σε δύο παράλληλες στοιβάδες. Σε επίπεδο τριτοταγούς δομής, το α-πηνίο 1 σχηματίζει ένα δομικό ικρίωμα για την CY περιοχή του RyR1. Ένα μέρος του εκτείνεται προς την περιφέρεια της CY περιοχής (περιοχές όπου έχουν χαρακτηριστεί ως λαβές), ενώ ένα μέρος του αναδιπλώνεται κάτω από την περιοχή AB [28]. Επομένως, το α-πηνίο 1

αποτελεί μία περιοχή, η οποία εκτείνεται από τον πυρήνα μέχρι τις περιφερειακές απολήξεις της περιοχής CY. Σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.3Γ, το α -πηνίο 1 περιλαμβάνει τμήματα από την αμινο-τελική έως την καρβοξυ-τελική περιοχή του μονομερούς του RyR1. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η προεξοχή του α -πηνίου 1 περιλαμβάνει την αα 3550-3650, περιοχή όπου εντοπίζεται η κύρια θέση πρόσδεσης της καλμοδουλίνης (calmodulin, CaM) [29], η οποία αποτελεί ρυθμιστή του διαύλου, όπως θα αναφέρουμε στην συνέχεια.



*R.G. Efremov, A. Leitner, R. Aebersold, S. Raunser, Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor, Nature, 517 (2015) 39-43.

Σχήμα 1.3: Η αρχιτεκτονική του σκελετικού RyR1. Α) Χάρτης πυκνότητας του RyR1 με την μέθοδο Cryo-EM, διακριτική ικανότητα 6,1 Å, όπου οι επιμέρους δομικές περιοχές είναι χρωματισμένες. Β) Το μοριακό μοντέλο και η πυκνότητα του μονομερούς. Γ) Σχηματική απεικόνιση της θέσης των χαρακτηριστικών δομών στην πρωτοταγή δομή του μονομερούς του RyR1.

Οι τρεις δομικές περιοχές SPRY (SPRY1, 2 και 3) σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα παρακείμενο στην περιφέρεια του α -πηνίου 1 (Σχήμα 1.3B). Ο λειτουργικός ρόλος των περιοχών SPRY δεν είναι ακόμη γνωστός. Βάσει την θέσης τους στον RyR1, μία από τις πιθανές λειτουργίες τους είναι η συμβολή τους στην διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του υποδοχέα, μεσολαβώντας στην επαφή μεταξύ των δύο περιοχών δομής α -πηνίων (α -πηνίο 1 και 2 βλ. επόμενη παράγραφο) και παρέχοντας ένα ικρίωμα για την δομική περιοχή των επαναλήψεων 1-2 (repeat 1-2 domain) [28].

Μία δεύτερη περιοχή δομής α-πηνίου, η οποία θα αναφέρεται ως α-πηνίο 2, σχηματίζει τις γωνίες της περιοχής CY στο τετραμερές του RyR1 (οι ήδη αναφερόμενες ως σφιγκτήρες). Η δομή αυτή των 38 α-ελίκων, σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, εκτείνεται μεταξύ της αα 1920-3500 (Σχήμα 1.3Γ). Σε επίπεδο τριτοταγούς δομής, το α-πηνίο 2 εκτείνεται ανάμεσα στις περιοχές SPRY του ενός μονομερούς και του α-πηνίου 1 του γειτονικού μονομερούς [28]. Γενικά, ο λειτουργικός ρόλος των περιοχών δομής α-πηνίου είναι η πρόσδεση διαφόρων πρωτεϊνών [30]. Επομένως είναι πιθανόν ορισμένες από τις πρωτεΐνες-ρυθμιστές του RyR1 να προσδένονται στις περιοχές αυτές.

Στην αλληλουχία του RyR1 εμφανίζονται 4 ομόλογες μονάδες, μήκους ~110 αμινοξέων, οι οποίες οργανώνονται διαδοχικά ανά δύο (repeat 1-2 και repeat 3-4) [31], όπου κάθε ζεύγος αναδιπλώνεται σε σχήμα V [24]. Η επανάληψη 1-2 εντοπίζεται στις γωνίες της περιοχής CY και αλληλεπιδρά με την περιοχή SPRY2, ενώ η επανάληψη 3-4 εντοπίζεται στην κορυφή της κεντρικής περιοχής του α-πηνίου 2 (Σχήμα 1.2B). Ο λειτουργικός ρόλος της επανάληψης 1-2 πιθανόν να είναι η μεσολάβησή της στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών του RyR1 [32]. Η επανάληψη 3-4 περιλαμβάνει την θέση φωσφορυλίωσης Ser2843 στην θηλιά που είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια του RyR1 και βρίσκεται απέναντι από την περιοχή SPRY1. Στην περιοχή αυτή, έχουν εντοπιστεί 7 μεταλλάξεις που συνδέονται με ασθένειες. Επιπλέον, είναι πιθανόν η περιοχή αυτή να συμβάλει στην αλληλεπίδραση του RyR1 με τον διάυλο ασβεστίου DHPR (διαμεμβρανικός διάυλος ασβεστίου του συστήματος σωληνίσκων T), γεφυρώνοντας την στενή κυτταροπλασματική περιοχή ανάμεσα στις μεμβράνες του συστήματος σωληνίσκων T και αυτών του ΣΔ [33].

Στο τελευταίο τμήμα του α-πηνίου 1 έχει εντοπιστεί ένα ζεύγος δομικών μοτίβων EF [34], όμοια με αυτά της CaM, μήκους 50 αμινοξέων (Σχήμα 1.3Γ). Τέτοιες δομές λειτουργούν ως διακόπτες της ενεργοποιημένης από το ασβέστιο διαμόρφωσης του RyR1 [35]. Καθώς οι συγκεντρώσεις ασβεστίου της τάξης των nM ενεργοποιούν τον RyR1, η κοντινή στον ιοντικό διάυλο θέση της περιοχής δομικών μοτίβων EF υποδηλώνει την ύπαρξη αλλοστερικού μοριακού μηχανισμού που επάγεται από το ασβέστιο και λειτουργεί ως διακόπτης του διαύλου του RyR1 [28].

Η αρχιτεκτονική του πόρου του RyR1 τον κατατάσσει ως μέλος της υπερικογένειας των 6TM ιοντικών διαύλων, με 6 διαμεμβρανικές έλικες (S1-S6) ανά μονομερές να περιβάλουν τον κεντρικό πόρο [36]. Ένα εκτεταμένο πεπτίδιο (το τμήμα Π, the P-segment), δομικό ανάλογο του φίλτρου επιλογής των διαύλων καλίου και νατρίου, οριοθετεί το άνοιγμα προς τον αυλό του ΣΔ. Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από δύο δομές: την δομή του πόρου, που σχηματίζεται από την S5 και S6, την έλικα του πόρου και το τμήμα Π, καθώς και την ψευδοδομή αισθητήρα τάσεως (pseudo voltage-sensor domain, pVSD), που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές έλικες S1-S4, η οποία συνδέεται με την δομή του πόρου του γειτονικού μονομερούς. Η TM περιοχή του RyR1 είναι ομόλογη κυρίως του τασεοελεγχόμενου διαύλου νατρίου, NavAb [37], παρόλο που το τμήμα Π είναι ομόλογο του αντίστοιχου τμήματος του διαύλου ασβεστίου TRPV1 [38].

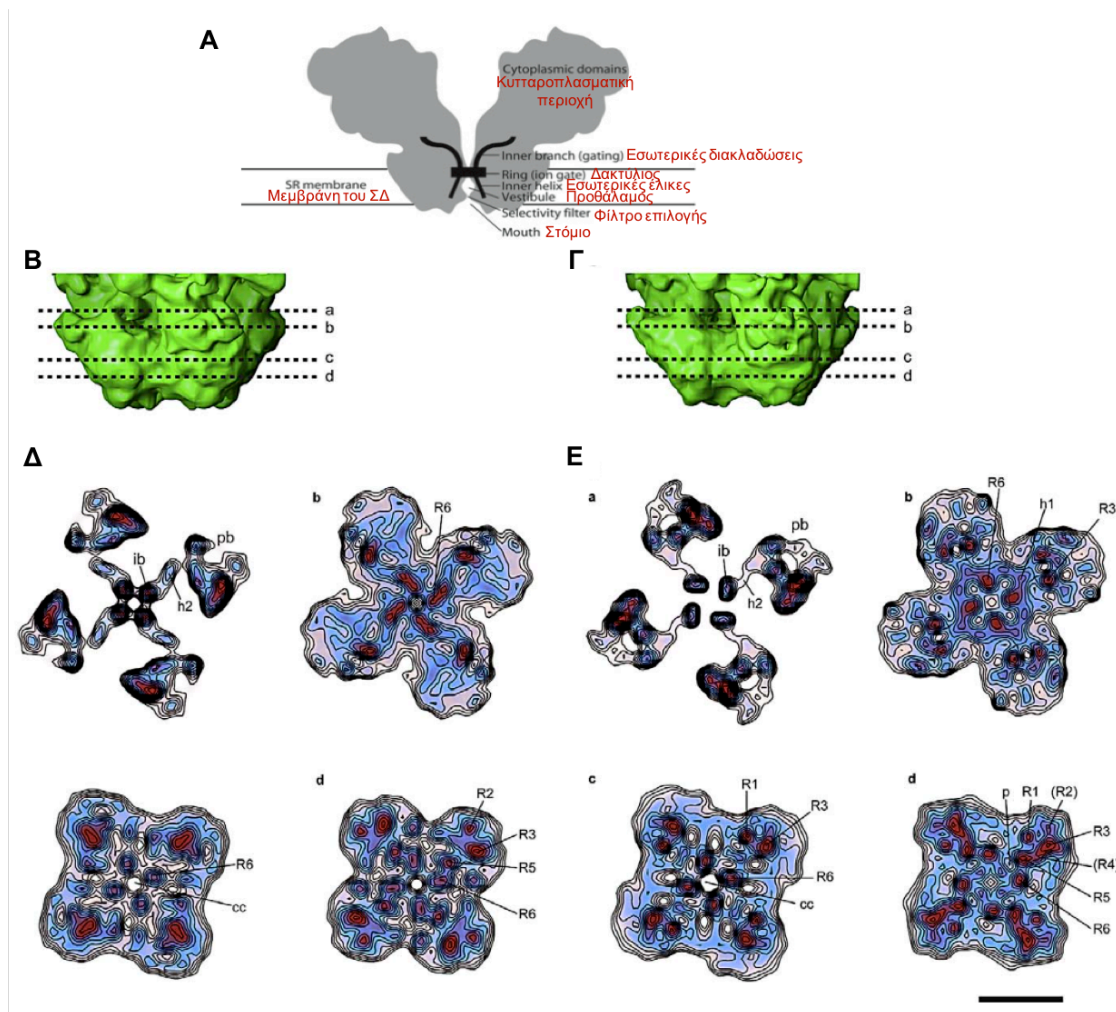
1.4.3 Δομικές μεταβολές του RyR1 κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση του διαύλου.

Η ρύθμιση των RyRs ελέγχεται από μια σειρά πρωτεϊνών, μικρών μορίων και ιόντων (προσδέτες) που αλληλεπιδρούν με το τετραμερές σε συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, που ρυθμίζουν τους RyRs ως διαύλους μεταφοράς ιόντων, λαμβάνουν χώρα σε περιοχές του τετραμερούς, που είναι απομακρυσμένες από τον φερόμενο ως πόρο μεταφοράς ιόντων (ιοντικό πόρο), υποδεικνύοντας την μεσολάβηση μιας σειράς αλλοστερικών μονοπατιών ανάμεσα στις κυτταροπλασματικές περιοχές που υφίστανται άμεση ρύθμιση και τον ιοντικό πόρο. Βάσει της τρισδιάστατης αναπαράστασης της ανοιχτής διαμόρφωσης του RyR1, λαμβάνουν χώρα αρκετές αλλαγές στην διαμόρφωση τόσο της περιοχής CY όσο και της περιοχής TM, εν συγκρίσει με την κλειστή διαμόρφωση [39, 40].

Για την καλύτερη κατανόηση των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση του RyR1 γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στις δομές που αποτελούν την περιοχή TM και συμβάλλουν στην διαμόρφωση του πόρου. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.4A, τέσσερις διαμεμβρανικές εσωτερικές έλικες (μία από κάθε μονομερές) σχηματίζουν μία δομή που πλαισιώνει τον πόρο. Οι εσωτερικές έλικες

απλώνονται προς τα έξω περιβάλλοντας μια κεντρική κοιλότητα (προθάλαμος), η οποία διαχωρίζεται από το στόμιο μέσω μιας στενής σήραγγας. Η σήραγγα πιθανόν να σχηματίζεται από βραχείες έλικες του πόρου (μία από κάθε μονομερές) και να οριοθετείται από το φίλτρο επιλογής των Ca^{2+} . Από την κυτταροπλασματική πλευρά της διαμεμβρανικής συγκρότησης (assembly) οι εσωτερικές έλικες συγκλίνουν υπό την μορφή δακτυλίου σχηματίζοντας τον πόρο. Ομοίως, οι εσωτερικές διακλαδώσεις, οι οποίες έχουν σχήμα λεπτού λυγισμένου ραβδίου, συνδέονται και αυτές άμεσα με τον πόρο (Σχήμα 1.4A). Στον RyR1 ο φερόμενος ως πόρος είναι στραμμένος προς το κυτταρόπλασμα ενώ το φίλτρο επιλογής προς τον αυλό του ΣΔ [41].

Κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση του RyR1 λαμβάνουν χώρα δομικές αλλαγές τόσο στην κυτταροπλασματική περιοχή όσο και στην περιοχή του πόρου. Όσον αφορά την κυτταροπλασματική περιοχή, κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση οι περιοχές 9 και 10 που αποτελούν τους σφιγκτήρες του τετραμερούς καθώς και οι περιοχές 7, 8 και 8α απομακρύνονται από το σύστημα των T-σωληνίσκων και μετατοπίζονται προς την μεμβράνη του ΣΔ (κατά 8 Å). Επακολούθως, η περιοχή 2 (που βρίσκεται πιο κεντρικά και είναι προς την πλευρά του συστήματος των T-σωληνίσκων) μετακινείται ~ 4 Å προς το σύστημα αυτό, ενώ απομακρύνεται από τον τετραπλό άξονα του διαύλου. Αποτέλεσμα των συνολικών δομικών αλλαγών που συμβαίνουν στην CY περιοχή είναι η μετακίνηση της κύριας μάζας του RyR1 από το κέντρο του τετραμερούς προς τα έξω, καθιστώντας τον τετραπλό άξονα του τετραμερούς λιγότερο συμπαγή. Οι μετακινήσεις που συμβαίνουν στις CY περιοχές μεταβιβάζονται στις εσωτερικές διακλαδώσεις που βρίσκονται στην περιοχή του πόρου [42].



* M. Samsó, T. Wagenknecht, P.D. Allen, Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM, Nature structural & molecular biology, 12 (2005) 539-544.

Σχήμα 1.4: Σχηματική απεικόνιση και όψεις του RyR1. Α) Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής του RyR1 με έμφαση στις δομικές περιοχές του πόρου. Β) και Γ) Πλευρική όψη της TM περιοχής του RyR1 στην κλειστή και την ανοιχτή διαμόρφωση του διαύλου, αντίστοιχα, με τις θέσεις διατομής να υποδεικνύονται με διακεκομμένες γραμμές. Δ) και Ε) Διατομές του RyR1 στην κλειστή και την ανοιχτή διαμόρφωση, αντίστοιχα, κατακόρυφα στον τετραπλό άξονα όπως φαίνεται από την CY περιοχή. Οι συντομογραφίες είναι οι εξής: cc, κεντρική κοιλότητα· h, οριζόντιες πυκνότητες· ib, εσωτερικές δέσμες· ih, εσωτερικές έλικες· p, έλικες πόρου· pb, περιφερειακές δέσμες.

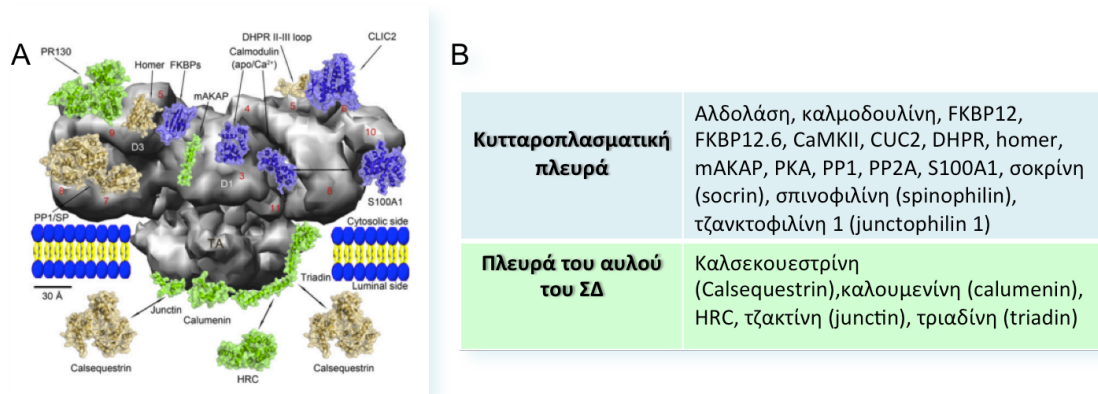
Στην περιοχή του πόρου, κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση λαμβάνουν χώρα μια σειρά από γεγονότα (Σχήμα 1.4B-E). Πρώτον, οι εσωτερικές έλικες απομακρύνονται από τον τετραπλό άξονα του τετραμερούς. Ενώ στην κλειστή διαμόρφωση οι εσωτερικές έλικες σχηματίζουν μια δεξιόστροφη ελικοειδή επιστοιβάδευση προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος, στην ανοιχτή διαμόρφωση αναπροσανατολίζονται και η ηλεκτρονική τους πυκνότητα γίνεται ασθενέστερη οδηγώντας στην αύξηση

της διαμέτρου του δακτυλίου. Κατά δεύτερον, απομακρύνονται και οι εσωτερικές διακλαδώσεις από τον τετραπλό άξονα. Στην κλειστή διαμόρφωση του διαύλου, οι εσωτερικές διακλαδώσεις συνενώνονται ισχυρά μεταξύ τους σχηματίζοντας δακτύλιο υψηλής πυκνότητας ενώ κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση, φέρουν κλίση και περιστροφή με αποτέλεσμα να απομακρύνονται μεταξύ τους αυξάνοντας την διάμετρο του δακτυλίου. Τρίτον, το επίπεδο δίκτυο που περιβάλλει τον δακτύλιο μετακινείται προς τα έξω. Τέσσερις επιπλέον δομές παράλληλες με την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης του ΣΔ, συνδέουν τον δακτύλιο με την περιφερειακή περιοχή της TM (h1, Σχήμα 1.4Eb). Στην κλειστή διαμόρφωση όπου ο δακτύλιος είναι μικρότερος, οι τέσσερις δομές h1 σε σχήμα ραβδίου, φέρουν την μορφή σταυρού (Σχήμα 1.4Δ), ενώ στην ανοιχτή διαμόρφωση μετακινούνται προς τα έξω, συμβάλλοντας στην αύξηση της διαμέτρου του δακτυλίου στην ανοιχτή διαμόρφωση. Τέλος, οι έλικες του πόρου που σχηματίζουν το φίλτρο επιλογής, το οποίο εμφανίζεται δομικώς όμοιο σε μια σειρά διαφορετικών κατιοντικών διαύλων όπως οι δίαυλοι καλίου, οι IP_3Rs και οι $RyRs$ και αποτελείται από μια αλληλουχία 6 αμινοξέων (GGGIGD), αποτελούν μια συμπαγή δομή που διαχωρίζει την κεντρική κοιλότητα από το στόμιο. Στην ανοιχτή διαμόρφωση, οι έλικες του πόρου εξέχουν προς την κεντρική κοιλότητα δημιουργώντας ένα στενό μονοπάτι μεταξύ της κεντρικής κοιλότητας και του αυλού του ΣΔ [42].

Συνοψίζοντας, κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση του $RyR1$, οι δομικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στην κυτταροπλασματική περιοχή συντονίζονται με τις δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στην περιοχή του πόρου. Όλες οι δομικές αλλαγές φαίνεται να ενορχηστρώνονται έτσι ώστε να προκαλούν σημαντική μείωση της πυκνότητας κατά μήκος του τετραπλού άξονα του τετραμερούς καθώς και αύξηση της διαμέτρου του δακτυλίου. Κατά την μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή διαμόρφωση υπάρχουν ορισμένες περιοχές, που η πυκνότητά τους δεν μεταβάλλεται. Το γεγονός αυτό μαρτυρά την ύπαρξη περιοχών στο μόριο του $RyR1$ που αποτελούν δομικούς σφιγκτήρες και που πιθανόν να λειτουργούν ως ρυθμιστικές περιοχές [42].

1.5 Ρύθμιση των RyRs

Οι υποδοχείς ρυανοδίνης ρυθμίζονται από μια πληθώρα πρωτεϊνών, μικρών μορίων και ιόντων τόσο από την κυτταροπλασματική πλευρά όσο και από την πλευρά του αυλού του ΣΔ. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες δρουν με την πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένες περιοχές των RyRs, λειτουργώντας είτε ως ενεργοποιητές είτε ως αναστολείς είτε και τα δύο (Σχήμα 1.5). Πιθανόν οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών από την πλευρά του κυτταροπλάσματος να επηρεάζουν τα πρώτα στάδια της σύζευξης διέγερσης-συστολής του μυός και την λειτουργική κατάσταση του διαύλου, ενώ οι αλληλεπιδράσεις από την πλευρά του αυλού του ΣΔ να συμβάλουν στην ρύθμιση του διαύλου μέσω της ανίχνευσης της αλλαγής στη συγκέντρωση των Ca^{2+} του ΣΔ.



Σχήμα 1.5: Α) Τρισδιάστατη απεικόνιση του RyR με τους προσδέτες του. Β) Αναφορά στις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τους RyRs από την κυτταροπλασματική πλευρά και από την πλευρά του αυλού του ΣΔ.

Στην συνέχεια, ακολουθεί αναφορά σε ορισμένους από τους ρυθμιστές των RyRs, ενώ θα γίνει λεπτομερής αναφορά στην καλμοδουλίνη (calmodulin, CaM), μία πανταχού παρούσα πρωτεΐνη στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των RyRs και ειδικά, στην ρύθμιση του RyR2.

1.5.1 Οι ρυθμιστές των RyRs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ρύθμιση των RyRs συμβάλλουν τόσο πρωτεΐνες όσο ιόντα και μικρά μη πρωτεϊνικά μόρια. Παρακάτω, θα γίνει αναφορά στην ρυθμιστική ικανότητα φυσικών προσδετών από την πλευρά του κυτταροπλάσματος, όπως είναι η δεσμευτική πρωτεΐνη της FK506 (FK506

binding protein, FKBP), η πρωτεϊνική κινάση A και η πρωτεϊνική κινάση II της καλμοδουλίνης (PKA και CaMKII, αντίστοιχα), τα ιόντα Ca^{2+} , μαγνησίου (Mg^{2+}) και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) καθώς και σε ρυθμιστές του αυλού του ΣΔ όπως η καλσεκουεστρίνη (calsequestrin), η τζανκτίνη (junctin) και η τριαδίνη (triadin). Πέρα από τους φυσικούς ρυθμιστές των RyRs, μια σειρά φαρμακολογικών παραγόντων που ρυθμίζουν τους RyRs, όπως η ρυανοδίνη και η καφεΐνη, έχουν συμβάλει στην καλύτερη μελέτη των υποδοχέων αυτών. Τέλος σε ξεχωριστή ενότητα θα γίνει εκτενής αναφορά στο μόριο της καλμοδουλίνης και στον ρόλο της ως ο ρυθμιστής κυρίως του καρδιακού RyR2.

FKBPs

Οι FKBP's αποτελούν ενδοκυτταρικούς υποδοχείς του ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου FK506, εντοπίζονται σε αφθονία σε όλα τα κύτταρα και αποτελούν μέλη της οικογένειας των ανοσοφιλινών [43]. Οι FKBP12 και FKBP12.6 (μοριακού βάρους 12 και 12.6 kDa, αντίστοιχα), αλληλεπιδρούν και με τις τρεις ισομορφές του RyR αλλά παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια σύνδεσης και επίπεδο έκφρασης σε διαφορετικούς ιστούς [44]. Η FKBP12 συνδέεται ισχυρά με τον RyR1 του σκελετικού μυός [45] σε αναλογία ένα μόριο FKBP12 ανά μονομερές του RyR1, σταθεροποιώντας την κλειστή διαμόρφωση του διαύλου [46]. Η αποδέσμευση του FKBP12 από τον RyR1 επιτυγχάνεται με την παρουσία του FK506 ενώ βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση του RyR1 από την PKA αποδεσμεύει τον FKBP12 από το σύμπλεγμα με τον RyR1 [47]. Με την απομάκρυνση του FKBP12, ενισχύεται η ευαισθησία του RyR1 στα Ca^{2+} που προκαλούν ενεργοποίηση, ενώ αυξάνεται η πιθανότητα και ο χρόνος παραμονής του διαύλου στην ανοιχτή διαμόρφωση οδηγώντας το σύστημα σε κατάσταση υπο-αγωγιμότητας [46, 48]. Στον καρδιακό μυ, ο FKBP12.6 προσδένεται με τον RyR2 σε αναλογία ίδια με αυτή του FKBP12 για τον RyR1. Η επίδραση του FKBP12.6 στην ρύθμιση του RyR2 αποτελεί αμφιλεγόμενο θέμα. Ορισμένες ερευνητικές ομάδες αναφέρουν ότι η αποδέσμευση του FKBP12.6 από τον RyR2 ενεργοποιεί τον δίαυλο [49, 50] ενώ άλλες ερευνητικές ομάδες αναφέρουν ότι η αποδέσμευση αυτή δεν επιφέρει καμία επίδραση στην λειτουργία του RyR2 [51, 52]. Η περιοχή πρόσδεσης των FKBP's στους RyRs επίσης αποτελεί αμφιλεγόμενο θέμα.

Πιστεύεται ότι η περιοχή πρόσδεσης βρίσκεται στην κεντρική περιοχή των RyRs (αα 2407-2520 και 2361-2396 για τον RyR1 και τον RyR2, αντίστοιχα) [53], ενώ ως περιοχή πρόσδεσης του FKBP12.6 στον RyR2 έχουν προταθεί επίσης περιοχές που βρίσκονται και στο αμινο-τελικό [54] και στο καρβοξυ-τελικό άκρο [55] του RyR2.

Ca²⁺, Mg²⁺ και ATP

Και οι τρεις αυτοί παράγοντες αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές των RyRs. Τα Mg²⁺ και το ATP ρυθμίζουν τους RyRs από την πλευρά του κυτταροπλάσματος ενώ τα Ca²⁺ τόσο από την πλευρά του κυτταροπλάσματος όσο και από τον αυλό του ΣΔ. Οι ισομορφές του καρδιακού και του σκελετικού μυός, RyR2 και RyR1 αντίστοιχα, εμφανίζουν διαφορές στην ρύθμισή τους από τους παραπάνω προσδέτες που πιθανόν να οφείλονται σε διαφορετικά χαρακτηριστικά που εμφανίζουν οι δύο αυτές ισομορφές στην σύζευξη διέγερσης-συστολής [33].

Τα Ca²⁺ από την κυτταροπλασματική πλευρά του τετραμερούς των RyRs ρυθμίζουν τους RyRs είτε μέσω άμεσης πρόσδεσης είτε μέσω της CaM και της CaMKII. Συγκεκριμένα, οι RyRs ενεργοποιούνται σε συγκεντρώσεις κυτταροπλασματικών Ca²⁺ από high-nM έως sub-μM μέσω πρόσδεσης του ασβεστίου σε εξειδικευμένες θέσεις υψηλής συγγένειας, ενώ παρεμποδίζονται σε ακόμα υψηλότερες συγκεντρώσεις Ca²⁺ (~1 mM) μέσω πρόσδεσης του ασβεστίου σε θέσεις λιγότερο επιλεκτικές και χαμηλής συγγένειας [56]. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός δράσης των Ca²⁺ δεν είναι πλήρως γνωστός. Τα Ca²⁺ που βρίσκονται στον αυλό του ΣΔ, ρυθμίζουν τους RyRs κυρίως μέσω της δράσης πρωτεϊνών-αισθητήρων ασβεστίου. Μείωση της συγκέντρωσης των Ca²⁺ στον αυλό του ΣΔ απενεργοποιεί τον δίαυλο και συνεισφέρει στον τερματισμό του μηχανισμού της Ca²⁺-επαγόμενης απελευθέρωσης Ca²⁺ [57].

Τα Mg²⁺ πιστεύεται ότι παρεμποδίζουν τους RyRs μέσω δύο μηχανισμών. Είτε μειώνοντας την πιθανότητα του διαύλου να είναι στην ανοιχτή του μορφή, με το να συναγωνίζονται με τα Ca²⁺ για τις υψηλής συγγένειας για τα Ca²⁺ θέσεις ενεργοποίησης, ή με την πρόσδεσή τους στις λιγότερο επιλεκτικές και χαμηλής συγγένειας για τα Ca²⁺ θέσεις παρεμπόδισης [3, 58]. Σε αυξανόμενες

[Ca²⁺] του κυτταροπλάσματος, τα Mg²⁺ προκαλούν ισχυρή παρεμπόδιση στον RyR1 και σχετικά μικρή παρεμπόδιση στους RyR2 και RyR3 [59].

Τέλος, το ATP είναι ενεργοποιητής των RyRs. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι ο RyR1 ενεργοποιείται από το ATP απουσία Ca²⁺, όμως για την μέγιστη ενεργοποίησή του είναι απαραίτητη η παρουσία Ca²⁺, ενώ για την ενεργοποίηση του RyR2 είναι απαραίτητη η παρουσία Ca²⁺ [3]. Στα κύτταρα, το ATP βρίσκεται κατά κύριο λόγο συνδεδεμένο με τα Mg²⁺, επομένως είναι πιθανό υπό κανονικές συνθήκες, το σύμπλεγμα MgATP, παρά το ελεύθερο ATP, να ρυθμίζει την απελευθέρωση Ca²⁺ από το ΣΔ μέσω των RyRs [33].

PKA και CaMKII

Οι RyRs εμφανίζουν πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης. Στον σκελετικό και καρδιακό μυ, οι RyR1 και RyR2 αντίστοιχα, φαίνεται να φωσφορυλιώνονται από την PKA και την CaMKII [60]. Σύμφωνα με σχετικά εργαστηριακά αποτελέσματα, η ενεργοποίηση ενσωματωμένου σε επίπεδη λιπιδική διπλοστοιβάδα RyR1 ενισχύεται από την φωσφορυλίωσή του από την PKA ή την CaMKII [61]. Επιπλέον, η ενδογενής PKA φαίνεται να ρυθμίζει την απελευθέρωση Ca²⁺ μέσω της φωσφορυλίωσης του RyR1 κατά την ECC του σκελετικού μυός [62]. Η φωσφορυλίωση του RyR1 από την PKA (στην θέση Ser2843) αποδεσμεύει την FKBP12 από τον διάυλο και αυξάνει την πιθανότητα μετάβασης του διαύλου στην ανοιχτή διαμόρφωση [47]. Στον καρδιακό μυ, η διέγερση β-αδρενεργικών υποδοχέων έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA και κατ'επέκταση την φωσφορυλίωση του RyR2 στην θέση Ser2808 [63, 64]. Η φωσφορυλίωση του RyR2 από την PKA οδηγεί στην παροδική μείωση της συγγένειας πρόσδεσης του FKBP12.6 στον RyR2 καθώς και στην αύξηση της εξαρτώμενης από το ασβέστιο ενεργοποίησης του διαύλου [53]. Στην καρδιακή ανεπάρκεια, χρόνια υπερφωσφορυλίωση του RyR2 από την PKA, οδηγεί σε αποδέσμευση του FKBP12.6 από τον RyR2, και, καθώς ο FKBP12.6 σταθεροποιεί την κλειστή διαμόρφωση του διαύλου, η αποδέσμευσή του από τον RyR2 ενισχύει την ενεργότητα του RyR2 οδηγώντας σε μη φυσιολογική διαρροή Ca²⁺ από το ΣΔ κατά την διαστολή [53, 65]. Η κατάσταση αυτή προκαλεί μείωση των αποθεμάτων Ca²⁺ στο ΣΔ και μειωμένη απελευθέρωση Ca²⁺ κατά την ενεργοποίηση του διαύλου. Η CaMKII φαίνεται να ενεργοποιεί [64] ή να παρεμποδίζει [66] τον RyR2 σε

επίπεδη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Η θέση φωσφορυλίωσης του RyR2 από την CaMKII είναι η Ser2814 και η φωσφορυλίωση του RyR2 στην θέση αυτή, ενεργοποιεί τον δίαυλο, χωρίς να αποδεσμεύει τον FKBP12.6 από τον RyR2. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του RyR2 από την CaMKII εμφανίζει θετική συσχέτιση με τον καρδιακό παλμό. Αυξανόμενες $[Ca^{2+}]_i$ συνδέονται με υψηλότερους καρδιακούς παλμούς. Επίσης, οι αυξανόμενες $[Ca^{2+}]_i$ ενισχύουν την ενεργοποίηση της CaMKII, η οποία οδηγεί στην φωσφορυλίωση του διαύλου και την αυξημένη πιθανότητα ο RyR2 να βρίσκεται στην ανοιχτή του διαμόρφωση [67].

Καλσεκουεστρίνη, τριαδίνη και τζανκτίνη

Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τον RyR από τον αυλό του ΣΔ. Η καλσεκουεστρίνη (CSQ) είναι μία όξινη πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στον αυλό του ΣΔ και προσδένει Ca^{2+} (40-50 και 18-40 moles Ca^{2+} ανά mole CSQ στον σκελετικό και τον καρδιακό μυ, αντίστοιχα) [68]. Στο ΣΔ, την ενδοκυτταρική αποθήκη Ca^{2+} , η CSQ δρα ως ρυθμιστής Ca^{2+} μειώνοντας την συγκέντρωση των ελεύθερων Ca^{2+} . Η αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων Ca^{2+} στον αυλό του ΣΔ επιφέρει αλλαγή στην διαμόρφωση της CSQ [69]. Το μονομερές της πολυμερίζεται σε $[Ca^{2+}]$ άνω των 10 μM , ενώ το πολυμερές σταθεροποιείται σε $[Ca^{2+}]$ περίπου 1 mM όπου και αγκιστρώνεται στην μεμβράνη του ΣΔ μέσω της πρόσδεσής της στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τριαδίνη και τζανκτίνη, οι οποίες φέρουν περιοχές πρόσδεσης για τον RyR [70]. Η CSQ πέρα από την αλληλεπίδρασή της με τον RyR μέσω των προαναφερθεισών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, αλληλεπιδρά και άμεσα με αυτόν. Η CSQ λειτουργεί ως ρυθμιστής του RyR κατά την διάρκεια της μυϊκής συστολής [71]. Τέλος, βάσει μελετών όπου γίνεται χρήση διαμεμβρανικής λιπιδικής διπλοστοιβάδας, η CSQ αυξάνει την πιθανότητα οι RyR1 και RyR2 να είναι στην ανοιχτή τους διαμόρφωση, σε 100 ή 250 μM συγκέντρωσης Ca^{2+} του αυλού του ΣΔ. Παρουσία 1 mM $[Ca^{2+}]$, η οποία είναι και η φυσιολογική $[Ca^{2+}]$ στον αυλό του ΣΔ σε κατάσταση ηρεμίας, η CSQ ενεργοποιεί τον RyR2 ενώ παρεμποδίζει τον RyR1 [72]. Επιπλέον, η CSQ φαίνεται να παρεμποδίζει τον RyR2 σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$ του αυλού (20 μM), ενώ το σύμπλεγμα CSQ/τριαδίνη/τζανκτίνη ενεργοποιεί τον RyR2 σε υψηλές $[Ca^{2+}]$ (5 mM) [73].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η τριαδίνη και η τζανκτίνη είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που φέρουν μια βραχεία αμινο-τελική κυτταροπλασματική περιοχή και μία επιμήκη περιοχή που εκτείνεται στον αυλό του ΣΔ [74, 75]. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με την CSQ και τον RyR δημιουργώντας ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, υπεύθυνο για την διατήρηση της φυσιολογικής απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ [74]. Η τριαδίνη και η τζανκτίνη ενισχύουν την ανοιχτή διαμόρφωση του RyR1 [76] ενώ στον RyR2 η τζανκτίνη προκαλεί παρεμπόδιση [77].

Ρυανοδίνη και καφεΐνη

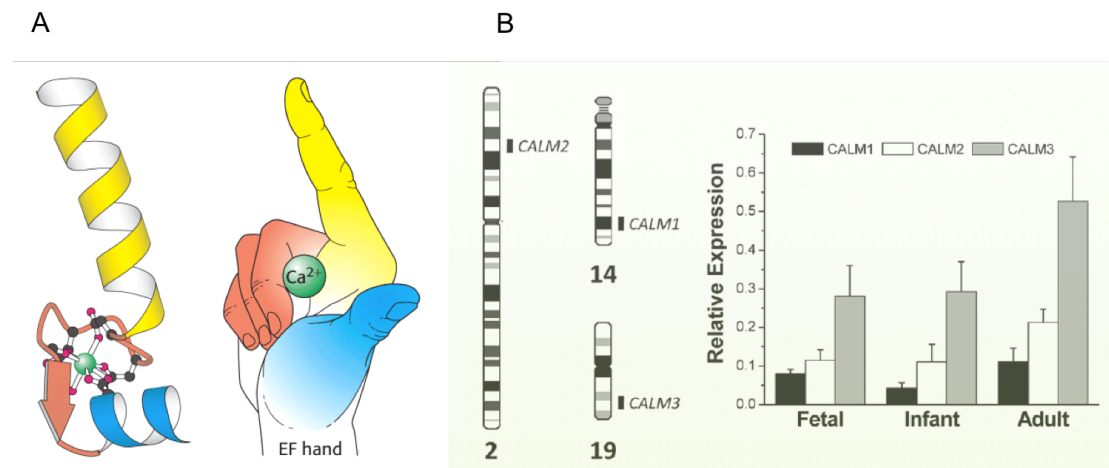
Εκτός από τους φυσικούς ρυθμιστές του RyR υπάρχουν μερικοί φαρμακολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για την μελέτη της λειτουργικότητας του υποδοχέα καθώς και της θέσης του μέσα στα κύτταρα, όπως η καφεΐνη που είναι ενεργοποιητής του RyR και η ρυανοδίνη που έχει διπλή δράση. Για την ρυανοδίνη έχει γίνει ήδη αναφορά στην υποενότητα 1.1. Συμπληρωματικά, ο RyR έχει θέσεις πρόσδεσης της ρυανοδίνης τόσο υψηλής όσο και χαμηλής συγγένειας (της τάξης των nM και μ M, αντίστοιχα), οι οποίες εντοπίζονται στην C-τελική περιοχή του διαύλου και συγκεκριμένα μετά την θέση Arg-4475 [78]. Η καφεΐνη ως ενεργοποιητής του RyR, αυξάνει και τον χρόνο παραμονής και την πιθανότητα εύρεσης του RyR στην ανοιχτή διαμόρφωση, δρώντας σε συνεργασία με τα Ca^{2+} και το ATP και αυξάνοντας την συγγένεια σύνδεσης των φυσικών αυτών ρυθμιστών για τον RyR [79]. Επιπλέον, η καφεΐνη χρησιμοποιείται για την έμμεση μέτρηση της ποσότητας των Ca^{2+} στο εσωτερικό του ΣΔ καθώς η εφαρμογή της προκαλεί το άδειασμα του ΣΔ, την ενδοκυτταρική αποθήκη Ca^{2+} .

1.6 Η καλμοδουλίνη (CaM) ως ρυθμιστής των RyRs

1.6.1 Γενικά στοιχεία

Η καλμοδουλίνη, μία πρωτεΐνη μικρού σχετικά μοριακού βάρους (~17 kDa) με τέσσερις θέσεις δέσμευσης ασβεστίου, λειτουργεί ως αισθητήρας ασβεστίου (calcium sensing protein) σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η CaM αποτελεί μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών με δομικό μοτίβο EF (EF-hand family) και είναι εξελικτικά από τις πιο συντηρημένες πρωτεΐνες που είναι γνωστές μέχρι σήμερα [80]. Το δομικό μοτίβο EF είναι ένα χαρακτηριστικό

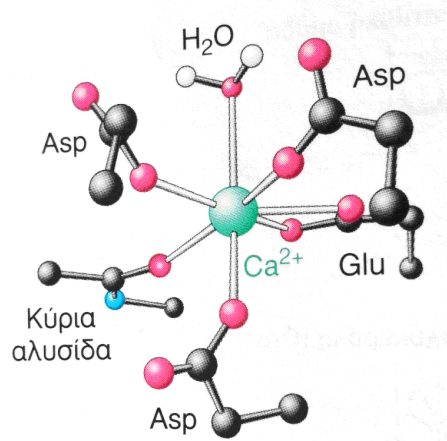
μοτίβο δέσμευσης των Ca^{2+} , που αποτελείται από μία έλικα, μία θηλιά και μία δεύτερη έλικα. Το μοτίβο αυτό που αρχικά ανακαλύφθηκε στην πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη, ονομάστηκε δομικό μοτίβο EF διότι οι έλικες που σχηματίζουν το μοτίβο δέσμευσης του ασβεστίου χαρακτηρίστηκαν E και F στην παρβαλβουμίνη και διότι οι δύο έλικες είναι διατεταγμένες όπως ο δείκτης και ο αντίχειρας του δεξιού χεριού (Σχήμα 1.6A) [81]. Επτά άτομα οξυγόνου σχηματίζουν το σύμπλοκο συναρμογής με κάθε Ca^{2+} έξι προερχόμενα από την πρωτεΐνη και ένα από ένα δεσμευμένο μόριο ύδατος. Στα θηλαστικά, η CaM κωδικοποιείται από τρία μη αλληλόμορφα γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, και συγκεκριμένα στον άνθρωπο από τα γονίδια *CALM1*, *CALM2* και *CALM3* τα οποία κωδικοποιούν μία πανομοιότυπη πρωτεΐνη [82]. Βάσει της μελέτης έκφρασης και των τριών γονιδίων της CaM στην ανθρώπινη καρδιά (αριστερή κοιλία) κατά την διάρκεια τριών σταδίων ανάπτυξης (εμβρυϊκή, βρεφική και ενήλικη), προκύπτει ότι και τα τρία γονίδια της CaM εκφράζονται και στα τρία στάδια ανάπτυξης με σειρά επιπέδου έκφρασης *CALM3*>*CALM2*>*CALM1* (Σχήμα 1.6B) [83].



Σχήμα 1.6: A) Το δομικό μοτίβο EF. Η έλικα E είναι κίτρινη, η έλικα F είναι μπλε και το ασβέστιο απεικονίζεται με την πράσινη σφαίρα. **B) Η θέση στα χρωμοσώματα του ανθρώπινου γονιδιώματος των γονιδίων της CaM (αριστερή στήλη).** Η σχετική έκφραση του mRNA για τα *CALM1*, *CALM2* και *CALM3* στην φυσιολογική ανθρώπινη καρδιά κατά την εμβρυϊκή, βρεφική και ενήλικη ανάπτυξη (δεξιά στήλη).

1.6.2 Καλμοδουλίνη και ασβέστιο

Το ασβέστιο (Ca^{2+}) αποτελεί έναν ενδοκυτταρικό αγγελιοφόρο πολλών πορειών μεταγωγής σήματος στα ευκαρυωτικά κύτταρα και ήδη έχει γίνει εκτενής αναφορά στον ρόλο του στον μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής του καρδιακού μυός. Η παρουσία αυξημένης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} είναι τοξική για το κύτταρο, ενώ παροδικές αυξομειώσεις της, γνωστές ως σπινθήρες Ca^{2+} (Ca^{2+} sparks), ελέγχουν μία πληθώρα φυσιολογικών κυτταρικών γεγονότων. Οι λόγοι που καθιστούν το Ca^{2+} ως αγγελιοφόρο μίας σειράς πορειών μέσα στο κύτταρο είναι αρκετοί. Πρώτον, τα σύμπλοκα του Ca^{2+} με φωσφορυλιωμένες ή καρβοξυλιωμένες ενώσεις είναι συνήθως αδιάλυτα, αλλά τέτοιες ενώσεις είναι θεμελιώδεις για πολλές βιοχημικές διεργασίες στο κύτταρο. Κατά συνέπεια, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} πρέπει να



Σχήμα 1.7: Ο τρόπος δέσμευσης του Ca^{2+} στην CaM.

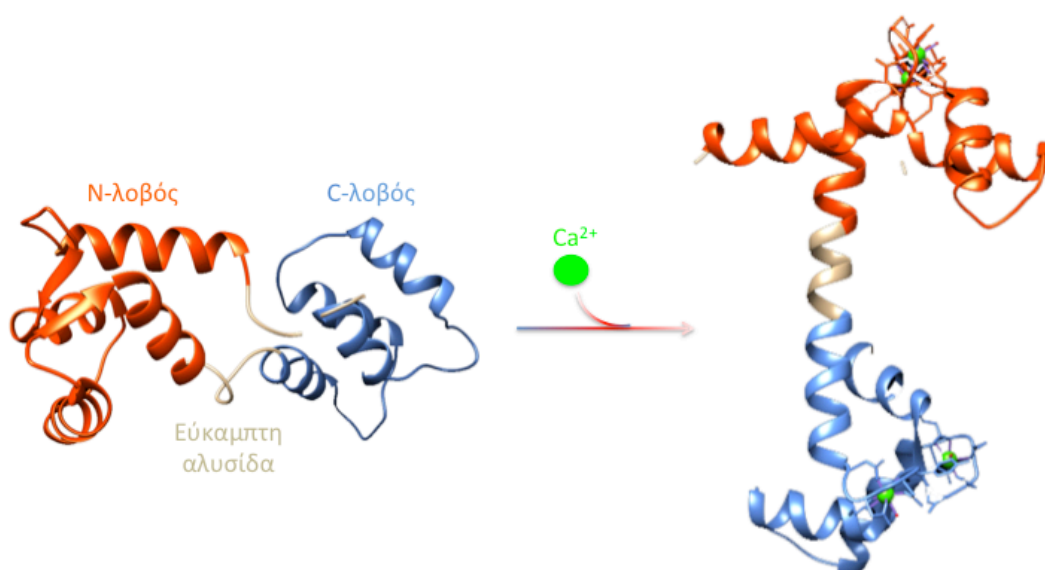
διατηρούνται χαμηλά έτσι ώστε να εμποδίζεται η καθίζηση αυτών των ενώσεων, γεγονός που συντελείται από συστήματα μεταφοράς, όπως η ATPάση Ca^{2+} και ο ανταλλάκτης νατρίου/ασβεστίου. Λόγω των δράσεων των συστημάτων αυτών, σε κατάσταση ηρεμίας, η $[\text{Ca}^{2+}]_i$ είναι περίπου 10^{-7} M, δηλαδή αρκετές τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από την συγκέντρωση Ca^{2+} εξωτερικά του κυττάρου, η οποία είναι $2,5 \times 10^{-3}$ M. Αυτή η βαθμίδωση συγκέντρωσης έχει σαν αποτέλεσμα η $[\text{Ca}^{2+}]_i$ να μπορεί να αυξηθεί αιφνίδια με σκοπό την σηματοδότηση μέσω μεταβατικής διάνοιξης διαύλων ασβεστίου της πλασματικής ή κάποιας ενδοκυτταρικής μεμβράνης. Μία δεύτερη ιδιότητα του Ca^{2+} είναι ότι μπορεί να δεσμεύεται ισχυρά σε πρωτεΐνες μέσω είτε αρνητικά φορτισμένων ατόμων οξυγόνου (από τις πλευρικές αλυσίδες του γλουταμινικού και του ασπαραγινικού) είτε μέσω μη φορτισμένων ατόμων οξυγόνου (από τις καρβονυλικές ομάδες των κυρίων αλυσίδων και τις πλευρικές ομάδες της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης) (Σχήμα 1.7). Η ικανότητα του Ca^{2+} να συναρμόζεται με πολλά προσδέματα (από έξι έως οκτώ

άτομα οξυγόνου) το καθιστά ικανό να σταυροσυνδέει διαφορετικά τμήματα μίας πρωτεΐνης και να επάγει σημαντικές αλλαγές στην στερεοδιάταξή της [84].

Βάσει της κρυσταλλικής της δομής, η CaM υιοθετεί μία διαμόρφωση τύπου αλτήρα (dumbbell-like conformation) με δύο σφαιρικές δομικές περιοχές στην αμινο- και την καρβοξυ-τελική περιοχή του μορίου (N- και C- λοβοί αντίστοιχα) οι οποίες συνδέονται μέσω μίας εύκαμπτης α-έλικας. Κάθε λοβός αποτελείται από δύο δομικά μοτίβα EF, όπου κάθε μοτίβο προσδένει ένα ιόν Ca^{2+} [85]. Η CaM φέρει δύο διαμορφώσεις ανάλογα με το αν είναι προσδεμένη (Ca^{2+}/CaM) ή όχι (apoCaM) με ασβέστιο. Και στις δύο αυτές διαμορφώσεις η CaM είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες. Στην apoCaM ο N-λοβός υιοθετεί μία πιο συμπαγή διαμόρφωση όπου οι έλικες και των δύο δομικών μοτίβων EF επιστοιβαδεύονται η μία πάνω στην άλλη, ενώ ο C-λοβός υιοθετεί μία ενδιάμεση/ημι-ανοιχτή διαμόρφωση όπου ένα μέρος των υδρόφοβων τμημάτων είναι εκτεθειμένο στην επιφάνεια του μορίου και προσβάσιμο σε διαλύτη. Το γεγονός αυτό πιθανόν να επιτρέπει στον C-λοβό της apoCaM να αλληλεπιδρά με κάποιες πρωτεΐνες-στόχους όταν τα επίπεδα της $[Ca^{2+}]_i$ είναι σε κατάσταση ηρεμίας [86]. Όταν τα επίπεδα $[Ca^{2+}]_i$ αυξάνονται, η CaM βρίσκεται στην Ca^{2+}/CaM διαμόρφωση όπου ένα Ca^{2+} προσδένεται σε κάθε δομικό μοτίβο EF. Τόσο ο N- όσο και ο C- λοβός αλλάζουν στερεοδιάταξη έτσι ώστε οι θέσεις δέσμευσης του Ca^{2+} να στρέφονται προς το εσωτερικό για να δεσμεύσουν Ca^{2+} , μετακινώντας τα υδρόφοβα αμινοξέα από το εσωτερικό προς το εξωτερικό αυτών των δομικών περιοχών. Αυτές οι στερεοδομικές αλλαγές προσανατολίζουν υδρόφοβα τμήματα στην επιφάνεια κάθε λοβού, τα οποία είναι κατάλληλα για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (Σχήμα 1.8) [87].

Ένα χαρακτηριστικό των μορίων που λειτουργούν ως αισθητήρες ασβεστίου είναι η ικανότητά τους να εντοπίζουν και να ανταποκρίνονται σε ένα βιολογικά συμβατό εύρος $[Ca^{2+}]_i$. Η CaM έχει το κατάλληλο αυτό προφίλ καθώς η συγγένεια σύνδεσης για το Ca^{2+} ($K_d = 5 \times 10^{-7}$ M με 5×10^{-6} M) είναι μέσα στο εύρος $[Ca^{2+}]_i$ των περισσότερων κυττάρων (10^{-7} M με 10^{-6} M). Η CaM έχει έναν επιπλέον τρόπο διάκρισης μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} καθώς το ζεύγος δομικών μοτίβων EF του C-λόβου εμφανίζει τρεις με πέντε

φορές υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης με το Ca^{2+} από ό,τι το αντίστοιχο ζεύγος του N-λοβού [87].



Σχήμα 1.8: Αλλαγές στερεοδιάταξης της CaM όπως επάγονται με τη δέσμευση του ασβεστίου.

1.6.3 Η CaM ως ρυθμιστής των RyR1 και RyR2

Η CaM αποτελεί βασικό ρυθμιστή των RyRs στην απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΣΔ/ΕΔ στον μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής. Η CaM προσδένεται άμεσα στους RyR1 και RyR2 με στοιχειομετρία 4 μόρια CaM/τετραμερές τόσο απουσία όσο και παρουσία ασβεστίου ρυθμίζοντας τις δύο αυτές ισομορφές του υποδοχέα με διαφορετικό τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, σε υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} (της τάξης των sub-mM έως μM) η CaM παρεμποδίζει τόσο τον RyR1 όσο και τον RyR2 ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} (της τάξης των nM) ενεργοποιεί τον RyR1 και παρεμποδίζει τον RyR2 [88-91]. Ορισμένοι ερευνητές ωστόσο υποστηρίζουν ότι η CaM στις υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} παρεμποδίζει τον RyR2, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} δεν επιφέρει επίδραση στην λειτουργία του RyR2 [92]. Πιθανόν, η διαφορά στην ρύθμιση των RyR1 και RyR2 από την CaM να οφείλεται στις διαφορές που εμφανίζουν οι υποδοχείς στον μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής. Από τα πρώτα στάδια της σύζευξης διέγερσης-συστολής είναι η απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΣΔ μέσω των RyRs. Η ενεργοποίηση των RyRs επιτυγχάνεται μέσω της δράσης των υποδοχέων DHPRs που βρίσκονται στην

μεμβράνη των T-σωληνίσκων, αρκετά κοντά στο ΣΔ, και διεγείρονται από την εκπόλωση αυτής της μεμβράνης λόγω εξωκυτταρικού σήματος με αποτέλεσμα την εισροή Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου. Στον σκελετικό μυ, η ενεργοποίηση του RyR1 γίνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον DHPR, ένα στάδιο που επιτυγχάνεται αρκετά γρήγορα (2 ms) [93]. Αντιθέτως, στον καρδιακό μυ, η ενεργοποίηση του RyR2 γίνεται μέσω του εξωκυτταρικού Ca^{2+} που εισρέει εσωτερικά του κυττάρου μέσω των DHPRs και όχι τόσο μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης RyR2-DHPR, μηχανισμός πιο αργός από τον αντίστοιχο του σκελετικού μύς [94].

Εστιάζοντας στον καρδιακό μυ, για την ομαλή διεξαγωγή της σύζευξης διέγερσης-συστολής του μύς, είναι απαραίτητη, πέρα από την συστολή του, και η χάλαση του μύς η οποία επιτυγχάνεται με τον τερματισμό της απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ, θεμελιώδης διαδικασία για τον κύκλο της καρδιακής λειτουργίας [95]. Ο μοριακός μηχανισμός του τερματισμού της απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ δεν είναι ακόμα γνωστός, παρόλα αυτά πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της απενεργοποίησης του RyR2, μέσω διαδικασίας η οποία επίσης δεν είναι γνωστή. Μία πληθώρα πειραματικών αποτελεσμάτων υποδεικνύουν ότι η μείωση των επιπέδων Ca^{2+} στον αυλό του ΣΔ που είναι αποτέλεσμα της απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ, παίζει σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση του RyR2 και στον τερματισμό της απελευθέρωσης [96-99]. Η χρήση χρωστικής που εντοπίζει τα Ca^{2+} στον αυλό του ΣΔ σε απομονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα, έδειξε ότι το μοτίβο σπινθήρων Ca^{2+} τερματίζεται όταν το περιεχόμενο του ΣΔ σε Ca^{2+} μειώνεται πέραν ενός ορίου, γνωστό ως όριο τερματισμού. Πιστεύεται ότι κύριο σήμα για τον τερματισμό της απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ μέσω των RyR2 αποτελεί η μείωση των Ca^{2+} στον αυλό του ΣΔ. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το όριο τερματισμού (~ 60% του επιπέδου Ca^{2+} στο ΣΔ σε κατάσταση ηρεμίας) φαίνεται να είναι ανεξάρτητο από το αρχικό φορτίο Ca^{2+} του ΣΔ, το μέγεθος της ροής απελευθέρωσης Ca^{2+} ή το επίπεδο του κυτταροπλασματικού ασβεστίου [96]. Σε παθολογικές καταστάσεις, το όριο τερματισμού μεταβάλλεται και μπορεί να ρυθμιστεί με την χρήση φυσιολογικών και φαρμακολογικών παραγόντων [100].

Η CaM αποτελεί βασικό ρυθμιστή του RyR2 στα μυοκαρδιακά κύτταρα μέσω ισχυρής πρόσδεσης ($K_d=10-20$ nM) και με ανασταλτική δράση παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΣΔ [101]. Βάσει αυτού του προφίλ, πιθανόν η CaM να εμπλέκεται στην ρύθμιση του τερματισμού απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ. Πράγματι, πρόσφατη *in vitro* μελέτη έδειξε ότι η αγρίου τύπου CaM αυξάνει το όριο τερματισμού, διευκολύνοντας τον τερματισμό, ενώ μεταλλάξεις της CaM σε θέσεις που αποτρέπουν την πρόσδεση του ασβεστίου, μειώνουν το όριο τερματισμού προκαλώντας καθυστέρηση στον τερματισμό της απελευθέρωσης Ca^{2+} . Επομένως, ο τερματισμός της απελευθέρωσης Ca^{2+} διευκολύνεται παρουσία CaM και συγκεκριμένα όταν στην CaM έχουν προσδεθεί Ca^{2+} (στον C-λοβό). Επιπλέον, εξάλειψη (deletion) της περιοχής πρόσδεσης της CaM (αα 3583-3603) ή τριπλή σημειακή μετάλλαξη (W3587A/L3591D/F3603A) που αποτρέπει την πρόσδεση της CaM στον RyR2 και την ανασταλτική δράση της CaM, επίσης μειώνουν το όριο τερματισμού. Ενδιαφέρον έχει και το γεγονός ότι οι μονές σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2 (W3587A, L3591D και F3603A) που δεν επηρεάζουν την ανασταλτική δράση της CaM αλλά απλώς μειώνουν την πρόσδεσή της στην κύρια περιοχή του RyR2, επίσης μειώνουν το όριο τερματισμού αναδεικνύοντας την πιθανότητα ύπαρξης και άλλων περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR2 που είναι απαραίτητες για την ανασταλτική της δράση [102]. Συνολικά, τόσο η CaM όσο και η ίδια η περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2 φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στο όριο τερματισμού της απελευθέρωσης Ca^{2+} . Η λειτουργία της περιοχής αυτής πιθανόν να ρυθμίζεται από την CaM με τρόπο εξαρτώμενο από το Ca^{2+} .

1.6.4 Οι περιοχές πρόσδεσης της CaM στους RyR1 και RyR2

Ο μηχανισμός ρύθμισης του RyR2 από την CaM δεν είναι πλήρως γνωστός. Για την κατανόησή του, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η εύρεση των περιοχών όπου η CaM προσδέεται στον RyR2.

Παρόλο που στην παρούσα διατριβή μελετάται η αλληλεπίδραση της CaM με τον RyR2, αναπόφευχτα, γίνεται αναφορά και στον RyR1 καθώς είναι η

καλύτερα μελετημένα ισομορφή και βάσει των αρχικών μελετών που αναφέρονταν στον RyR1 ακολούθησαν και κάποιες μελέτες για τον RyR2.

Οι πρώτες προσπάθειες εύρεσης περιοχών όπου προσδέεται η CaM στον RyR έγιναν όταν για πρώτη φορά κλωνοποιήθηκε το cDNA που κωδικοποιεί τον σκελετικό RyR1 [5] και τον καρδιακό RyR2 [9], όποτε και έγινε γνωστή η πρωτοταγής δομή των RyRs. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι περιοχές πρόσδεσης της CaM σε διάφορες πρωτεΐνες φέρουν ένα προβλεπόμενο μοτίβο αμφιπαθούς α-έλικας αποτελούμενης από δύο δέσμες θετικά φορτισμένες, οι οποίες διαχωρίζονται από μία υδρόφοβη περιοχή [103, 104], συνέβαλε στην εύρεση τέτοιων περιοχών στην πρωτοταγή δομή των RyRs. Συγκεκριμένα, βάσει της ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής των RyRs, προτάθηκαν ως πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR1 [5, 31, 105, 106] και τον RyR2 [9, 107], οι περιοχές όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2: Πιθανές θέσεις πρόσδεσης της CaM στους RyR1 και RyR2 βάσει της ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής των RyRs.

RyR1	2807-2840 2909-2930 3031-3049	Zorzato <i>et al.</i> Ref. 31
	3614-3637 4295-4325	Takeshima <i>et al.</i>
	2641-2657 3362-3374	Ref. 5
	3947-3965 4309-4322	Marks <i>et al.</i> Ref. 106
	1383-1400 1974-1996 3358-3374	Brandt <i>et al.</i> Ref. 105
RyR2	2775-2807 2877-2898 2998-3016	Otsu <i>et al.</i> Ref. 9
	3581-3604 4257-4286	Nakai <i>et al.</i> Ref. 107

Στην συνέχεια, ακολούθησε η εφαρμογή μίας σειράς από βιοχημικές μεθόδους για την εύρεση πιθανών περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR1 και τον RyR2, βασισμένες στις προτεινόμενες περιοχές δέσμευσης που προέκυψαν από την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας των μονομερών των RyRs. Μέσω επισήμανσης της CaM είτε με ραδιενεργά ισότοπα (^{125}I και ^{35}S) είτε με ουσίες που δίνουν αντιδράσεις χημειοφωταύγειας (DUTP-

διοξυγενίνη) ή φθορισμού (dansyl chloride), μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της CaM είτε με συντετηγμένες πρωτεΐνες (fusion proteins) είτε με συνθετικά πεπτίδια που αποτελούν τμήματα των RyR1 και RyR2 [88, 108-110]. Συγκεκριμένα, ορισμένες από τις πιθανές, βάσει πρωτοταγούς δομής, περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR1 που εμφάνισαν και πειραματικά ισχυρή πρόσδεση με την CaM σύμφωνα και με τα αποτελέσματα των βιοχημικών μεθόδων, ήταν οι συντετηγμένες πρωτεΐνες με αα 2063-2091, 3611-3642, 4303-4328 [110] και τα συνθετικά πεπτίδια 3610-3629, 4534-4552 [108] και 3042-3057 [109]. Αντίστοιχα, για τον RyR2 περιοχές ισχυρής πρόσδεσης αποτέλεσαν οι συντετηγμένες πρωτεΐνες με αα 263-615, 2724-3016, 3298-3595, 3543-3961, 4548-4748 [88] καθώς και τα συνθετικά πεπτίδια 3007-3023 και 4480-4497 [109]. Στην πρόσδεση των περιοχών αυτών του RyR με την CaM κύριο ρόλο έπαιξε η παρουσία Ca^{2+} , ενώ ορισμένες περιοχές εξακολουθούσαν να αλληλεπιδρούν με την CaM παρουσία EGTA, αντιδραστήριο που απομακρύνει τα ελεύθερα Ca^{2+} από το διάλυμα. Τον ενδιαφέρον των ερευνητικών ομάδων στράφηκε στην περιοχή με αα 3614-3643 για τον RyR1, ενώ για τον RyR2 στην περιοχή με αα 3583-3603, αλληλουχίες που αποτελούν πλέον την επικρατέστερη περιοχή πρόσδεσης της CaM στους RyRs και η οποία είναι γνωστή ως περιοχή πρόσδεσης της CaM (Calmodulin binding domain, CaMBD). Πριν αναφερθούμε εκτενώς στην CaMBD και στις μελέτες που ακολούθησαν, είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι η χρήση είτε λυμάτων κυτάρων (cell lysate) που περιέχουν τις υπό μελέτη συντετηγμένες πρωτεΐνες είτε συνθετικών πεπτιδίων για την μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με την CaM μέσω βιοχημικών μεθόδων, μπορεί να απλοποιεί τα πειράματα, όμως τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτές τις μελέτες πιθανόν να μην αντιπροσωπεύουν τι πραγματικά συμβαίνει με το πλήρες, άθικτο μόριο του RyR. Για παράδειγμα, ορισμένες από τις υπό μελέτη περιοχές είναι πιθανόν να βρίσκονται θαμμένες στο τετραμερές του RyR και να μην είναι προσβάσιμες από το μόριο της CaM, μίας διαλυτής πρωτεΐνης που μπορεί και προσδένεται σε αλληλουχίες που είναι εκτεθειμένες στην επιφάνεια του RyR, με αποτέλεσμα τα θετικά αποτελέσματα των παραπάνω βιοχημικών πειραμάτων να μην αντανakλούν κατ' ανάγκη το τι πραγματικά συμβαίνει μέσα στο κύτταρο.

1.6.4.1 Οι αλληλουχίες 3614-3643 και 3583-3603 ως η κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM (CaMBD) στον RyR1 και τον RyR2, αντίστοιχα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Ca^{2+}/CaM παρεμποδίζει τόσο τον RyR1 όσο και RyR2 ενώ η $aroCaM$ ενεργοποιεί τον RyR1 και παρεμποδίζει τον RyR2. Το ερώτημα που γεννάται είναι υπό ποιες συνθήκες η CaM μετατρέπεται από ενεργοποιητή σε αναστολέα του RyR1 με την πρόσδεση των Ca^{2+} στο μόριό της και γιατί δεν συμβαίνει το ίδιο και με τον RyR2. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι CaMBDs στους RyR1 και RyR2 παρουσιάζουν υψηλή ομολογία πρωτοταγούς δομής (Πίνακας 1.3). Το γεγονός αυτό ενισχύει την ιδιότητα των περιοχών αυτών να δρουν ως η κύρια CaMBD. Επίσης, δίνει την δυνατότητα άμεσης συσχέτισης των συμπερασμάτων που προκύπτουν από την μελέτη της αλληλεπίδρασης της CaM με τον RyR1 με τα αποτελέσματα της αντίστοιχης αλληλεπίδρασης με τον RyR2.

Πίνακας 1.3: Αμινοξική αλληλουχία της CaMBD στους RyR1 και RyR2 του ανθρώπου.

Human RyR1 [3614-3643]	KSKKAVWHKLLSKQRRRAVVACFRMTPLYNL
Human RyR2 [3583-3603]	KKAVWHKLLSKQRKRAVVACF

Βάσει πειραμάτων ήπιας πέψης με θρυψίνη μεμβρανών του ΣΔ πριν και μετά την επώαση με Ca^{2+}/CaM ή $aroCaM$, προκύπτει ότι οι περιοχές πρόσδεσης των Ca^{2+}/CaM και $aroCaM$ στον RyR1 είναι επικαλυπτόμενες διότι η προεπώαση τόσο με Ca^{2+}/CaM όσο και με $aroCaM$ προστατεύει από θρυψινόλυση μετά την Arg-3630 και την Arg-3637, αμινοξέα που ανήκουν στην περιοχή με αα 3614-3643 [111]. Με την χρήση του συνθετικού πεπτιδίου με αα 3614-3643 του RyR1 σε πειράματα πρόσδεσης με την ^{35}S -CaM απουσία και παρουσία Ca^{2+} , επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση και των δύο διαμορφώσεων στο παραπάνω πεπτίδιο, ενώ σε ίδια πειράματα με το αντίστοιχο πεπτίδιο πλην των 9 τελευταίων αμινοξέων (δηλ με το πεπτίδιο 3614-3634), προσδένεται η Ca^{2+}/CaM ενώ χάνει την πρόσδεσή της η $aroCaM$. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο λαμβάνει χώρα μία μετατόπιση του μορίου της CaM προς το N-τελικό άκρο της περιοχής πρόσδεσης της CaM, όταν η CaM προσδένει Ca^{2+} και μάλιστα

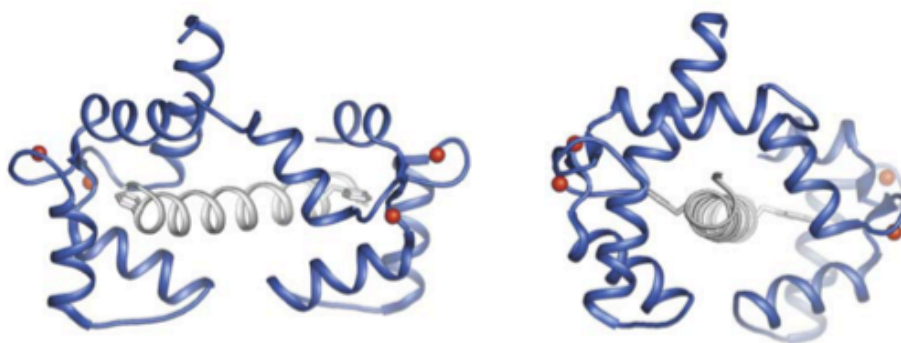
σε αυτή την μετατόπιση πιθανόν να έγκειται η διαφορά στην ρύθμιση του RyR1 από τις apoCaM και Ca²⁺/CaM [112]. Την μετατόπιση αυτή ενισχύουν και πειραματικά δεδομένα που βασίζονται σε τρισδιάστατες αναπαραστάσεις αλληλεπίδρασης των apo- και Ca²⁺/CaM με τον RyR1 μέσω της κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Πράγματι, επιβεβαιώνεται ότι οι περιοχές πρόσδεσης της apo- και της Ca²⁺/CaM στον RyR1 είναι επικαλυπτόμενες και υπολογίζουν την σχετική μετατόπιση περίπου στα 33 Å [113]. Ένα ερώτημα που γεννάται είναι κατά πόσο η μετατόπιση αυτή οφείλεται στην πρόσδεση των Ca²⁺ στον RyR1, με δεδομένο ότι τα Ca²⁺ αποτελούν επίσης ρυθμιστή του διαύλου, ή οφείλεται άμεσα στην πρόσδεση της Ca²⁺/CaM στον RyR1. Συγκρίνοντας τις δομικές αλλαγές που προκαλεί η πρόσδεση του Ca²⁺ στον RyR1 απουσία [114, 115] και παρουσία [113] των δύο ισομορφών της CaM, προκύπτει ότι οι δομικές αλλαγές που προκαλεί το Ca²⁺ από μόνο του στην γειννίαση των περιοχών πρόσδεσης των apo- και Ca²⁺/CaM στον RyR1 είναι δευτερεύουσας σημασίας σε σχέση με αυτή που προκαλείται παρουσία των δύο ισομορφών της CaM. Το γεγονός ότι η πρόσδεση του Ca²⁺ στην CaM και όχι στον RyR1 προκαλεί την μετατόπιση των 33 Å, ενισχύεται και από πειράματα ανίχνευσης της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (Fluorescence resonance energy transfer, FRET), όπου μία μεταλλαγμένη μορφή της CaM, στην οποία και οι τέσσερις περιοχές που προσδένουν Ca²⁺ έχουν καταστεί μη ικανές για σύμπλεξη Ca²⁺ (CaM₁₂₃₄), προσδένεται στην ίδια θέση όπου προσδένεται και η apoCaM στον RyR1, σε [Ca²⁺] τόσο της τάξης των nM όσο και των μM [116].

Η αμινοξική αλληλουχία 3583-3603 του RyR2 αποτελεί την CaMBD και αυτό ενισχύεται από πειράματα πρόσδεσης της ³⁵S-CaM σε χαμηλές και υψηλές για το κύτταρο [Ca²⁺]_i, στα οποία και οι δύο ισομορφές της CaM χάνουν την ικανότητα πρόσδεσής τους στον RyR2, όταν στο μόριο έχει γίνει εξάλειψη της περιοχής με aa 3583-3603. Σε πειράματα καταγραφής σήματος μονού διαύλου RyR2 που φέρει την εξάλειψη της CaMBD, η CaM εμφανίζει αισθητά μειωμένη παρεμπόδιση στην ενεργότητα του RyR2 σε σχέση με τον αγρίου τύπου υποδοχέα. Επιπλέον, σε πειράματα όπου έχουν λάβει χώρα μονές ή διπλές σημειακές μεταλλάξεις σε θέσεις που βρίσκονται μέσα στην CaMBD του RyR2 (W3587A, L3591D, F3603A, W3587A/L3591D και

L3591D/F3603A), η πρόσδεση της apoCaM στις μεταλλαγμένες μορφές του RyR2, εξαλείφεται ή μειώνεται σε μεγάλο βαθμό σε όλες τις περιπτώσεις. Αντίθετα, μόνο οι διπλές μεταλλάξεις οδηγούν σε απώλεια ή μειωμένη πρόσδεση της Ca^{2+} /CaM στις μεταλλαγμένες μορφές του υποδοχέα. Τέλος, για να μελετηθεί κατά πόσο η διαφορά στην ρύθμιση των RyR1 και RyR2 από την CaM οφείλεται στις μικρές διαφορές στα αμινοξέα που εμφανίζουν οι αντίστοιχες CaMBD, έλαβαν χώρα 4 υποκαταστάσεις αμινοξέων στην CaMBD του RyR2 από τα αντίστοιχα αμινοξέα της CaMBD του RyR1. Όπως βρέθηκε, η μεταλλαγμένη μορφή του RyR2 εμφανίζει πανομοιότυπη συμπεριφορά με τον αγρίου τύπου RyR2 τόσο στην πρόσδεσή του με την ^{35}S -CaM όσο και στην ρύθμισή του από την CaM. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η διαφορά στην ρύθμιση των RyR1 και RyR2 από τη CaM δεν οφείλεται στις μικρές διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία που παρουσιάζουν τα μόρια στην κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM αλλά σε κάποιες άλλες περιοχές που πιθανόν να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση CaM-RyR και όπου οι RyR1 και RyR2 διαφέρουν [117].

Σε μία σειρά πειραμάτων πρόσδεσης είτε ολόκληρου του μορίου της CaM είτε ξεχωριστά του N-λοβού (αα 1-79) και του C-λοβού (αα 78-148) με το πλήρες μόριο του RyR1 ή με το πεπτιδίο που αντιστοιχεί στην CaMBD του RyR1 (αα 3614-3643), προέκυψαν σημαντικά αποτελέσματα που έριξαν φως στην πρόσδεση της CaM στον RyR1. Σχετικά με το πλήρες μόριο του RyR1, η CaM εμφανίζει ισχυρότερη πρόσδεση, και σε χαμηλές και σε υψηλές $[Ca^{2+}]$, σε σχέση με τον C-λοβό, ενώ ο N-λοβός προσδένεται λίγο έως και καθόλου. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι για την πρόσδεση της CaM στον RyR1, αν και είναι πιθανόν να είναι πιο σημαντικός ο C-λοβός, είναι απαραίτητοι και οι δύο λοβοί. Σχετικά με το συνθετικό πεπτιδίο με αα 3614-3643, ο μεν C-λοβός της CaM προσδένεται ισχυρότερα από το πλήρες μόριο της CaM και στις δύο $[Ca^{2+}]$, ο δε N-λοβός δεν προσδένεται στο πεπτιδίο σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$, ενώ προσδένεται με πολύ μικρότερη συγγένεια από ό,τι ο C-λοβός σε υψηλές $[Ca^{2+}]$. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών φαίνεται ότι η περιοχή με αα 3614-3643 αποτελεί κυρίως την περιοχή που προσδένεται ο C-λοβός της CaM, ενώ ο N-λοβός πιθανόν να προσδένεται και σε άλλη περιοχή του RyR1 [118].

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχεται να ενισχύσει η δομή, που αναλύθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, του συμπλέγματος του συνθετικού πεπτιδίου του RyR1 με αα 3614-3643 και της Ca^{2+}/CaM [29]. Βάσει της κρυσταλλικής αυτής δομής (Σχήμα 1.9), η Ca^{2+}/CaM προσδένεται αντιπαράλληλα στο πεπτίδιο (ο C-λοβός αλληλεπιδρά με το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου και αντίστροφα), ενώ οι δύο λοβοί δεν έρχονται σε επαφή ο ένας με τον άλλον, σταθεροποιώντας το σύμπλεγμα Ca^{2+}/CaM -πεπτίδιο μέσω των αλληλεπιδράσεων του κάθε λοβού της Ca^{2+}/CaM με το αντίστοιχο μισό του πεπτιδίου. Επιπροσθέτως, ο C-λοβός αλληλεπιδρά ισχυρά με το N-τελικό τμήμα του πεπτιδίου με ασβεστιο-εξαρτώμενο τρόπο και κυρίως μέσω του αμινοξέος Trp-3620 του πεπτιδίου, ενώ ο N-λοβός αλληλεπιδρά ασθενώς με το C-τελικό τμήμα του πεπτιδίου κυρίως μέσω του αμινοξέος Phe-3636 [29].



*A.A. Maximciuc, J.A. Putkey, Y. Shamoo, K.R. Mackenzie, Complex of calmodulin with a ryanodine receptor target reveals a novel, flexible binding mode, Structure, 14 (2006) 1547-1556.

Σχήμα 1.9: Η κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος CaM /πεπτιδίου $RyR1$. Η CaM αναπαρίσταται με μπλέ χρώμα, το πεπτίδιο (αα 3614-3643) με γκρι και το ασβέστιο με κόκκινο.

Η ικανότητα του C-λοβού να προσδένεται στο πεπτίδιο του $RyR1$ με αα 3614-3643 απουσία του N-λοβού [118], η έλλειψη αλληλεπίδρασης των δύο λοβών μεταξύ τους στην κρυσταλλική δομή Ca^{2+}/CaM -πεπτίδιο του $RyR1$ καθώς και το ότι στο σύμπλεγμα αυτό σε διάλυμα επιτρέπονται ανεξάρτητες κινήσεις δομικών περιοχών των λοβών βάσει δεδομένων NMR, υποδεικνύουν την πιθανότητα απομάκρυνσης του N-λοβού από το πεπτίδιο στον ανέπαφο $RyR1$, χωρίς να διαταρράσσεται η αλληλεπίδραση του C-λοβού με αυτό. Ο N-λοβός πιθανόν να εκτοπίζεται από μία άλλη ανταγωνιστική περιοχή πρόσδεσης του $RyR1$ [29]. Επομένως, βάσει δομικών, βιοφυσικών και βιοχημικών μελετών, η CaM φαίνεται ότι προσδένεται στο πεπτίδιο με αα

3614-3643 του RyR1 μέσω των δύο ή και μέσω μόνο του C-λοβού, γεγονός που επιτρέπει στην CaM να προσδένεται στον RyR1 τόσο μέσω της περιοχής με αα 3614-3643 όσο και μέσω μίας άλλης μη παρακείμενης περιοχής, ταυτόχρονα.

Διπλός ρόλος της κύριας περιοχής πρόσδεσης της CaM στον RyR1

Μία επιπλέον μελέτη έδειξε δύο διαφορετικούς ρόλους της περιοχής 3614-3643 του RyR1, ως κύριας περιοχής πρόσδεσης της CaM και ως περιοχής που ρυθμίζει τον ίδιο τον RyR1, επιτρέποντας την σταθεροποίηση θεμελιωδών ιδιοτήτων του διαύλου, όπως η άμεση ρύθμιση του διαύλου και η απόκριση σε διάφορους ρυθμιστές. Συγκεκριμένα, σε πειράματα πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR1 (όπως έχει ήδη αναφερθεί η ρυανοδίνη προσδένεται ισχυρά στον υποδοχέα όταν ο διάυλος βρίσκεται στην ανοιχτή του διαμόρφωση), η παρουσία συνθετικού πεπτιδίου με αα 3614-3643 (CaM binding peptide, CaMBP), αυξάνει την πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR1 σε σχέση με την αντίστοιχη πρόσδεσή της απουσία του πεπτιδίου, υποδεικνύοντας την επιπρόσθετη λειτουργία της περιοχής αυτής ως ρυθμιστή του RyR1. Επιπροσθέτως, έλαβε χώρα η έκφραση του γονιδίου RyR1 αγρίου τύπου καθώς και του γονιδίου RyR1 όπου έχει γίνει εξάλειψη της περιοχής 3614-3643 σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τον RyR1. Η εξάλειψη της περιοχής 3614-3643 δεν επηρεάζει την έκφραση και τα επιπέδα έκφρασης του RyR1, ενώ η μεταλλαγμένη αυτή μορφή του RyR1 παρουσιάζει μειωμένη απελευθέρωση Ca²⁺ σε απόκριση της καφεΐνης, καθώς και αισθητά μειωμένη ενεργότητα. Τέλος, πειράματα πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR1 παρουσία διαφορετικών συνθετικών τμημάτων του CaMBP έδειξαν ότι το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου λειτουργεί ως ενεργοποιητής, ενώ το C-τελικό ως αναστολέας του RyR1, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η πρόσδεση του Ca²⁺ στην CaM οδηγεί σε μετατόπιση του μορίου προς το N-τελικό άκρο της περιοχής 3614-3643. Επιπλέον, επικάλυψη του τμήματος CaMBP που προκαλεί ενεργοποίηση του RyR1 οδηγεί στην παρεμπόδιση του διαύλου, ερμηνεύοντας την ανασταλτική δράση της Ca²⁺/CaM στον RyR1, η οποία προσδένεται στο N-τελικό άκρο της περιοχής 3614-3643. Αντιστρόφως, η apoCaM προσδένεται στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου, το οποίο έχει

ανασταλτική δράση για τον RyR1, ενεργοποιώντας κατ'αυτόν τον τρόπο τον δίαυλο [119].

1.6.4.2 Αλληλουχίες που πιθανόν δρουν ως μία, επιπλέον της κύριας, περιοχή πρόσδεσης της CaM στους RyR1 και RyR2, μέσω του N-λοβού

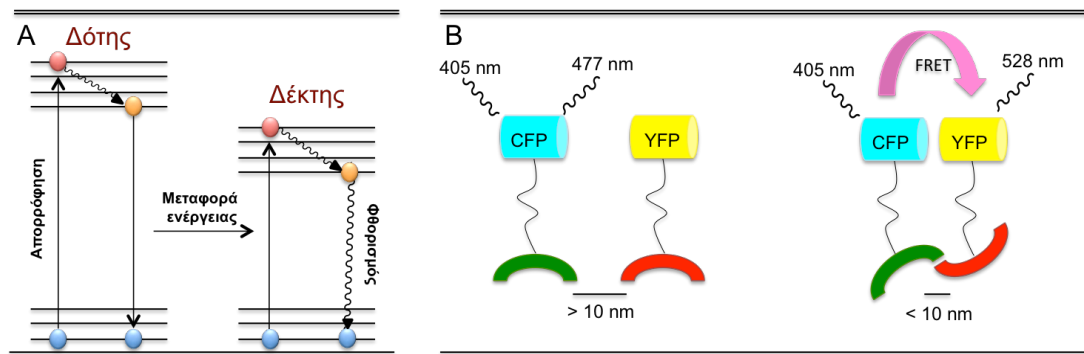
Οι περιοχές με αα 3614-3643 και 3583-3603 στον RyR1 και τον RyR2, αντίστοιχα, αποτελούν τις κύριες CaMBD, όπου η CaM προσδένεται κυρίως μέσω του C-λοβού της. Μία σειρά από πειραματικά δεδομένα, των οποίων έχει γίνει εκτενής αναφορά στο υποκεφάλαιο 1.6.3.1, οδήγησαν στην υπόθεση για ύπαρξη επιπλέον περιοχών στους RyR1 και RyR2 με χαρακτηριστικά ικανότητας πρόσδεσης της CaM κυρίως μέσω του N-λοβού. Οι περιοχές αυτές πιθανότατα περιλαμβάνουν αλληλουχίες του RyR1 και του RyR2 που διαφέρουν δομικά μεταξύ τους και στις οποίες πιθανόν να οφείλεται η διαφορά στην ρύθμιση των δύο αυτών ισομορφών του RyR από την CaM. Ακολούθησε μία σειρά μελετών για τον εντοπισμό τέτοιων πιθανών περιοχών.

Μία υποψήφια επιπλέον περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR1, είναι η περιοχή με αα 1975-1999. Συγκεκριμένα, μέσω πειραμάτων πρόσδεσης συνθετικών πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα θραύσματος μετά από θρυψινόλυση, που προστατεύεται από την apoCaM, σε σύστημα ηλεκτροφόρησης γέλης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, βρέθηκε ότι τόσο η apoCaM όσο και η Ca^{2+}/CaM προσδένονται στο συνθετικό πεπτίδιο 1975-1999 [120]. Μία επιπλέον πληροφορία για την θέση πρόσδεσης της CaM στον RyR1 προκύπτει από την οξειδωση του RyR1. Πιο συγκεκριμένα, η οξειδωση του RyR1 αυξάνει την ενεργότητα του διαύλου και επάγει σταυροσυνδέσεις μεταξύ γειτονικών υπομονάδων στο τετραμερές του RyR1 μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Επιπλέον, η οξειδωση του RyR1 παρεμποδίζει την πρόσδεση ραδιοεπισημασμένης CaM (^{125}I -CaM) και σε υψηλές και σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$, ενώ αντιστρόφως, η προσδεδεμένη CaM επιβραδύνει την οξειδωση του RyR1 [121]. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, πιθανόν η επιπλέον περιοχή πρόσδεσης της CaM να βρίσκεται σε θέση όπου λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση μεταξύ υπομονάδων στο τετραμερές του RyR1. Σε συνάρτηση με αυτό, βρέθηκε ότι μία από τις Cys, που εμπλέκονται σε αυτή την σταυροσύνδεση, βρίσκεται μέσα στην περιοχή του RyR1 με αα 3614-3643

[122] ενώ η δεύτερη Cys πιθανόν να βρίσκεται στην περιοχή 2000-2401 γειτονικής υπομονάδας του RyR1 [120], γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η περιοχή 1975-1999 αποτελεί μία δεύτερη περιοχή όπου προσδένεται η CaM, πιθανόν μέσω του N-λοβού.

Μέχρι στιγμής, έχει γίνει αναφορά σε βιοχημικές τεχνικές που έχουν αξιοποιηθεί για την μελέτη των περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR. Στις τεχνικές αυτές χρησιμοποιήθηκαν τμήματα του RyR ως συνθετικά πεππίδια ή ως λύματα κυττάρων (cell lysate) που περιέχουν τις υπό μελέτη συντετηγμένες πρωτεΐνες ή και ολόκληρο το μόριο του RyR σε *in vitro* μελέτες, χωρίς να παίρνουμε πληροφορίες για το τι συμβαίνει στην τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του RyR *in vivo*. Στην συνέχεια, θα γίνει αναφορά σε άρθρα που μας δίνουν πληροφορίες για την πρόσδεση της CaM στην τρισδιάστατη δομή των RyR1 και RyR2 με την εφαρμογή μεθόδων όπως η cryo-EM μέσω τρισδιάστατων αναπαραστάσεων καθώς και η μέθοδος FRET. Η cryo-EM, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, δίνει πληροφορίες για την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του διαύλου με σχετικά μεγάλη ανάλυση (διακριτική ικανότητα $\leq 30 \text{ \AA}$). Η μέθοδος FRET αποτελεί μία φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή στηρίζεται σε μετρήσεις της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού ανάμεσα σε δύο διαφορετικά φθοριοχρώματα –δότης και δέκτης- όταν αυτά βρίσκονται πολύ κοντά στο χώρο (σε απόσταση μεταξύ 1-10 nm). Ένα βασικό χαρακτηριστικό που πρέπει να έχουν τα φθοριοχρώματα είναι το φάσμα εκπομπής φθορισμού του δότη να αλληλοεπικαλύπτεται με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη (Σχήμα 1.10). Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς ενέργειας είναι αντιστρόφως ανάλογη, στην έκτη δύναμη, με την απόσταση μεταξύ δότη και δέκτη, καθιστώντας την μέθοδο FRET αρκετά ευαίσθητη σε μικρές αλλαγές της απόστασης αυτής [123].

Από τα πρώτα πειράματα που έλαβαν χώρα, ήταν ο προσδιορισμός της θέσης πρόσδεσης της CaM στους RyR1 και RyR2 σε μελέτες cryo-EM μέσω σύγκρισης της τρισδιάστατης αναπαράστασης του συμπλέγματος CaM/RyR

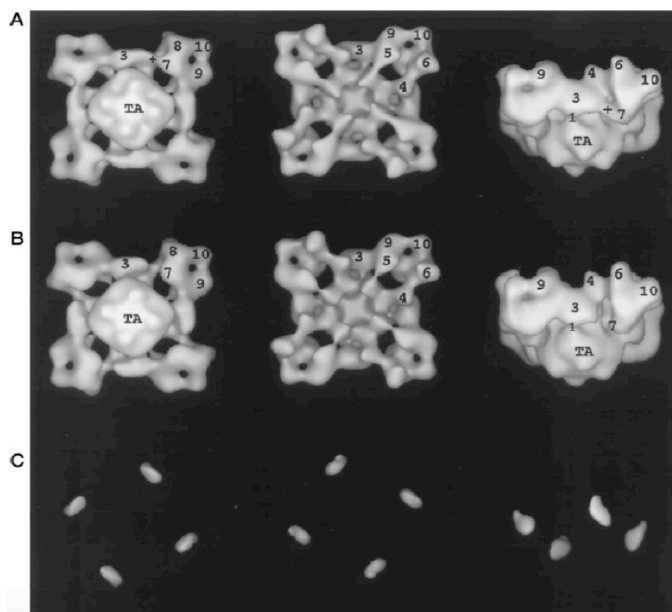


Σχήμα 1.10: Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού ανάμεσα σε έναν δότη και έναν δέκτη σε επίπεδο στοιβάδων (A) και μορίων (B).

σε σχέση με την τρισδιάστατη αναπαράσταση του RyR απουσία της CaM (Σχήμα 1.11). Βάσει αυτών των πειραμάτων βρέθηκε ότι η θέση πρόσδεσης της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ βρίσκεται μεταξύ των κυτταροπλασματικών περιοχών 3 και 7 στον RyR1 [114], ενώ της αροCaM μεταξύ των περιοχών 3 και 4 [116]. Στον RyR2 η θέση πρόσδεσης της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ δεν έγινε δυνατόν να εντοπιστεί με αυτά τα πειράματα, ενώ η θέση πρόσδεσης της αροCaM βρέθηκε μεταξύ των περιοχών 3 και 7, επομένως συγκριτικά με τον RyR1 είναι πιο κοντά στην θέση πρόσδεσης της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ στον RyR1 παρά σε αυτή της αροCaM. Πιθανόν, σε αυτή την διαφορά να οφείλεται η διαφορετική δράση των αροCaM και $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ στον RyR2 και τον RyR1 [116].

Σε πρόσφατη μελέτη, χαρτογραφήθηκαν δύο περιοχές στην τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του RyR2, που βάσει βιοχημικών μελετών αποτελούν πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι περιοχές με αα 3581-3612 και 4261-4286, μέσω της εισαγωγής του γονιδίου της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP σε συγκεκριμένες θέσεις στο cDNA του RyR2 και απεικόνιση του επισημασμένου RyR2 με 3D cryo-EM. Επιπλέον, με πειράματα FRET βρέθηκε ότι οι δύο αυτές περιοχές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στην ίδια υπομονάδα στο τετραμερές του RyR2, σχηματίζοντας μία θέση πρόσδεσης για την CaM [124]. Συγκεκριμένα, για την χαρτογράφηση της περιοχής 3581-3612 στον RyR2, έλαβε χώρα γενετικά η επισήμανση του αμινοξέος Arg3595 με την GFP. Στην συνέχεια έγινε απεικόνιση του $\text{RyR2}_{\text{R3595-GFP}}$ με cryo-EM και σε σύγκριση με την εικόνα του RyR2 αγρίου τύπου, βρέθηκε ότι η αλληλουχία 3581-3612 βρίσκεται στις περιοχές 3 και 8α, δηλαδή πολύ κοντά στις περιοχές όπου προηγούμενες μελέτες έδειξαν την

περιοχή πρόσδεσης των αρο- και $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ στον RyR1 και της αροCaM στον RyR2 [114, 116]. Η ίδια λογική ακολουθήθηκε και για την αλληλουχία 4261-4286, όπου αρχικά έγινε γενετικά επισήμανση του αμινοξέος Lys4269 με την GFP και βρέθηκε στην συνέχεια με απεικόνιση του RyR2_{K4269-GFP} με 3D cryo-EM, ότι η αλληλουχία αυτή εντοπίζεται στις περιοχές 3 και 7, αποτέλεσμα που βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες για την θέση πρόσδεσης της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ στον RyR1 και της αροCaM στον RyR2 [114, 116].



* T. Wagenknecht, M. Radermacher, R. Grassucci, J. Berkowitz, H.B. Xin, S. Fleischer, Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor, *The Journal of biological chemistry*, 272 (1997) 32463-32471.

Σχήμα 1.11: Απεικόνιση της τρισδιάστατης αναπαράστασης του συμπλέγματος $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -RyR1 (A) και του RyR1 (απουσία CaM) (B) καθώς και ύστερα από αφαίρεση της αναπαράστασης του $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -RyR1 από εκείνη του RyR1 (C). Για κάθε αναπαράσταση απεικονίζονται τρεις όψεις: από τον αυλό του ΣΔ (αριστερά), την πλευρά του κυτταροπλάσματος (μέσο) και παράλληλα με την μεμβράνη του ΣΔ (δεξιά)

Για την καταγραφή της δυναμικής της διαμόρφωσης των δύο αυτών περιοχών πρόσδεσης της CaM, αναπτύχθηκε ένα ζεύγος FRET και συγκεκριμένα ένα διπλά επισημασμένο μόριο RyR2 με τις φθορίζουσες πρωτεΐνες CFP (cyan fluorescent protein) και YFP (yellow fluorescent protein) ένθετες στην θέση μετά την Arg3595 και την Lys4269, αντίστοιχα. Στην συνέχεια, σε μετασχηματισμένα κύτταρα HEK293 με το cDNA του RyR2_{R3595-CFR/K4269-YFP} έλαβαν χώρα αναλύσεις FRET για τυχόν δομικές αλλαγές γύρω από τις δύο πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM. Να σημειωθεί ότι ο επισημασμένος υποδοχέας RyR2_{R3595-CFR/K4269-YFP} εξακολουθεί να λειτουργεί ως δίαυλος

ασβεστίου παρά την τροποποίηση που έχει υποστεί. Το σήμα FRET είναι υψηλό, γεγονός που υποδηλώνει την ενδομοριακή αλληλεπίδραση των περιοχών που εμπεριέχουν τις θέσεις R3595 και K4269 δηλαδή των αλληλουχιών 3581-3610 και 4261-4286, αντίστοιχα. Επιπλέον, ο RyR2_{R3595-CFR/K4269}-YFP παρουσία καφεΐνης, που δρα ως ενεργοποιητής του RyR2, εκπέμπει χαμηλότερης έντασης σήμα FRET, γεγονός που δείχνει ότι οι δύο φερόμενες ως αλληλουχίες πρόσδεσης της CaM, απομακρύνονται η μία από την άλλη όταν ο διάυλος μεταβαίνει από την κλειστή (μη λειτουργική) στην ανοιχτή (λειτουργική) διαμόρφωσή του [124]. Συμπερασματικά, από την μελέτη αυτή προκύπτει ότι πολλαπλές αλληλουχίες του RyR2 είναι πιθανόν να συνεισφέρουν στην θέση πρόσδεσης της CaM, μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, ενώ η θέση πρόσδεσης είναι πιθανόν να υφίσταται αλλαγές στην διαμόρφωση κατά την ρύθμιση της λειτουργίας του διαύλου.

Τέλος, μία άλλη προσέγγιση για την μελέτη των περιοχών πρόσδεσης της CaM στους RyRs αποτελεί η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC, isothermal titration calorimetry). Η μέθοδος ITC, είναι μία ποσοτική τεχνική η οποία καταγράφει τις θερμοδυναμικές παραμέτρους (όπως, μεταβολή ενθαλπίας, ελεύθερη ενέργεια Gibbs και μεταβολή εντροπίας) της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικρών μορίων (όπως πεπτιδία) και μεγαλύτερων μακρομορίων (όπως πρωτεΐνες), σε διάλυμα. Η τιτλοδότηση του υπό εξέταση μακρομορίου από τον προσδέτη λαμβάνει χώρα σε ένα κελί ειδικά διαμορφωμένο, όπου σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των υπό εξέταση μορίων λαμβάνει χώρα αλλαγή της θερμοκρασίας λόγω έκλυσης ή απορρόφησης θερμότητας όταν η αντίδραση είναι εξώθερμη ή ενδόθερμη, αντίστοιχα. Επομένως, η μέθοδος ITC χρησιμοποιείται για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μορίων δίνοντας πληροφορίες όπως η συγγένεια σύνδεσης και η στοιχειομετρία της αντίδρασης. Βάσει αυτής της μεθόδου, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση ολόκληρου του μορίου της CaM ή των N- και C-λοβών της ξεχωριστά, με τρεις υποψήφιες αλληλουχίες πρόσδεσης της CaM στον RyR2, απουσία και παρουσία Ca²⁺ [125]. Οι αλληλουχίες αυτές, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.12, είναι οι περιοχές με αα 1941-1965 (CaMBD1), 3580-3606 (CaMBD2), και 4246-4276 (CaMBD3), οι οποίες εμφανίζουν ομολογία με τις



* K. Lau, M.M. Chan, F. Van Petegem, Lobe-specific calmodulin binding to different ryanodine receptor isoforms, *Biochemistry*, 53 (2014) 932-946.

Σχήμα 1.12: Η αλληλουχία των τριών υπό εξέταση περιοχών πρόσδεσης της CaM στους RyR1, RyR2 και RyR3. Η αρίθμηση αφορά τον RyR1 του κουνελιού, τον RyR2 του ποντικού και τον RyR3 του ανθρώπου.

αντίστοιχες περιοχές στον RyR1 64, 89 και 26%, αντίστοιχα (Σχήμα 1.12). Ξεκινώντας από την CaMBD2, που είναι και η κύρια CaMBD: η Ca^{2+}/CaM προσδένεται πολύ ισχυρά στην CaMBD2, κυρίως μέσω του C-λοβού της, ενώ η $aroCaM$ προσδένεται λιγότερο ισχυρά στην CaMBD2 από ότι η Ca^{2+}/CaM , με συνεισφορά και των δύο λοβών της. Η αλληλουχία CaMBD1 του RyR2, η οποία εμφανίζει 64% ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία του RyR1 και έχει προταθεί, σε προηγούμενη μελέτη, ως επιπλέον περιοχή πρόσδεσης της CaM [120], βρέθηκε ότι προσδένεται μόνο με την Ca^{2+}/CaM και όχι με την $aroCaM$, μέσω του N-λοβού. Η πρόσδεση της Ca^{2+}/CaM στην CaMBD1 είναι πιο ασθενής από ό,τι στην CaMBD2, όμως η πρόσδεση του Ca^{2+}/N -λοβού είναι ισχυρότερη στην CaMBD1 σε σχέση με την CaMBD2, υποδηλώνοντας ότι η Ca^{2+}/CaM μπορεί να γεφυρώσει τις δύο αυτές περιοχές του RyR2. Τέλος, η CaMBD3 προσδένεται ισχυρότερα με την $aroCaM$ από ό,τι η $aroCaM$ με την CaMBD2 μέσω και των δύο λοβών της, γεγονός που υποδηλώνει ότι η CaMBD3 πιθανόν να αποτελεί την κύρια περιοχή πρόσδεσης της $aroCaM$. Η Ca^{2+}/CaM φαίνεται να προσδένεται στην CaMBD3, ασθενέστερα όμως σε σχέση με την CaMBD2 [125].

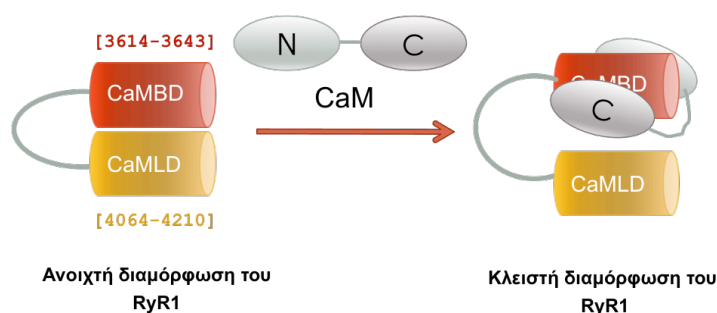
Συνοψίζοντας, για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της CaM στον RyR είναι απαραίτητη η εύρεση των περιοχών του RyR που συμμετέχουν στην

αλληλεπίδραση με την CaM, τόσο απουσία όσο και παρουσία Ca^{2+} . Όπως προκύπτει από μία πληθώρα πειραματικών μελετών, πολλαπλές αλληλουχίες του RyR φαίνεται να συμμετέχουν στον σχηματισμό της θέσης πρόσδεσης της CaM στο τετραμερές του RyR. Μέχρι στιγμής, η επικρατέστερη αλληλουχία πρόσδεσης της CaM στον RyR1 και τον RyR2 είναι η αλληλουχία 3614-3643 και 3583-3603, αντίστοιχα, που παρουσιάζει υψηλή δομική αλληλουχία μεταξύ των δύο ισομορφών του υποδοχέα. Όπως προκύπτει από μία σειρά πειραματικών δεδομένων, η περιοχή αυτή προσδένεται κυρίως με την Ca^{2+}/CaM μέσω του C-λοβού της. Στην συνέχεια, έχει προταθεί και μία σειρά περιοχών της N-τελικής και της C-τελικής περιοχής του RyR, στις οποίες έχει γίνει εκτενής αναφορά στο υπο-κεφάλαιο αυτό, που πιθανόν να αποτελούν περιοχές πρόσδεσης της Ca^{2+}/CaM , κυρίως μέσω του N-λοβού της, είτε της apoCaM. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η CaM ρυθμίζει τους RyRs και των περιοχών πρόσδεσής της στις ισομορφές αυτών των υποδοχέων.

1.6.4.3 Η αλληλουχία 4064-4210 του RyR1 ως περιοχή που μοιάζει δομικά με την CaM (CaM-like domain, CaMLD)

Σύμφωνα με θεωρητική πρόβλεψη που επιβεβαιώθηκε πειραματικά, η περιοχή του RyR1 με αα 4064-4210 φαίνεται να προσομοιάζει δομικά με την CaM, γι' αυτό χαρακτηρίζεται και ως περιοχή που μοιάζει με την CaM (CaM-like domain, CaMLD). Η περιοχή αυτή περιέχει δύο δομικά μοτίβα EF που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης του Ca^{2+} -μάλιστα η πρόσδεση Ca^{2+} προκαλεί δομικές αλλαγές στην περιοχή (έκθεση υδροφοβικών τμημάτων). Επίσης, η CaMLD προσδένεται στον RyR1, στους διαύλους ασβεστίου τύπου L και σε διάφορα πεπτιδία που δεσμεύουν CaM, συμπεριλαμβανομένου του πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην CaMBD του RyR1 (CaMBP, αα 3614-3643). Ένα άλλο χαρακτηριστικό της περιοχής αυτής είναι ότι σε πειράματα πρόσδεσης της [3H]ρυανοδίνης στον RyR1, η περιοχή αυτή φαίνεται να επηρεάζει την λειτουργικότητα του διαύλου με ασβεστιο-εξαρτώμενο τρόπο [126]. Τον ρόλο της περιοχής αυτής στον μηχανισμό αλληλεπίδρασης της CaM με τον RyR1, ενισχύει το γεγονός ότι η πρόσδεση του CaMBP τόσο σε ολόκληρο το μόριο του RyR1 όσο και στην περιοχή του RyR1 με αα 3543-4271 (περιοχή που περιέχει και την CaMBD και την CaMLD) εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες

σχετικά με την πρόσδεση του CaMBP, τις τοπικές αλλαγές στην διαμόρφωση και την απελευθέρωση Ca^{2+} [127]. Επιπροσθέτως, η χρήση αντι-πεπτιδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων, που αναπτύχθηκαν έναντι των αλληλουχιών 3614-3643 (CaMBD) και 4114-4142 (που ανήκει στην CaMLD) του RyR1, σε πειράματα πρόσδεσης [3H]ρυανοδίνης στον RyR1, έδειξε ότι και τα δύο αντισώματα παρεμποδίζουν τον RyR1, γεγονός που υποδεικνύει ότι και οι δύο περιοχές είναι απαραίτητες για την λειτουργία του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την υπόθεση ότι η ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των CaMBD και CaMLD ενεργοποιεί τον δίαυλο και τα παραπάνω αντισώματα παρεμβαίνουν στην ενδομοριακή αυτή αλληλεπίδραση παρεμποδίζοντας τον δίαυλο. Μάλιστα, η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται τόσο με ασβεστιο-εξαρτώμενο τρόπο, όσο και με τρόπο που εξαρτάται από την δράση αγωνιστών του RyR1 [128]. Βάσει των συνολικών δεδομένων που προκύπτουν από τις παραπάνω μελέτες για την περιοχή με αα 4064-4210, προκύπτει μία θεωρία σύμφωνα με την οποία απουσία της CaM λαμβάνει χώρα ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών CaMBD και CaMLD οδηγώντας στην ενεργοποίηση του RyR1, ενώ η παρουσία της CaM διαταράσσει την αλληλεπίδραση αυτή, παρεμποδίζοντας τον δίαυλο (Σχήμα 1.13). Η θεωρία αυτή μπορεί να εξηγήσει την ανασταλτική δράση της CaM τόσο στον RyR1 όσο και στον RyR2 (παρόλο που μέχρι στιγμής δεν έχει εντοπιστεί αντίστοιχη CaMLD περιοχή στον RyR2), αποτυγχάνει όμως να εξηγήσει την δράση της CaM ως ενεργοποιητή του RyR1 σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$.



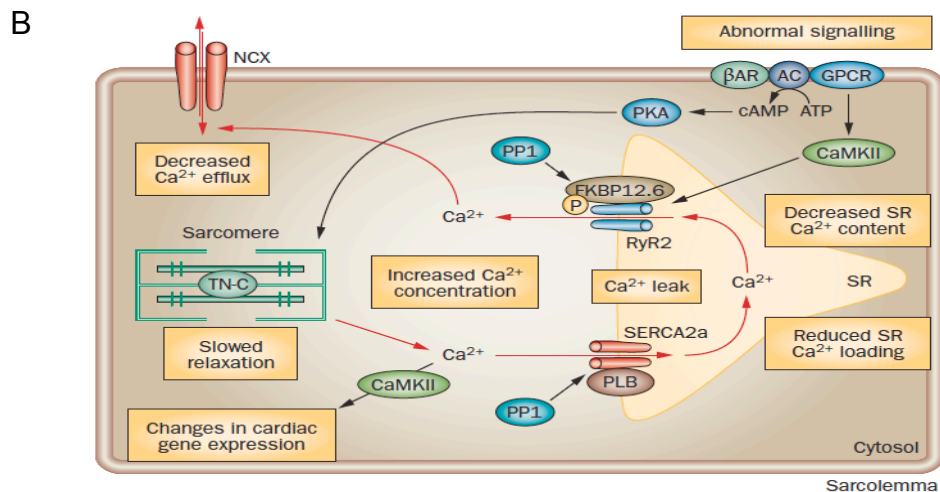
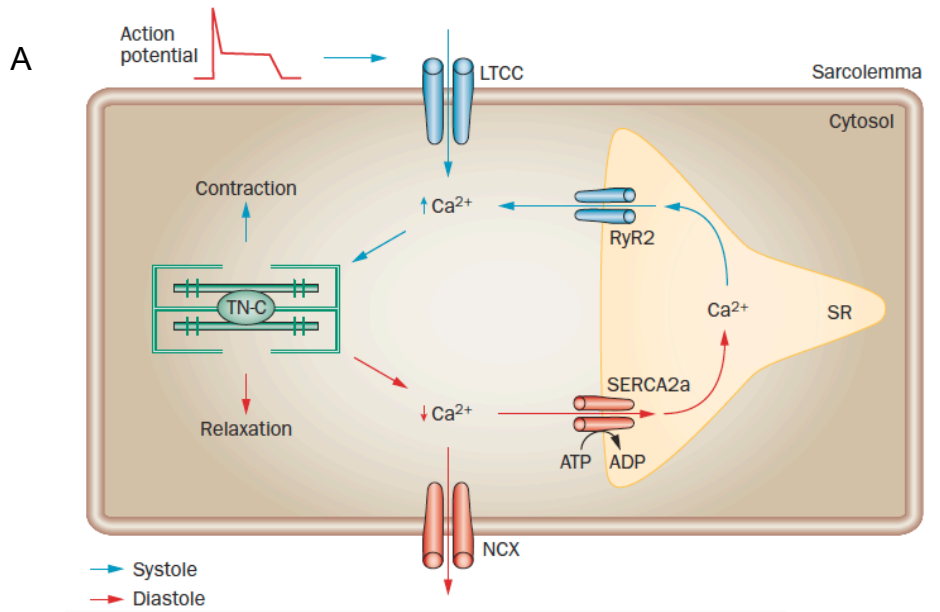
CaMBD: Calmodulin Binding Domain

CaMLD: Calmodulin Like Domain

Σχήμα 1.13: Σχηματική απεικόνιση της θεωρίας που αναφέρεται στην ύπαρξη της CaMLD στον RyR1.

1.7 Παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με δυσλειτουργία του καρδιακού RyR2

Η καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί την αιτία περίπου 200.000 θανάτων ετησίως μόνο στις ΗΠΑ. Περίπου το 50% των θανάτων αυτών είναι αιφνίδιοι και ενδεχομένως συνέπεια θανατηφόρας κοιλιακής ταχυαρρυθμίας [129]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της καρδιακής ανεπάρκειας αποτελεί η δυσλειτουργία ιοντικών διαύλων, γεγονός που υποδηλώνει πολλά σχετικά με την ανακατανομή (electrical remodeling) του ηλεκτρικού σήματος που λαμβάνει χώρα σε κυτταρικό επίπεδο στην παθολογική αυτή κατάσταση, προδιαθέτοντας τους ασθενείς για αρτηριακή και κοιλιακή αρρυθμία. Η περιορισμένη γνώση μας για τους θεμελιώδεις μηχανισμούς που προκαλούν αρρυθμία, σε ιοντικό και μοριακό επίπεδο, αποτελεί τροχοπέδη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμακολογικών θεραπειών για τους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [130]. Η σύζευξη διέγερσης-συστολής, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, αποτελεί μία κυκλική διαδικασία, όπου κύριο ρόλο παίζει το Ca^{2+} . Στα φυσιολογικά μυοκαρδιακά κύτταρα, σε κατάσταση συστολής, λαμβάνει χώρα εισροή Ca^{2+} από το εξωτερικό του κυττάρου καθώς και εκροή από το ΣΔ, με αποτέλεσμα την αύξηση της $[Ca^{2+}]$ στο κυτταρόπλασμα, ενώ κατά την διαστολή επέρχεται μείωση της $[Ca^{2+}]$ στα επίπεδα ηρεμίας του κυττάρου μέσω επιστροφής του Ca^{2+} τόσο στο ΣΔ όσο και εξωτερικά του κυττάρου (Σχήμα 1.14A). Κάθε μορφή δυσλειτουργίας σε οποιοδήποτε στάδιο του μηχανισμού της σύζευξης διέγερσης-συστολής στον καρδιακό μυ οδηγεί σε μη φυσιολογικές καταστάσεις διαστολής και συστολής, καθώς επίσης και σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης κοιλιακών αρρυθμιών. Οι δυσλειτουργίες αυτές είναι αποτέλεσμα μεταβολής της έκφρασης ή της λειτουργίας των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την ομοιόσταση του ασβεστίου. Ο RyR2 αποτελεί βασικό μόριο για την σωστή λειτουργία της σύζευξης διέγερσης-συστολής, καθώς απελευθερώνει Ca^{2+} από το ΣΔ, την ενδοκυτταρική αποθήκη των καρδιακών κυττάρων, στο κυτταρόπλασμα, απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της συστολής της καρδιάς.



* C. Kho, A. Lee, R.J. Hajjar, Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling--targets for heart failure therapy, Nat Rev Cardiol, 9 (2012) 717-733.

Σχήμα 1.14: Ο κύκλος του Ca^{2+} σε ένα φυσιολογικό (A) και σε ένα μη φυσιολογικό μυοκαρδιακό κύτταρο (B).

Επομένως, η δυσλειτουργία του RyR2 ευθύνεται για παθολογικές καταστάσεις της καρδιάς, όπως η καρδιακή ανεπάρκεια και διάφορες μορφές αρρυθμίας. Συγκεκριμένα, διάφορες μελέτες έδειξαν αυξημένη διαρροή Ca^{2+} από το ΣΔ κατά την διαστολή ως αποτέλεσμα δυσλειτουργίας του RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια [131, 132]. Η διαρροή Ca^{2+} στην διαστολή εξαντλεί τις αποθήκες των Ca^{2+} και ενδεχομένως να εξασθενεί την συστολή των μυοκαρδιακών κυττάρων [133] (Σχήμα 1.14B).

Τα επίπεδα έκφρασης του RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια δεν εμφανίζουν διαφορά σε σχέση με την φυσιολογική κατάσταση της καρδιάς στον άνθρωπο

[134]. Παρόλα αυτά, στην καρδιακή ανεπάρκεια παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του RyR2 από την PKA [53, 135]. Έχει γίνει αναφορά και στο υποκεφάλαιο 1.5.1 σχετικά με την υπερφωσφορυλίωση του RyR2 από την PKA. Η χρόνια υπερ-ενεργότητα του μονοπατιού της β-αδρενεργικής διέγερσης πιθανόν να οδηγεί στην υπερ-ενεργότητα της PKA και ακολούθως στην υπερφωσφορυλίωση του RyR2 (αμινοξέα Ser2008 και Ser2009) σε κατάσταση καρδιακής ανεπάρκειας. Ο RyR2, επίσης, υπερφωσφορυλιώνεται και από την CaMKII (αμινοξέα Ser2814 και Ser2815). Μέχρι στιγμής η επίδραση της υπερφωσφορυλίωσης του RyR2 στην ενεργοποίηση του διαύλου δεν είναι ξεκάθαρη. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η υπερφωσφορυλίωση του RyR2 από την PKA ενεργοποιεί τον δίαυλο [53, 135], ενώ άλλες μελέτες ισχυρίζονται ότι η πιθανότητα να βρίσκεται ο δίαυλος στην ανοιχτή του διαμόρφωση ελαφρώς μειώνεται σε απόκριση φωσφορυλίωσης [136, 137]. Στον φυσιολογικό μηχανισμό της φωσφορυλίωσης του RyR2 φαίνεται να εμπλέκεται το μακρομοριακό σύμπλεγμα που αποτελείται από την PKA, τον FKBP12.6, τις φωσφατάσες PP1 και PP2A (PP1 και 2, protein phosphatase 1 and 2A) καθώς και την πρωτεΐνη mAKAP [53]. Εναλλακτικά, τα επίπεδα και επομένως η λειτουργικότητα της PKA δεν μεταβάλλονται στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια αλλά μειώνονται τα επίπεδα των φωσφατάσων PP1 και PP2A στο σύμπλεγμα του RyR2. Οι μεταβολές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τον μειωμένο ρυθμό αποφωσφορυλίωσης του RyR2 καθώς και τον μειωμένο ρυθμό διάσπασης του FKBP12.6 από τον RyR2 [133]. Αυτό οδηγεί στην αύξηση της ευαισθησίας του RyR2 για τα Ca^{2+} που ενεργοποιούν τον υποδοχέα καθώς και στην διαρροή Ca^{2+} από το ΣΔ κατά την διαστολή, αιτίες που σχετίζονται με την καρδιακή ανεπάρκεια.

Για την θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, μία πρωτοποριακή στρατηγική αποτελεί η ανάπτυξη φαρμάκων που αποτρέπουν την διαρροή των Ca^{2+} από το ΣΔ με το να σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση μεταξύ του RyR2 και του FKBP12.6 [138-140]. Κατά αυτό τον τρόπο, έχουν αναπτυχθεί φάρμακα, όπως το K201, που παρεμποδίζουν την διαρροή Ca^{2+} με το να επαναφέρουν την φυσιολογική ρύθμιση του διαύλου ή να προάγουν την αλληλεπίδραση RyR2-FKBP12.6 [140, 141]. Ένα επιπλέον φάρμακο είναι το ivabradine, το

οποίο αυξάνει την έκφραση του FKBP12.6 σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση RyR2-FKBP12.6 και παρεμποδίζοντας την διαρροή Ca^{2+} από το ΣΔ [138, 139]. Αναστολείς της CaMKII (KN-93), αλλά όχι της PKA, επίσης μειώνουν την διαστολική διαρροή Ca^{2+} από το ΣΔ, γεγονός που υποδηλώνει ότι έναντι της PKA, η CaMKII παίζει σημαντικό ρόλο στην υπερφωσφορυλίωση του RyR2 σε καταστάσεις καρδιακής ανεπάρκειας [142]. Μία άλλη προσέγγιση σε ερευνητικό επίπεδο εμπλέκει τον αυξητικό παράγοντα NRG1. Ο NRG1 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς και παίζει ρόλο-κλειδί στην ανάπτυξη της καρδιάς και στην διατήρηση της δομικής και λειτουργικής της ακεραιότητας, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλεται η έκφραση και η σηματοδότησή του σε μοντέλα αρουραίων που πάσχουν από καρδιακή ανεπάρκεια [143]. Η χρήση ανασυνδυασμένου ανθρώπινου NRG1 επαναφέρει την σωστή ρύθμιση των Ca^{2+} και ενισχύει την καρδιακή συστολή με το να καταστέλει την έκφραση των φωσφατασών PP1 και 2 και να αυξάνει την ενεργοποίηση της SERCA2 [144].

Μία επιπλέον αιτία που συνδέει τον RyR2 με παθολογικές καταστάσεις, όπως η κατεχολαμινεργική πολυμορφική κοιλιακή ταχυκαρδία (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT), είναι ένας μεγάλος αριθμός σημειακών μεταλλάξεων στον καρδιακό RyR2 [145]. Συγκεκριμένα, ο παθολογικός ρόλος της μετάλλαξης R4497C στον RyR2 φάνηκε σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται ως μοντέλα ποντίκια που φέρουν την μετάλλαξη αυτή, και έδειξαν ότι η μορφολογία και η ένταση της αρρυθμίας καθώς και η ελλιπή απόκριση σε β - αναστολείς των ποντικών που φέρουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη, ήταν όμοια με αυτή των ασθενών με CPVT [146].

Επιπλέον, μία σειρά μελετών αναδεικνύει την επίδραση συγκεκριμένων μεταλλάξεων του RyR2 στην λειτουργία της καρδιάς ειδικά στα πρώτα στάδια ανάπτυξής της, ιδιαίτερα σε σχέση με ελλιπή ρύθμιση των μεταλλαγμένων μορφών RyR2 από την CaM. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα ποντίκια (knock-in mouse) που φέρουν την τριπλή μετάλλαξη W3587A/L3591D/F3603A (RyR^{ADA}) στο γονίδιο του RyR2. Η τριπλή αυτή μετάλλαξη αφορά την περιοχή πρόσδεσης της CaM (αα 3583-3603) με αποτέλεσμα η CaM να αδυνατεί να προσδεθεί στον RyR2 και κατά συνέπεια να αδυνατεί να ρυθμίσει σωστά την λειτουργία

του. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, έδειξαν ότι η ελλιπής ρύθμιση του RyR2 από την CaM σχετίζεται με μη φυσιολογική απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΣΔ καθώς και μεταβολή στην γονιδιακή ρύθμιση, προφίλ που οδηγεί σε υπερτροφία της καρδιάς και πρόωρο θάνατο σε ομόζυγα στην συγκεκριμένη μετάλλαξη ποντίκια [147]. Τα αποτελέσματα αυτά έρχεται να ενισχύσει μία επιπλέον μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε η ίδια τριπλή μετάλλαξη, εξετάζοντας αυτή την φορά την επίδραση αυτής στο προφίλ των Ca^{2+} . Η μετάλλαξη RyR^{ADA} επιφέρει μείζονες ανωμαλίες στα Ca^{2+} -εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια κυττάρων πρόσφατα απομονωμένων από υπερτροφική καρδιακή κοιλία (π.χ. εμφάνιση μεγαλύτερης διάρκειας αλλά μικρότερης συχνότητας σπινθήρων Ca^{2+}) [148]. Τέλος, η ελαττωματική πρόσδεση της CaM στον RyR2 παίζει ρόλο-κλειδί στην δυσλειτουργία του διαύλου που σχετίζεται με την CPVT. Συγκεκριμένα, σε *in vivo* μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα ποντίκια knock-in που φέρουν την μετάλλαξη R2474S στο μόριο του RyR2, μετάλλαξη που σχετίζεται με παθολογία τύπου CPVT, έδειξαν σημαντική μείωση της συγγένειας πρόσδεσης της CaM στον RyR2 σε απόκριση φωσφορυλίωσής του από την PKA, διαρροή Ca^{2+} κατά την διαστολή καθώς και θανατηφόρα αρρυθμία [149].

1.7.1 Μεταλλάξεις στο μόριο της CaM που σχετίζονται με καρδιακές ασθένειες

Την τελευταία 5ετία, βάσει γενετικών μελετών έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την CaM σε ασθενείς που πάσχουν από διάφορες μορφές ρυθμικών καρδιακών διαταραχών που σχετίζονται με αιφνίδιους καρδιακούς θανάτους κυρίως στην βρεφική και παιδική ηλικία, συμπεριλαμβανομένης της CPVT, του LQTS (Long-QT syndrome) και της ιδιοπαθούς κοιλιακής μαρμαρυγής (Idiopathic ventricular fibrillation, IVF) [83, 150-152]. Οι ασθενείς τόσο με CPVT όσο και με LQTS, δεν φέρουν αλλαγές στα ανατομικά χαρακτηριστικά της καρδιάς, έχουν χαρακτηριστικό ηλεκτροκαρδιογράφημα, εμφανίζουν επεισόδια συγκοπής και καρδιακής προσβολής σε μικρή ηλικία, συνήθως κατά την διάρκεια έντονης άσκησης ή έντονων συναισθημάτων και πιθανόν να έχουν οικογενειακό ιστορικό (κληρονομικότητα). Από την άλλη, οι ασθενείς με IVF δεν έχουν χαρακτηριστικό ηλεκτροκαρδιογράφημα και η γενετική παρακολούθηση είναι

δύσκολη λόγω του ότι η διάγνωση ασθενούς με IVF γίνεται αφού το άτομο έχει υποστεί επεισόδιο αρρυθμίας. Το γεγονός αυτό περιορίζει τον αριθμό των διαθέσιμων μελών μιας οικογένειας για γενετικές μελέτες [151].

Σε μοριακό επίπεδο, οι μορφές CPVT χαρακτηρίζονται από δυσλειτουργία του RyR2 σε κατάσταση διαστολής λόγω διαρροής Ca^{2+} από το ΣΔ. Η δυσλειτουργία αυτή, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις στον RyR2 που σχετίζονται με την ελλιπή ρύθμιση του υποδοχέα από την CaM. Η διαρροή αυτή των Ca^{2+} προκαλεί αναστροφή στον ιονανταλλάκτη Na^+/Ca^{2+} οδηγώντας σε επιβραδυνόμενη εκπόλωση, η οποία γεννά χαρακτηριστική πολυμορφική ταχυκαρδία [153]. Το LQTS, από την άλλη, σχετίζεται με μεταλλάξεις στους διαύλους καλίου KCNQ1, KCNH2 [154, 155], στον δίαυλο νατρίου SCN5A [156] καθώς και σε μεταλλάξεις στην α-υπομονάδα του διαύλου ασβεστίου L-τύπου, $Ca_{v1.2}$ [157, 158]. Οι C-τελικές περιοχές των διαύλων αυτών φέρουν περιοχές πρόσδεσης της CaM και αποτελούν μόρια-στόχους της [159, 160]. Για τον λόγο αυτό, στις γενετικές μελέτες των ασθενών με CPVT και LQTS, έλαβε χώρα πρώτα ο προσδιορισμός της αλληλουχίας αυτών των γονιδίων (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A* κ.λπ.) και βρέθηκε ότι τα γονίδια αυτά δεν φέρουν τις χαρακτηριστικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις παραπάνω ασθένειες. Στην συνέχεια, λόγω του ότι στα καρδιακά κύτταρα η CaM θεωρείται ως αναστολέας της σύζευξης διέγερσης-συστολής, καθώς δρα σε μία σειρά πρωτεϊνών-κλειδιών όπως ο RyR2, οι δίαυλοι καλίου, νατρίου και ασβεστίου τύπου L, με τρόπο που μπορεί να μειώσει τον ρυθμό του μηχανισμού αυτού, ακολούθησε ο προσδιορισμός αλληλουχίας των γονιδίων της CaM. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, στον άνθρωπο, τρία γονίδια που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (*CALM1*, 2 και 3) κωδικοποιούν πρωτεΐνη ίδιας ακριβώς αμινοξικής αλληλουχίας. Μία μετάλλαξη σε ένα από τα 6 αλληλόμορφα, ενός εκ των τριών γονιδίων, αρκεί για να προκαλέσει παθολογικό φαινότυπο. Πράγματι, βρέθηκε μία σειρά από μεταλλάξεις κυρίως στα γονίδια *CALM1* και *CALM2* με φαινότυπο IVF, CPVT ή/και LQTS (Πίνακας 4).

Βάσει του Πίνακα 1.4, η συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου ανάμεσα στα άτομα που φέρουν τις μεταλλάξεις της CaM, πιθανόν, να παρέχει στοιχεία για

τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις D132E και Q136P στο *CALM2*, που συνδυάζουν κλινικά χαρακτηριστικά και από την

Πίνακας 1.4: Μεταλλάξεις στο μόριο της CaM που σχετίζονται με καρδιακές παθήσεις

Γονίδιο της CaM	Μετάλλαξη	Ασθένεια	Γενετική μελέτη
<i>CALM1</i>	D54I	CPVT	Nyeggard <i>et al.</i> (Ref. 152)
<i>CALM1</i>	N98S	CPVT	Nyeggard <i>et al.</i> (Ref. 152)
<i>CALM2</i>	D96V	LQTS	Crotti <i>et al.</i> (Ref. 83)
<i>CALM1</i>	D130G	LQTS	Crotti <i>et al.</i> (Ref. 83)
<i>CALM1</i>	F142L	LQTS	Crotti <i>et al.</i> (Ref. 83)
<i>CALM1</i>	F90L	IVF	Marsman <i>et al.</i> (Ref. 151)
<i>CALM2</i>	D134H	LQTS	Makita <i>et al.</i> (Ref. 150)
<i>CALM2</i>	N98S	LQTS	Makita <i>et al.</i> (Ref. 150)
<i>CALM2</i>	N98I	LQTS	Makita <i>et al.</i> (Ref. 150)
<i>CALM2</i>	D132E	LQTS, CPVT	Makita <i>et al.</i> (Ref. 150)
<i>CALM2</i>	Q136P	LQTS, CPVT	Makita <i>et al.</i> (Ref. 150)

CPVT και το LQTS, πιθανόν να αντικατοπτρίζουν την επίδραση των δύο αυτών μεταλλάξεων σε δύο μόρια-στόχους [150]. Πιο συγκεκριμένα, στην μη φυσιολογική ρύθμιση του διαύλου Ca^{2+} τύπου L από την μεταλλαγμένη CaM πιθανόν να οφείλεται η ασθενής μυοκαρδιακή επαναπόλωση, εικόνα που σχετίζεται με το LQTS [161], ενώ στην απορρύθμιση του RyR2 από την μεταλλαγμένη CaM που οδηγεί σε αλλαγή στην ρύθμιση της ομοιόστασης του Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου, πιθανόν να οφείλεται ο φαινότυπος CPVT [162, 163]. Επιπλέον, η ίδια μετάλλαξη (N98S) έχει βρεθεί τόσο στο *CALM1* [152] όσο και στο *CALM2* [150] με διαφορετικούς όμως κλινικούς φαινότυπους (CPVT και LQTS, αντίστοιχα). Η φυσιολογική βάση της διαφοράς γονότυπου-φαινότυπου δεν είναι γνωστή, πιθανόν όμως να οφείλεται είτε σε διαφορές στο πρωτόμα των ατόμων που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις, λόγω διαφορετικής εθνικότητας και φύλου, ή σε διαφορές στην ειδική έκφραση των *CALM1* και *CALM2* ανάλογα με το τμήμα του οργάνου και τον κυτταρικό τύπο [150].

Η θέση μίας μετάλλαξης στην τριτοταγή δομή της CaM μπορεί να καθορίσει την διαμόρφωση και την σταθερότητα του ίδιου του μορίου της CaM και κατ'επέκταση την αλληλεπίδρασή της με τις διάφορες περιοχές πρόσδεσής

της στις πρωτεΐνες-στόχους, όσο και στην πρόσδεσή της με το Ca^{2+} . Στο Σχήμα 1.15A φαίνεται η πρωτοταγής δομή της ανθρώπινης CaM και η θέση των τεσσάρων δομικών μοτίβων EF, ενώ στο Σχήμα 1.15B παρουσιάζεται η τριτοταγής δομή της CaM καθώς και η κατανομή των μεταλλάξεων που σχετίζονται με καρδιακές παθήσεις. Μετά την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στο μόριο της CaM που είχαν σχέση με καρδιακές παθήσεις, έλαβε χώρα μία σειρά βιοφυσικών και βιοχημικών μελετών που αφορούν τις αντίστοιχες μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης [164, 165]. Ένα τμήμα των πειραμάτων αυτών έγινε πρόσφατα από την ερευνητική μας ομάδα και τα αποτελέσματά τους δημοσιεύθηκαν στο περιοδικό FEBS Letters [165]. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι βιοφυσικές και βιοχημικές ιδιότητες της μετάλλαξης F90L με φαινότυπο IVF [165]. Όπως βρέθηκε, η μεταλλαγμένη μορφή της CaM F90L είχε μειωμένη συγγένεια για τα Ca^{2+} . Επίσης η CaM F90L είχε μειωμένη ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον RyR2 και ελαττωματική ρύθμιση της δέσμευσης της [3H]ρυανοδίνης στον υποδοχέα. Από την άλλη πλευρά βρέθηκε μείωση της θερμικής σταθερότητας σε σχέση με την αγρίου τύπου CaM [165], γενικό χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων μεταλλάξεων της CaM που έχουν μελετηθεί [83, 166].

Αρκετές από τις μεταλλαγμένες μορφές CaM μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσδένουν Ca^{2+} τόσο στον N- όσο και στον C-λοβό τους, με μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού. Καμία από τις μεταλλάξεις του Πίνακα 1.4 δεν εμφάνισε αλλαγή στην συγγένεια σύνδεσης του Ca^{2+} στον N-λοβό σε σχέση με την αγρίου τύπου. Αντιθέτως οι μεταλλάξεις F90L, D96V, N98S, N98I, D132E, D134H, Q136P και F142L εμφάνισαν 3-23 φορές μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης Ca^{2+} στον C-λοβό [83, 150, 152, 164, 165]. Η μετάλλαξη D130G παρουσίασε πρωτοφανή μείωση στην συγγένεια πρόσδεσης του C-λοβού με το Ca^{2+} μέχρι και 46 φορές, ενώ αντίθετα, η μετάλλαξη N54I δεν εμφάνισε καμία αλλαγή σε σχέση με την αγρίου τύπου, δεδομένου του ότι εντοπίζεται στην θηλιά που συνδέει τα δομικά μοτίβα EF1 και 2 του N-λοβού [164].

Δύο ερευνητικές ομάδες, έχουν μελετήσει τις μεταλλάξεις D54I, N98S, D96V, D130G και F142L της CaM σε απομονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα και σε ένα

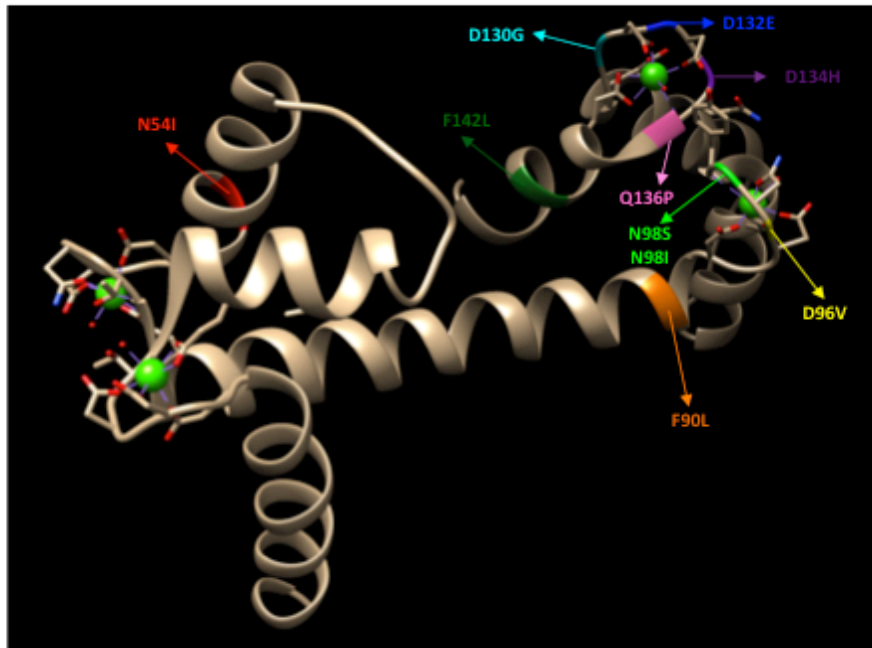
A

```

                                  EF-1
1  MADQLTEEQI AEFKEAFSLF DKDGDGTITT KELGTVMRSL GQNPTAEELQ DMINEVDADG
      EF-2                                  EF-3
61 NGTIDFPEFL TMMARKMKDT DSEEEIREAF RVFDKDGNGY ISAAELRHVM TNLGEKLTDE
      EF-4
121 EVDEMIREAD IDGDGQVNYE EfvqmmTAK

```

B



Σχήμα 1.15: **A)** Η πρωτοταγής δομή της ανθρώπινης CaM. Με κόκκινες γραμμές υποδεικνύονται τα δομικά μοτίβα EF, ενώ με πράσινα γράμματα οι θέσεις των αμινοξέων που έχουν υποστεί μετάλλαξη. **B)** Η κρυσταλλική δομή της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Με τα διαφορετικά χρώματα παρουσιάζεται το σύνολο των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί σε ασθενείς με καρδιακές παθήσεις.

κυτταρικό μοντέλο έκφρασης, η μία από την πλευρά των αυθόρμητων σπινθήρων και κυμάτων Ca^{2+} (φαινότυπος CPVT) [164] και η άλλη από την πλευρά της επίδρασης των μεταλλάξεων αυτών στην διάρκεια του δυναμικού ενέργειας (action potential duration, APD) καθώς και στην εξαρτώμενη από το Ca^{2+} απενεργοποίηση (Ca^{2+} -dependent inactivation, CDI) του διαύλου Ca^{2+} τύπου L (φαινότυπος LQTS) [167]. Ουσιαστικά, βρέθηκε ότι η N54I προξενεί αύξηση των σπινθήρων Ca^{2+} και της συχνότητας των κυμάτων Ca^{2+} σε σχέση με την αγρίου τύπου CaM, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τον φαινότυπο CPVT, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στις APD και CDI [164]. Αντίθετη εικόνα εμφάνισαν οι μεταλλάξεις D96V, D130G και F142L, υποστηρίζοντας τον φαινότυπο LQTS [167]. Η μετάλλαξη N98S έδωσε μία ενδιάμεση εικόνα. Συγκεκριμένα, παρουσίασε APD όμοια με εκείνη των

μεταλλάξεων που προκαλούν LQTS, αλλά ασθενή επίδραση στην CDI [167] καθώς και αύξηση των σπινθήρων Ca^{2+} και της συχνότητας των κυμάτων Ca^{2+} (φαινότυπος CPVT) [164]. Αυτή η αντίθεση ταιριάζει με τα κλινικά συμπτώματα τριών ασθενών που, ενώ εμφανίζουν τον ίδιο γονότυπο, δηλαδή μετάλλαξη στην ίδια θέση στο μόριο της CaM, δύο από αυτούς φέρουν τις μεταλλάξεις N98S και N98I στο γονίδιο *CALM2* με φαινότυπο LQTS [150] ενώ ο τρίτος φέρει την μετάλλαξη N98S στο γονίδιο *CALM1* με φαινότυπο CPVT [152].

Συνολικά, η ταξινόμηση των μεταλλάξεων της CaM βάσει της ενεργότητάς τους σε *in vitro* μελέτες και της θέσης τους στην τριτοταγή δομή της CaM, δεν έχουν αποδειχθεί μέχρι στιγμής ως αξιόπιστοι δείκτες του κλινικού φαινότυπου, όμως πιθανόν να βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου των ιοντικών διαύλων στην σύζευξη διέγερσης-συστολής. Η περαιτέρω μελέτη των μεταλλάξεων αυτών, καθώς και νέων μεταλλάξεων της CaM, που σχετίζονται με καρδιακές ασθένειες, πιθανόν να οδηγήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε ασθένειες.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η συνεισφορά στη μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου CaM με τον RyR2 καθώς και η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταλλαγμένων μορφών της CaM, που σχετίζονται με δυσλειτουργίες της καρδιάς, με τον RyR2.

Αρχικά, για τη μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου CaM με τον RyR2 έγινε προσπάθεια εντοπισμού πιθανών περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR2 πέραν της κύριας περιοχής πρόσδεσης. Στο πλαίσιο αυτό, έλαβε χώρα η σύνθεση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση οκτώ πεπτιδικών τμημάτων του RyR2, καθώς και παραγώγων τους, με τη μέθοδο της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Τα δύο από τα οκτώ συνθετικά πεπτίδια (P_B και $P_{B\text{ extended}}$ με αα 3584-3602 και 3581-3607, αντίστοιχα) ανήκουν στην κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2 (αα 3583-3603), τα τρία από αυτά (P_A , P_C και P_D , με αα 4240-4254, 3907-3922 και 4255-4277, αντίστοιχα) είναι τμήματα της C-τελικής περιοχής του RyR2 και αποτελούν τις υπό εξέταση πιθανές (δευτερεύουσες) περιοχές πρόσδεσης της CaM, ενώ τα υπόλοιπα τρία πεπτίδια (P_E , P_F και P_G , με αα 4265-4277, 4255-4271 και 4255-4268, αντίστοιχα) αποτελούν μικρότερα τμήματα του P_D . Ορισμένα από τα παραπάνω πεπτίδια (P_A , P_B , P_C και P_F) χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα, μέσω της σύζευξής τους στην πρωτεΐνη-φορέα keyhole limpet hemocyanin (KLH), με στόχο την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων ικανών να αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτίδια ή και ολόκληρο το μόριο του RyR2. Επιπλέον, και τα οκτώ πεπτίδια αξιοποιήθηκαν σε πειράματα για την μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με την CaM είτε έμμεσα (μέθοδος συγκατακρήμνισης), είτε άμεσα (τροποποιημένη μορφή μεθόδου ELISA και μέθοδος της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης, ITC). Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου CaM τόσο με τα συνθετικά πεπτίδια του RyR2, όσο και με ολόκληρο το μόριο του RyR2, έλαβε χώρα η παραγωγή ανασυνδυασμένης CaM είτε εκφρασμένης με την συνοδό-πρωτεΐνη GST (αξιοποίηση σε πειράματα συγκατακρήμνισης με τον RyR2) είτε απουσία συνοδού-πρωτεΐνης (αξιοποίηση σε πειράματα τύπου ELISA και ITC). Επιπλέον, έλαβε χώρα η σύνθεση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση δύο πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα της C-τελικής περιοχής της CaM (με αα

134-148 και 128-148) και η χρησιμοποίησή τους ως αντιγόνων, μέσω της σύζευξής τους σε KLH, για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων, ικανών να αναγνωρίζουν ολόκληρο το μόριο της CaM. Τα αντισώματα αυτά αξιοποιήθηκαν στα πειράματα τύπου ELISA για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM.

Στα πλαίσια της μελέτης της αλληλεπίδρασης του RyR2 με μεταλλαγμένες μορφές της CaM που σχετίζονται με καρδιακές παθήσεις, όπως οι CPVT (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia), LQTS (long QT-syndrome) και IVF (idiopathic ventricular fibrillation), αρχικά έλαβε χώρα η παραγωγή έξι μεταλλαγμένων μορφών της CaM (CaM^{D54I}, CaM^{F90L}, CaM^{D96V}, CaM^{N98S}, CaM^{D130G} και CaM^{F142L}), ως ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς επίσης και η παρασκευή βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιές χοίρων, ως πηγή του RyR2. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της CaM στη λειτουργικότητα του RyR2, σε σχέση με την αγρίου τύπου CaM, σε πειράματα πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2. Επιπλέον, μελετήθηκε η πρόσδεση των μεταλλαγμένων μορφών της CaM στον RyR2 σε σχέση με την αγρίου τύπου CaM σε πειράματα συγκατακρήμνισης, τόσο απουσία όσο και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Ca²⁺ (10 και 100 μM).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών και η συμβολή τους αφενός στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου CaM με τον RyR2 και αφετέρου στο συσχετισμό συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο μόριο της CaM με πλημμελή πρόσδεση στον RyR2 ή/και πλημμελή ρύθμιση του υποδοχέα παρουσιάζονται εκτενώς στην παρούσα διατριβή.

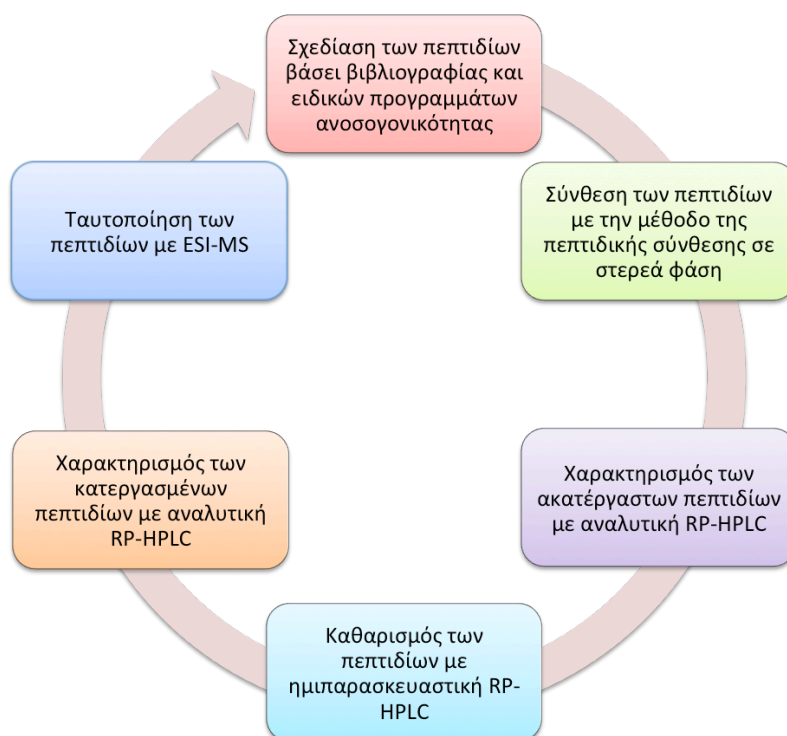
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίων

Ο σκοπός της σύνθεσης των πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα του RyR2 (ανθρώπινη αλληλουχία, hRyR2), ήταν τόσο η χρήση τους ως απτένια για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας όσο και η χρήση τους σε βιοχημικές μεθόδους για την μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασής τους με την CaM (ανθρώπινη αλληλουχία, hCaM). Ο σκοπός της σύνθεσης των πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα της CaM ήταν κυρίως η χρήση τους ως απτένια για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της CaM. Η πορεία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση καθώς και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στο Σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας παραγωγής πεπτιδίων.

2.1.1 Πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης (Solid-phase peptide synthesis, SPPS)

Το 1963, ο Bruce Merrifield δημοσίευσε μία εργασία, που αποτέλεσε ορόσημο για την χημεία της σύνθεσης πεπτιδίων, περιγράφοντας την ανάπτυξη της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση (solid-phase peptide synthesis, SPPS) [168]. Η τεχνική αυτή, για την οποία βραβεύτηκε με το Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1984, είναι η κύρια αιτία για την εκτεταμένη χρήση των συνθετικών πεπτιδίων ως αντιδραστήρια στο πεδίο έρευνας της Χημείας και της Βιοϊατρικής. Οι κλασσικές τεχνικές που χρησιμοποιούνταν μέχρι το 1963 έβρισκαν εφαρμογή στην σύνθεση πεπτιδίων μικρού μήκους, ενώ εμφάνιζαν σημαντικές τεχνικές δυσκολίες διαλυτότητας και καθαρισμού στην σύνθεση πολυπεπτιδίων.

Η αρχή της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση (Σχήμα 2.2) βασίζεται:

- ✓ Στην πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας σε ένα στερεό πολυμερές (ρητίνη). Η πρόσδεση γίνεται μέσω ομοιοπολικού δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ της α -καρβοξυλομάδας του αμινοξέος και της ενεργού ομάδας ενός μορίου-συνδέτη (linker) που παρεμβάλλεται μεταξύ ρητίνης και 1^{ου} αμινοξέος.
- ✓ Στην ανάπτυξη του πεπτιδίου, πάνω στο πολυμερές, προσθέτοντας ένα αμινοξύ κάθε φορά με την μορφή ενός σταδίου μέχρι την συναρμολόγηση της επιθυμητής αλληλουχίας. Τα αμινοξέα που προστίθενται κάθε φορά περιέχουν συνήθως δύο προστατευτικές ομάδες. Η μία από αυτές αποτελεί μόνιμη προστατευτική ομάδα (permanent protection group) της πλευρικής ομάδας του αμινοξέος ενώ η άλλη αποτελεί παροδική προστατευτική ομάδα (temporary protection group) της α -αμινομάδας του αμινοξέος. Ο χαρακτηρισμός παροδική αναφέρεται στην δυνατότητα απομάκρυνσης της προστατευτικής ομάδας κατά τη διάρκεια της σύνθεσης σε αντίθεση με την μόνιμη, που δεν απομακρύνεται κατά την διάρκεια των σταδίων της σύνθεσης.
- ✓ Στην απομάκρυνση του πεπτιδίου από την στερεά φάση μετά την προσθήκη και του τελευταίου αμινοξέος.

Ο Merrifield προσέγγισε την πεπτιδική σύνθεση από την πλευρά αυτή λόγω του ότι όταν η αναπτυσσόμενη πεπτιδική αλυσίδα είναι σταθερά προσδεμένη σε ένα απόλυτα αδιάλυτο στερεό υπόστρωμα μπορεί εύκολα να διηθηθεί και να εκπλυθεί από την περίσσεια των αντιδραστηρίων και τα παραπροϊόντα της αντίδρασης. Έτσι ο καθαρισμός των ενδιάμεσων πεπτιδίων από τις προσμίξεις βασίζεται στην διαλυτοποίηση των τελευταίων και όχι σε τεχνικές ανακρυστάλλωσης. Με την μέθοδο αυτή απλοποιούνται οι χειρισμοί και μειώνεται ο χρόνος που απαιτείται για την σύνθεση των πεπτιδίων, ενώ αυξάνεται θεαματικά η συνολική απόδοση της σύνθεσης [168].

Ως στερεό υπόστρωμα χρησιμοποιούνται ρητίνες με επαρκή μηχανική σταθερότητα και επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως σημαντικό βαθμό διόγκωσης στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση. Οι πιο διαδεδομένες για το σκοπό αυτό είναι οι υποκατεστημένες πολυστυρολικές ρητίνες και πιο συγκεκριμένα το πολυστυρόλιο συμπολυμερισμένο με 1 % 1,3-διβινυλοβενζόλιο που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και ρητίνες πολυαμιδίου.

Λόγω της ταχύτητας και της απλότητας των επαναλαμβανόμενων σταδίων της SPPS, που επιτυγχάνονται σε ένα δοχείο σταθερής θερμοκρασίας, η μέθοδος έχει πλέον αυτοματοποιηθεί. Παρόλα αυτά, υπάρχουν εργαστηριακές ομάδες που επιτελούν την τεχνική χειρωνακτικά.

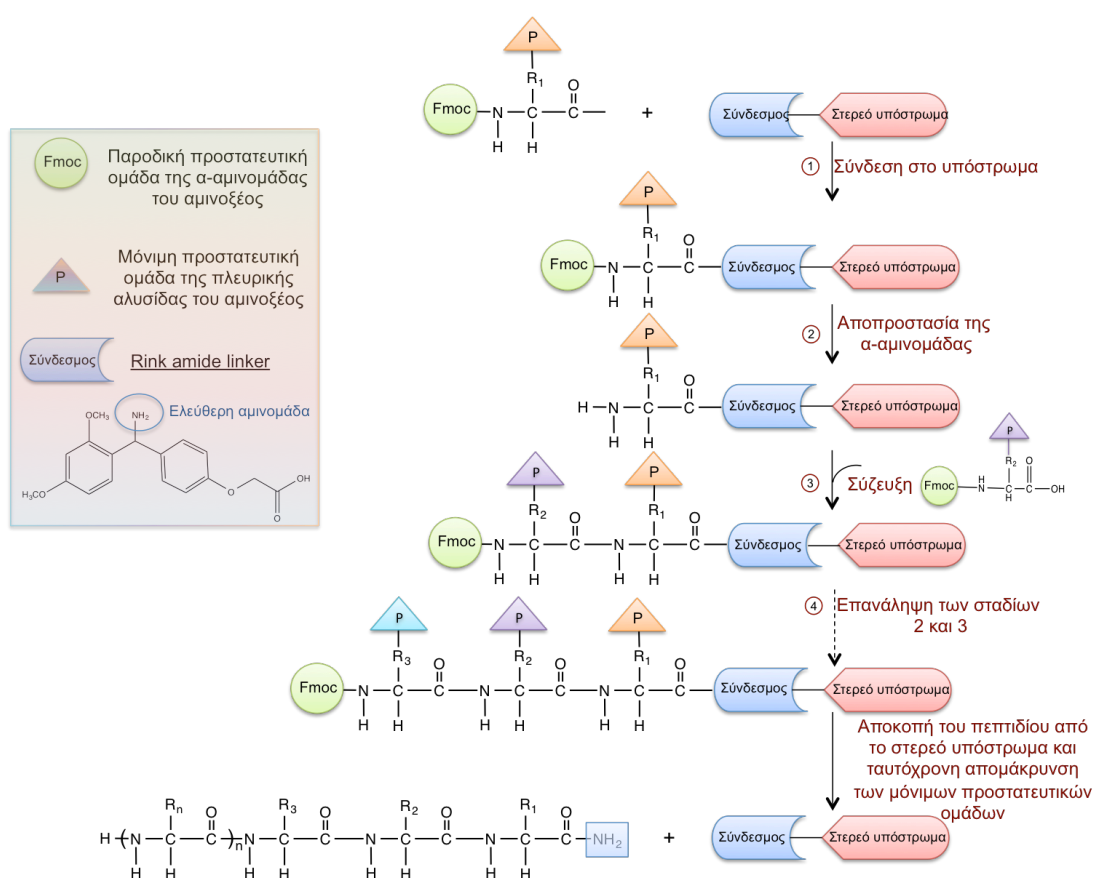
Προστατευτικές ομάδες-Μεθοδολογία Fmoc

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση είναι απαραίτητη τόσο η προσωρινή προστασία της α-αμινομάδας του αμινοξέος που προστίθεται, όσο και η προστασία των πλευρικών χαρακτηριστικών ομάδων των αμινοξέων, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα πολυμερισμού ή διακλαδισμένων παραπροϊόντων.

Για την παροδική προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων πρέπει η προστατευτική ομάδα να μπορεί να απομακρύνεται εύκολα μετά την ολοκλήρωση του σταδίου της προσθήκης, έτσι ώστε η α-αμινομάδα να είναι έτοιμη να αντιδράσει με την α-καρβοξυλομάδα του επόμενου αμινοξέος. Αντίθετα, οι πλευρικές ομάδες προστασίας πρέπει να είναι σταθερές σε όλους τους επαναλαμβανόμενους κύκλους αποπροστασίας των α-αμινομάδων. Το

σύστημα όπου κάθε τάξη προστατευτικών ομάδων μπορεί να απομακρυνθεί παρουσία των υπολοίπων ονομάζεται «ορθογωνικό».

Το ορθογωνικό σύστημα προστατευτικών ομάδων, που χρησιμοποιήσαμε κατά τη σύνθεση των πεπτιδικών τμημάτων του hRyR2 ήταν ο συνδυασμός φθορομεθοξυκαρβονυλομάδας (Fmoc ομάδας) για την α-αμινομάδα και τριτοταγούς βουτυλομάδας/τριτυλομάδας για τις πλευρικές αμινομάδες. Η ομάδα Fmoc απομακρύνεται σε ασθενώς βασικό περιβάλλον, ενώ οι μόνιμες τριτοταγείς βουτυλικές προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται σε όξινες συνθήκες.



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της μεθοδολογίας της SPPS.

Επιγραμματικά, η μεθοδολογία της πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης με την ομάδα Fmoc παροδικής προστασίας, περιλαμβάνει τα στάδια που ακολουθούν:

1. Την ομοιοπολική σύζευξη του αμινοξέος που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί στη ρητίνη μέσω ενός

ενδιάμεσου μορίου-συνδέτη (linker). Το αμινοξύ έχει την πλευρική του ομάδα καθώς και την α-αμινομάδα του προστατευμένες. Ο ομοιοπολικός δεσμός που δημιουργείται παραμένει σταθερός καθόλη τη διάρκεια της σύνθεσης.

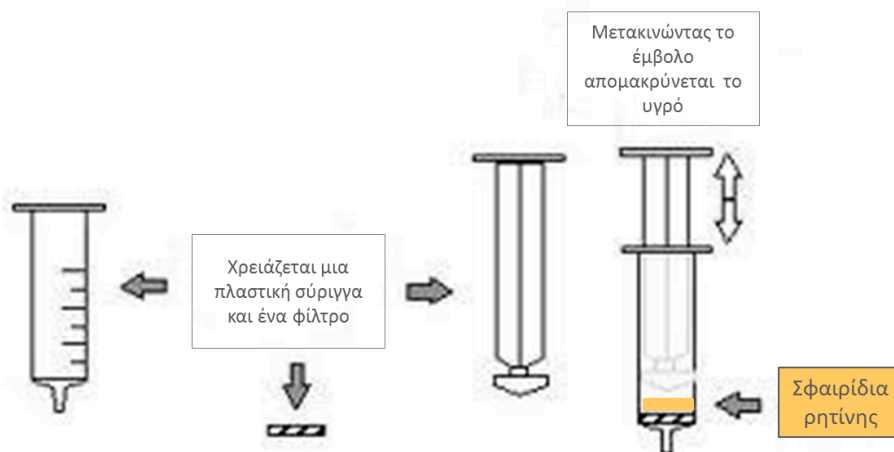
2. Την αποπροστασία της α-αμινομάδας σε συνθήκες στις οποίες η προστασία των πλευρικών ομάδων παραμένει σταθερή. Συγκεκριμένα, η ομάδα προστασίας Fmoc απομακρύνεται γρήγορα με πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες και πιο αργά με τριτοταγείς αμίνες, σε πολικό διάλυμα [169]. Έτσι, η απομάκρυνση της ομάδας Fmoc γίνεται συνήθως σε διάλυμα πιπεριδίνης 20-50 % σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF).

3. Την κατάλληλη ενεργοποίηση της καρβοξυλικής ομάδας του επόμενου αμινοξέος της αλληλουχίας και τη σύζευξη αυτού στην ελεύθερη αμινομάδα του προηγούμενου αμινοξέος, μέσω του σχηματισμού ενός πεπτιδικού δεσμού.

4. Την επανάληψη των σταδίων της αποπροστασίας και της προσθήκης του επόμενου ενεργοποιημένου αμινοξέος έως ότου συντεθεί το πεπτίδιο με την επιθυμητή αλληλουχία.

5. Τέλος, την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη με ειδικά μίγματα αποκοπής, ανάλογα με την σύσταση των αμινοξέων του πεπτιδίου.

Όλα τα στάδια της SPPS λαμβάνουν χώρα σε ειδικό δοχείο ή σύριγγα που είναι κατάλληλα τροποποιημένα. Συγκεκριμένα, στο στόμιο της σύριγγας είναι τοποθετημένος ένας πορώδης ηθμός έτσι ώστε να πραγματοποιούνται εκπλύσεις χωρίς την απομάκρυνση της στερεάς φάσης και του αναπτυσσόμενου πεπτιδίου, που είναι συνδεδεμένο σε αυτήν, από την σύριγγα (Σχήμα 2.3). Η σύριγγα είναι κατασκευασμένη από πλαστικό που είναι συμβατό με τη χρήση οργανικών διαλυτών.



Σχήμα 2.3: Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται η σύριγγα όπου επιτελείται η SPPS.

Στην παρούσα εργασία έλαβε χώρα η σύνθεση πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα του RyR2 και της CaM (Πίνακας 2.1 A), καθώς και παράγωγα αυτών (Πίνακας 2.1 B).

Πίνακας 2.1: A) Πεπτίδια που αποτελούν τμήματα των RyR2 και CaM, καθώς και B) παράγωγά τους.

A

Κωδική ονομασία	Θέση στον hRyR2	Αμινοξική αλληλουχία
P _A	[4240-4254]	TVRSALFALRYNILT
P _B	[3584-3602]	KAVWHKLLSKQRKRAVAC
P _{B extended}	[3581-3607]	RSKKAVWHKLLSKQRKRAVACFRMAP
P _C	[3907-3922]	SKAIQVAKQVFNLTLE
P _D	[4255-4277]	LMRMLSLKSLKKQMKKVKKMTVK
P _E	[4265-4277]	KKQMKKVKKMTVK
P _F	[4255-4271]	LMRMLSLKSLKKQMKKV
P _{F scrambled}	-	KSLKQRKMLKMLKVLMS
P _G	[4255-4268]	LMRMLSLKSLKKQM
Κωδική ονομασία	Θέση στην hCaM	Αμινοξική αλληλουχία
P ₁	[134-148]	GQVNYEEFVQMMTAK
P ₂	[128-148]	ADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK

B

Κωδική ονομασία	Αμινοξική αλληλουχία
CysP _A	<u>C</u> TVRSALFALRYNILT
LysP _A	<u>K</u> TVRSALFALRYNILT
BiotP _A	Biot TVRSALFALRYNILT
BiotP _B	Biot KAVWHKLLSKQRKRAVVAC
CysP _C	<u>C</u> SKAIQVAKQVFNTLTE
CysP _F	<u>C</u> LMRMLSLKSLKKQMKKV
BiotP _F	Biot LMRMLSLKSLKKQMKKV
pSer ₄₂₆₀ P _F	LMRML(pS)LKSLKKQMKKV
pSer ₄₂₆₃ P _F	LMRMLSLK(pS)LKKQMKKV
Κωδική ονομασία	Αμινοξική αλληλουχία
CysP ₁	<u>C</u> GQVNYEEFVQMMTAK
CysP ₂	<u>C</u> ADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK

Αποπροστασία της ρητίνης και μέτρηση του βαθμού της υποκατάστασής της (Capacity, C).

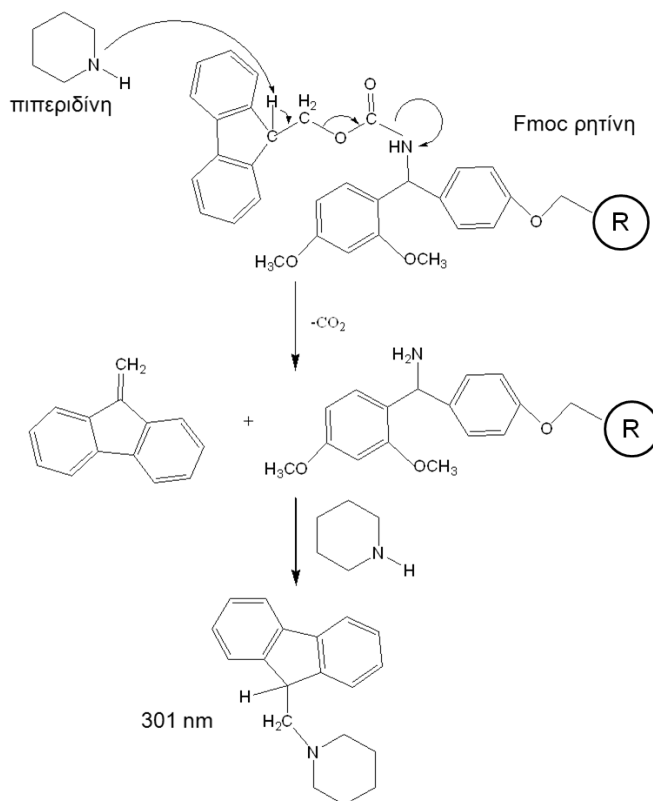
Υλικά και Όργανα

- Διχλωρομεθάνιο (DCM)
- *N, N'*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)
- Πιπεριδίνη
- Φασματοφωτόμετρο Shimadzu, UV-1800
- Ρητίνη Rink-amide, παρασκευασμένη στο εργαστήριο

Η σύνθεση των πεπτιδικών τμημάτων του RyR2 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη ρητίνη 4-(2',4'-διμεθοξυφαινυλο-Fmoc-αμινομεθυλο)-φαινοξυπολυστερένιο. Η ρητίνη είναι Fmoc προστατευμένη, επομένως, πριν την προσθήκη του 1^{ου} Fmoc-αμινοξέος πρέπει να γίνει η αποπροστασία της ρητίνης, ώστε να καταστεί ελεύθερη η αμινομάδα της για να γίνει η αγκυροβόληση του 1^{ου} αμινοξέος.

Ζυγίζεται ποσότητα ρητίνης (500 mg) και τοποθετείται μέσα στην σύριγγα. Στην συνέχεια, διαβιβάζεται στην σύριγγα DMF (δύο φορές) και το σύστημα παραμένει να ισορροπήσει για 1 min μετά από κάθε προσθήκη. Με τον τρόπο

αυτό η ρητίνη διογκώνεται εκθέτοντας στην επιφάνεια σημεία αγκυροβόλησης που πιθανόν να ήταν "κρυμμένα" στο εσωτερικό των σφαιριδίων της ρητίνης. Ακολουθεί διήθηση και 5 εκπλύσεις του 1 min με DMF που αποτελεί και τον διαλύτη της αντίδρασης δημιουργίας του πεπτιδικού δεσμού. Μετά την διήθηση του διαλύτη προστίθεται διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF 20%. Μετά από 5 min το μίγμα διηθείται και νέα ποσότητα διαλύματος πιπεριδίνης προστίθεται. Στο σύνολο, επιτελούνται 5 εκπλύσεις με το διάλυμα της πιπεριδίνης και τα εκπλύματα συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα (falcon). Στην συνέχεια, τοποθετείται στην κυψελίδα του φωτόμετρου, το οποίο είναι ρυθμισμένο στα 301 nm, 1 mL διαλύματος πιπεριδίνης σε DMF 20% και καταγράφεται η ένδειξη. Ακολουθεί ο μηδενισμός της ένδειξης του φωτομέτρου και η τοποθέτηση στην κυψελίδα, που περιέχει ήδη το 1 mL διαλύματος πιπεριδίνης, 10 μ L των εκπλυμάτων. Λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης (A). Στα 301 nm απορροφά το προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση της Fmoc με την πιπεριδίνη (Σχήμα 2.4). Ο τερματισμός σχηματισμού του προϊόντος αυτού σημαίνει και την ολοκλήρωση του σταδίου της αποπροστασίας. Τέλος, γίνονται 10 εκπλύσεις με DMF του 1 min.



Σχήμα 2.4: Στάδιο αποπροστασίας της Fmoc-ρητίνης.

Ο βαθμός υποκατάστασης της ρητίνης σε ενεργές αμινομάδες υπολογίζεται μέσω του τύπου:

$$C = \frac{A}{0,78 \times M_{\text{ρητίνης}}} \quad \text{mmol/g}$$

όπου C: υποκατάσταση ρητίνης (mmol/g ρητίνης), A: απορρόφηση δείγματος στα 301 nm, $M_{\text{ρητίνης}}$: μάζα δείγματος ρητίνης (g).

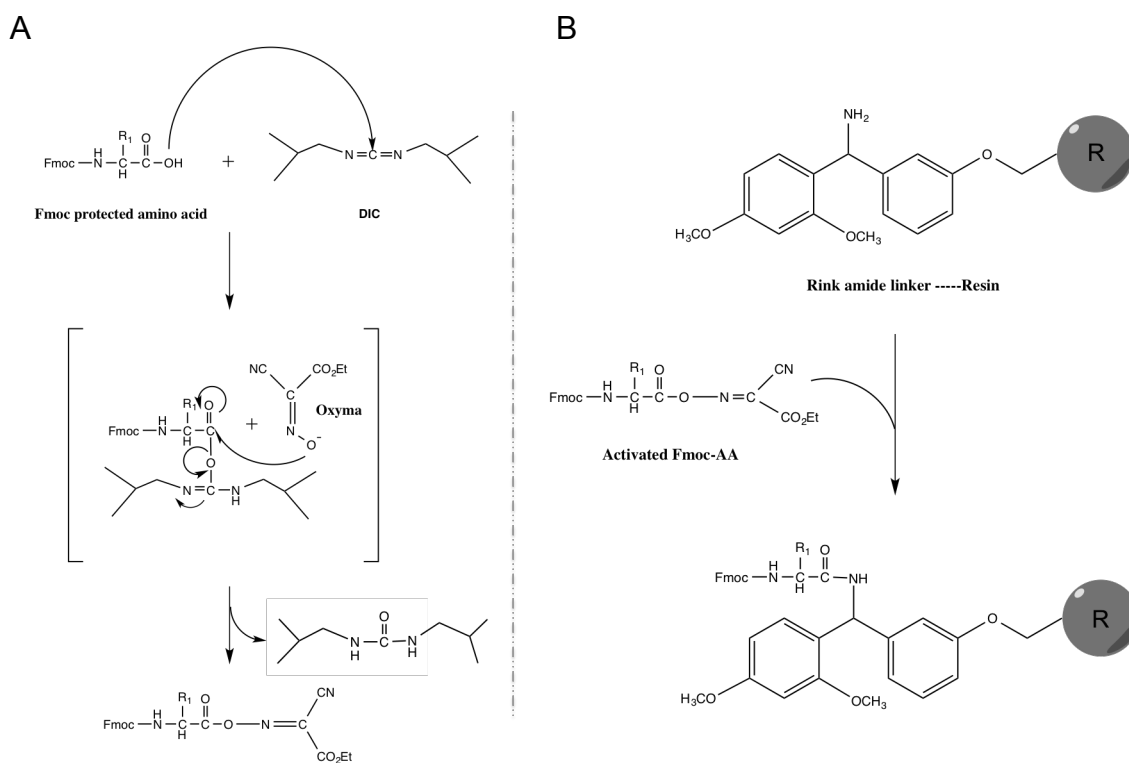
Βάσει της τιμής C υπολογίζονται οι ποσότητες των Fmoc αμινοξέων που θα προστεθούν κατά την διάρκεια της SPPS καθώς και οι ποσότητες των υπόλοιπων αντιδραστηρίων.

Αγκυροβόληση του πρώτου αμινοξέος

Υλικά και Όργανα

- DMF, 2-κυανο-2-(υδροξυίμινο) οξικό αιθύλιο (Oxyma), *N,N'*-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), Οξικός ανυδρίτης, δισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIEA)
- Νινυδρίνη, φαινόλη, απόλυτη αιθανόλη, πυριδίνη, υδατικό διάλυμα KCN 0,001 N
- Fmoc-αμινοξέα (Merck/Novabiochem)

Σε ένα γυάλινο φιαλίδιο ζυγίζεται ποσότητα του 1^{ου} Fmoc αμινοξέος 4 eq σε σχέση με την υπολογιζόμενη τιμή της C της ρητίνης, καθώς και 4 eq του αντιδραστηρίου Oxyma. Τόσο τα Fmoc αμινοξέα όσο και το Oxyma βρίσκονται σε στερεή μορφή. Στην συνέχεια, προστίθεται DMF (Fmoc αμινοξύ/DIC/Oxyma ~0,25 M σε DMF) και μετά την διαλυτοποίηση των στερεών αντιδραστηρίων το φιαλίδιο αφήνεται σε πάγο για 5 min, για να ακολουθήσει η προσθήκη 4 eq DIC (0,25 M σε DMF) και η παραμονή του φιαλιδίου στον πάγο για άλλα 10 min. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται η καρβοξυλομάδα του Fmoc αμινοξέος (Σχήμα 2.5 A). Μετά την παρέλευση των



Σχήμα 2.5: Α) Ενεργοποίηση του Fmoc αμινοξέος. Β) Στάδιο σύζευξης του 1^{ου} αμινοξέος στην ρητίνη.

10 min γίνεται προσθήκη του διαλύματος του ενεργοποιημένου αμινοξέος στη σύριγγα που περιέχει την αποπροστατευμένη ρητίνη προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού μεταξύ συνδέσμου και 1^{ου} αμινοξέος (Σχήμα 2.5B). Το μίγμα μένει να αντιδράσει υπό ανακίνηση για 2 h, διηθείται και εκπλένεται με DMF (έξι φορές).

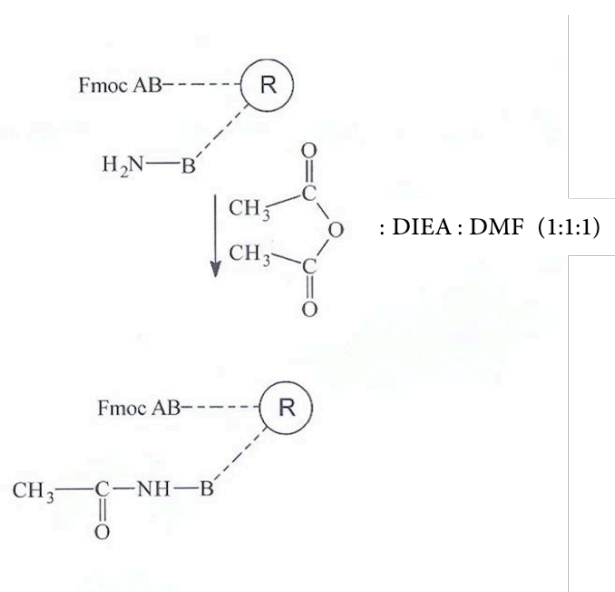
Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης γίνεται με βάση τη δοκιμασία νινυδρίνης (Kaiser test). Για την εφαρμογή της δοκιμασίας νινυδρίνης παρασκευάζονται τριών ειδών αντιδραστήρια, τα Kaiser 1, 2 και 3.

- Kaiser 1: 500 mg καθαρής νινυδρίνης σε 10 mL απόλυτης αιθανόλης,
- Kaiser 2: 80 g καθαρής φαινόλης σε 20 mL απόλυτης αιθανόλης,
- Kaiser 3: 2 mL υδατικού διαλύματος 0,001 M KCN σε 98 mL πρόσφατα απεσταγμένης πυριδίνης πάνω από νινυδρίνη.

Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγουμε μία πολύ μικρή ποσότητα της ρητίνης (~1 mg) και προσθέτουμε με τη σειρά 4, 2 και 2 σταγόνες από τα διαλύματα Kaiser 1, 2 και 3, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, θερμαίνουμε για 4 min στους 100 °C. Αν δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα (αρνητικό Kaiser test), το διάλυμα

παραμένει κίτρινο και οι κόκκοι της ρητίνης δεν μεταβάλλονται χρωματικά. Στην περίπτωση που οι κόκκοι της ρητίνης και το διάλυμα χρωματιστούν μπλε ή μωβ, τότε συμπεραίνουμε ότι στην πεπτιδική αλυσίδα εξακολουθούν να υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες.

Στις περιπτώσεις όπου η δοκιμασία είναι έντονα θετική, η σύζευξη επαναλαμβάνεται (double coupling). Στις περιπτώσεις όπου η δοκιμασία είναι αμυδρά θετική συνήθως γίνεται ακετυλίωση (capping). Η ακετυλίωση πραγματοποιείται με προσθήκη μίγματος οξικού ανυδρίτη/DMF/DIEA 1:1:1 και επώαση υπό ανάδευση για 30 min (Σχ 2.6).



Σχήμα 2.6: Το στάδιο της ακετυλίωσης (capping).

Την αγκυροβόληση του 1^{ου} Fmoc αμινοξέος ακολουθεί το στάδιο της αποπροστασίας, για την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας ώστε να είναι δυνατή η σύζευξη του επόμενου αμινοξέος. Το στάδιο της αποπροστασίας είναι το ίδιο με αυτό που ακολουθείται για την αποπροστασία της ρητίνης (Σχήμα 2.4).

Επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας

Υλικά και Όργανα

- DMF, Οξυμα, *N,N'*-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), HATU (1-[δισ(διμεθυλάμινο)μεθυλενο]-1H-1,2,3τριαζολο[4,5-b]πυριδινιο-3-οξειδιο εξαφθοροφωσφορικό), Διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO)

- Οξικός ανυδρίτης, διισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIEA)
- Νινυδρίνη, φαινόλη, απόλυτη αιθανόλη, πυριδίνη, υδατικό διάλυμα KCN 0,001 N
- Fmoc-αμινοξέα, (Merck/Novabiochem)

Η πορεία που ακολουθείται φαίνεται συνοπτικά στον Πίνακα 2.2 και είναι ίδια με αυτή της αγκυροβόλησης του 1^{ου} αμινοξέος, με την διαφορά ότι δημιουργείται πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του προστιθέμενου αμινοξέος και του προηγούμενου από αυτό, αμινοξέος.

Πίνακας 2.2: Συνοπτική παρουσίαση των σταδίων επιμήκυνσης της αλυσίδας των υπό σύνθεση πεπτιδίων.

Αριθμός σταδίου	Αντιδραστήρια-διαλύτες	Επαναλήψεις x Χρόνος (min)
1	DMF-πιπεριδίνη 20% ^α	3 x 10
2	DMF-έκπλυση	10 x 1
3	Fmoc-AA-OH/Οχγμα/DIC (4 eq) σε DMF ^β (0,25 M)	1 x 120
4	DMF-έκπλυση ^γ	6 x 1

^αΑπομάκρυνση ομάδας Fmoc.

^βΗ σύζευξη γίνεται μετά από προενεργοποίηση του αμινοξέος

^γΗ ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων ελέγχεται με την μέθοδο της νινυδρίνης (Kaiser test). Στην περίπτωση που η δοκιμασία είναι θετική τότε επαναλαμβάνεται η σύζευξη (στάδιο 3) ή ακετυλιώνονται οι ελεύθερες αμινομάδες με μίγμα Ac₂O/DMF/DIEA, 1:1:1. Αν η δοκιμασία της νινυδρίνης αποδειχθεί αρνητική συνεχίζεται η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας ακολουθώντας πάλι τα στάδια 1-4.

Σε ορισμένα από τα πεπτιδία που συντέθηκαν, προστέθηκαν και κάποια ειδικά αμινοξέα όπως η φωσφορυλιωμένη σερίνη (Fmoc-Ser(Ph)OH) αλλά και κάποιες ενώσεις όπως η βιοτίνη (Biot), η οποία ανήκει στο σύμπλεγμα της βιταμίνης B και συνδέεται ισχυρά και εξειδικευμένα με την στρεπταβιδίνη, ιδιότητα στην οποία βασίζεται η ανάπτυξη του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης, το οποίο έχει ευρύτερη εφαρμογή σε πλήθος βιοχημικών και άλλων εργαστηριακών τεχνικών. Η φωσφορυλιωμένη σερίνη είναι Fmoc προστατευμένη στην α-αμινομάδα της ενώ η πλευρική αλυσίδα της Ser έχει υποστεί φωσφορυλίωση. Η Biot μπαίνει πάντα μετά το τελευταίο αμινοξύ της αναπτυσσόμενης πεπτιδικής αλυσίδας μέσω πεπτιδικού δεσμού καθώς περιέχει στο μόριο της μία καρβοξυλομάδα. Στον Πίνακα 2.3 φαίνονται οι

διαφορές κατά την προσθήκη των δύο αυτών ιδιαίτερων ενώσεων σε σχέση με τα διάφορα αμινοξέα.

Μετά την προσθήκη και την αποπροστασία του τελευταίου αμινοξέος, ακολουθούν εκπλύσεις και το στάδιο της ξήρανσης. Πραγματοποιούνται 6 εκπλύσεις του 1 min με DCM και 2 εκπλύσεις του 1 min με πετρελαϊκό αιθέρα. Η ξήρανση γίνεται σε ξηραντήρα υψηλού κενού πάνω από P₂O₅ για 24 h.

Πίνακας 2.3: Διαφοροποιήσεις στα στάδια προσθήκης ειδικών αμινοξέων/ενώσεων.

	Στάδιο διαφοροποίησης	Αντιδραστήρια-διαλύτες	Επαναλήψεις x Χρόνος (min)
Fmoc-Ser(Ph)OH	3	Fmoc-Ser(Ph)OH/Oxyma/ HATU/DIC (3 eq) σε DMF (0,25 M)/ DIEA (9 eq)	1 x 120
Biot	3	Biot/DMSO/Oxyma/DIC (4 eq) σε DMF (0,25 M) ^α	1 x 120

^αΔεν ακολουθεί στάδιο αποπροστασίας γιατί η Biot δεν είναι αμινοξύ και επομένως δεν περιέχει α-αμινομάδες.

Απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων και αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη

Υλικά και Όργανα

- Τριφθοροξικό οξύ (TFA), τρισοπροπυλοσιλάνιο (TIS), 1,2 αιθανοδιθειόλη (EDT), διαιθυλαιθέρας (Et₂O), θειοανισόλη, ανισόλη, βρωμίδιο του τετρα-n-βουτυλαμμωνίου (Bu₄NBr)
- Πλαστικοί σωλήνες των 50 mL (falcons)
- Απιονισμένο H₂O

Η επιλογή του μίγματος αποκοπής γίνεται βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας του πεπτιδίου. Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζεται η σύσταση των μιγμάτων αποκοπής (20 mL μίγματος/g ρητίνης) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τα πεπτίδια του hRyR2.

Σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται τα συστατικά του μίγματος αποκοπής. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος στη σύριγγα, που περιέχει το προς αποκοπή πεπτίδιο συνδεδεμένο στην ρητίνη, το οποίο και αφήνεται για 2 h. Κατά την αποκοπή των πεπτιδίων που φέρουν στην αλληλουχία τους πάνω από μία Met, 10 min πριν την ολοκλήρωση των 2 h προστίθεται αναγωγικό αντιδραστήριο [170], επειδή η μεθειονίνη είναι επιρρεπής στην οξείδωση υπό τις συνθήκες της αποκοπής με αποτέλεσμα να μειώνεται πολύ η απόδοση της σύνθεσης. Στην συνέχεια, γίνεται διήθηση σε δύο falcons των 50 mL, στα οποία έχει γίνει προσθήκη 10 mL διαιθυλαιθέρα στο κάθε ένα, όπου και καταβυθίζεται το πεπτίδιο, ενώ η ρητίνη εκπλένεται με TFA για την απομάκρυνση ποσότητας πεπτιδίου που πιθανόν να έχει απομείνει. Στην συνέχεια τοποθετούνται τα δύο falcons στο πάγο για λίγα λεπτά για να μειωθεί η διαλυτότητα του πεπτιδίου και να καταβυθιστεί πιο γρήγορα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και το ακατέργαστο πεπτίδιο παραλαμβάνεται ως ίζημα. Το ακατέργαστο στερεό πεπτίδιο ξηραίνεται σε ξηραντήρα υψηλού κενού πάνω από P₂O₅ για 18 h. Ακολουθεί καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και λυοφιλοποίηση των κλασμάτων.

Πίνακας 2.4: Σύσταση των μιγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της αποκοπής.

Αιτία επιλογής	Συστατικά του μίγματος αποκοπής
Απουσία αμινοξέων Cys, Met, Trp, Arg ή Trt- προστατευτικής ομάδας στο προς αποκοπή πεπτίδιο	TFA/H ₂ O/TIS, 95/2,5/2,5% v/v
Παρουσία των αμινοξέων Cys, Met, Trp, Arg ή Trt - προστατευτικής ομάδας στο προς αποκοπή πεπτίδιο	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v
Παρουσία πάνω από μιας Met στο προς αποκοπή πεπτίδιο (κίνδυνος δημιουργίας παραπροϊόντων λόγω οξείδωσης της Met)	TFA/Thioanisole/Anisole/EDT 90/5/2/3% v/v Bu ₄ NBr (30 eq) ^α

^αΤο Bu₄NBr είναι αναγωγικό αντιδραστήριο και προστίθεται στο μίγμα αποκοπής 10 λεπτά πριν ολοκληρωθούν οι 2 h επώασης.

2.1.2 Καθαρισμός και ανάλυση πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

Υλικά και Όργανα

- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN), Sigma
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA), Sigma
- Σύστημα ημιπαρασκευαστικής στήλης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), Waters, αποτελούμενο από αντλία Model 600 και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) Model 486
- Σύστημα αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αντίστροφης φάσης, Waters, αποτελούμενο από αντλία Model 600E και ανιχνευτή τύπου 991 PDA.
- Στήλη 10 Nucleosil 7 C18 (250 x 12,7 mm ID), Macherey-Nagel
- Στήλη LiChrospher RP C18 (250 x 4,6 mm ID), Merck

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) θεωρείται σήμερα η καλύτερη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας και αποτελεί βασικό εργαλείο καθαρισμού και ανάλυσης πληθώρας ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των μικρών πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται γενικά από τα εξής μέρη:

1. *Δύο δοχεία αποθήκευσης διαλυτών (A και B)*, τα οποία είναι συνήθως συνδεδεμένα με απασερωτές, για την απομάκρυνση του διαλυμένου αέρα, ο οποίος επηρεάζει την ανάλυση.
2. *Βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών*. Συντελεί στην ανάμιξη των διαλυτών πριν αυτοί εισέλθουν στο θάλαμο διαχωρισμού και περάσουν από τη στήλη.
3. *Αντλίες*. Η υψηλή πίεση, που πρέπει να εφαρμοστεί στην υγρή κινητή φάση για να διέλθει από τη στήλη με ικανοποιητική ταχύτητα, επιτυγχάνεται με τις αντλίες. Η κατασκευή των αντλιών γίνεται από υψηλής ποιότητας ανοξειδωτο χάλυβα ή από αδρανή πολυμερή, όπως το πολυτετραφθοροαιθυλένιο, ώστε να αντιστέκονται στην προσβολή από οποιαδήποτε κινητή φάση.

4. *Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος.* Περιέχει ένα βαθμονομημένο βρόγχο, ώστε να εισάγεται σταθερός και επαναλήψιμος όγκος δείγματος κάθε φορά ή περιέχει βρόγχο μεγάλης περιεκτικότητας και ο όγκος δείγματος υπολογίζεται με σύριγγα. Έπειτα, γίνεται έγχυση του δείγματος στην κινητή φάση, συνήθως χειροκίνητα.

5. *Προστήλη.* Η προστήλη έχει ακριβώς τα ίδια υλικά με τη στήλη και δρα ως χημικό φίλτρο απομακρύνοντας ισχυρώς κατακρατούμενες ενώσεις που είναι δυνατό να κορέσουν την αναλυτική στήλη και να ελαττώσουν τη διάρκεια ζωής της.

6. *Στήλη.* Ως υλικά πλήρωσης των στηλών έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά συστατικά (άνθρακας, οργανικά πολυμερή, κ.α.), ενώ η επιλογή τους καθορίζει και το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στους διαχωρισμούς και συνεπώς το είδος της χρωματογραφίας. Το οξειδίο του πυριτίου (Silica) είναι το πιο διαδεδομένο υλικό πλήρωσης.

7. *Ανιχνευτές.* Χρησιμοποιείται πληθώρα ανιχνευτών και όλοι παράγουν ένα ενισχυμένο σήμα ανάλογο της ποσότητας της ουσίας που εκλούεται κάθε στιγμή. Στην HPLC οι σημαντικότεροι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι: α) φασματοφωτομετρικοί (UV ή IR), β) φθορισμομετρικοί, γ) ανιχνευτές δείκτη διάθλασης, δ) ιονισμού φλόγας, ε) φάσματος μαζών, στ) ραδιενέργειας, ζ) ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές.

8. *Καταγραφέας.* Περιέχει ψηφιακό ολοκληρωτή που μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή σε αριθμητικά δεδομένα που καταγράφονται σε εκτυπωτή ως διάγραμμα απόκρισης-χρόνου.

Ανάλογα με τον τύπο του διαχωρισμού, οι μέθοδοι HPLC μπορούν να διακριθούν σε διάφορες κατηγορίες, όπως σε μεθόδους διαπερατότητας πηκτής (gel-permeation chromatography), μεθόδους προσρόφησης (absorption chromatography) ή μεθόδους κανονικής φάσης (normal-phase chromatography, NP-HPLC), μεθόδους κατανομής (partition chromatography), μεθόδους ιοντοανταλλαγής (ion-exchange chromatography) και μεθόδους αντίστροφης φάσης (reversed-phase chromatography, RP-HPLC). Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι HPLC, λόγω του ότι χαρακτηρίζονται

από μεγάλο εύρος δυνητικών εφαρμογών. Η στατική φάση που χρησιμοποιείται στις μεθόδους RP-HPLC είναι οξειδίο του πυριτίου. Η στατική φάση, μετά από κατάλληλη χημική επεξεργασία, φέρει στην επιφάνειά της αλκυλο-πυριτικές ομάδες, συνήθως τετρα- ή δεκαοκτυλο-πυριτικές (C_4 ή C_{18} , αντίστοιχα), που της προσδίδουν υδρόφοβο χαρακτήρα. Η κατακράτηση στη στήλη των προς καθαρισμό ή ανάλυση ουσιών οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και της επιφάνειας της στατικής φάσης. Για την έκλυση των ουσιών χρησιμοποιείται κυρίως μία πολική κινητή φάση, αποτελούμενη συνήθως από H_2O και $MeOH$, CH_3CN ή κάποιον άλλον οργανικό διαλύτη αναμίξιμο με H_2O . Οι διάφορες ουσίες εκλύονται κατά σειρά αύξουσας υδροφοβικότητας [171].

Όπως αναφέρθηκε ήδη, έπειτα από την απομάκρυνση των πεπτιδίων από τη ρητίνη, τα ακατέργαστα πεπτίδια ξηραίνονται για 24 h σε ξηραντήρα υψηλού κενού πάνω από P_2O_5 . Ακολουθεί ο καθαρισμός των πεπτιδίων με στήλη ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC και το πεπτίδιο ανιχνεύεται με ανιχνευτή οπτικής απορρόφησης στα 220 nm. Για την έκλυση των πεπτιδίων από τη στήλη, χρησιμοποιείται σύστημα έκλυσης γραμμικής βαθμίδωσης δύο διαλυτών A και B. Ο διαλύτης A είναι συνήθως 0,05 % TFA σε H_2O και ο διαλύτης B είναι συνήθως ακετονιτρίλιο 60 % σε διαλύτη A. Η τελική περιεκτικότητα του διαλύτη έκλυσης σε ακετονιτρίλιο ρυθμίζεται με βάση την πολικότητα του κάθε πεπτιδίου. Η επιλογή των κλασμάτων από την έκλυση των πεπτιδίων γίνεται με την βοήθεια της αναλυτικής RP-HPLC, όπου αναμένεται προϊόν μίας κορυφής. Μετά τον καθαρισμό τα κλάσματα που περιέχουν το αντίστοιχο πεπτίδιο λυοφιλοποιούνται και αποθηκεύονται στους $-35\text{ }^\circ\text{C}$.

Τέλος, τα πεπτίδια ταυτοποιούνται βάσει του μοριακού τους βάρους με φασματομετρία μαζών με τη μέθοδο ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS) [172].

2.2 Κλωνοποίηση και έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακό σύστημα

Η Μοριακή Βιολογία είναι η μελέτη της βιολογίας σε μοριακό επίπεδο. Το πεδίο αυτό συναντάται και με άλλα πεδία της Βιολογίας και ειδικά με την Γενετική και την Βιοχημεία. Η Μοριακή Βιολογία εστιάζει κυρίως στην

κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ποικίλων συστημάτων του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ DNA, RNA και πρωτεϊνών καθώς επίσης και στην κατανόηση του τρόπου ρύθμισης των αλληλεπιδράσεων αυτών. Η κλωνοποίηση (expression cloning) αποτελεί μία από τις βασικές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας για την μελέτη της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Στην τεχνική αυτή, αρχικά κλωνοποιείται το DNA που κωδικοποιεί για την αλληλουχία της υπό μελέτη πρωτεΐνης (με τεχνικές PCR και/ή χρήση περιοριστικών ενζύμων) μέσα σε ένα φορέα έκφρασης, κυρίως πλασμίδιο. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει ειδικές αλληλουχίες προαγωγέων που οδηγούν στην έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στη συνέχεια, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται σε βακτηριακά ή ευκαρυωτικά κύτταρα, μία διαδικασία γνωστή ως μετασχηματισμός. Τα πλασμίδια αυτά είτε ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή είτε παραμένουν ανεξάρτητα του γονιδιώματος. Και στις δύο περιπτώσεις, η επιθυμητή αλληλουχία βρίσκεται μέσα στο κύτταρο και μπορεί πλέον να εκφραστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη με την βοήθεια ειδικών παραγόντων (όπως IPTG, Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) που εισάγονται στα κύτταρα για την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες. Οι μεγάλες αυτές ποσότητες των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μπορούν να εκχυλιστούν στη συνέχεια από τα βακτηριακά ή ευκαρυωτικά κύτταρα. Όλα τα στάδια της κλωνοποίησης παρουσιάζονται αναλυτικά στο Σχήμα 2.7.

Στην παρούσα διατριβή, δημιουργήθηκε η ανάγκη παραγωγής ανασυνδυασμένης CaM αγρίου τύπου, είτε εκφρασμένης με την συνοδό-πρωτεΐνη GST για την χρήση της σε πειράματα συγκατακρήμνισης 1^{ου} τύπου, είτε χωρίς κάποια συνοδό-πρωτεΐνη, για την χρήση της τόσο σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης 2^{ου} τύπου όσο και σε πειράματα πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης, στα οποία θα γίνει αναφορά στην συνέχεια (βλέπε υποκεφάλαια 2.8 και 2.4, αντίστοιχα). Επιπλέον, με τεχνικές μοριακής βιολογίας παράχθησαν έξι μεταλλαγμένες μορφές της CaM που έχουν βρεθεί σε ασθενείς με καρδιακές παθήσεις. Στην συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά τα στάδια που ακολουθήθηκαν για την παραγωγή των

ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών της CaM από το σημείο της εισαγωγής στον πλασμιδιακό φορέα των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τις επιθυμητές πρωτεΐνες (κλωνοποίηση).

Σημείωση: τα πειράματα που αναφέρονται στα υποκεφάλαια 2.2, 2.3, 2.4, 2.7 και 2.8, έλαβαν χώρα κατά την διάρκεια επίσκεψης στο Πανεπιστήμιο του Κάρντιφ στην σχολή της Ιατρικής στο Ινστιτούτο Καρδιολογίας (Καθηγητής Anthony F. Lai). Όλα τα αντιδραστήρια ήταν υψηλής καθαρότητας (analytical grade) και αγοράστηκαν από την Sigma Aldrich ή Fisher Scientific, με εξαίρεση τα αντιδραστήρια η προέλευση των οποίων αναγράφεται στα Υλικά και Όργανα.

2.2.1 Συνένωση του πλασμιδίου με το ένθεμα ξένου DNA

Υλικά και Όργανα

- ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης, pH 7,5 (NEB)
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
10 mM DTT
1mM ATP
- T4 DNA λιγάση σε ρυθμιστικό διάλυμα φύλαξης (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 50% γλυκερόλη) (NEB)
- Απιονισμένο H₂O
- Θερμικός κυκλοποιητής GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer)

Η διαδικασία της συνένωσης του πλασμιδίου με το ένθεμα έγινε στη συνιστώμενη μοριακή αναλογία 3:1, δηλαδή χρησιμοποιήθηκαν 300 ng ενθέματος (DNA που περιέχει τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις επιθυμητές πρωτεΐνες και έχει υποστεί πέψη με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες) προς 100 ng πλασμιδίου (που έχει υποστεί πέψη με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες με το ένθεμα). Στο διάλυμα του ενθέματος και του πλασμιδίου προστέθηκε T4 DNA λιγάση στην ίδια ποσότητα με το πλασμίδιο και οι κατάλληλες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος T4 DNA λιγάσης και dH₂O. Η κλωνοποίηση έγινε στους 16°C για 15h. Το μείγμα

κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων One Shot® TOP10 *Escherichia coli*.

2.2.2 Μετασχηματισμός

Υλικά και Όργανα

- κύτταρα One Shot® TOP10 *Escherichia coli*, Thermo Fisher Scientific
- θρεπτικό υλικό LB
- στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ (1 % w/v τρυπτόνη, 0,5 % w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,5 % w/v NaCl, 1,5 % άγαρ)
- αντιβιοτικά (αμπικιλίνη 50 mg/mL, καναμυκίνη 25 mg/mL, χλωραμφενικόλη 34 mg/mL)
- τρυβλία Petri
- υδατόλουτρο
- επωαστικός κλίβανος

Για κάθε μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε μία δόση (100 μ L) από τα κατάλληλα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα One Shot® TOP10 *Escherichia coli*. Τα κύτταρα αφέθηκαν στον πάγο έως ότου επέλθει η τήξη τους. Στη συνέχεια, 2-3 μ L (5-10 ng DNA) από το μείγμα κλωνοποίησης προστέθηκε στα κύτταρα, έγινε ήπια ανάμιξη και τα κύτταρα αφέθηκαν στον πάγο για 30 min. Μετά από 30 min, τα κύτταρα εμβαπτίστηκαν σε υδατόλουτρο 42°C για 45 sec και επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 min. Εννιακόσια μ L θρεπτικού μέσου LB προστέθηκαν στο κυτταρικό εναιώρημα και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για μία ώρα με συνεχή ανάδευση στα 225 rpm. Διακόσια μ L της κυτταρικής καλλιέργειας επιστρώθηκαν σε τρυβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες.

2.2.3 Ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

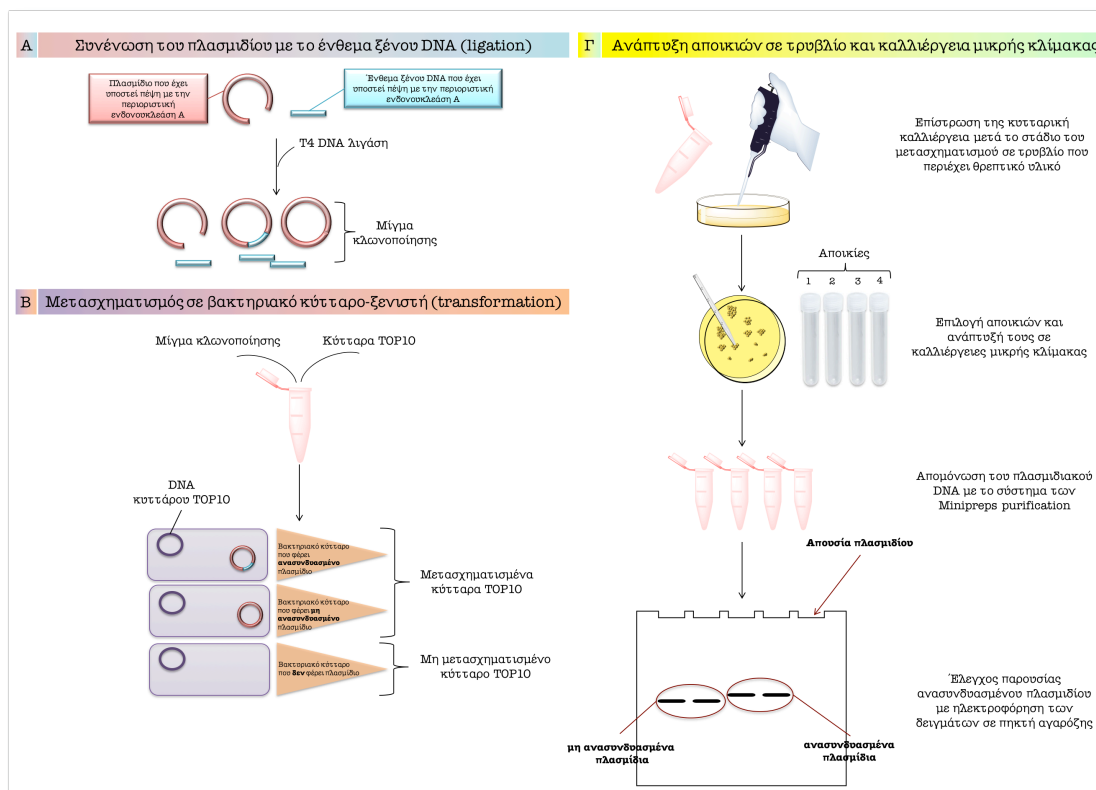
Υλικά και Όργανα

- Wizard® Plus SV Minipreps purification system (Promega)

- 50x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης tris-acetate-EDTA (TAE) αραιωμένο σε απιονισμένο H₂O με αναλογία 1:50
- αγαρόζη (BioRad)
- βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/mL (Sigma)
- 6x διάλυμα φόρτωσης (40% v/v σακχαρόζη, 0,25% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης)
- μάρτυρας μοριακών βαρών (1kb DNA ladder, Promega)
- εκμαγείο και χτένες
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- τράπεζα UV
- φωτογραφική μηχανή
- ρυθμιστικά διαλύματα περιοριστικών ενδονουκλεασών (NEB)
- BSA (NEB)
- περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoR I και Sal I (NEB)
- απιονισμένο H₂O
- μικροφυγόκεντρος
- υδατόλουτρο
- BigDye terminator sequencing kit (Perkin-Elmer)
- αναλύτης αλληλουχίας ABI Prism 377 sequencer (Perkin-Elmer)

Για να διαπιστωθεί ποιές από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, έγινε επιλογή 10 αποικιών από κάθε τρυβλίο. Για κάθε μία αποικία έγινε μικρής κλίμακας καλλιέργεια για να απομονωθεί στην συνέχεια το DNA από τα κύτταρα, ώστε να διαπιστωθεί ποιο πλασμίδιο περιέχει το ένθεμα (διαχωρισμός ανασυνδυασμένου και μη ανασυνδυασμένου πλασμιδίου). Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη βοήθεια του Wizard[®] Plus SV Minipreps purification system (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η έκλυση του DNA έγινε με 50 μL dH₂O, αποστειρωμένο. Πεντακόσια ng πλασμιδιακού DNA υποβλήθηκαν

σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και το DNA που αποκόπηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ενθέματος. Η τελική επιβεβαίωση επήλθε με αλληλούχηση που έγινε στο πλασμιδιακό DNA με τη βοήθεια του BigDye terminator sequencing kit σε θερμικό κυκλοποιητή και σε αναλύτη αλληλουχίας ABI Prism 377.



Σχήμα 2.7: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της κλωνοποίησης συμπεριλαμβανομένων των σταδίων της συνένωσης του πλασμιδίου με το ένθεμα (Α), του μετασχηματισμού (Β) και της ανάλυσης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (Γ).

2.2.4 Έκφραση πρωτεϊνών σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες

Υλικά και Όργανα

- θρεπτικό υλικό LB
- αντιβιοτικά (αμπικικιλίνη 50 mg/mL)
- 0,1 M IPTG
- Επωαστικός κλίβανος
- Φυγόκεντρος

Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα BL21-Codon Plus (DE3)-RILP μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει την ετικέτα των έξι ιστιδινών (6His-tag). Η διαδικασία του μετασχηματισμού είναι ίδια με αυτή του Υποκεφαλαίου 2.2.2 με την διαφορά ότι χρησιμοποιούνται τα κύτταρα BL21-Codon Plus (DE3)-RILP έναντι των κυττάρων One Shot® TOP10 *Escherichia coli* και επιπλέον τα κύτταρα μετασχηματίζονται με το ανασυνδυασμένο πλέον πλασμίδιο έναντι του μίγματος κλωνοποίησης. Μία από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν ενοφθαλμίστηκε σε 10 mL θρεπτικού υλικού LB, που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό, και επωάστηκε στους 37°C για 14 h με συνεχή ανάδευση στα 225 rpm. Το επόμενο πρωί, 5 mL της υγρής καλλιέργειας προστέθηκαν σε 1 L θρεπτικού υλικού LB που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό και η καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37°C με συνεχή ανάδευση στα 225 rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0,6. Στη συνέχεια, προστέθηκε 0,5 mg/mL IPTG για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης και η καλλιέργεια επωάστηκε στους 16°C για 16 h με συνεχή ανάδευση στα 225 rpm. Μετά την επαγωγή, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 3.500 g στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα φυλάχθηκε στους -80°C.

2.2.5 Καθαρισμός ενός σταδίου και αποκοπή της ιντεΐνης από τις 6xHis-SUMO2-intein-CaM και 6xHis-SUMO2-intein-GST-CaM με χρωματογραφία συγγενείας

Ένα βασικό πρόβλημα που σχετίζεται με την έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακό σύστημα είναι η έκφραση διαλυτών και σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Τα προβλήματα αυτά, εν μέρει, αντιμετωπίζονται με την χρήση διαφόρων συντετηγμένων συνοδών-πρωτεϊνών όπως η GST (glutathione S-transferase) και η SUMO (small ubiquitin-related modifier). Η απομάκρυνση των συνοδών-πρωτεϊνών με την χρήση κάποιων πρωτεασών (στην περίπτωση της SUMO) αυξάνει το κόστος παραγωγής ενώ επίσης αυξάνει τα στάδια καθαρισμού, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή τους στην μεγάλης κλίμακας παραγωγή πρωτεϊνών. Την τελευταία δεκαετία, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός ιντεϊνών που υπόκεινται σε αυτό-αποκοπή (self-cleaving), οι οποίες εισάγονται συνήθως ανάμεσα στην συνοδό-πρωτεΐνη και στην

πρωτεΐνη που ενδιαφέρει. Η αυτο-αποκοπή γίνεται υπό ήπιες αλλαγές στην θερμοκρασία και στο pH κατά την διάρκεια του καθαρισμού [173].

Υλικά και Όργανα

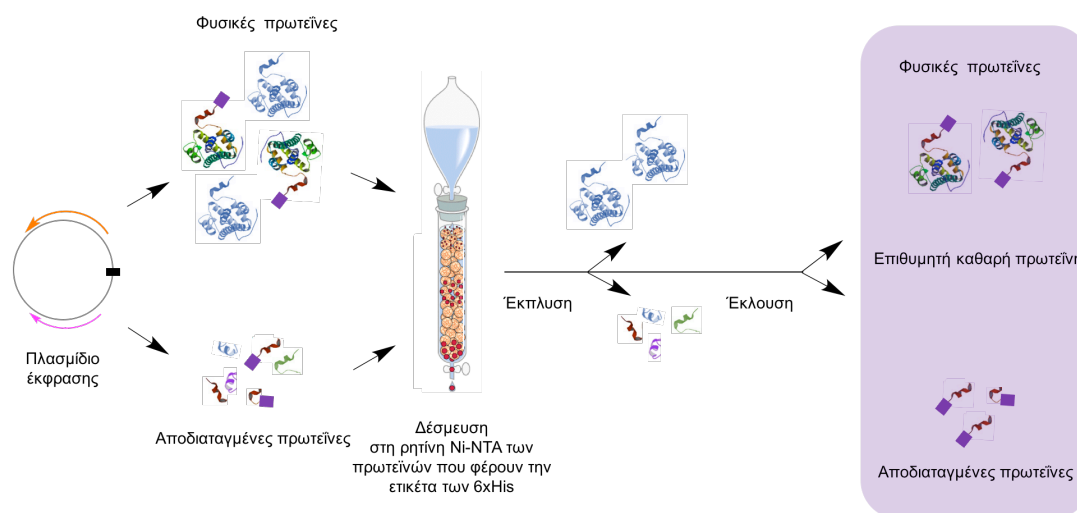
- Ρυθμιστικό διάλυμα A, pH 8,5
Tris 50 mM
NaCl 300 mM
Ιμιδαζόλη 20 mM
dH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης
Αναστολείς πρωτεασών (Pierce)
1 mg/mL λυσοζύμη
ρυθμιστικό διάλυμα A
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7,4
NaCl 137 mM
KCl 2,7 mM
Na₂HPO₄ 10 mM
KH₂PO₄ 1,8 mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αποκοπής, pH 6,0
Bis-Tris 40 mM
Ιμιδαζόλη 20 mM
PBS
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, pH 6,0
Bis-Tris 40 mM
Ιμιδαζόλη 500 mM
PBS
- β-μερκαπτοαιθανόλη

- Ρητίνη αγαρόζης Ni-NTA, Qiagen
- Snakeskin dialysis tubing 10 kDa MWCO, Pierce
- Φίλτρα (Millipore)
- Ομογενοποιητής υπερήχων
- Φυγόκεντρος

Το ίζημα των κυττάρων του προηγούμενου σταδίου, επαναιωρήθηκε σε 20 mL/L (σε σχέση με τον αρχικό όγκο της καλλιέργειας) ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Καθ' όλη τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων και του καθαρισμού της πρωτεΐνης, το δείγμα διατηρούνταν συνεχώς στους 4°C. Το εναιώρημα επωάστηκε για 1 h, ακολούθησε κατεργασία του με υπερήχους 3 φορές για 15 min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε σε 15.000 g για 15 min και κρατήθηκε το υπερκείμενο. Μετά την εξισορρόπηση της ρητίνης με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 2 mL ρητίνης αγαρόζης Ni-NTA ανά L αρχικής καλλιέργειας προστέθηκαν στο υπερκείμενο και το εναιώρημα αναδεύτηκε για 30 min στους 4°C, για την πρόσδεση των πρωτεϊνών, που φέρουν την αλληλουχία των 6xHis, στην ρητίνη. Εν συνεχεία, το εναιώρημα διήλθε μέσω στήλης με φίλτρο, οπότε τα σφαιρίδια της ρητίνης που πλέον έχουν δεσμεύσει τις πρωτεΐνες που φέρουν την αλληλουχία των 6xHis παρέμειναν στην στήλη, ενώ απομακρύνθηκαν οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια της ρητίνης. Ακολούθησαν εκπλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα A, όγκου 10 φορές τον όγκο της στήλης, ενώ στην συνέχεια ακολούθησε ακόμη μία έκπλυση με το ρυθμιστικό διάλυμα αποκοπής.

Αμέσως μετά, στην στήλη προστέθηκαν 2-3 mL ρυθμιστικού διαλύματος αποκοπής, εφόσον στην στήλη είχε εφαρμοστεί το καπάκι της για να μην απομακρύνεται το διάλυμα, και η στήλη αφέθηκε για 4 h, αυτή τη φορά σε RT. Ακολούθησε η έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη και η ρητίνη εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα αποκοπής, όγκου 2-3 mL για 3-4 φορές, έως ότου να εκλουστεί όλη η ποσότητα της CaM ή της GST-CaM από την ρητίνη (Σχήμα 2.8). Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης προστίθεται στην στήλη εφόσον έχει εκλουστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη, για την έκλυση της SUMO, ως επιβεβαίωση του σταδίου αυτο-αποκοπής της ιντεΐνης. Τα εκλούσματα που παρελήφθησαν με το ρυθμιστικό διάλυμα αποκοπής, υπέστησαν διαπίδυση

με Snakeskin dialysis tubing 10 kDa MWCO (Pierce) σε PBS στους 4°C για 16 h. Μετά την διαπίδυση, το διάλυμα της πρωτεΐνης συμπυκνώθηκε με φίλτρα (Millipore) και η συγκέντρωσή πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με δοκιμασία BCA (Pierce).



Σχήμα 2.8: Διαγραμματική απεικόνιση του καθαρισμού των πρωτεϊνών με ετικέτα 6xHis

2.3 Παρασκευή βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ χοίρου

Το ΣΔ αποτελεί ένα υποκυτταρικό οργανίδιο με κύριο ρόλο τον έλεγχο των επιπέδων του Ca^{2+} στα μυϊκά κύτταρα. Το ΣΔ βρίσκεται ανάμεσα στα μυοϊνίδια, τα οποία και περιβάλλει, και ταξινομείται σε δύο τύπους: στο διαμήκες ΣΔ (longitudinal SR, LSR) όπου βρίσκεται ανάμεσα στα μυοϊνίδια, και στο συνδετικό ΣΔ (junctional SR, JSR) που είναι το ΣΔ που σχηματίζει την τελική δεξαμενή (terminal cisternae) και συνδέεται με τις μεμβράνες του συστήματος των T σωληνίσκων. Όταν ο καρδιακός μυς ομογενοποιείται, οι μεμβράνες του ΣΔ θραυσατοποιούνται και στην συνέχεια επανενώνονται αυθόρμητα και σχηματίζουν μικρά κυστίδια-φορείς ΣΔ. Το ρυθιστικό διάλυμα ομογενοποίησης περιέχει 0,3 M σουκρόζης. Μετά από φυγοκέντρηση σε 10.500 g και συλλογή του υπερκείμενου απομακρύνονται κυτταρικά υπολείμματα, ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια καθώς και τα μυοϊνίδια. Με περαιτέρω φυγοκέντρηση του υπερκείμενου στα 100.000 g για 45 min παραλαμβάνεται το ίζημα, που αντιστοιχεί στο ακατέργαστο καρδιακό μικροσωμικό κλάσμα που περιέχει τόσο το ελαφρύ (αντιπροσωπεύει το

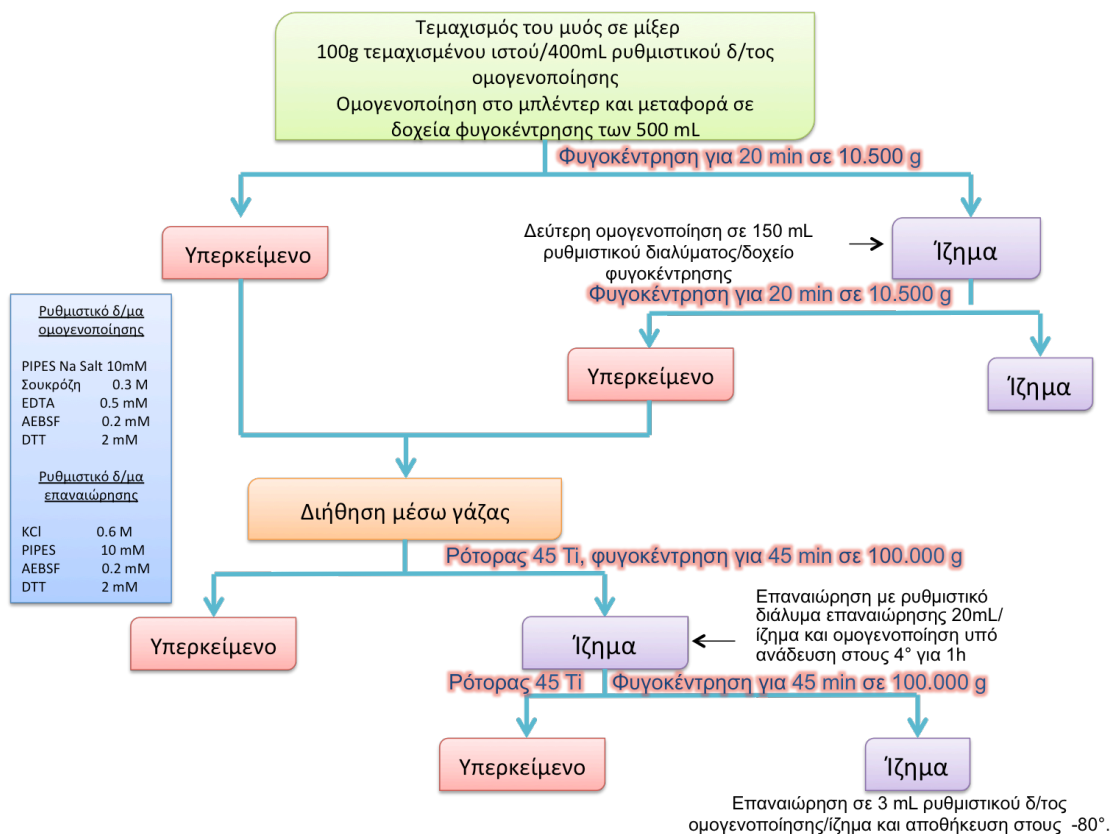
διαμήκες ΣΔ) όσο και το βαρύ (αντιπροσωπεύει το συνδετικό ΣΔ) κλάσμα. Το ελαφρύ κλάσμα περιέχει σε ποσοστό 90% την πρωτεΐνη Ca^{2+} -ΑΤΡάση και μεγάλο ποσοστό φωσφολιπιδίων. Το βαρύ κλάσμα περιέχει και άλλες πρωτεΐνες, ανάμεσα σε αυτές και τον RyR2. Σε τελικό στάδιο, το ακατέργαστο ΣΔ ομογενοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει KCl 0,6 M και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 100.000 g, οπότε παραλαμβάνεται το ίζημα που περιέχει μόνο το βαρύ κλάσμα του ΣΔ [174, 175].

Υλικά και Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης
 - ✓ Na₂PIPES (1,4-Piperazinediethanesulfonic acid) 10 mM
 - ✓ Σουκρόζη 0,3 M
 - ✓ EDTA ((Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,5 mM
 - ✓ AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), 0,2 mM
 - ✓ DTT (Dithiothreitol) 2 mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης
 - ✓ Na₂PIPES 10 mM
 - ✓ KCl 0,6 M
 - ✓ AEBSF 0,2 mM
 - ✓ DTT 2 mM
- Συσκευή μίξερ, μπλέντερ, γυάλινος ομογενοποιητής χειρός (Ultra-Turrax T25)
- Δοχεία φυγοκέντρησης των 500 mL
- Κωνική φιάλη του 1L, γάζα, σπάτουλες
- Φυγόκεντρος Beckman, ρότορας 45Ti

Αρχικά 200 g καρδιακού μυός τεμαχίζονται με την βοήθεια μίξερ. Ο τεμαχισμένος ιστός ομογενοποιείται με την προσθήκη 800 mL ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης μέσω συσκευής μπλέντερ. Στην συνέχεια, το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε δοχεία φυγοκέντρησης των 500 mL και φυγοκεντρείται σε 6.500 rpm (10.500 g) για 20 min στους 4°C. Το υπερκείμενο διηθείται μέσω γάζας και φυγοκεντρείται σε 30.000 rpm (100.000 g) για 45 min στους 4°C. Το ίζημα της φυγοκέντρησης, που

αντιπροσωπεύει το ακατέργαστο μικροσωμικό κλάσμα της καρδιάς, επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης και ύστερα από 1 h ήπιας ανάδευσης στους 4°C, το αιώρημα φυγοκεντρείται στα 30.000 rpm, όπως προηγουμένως. Το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης, ακολουθεί ομογενοποίηση με γυάλινο ομογενοποιητή χειρός και το ομογενοποίημα φυλάσσεται σε δείγματα του 1 mL στους -80°C (Σχήμα 2.8). Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο δείγμα προσδιορίζεται με την μέθοδο BCA, ενώ η παρουσία αλλά και η ενεργότητα του RyR2 που περιέχεται σε αυτό, ελέγχεται με την μέθοδο πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης.

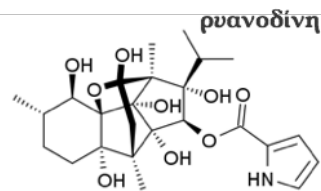


Σχήμα 2.9: Σχηματική απεικόνιση της παρασκευής βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από τον καρδιακό μυ χοίρου.

2.4 Προσδιορισμός της πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2

Η ρυανοδίνη, όπως έχουμε ήδη αναφέρει στο υποκεφάλαιο 1.1, είναι ένα αλκαλοειδές που προσδένεται στον RyR2 με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση. Η πρόσδεσή της στον RyR2 εξαρτάται από την λειτουργική

κατάσταση στην οποία βρίσκεται ο δίαυλος και συγκεκριμένα προσδένεται ισχυρά όταν ο δίαυλος βρίσκεται στην ανοιχτή του διαμόρφωση. Επομένως, η ραδιενεργά επισημασμένη με τρίτιο ($[^3\text{H}]$) ρυανοδίνη, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της λειτουργικότητας του υποδοχέα. Η παρουσία Ca^{2+} , που δρα ως ενεργοποιητής του RyR2 σε συγκεντρώσεις έως και $1 \mu\text{M}$ και ως αναστολέας σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, κατά τον προσδιορισμό της πρόσδεσης της $[^3\text{H}]$ ρυανοδίνης στον RyR2 σε ένα εύρος συγκεντρώσεων μέχρι τη συγκέντρωση $1 \mu\text{M}$, ευνοεί την ανοιχτή διαμόρφωση του διαύλου άρα και την σταδιακά αυξανόμενη πρόσδεση της $[^3\text{H}]$ ρυανοδίνης στον RyR2 [2, 3]. Επίσης, η $[^3\text{H}]$ ρυανοδίνη αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων ρυθμιστών του RyR2, όπως η CaM, στη λειτουργία του διαύλου.



Υλικά και Όργανα

- Βασικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7,1
 - ✓ PIPES 25 mM
 - ✓ KCl 150 mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, pH 7,4
 - ✓ Tris/HCl 20 mM
 - ✓ KCl 200 mM
- Υδατικό διάλυμα ψυχρής ρυανοδίνης 1,5 mM
- Αραιό υδατικό διάλυμα ψυχρής ρυανοδίνης 4,5 μM
- Κύριο μίγμα (master mix)
 - ✓ Σε 400 μL κύριου ρυθμιστικού δ/τος προστίθενται 10 μL αραιού υδατικού διαλύματος ψυχρής ρυανοδίνης και 10 μL ραδιενεργώς επισημασμένης με τρίτιο (θερμής) ρυανοδίνης (100 Ci/mmol, Amersham)
- EGTA (αιθυλενογλυκολ-τετραοξικό οξύ) 1mM
- Πρότυπα διαλύματα έλευθερων Ca^{2+} , συγκέντρωσης pCa 8 – pCa 4 (όπου $\text{pCa } X = -\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]^X$ που προκύπτουν από ανάμειξη διαλυμάτων

1mM EGTA και 1mM CaCl₂, βάσει υπολογισμών του προγράμματος Max Chelator

- Διάλυμα ανασυνδυασμένης, αγρίου τύπου CaM και μεταλλαγμένων μορφών της, τελικής συγκέντρωσης 1 mM
- 50 μL βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιά χοίρου, συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης 20-25 mg/mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες RIA 12x55 mm PKG/1000 (Perkin Elmer), φίλτρα από ίνες γυαλιού Whatman GF/B, λαβίδα, ποτήρι ζέσεως 1 L
- Φιαλίδια υγρού σπινθηρισμού των 20 mL με πώμα (Wheaton), κοκτέιλ υγρού σπινθηρισμού -Ultima Gold™ Cocktails (PerkinElmer)
- Συσκευή κενού, αντλία κενού, υδατόλουτρο
- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού- Liquid scintillation Analyzer (Packard)

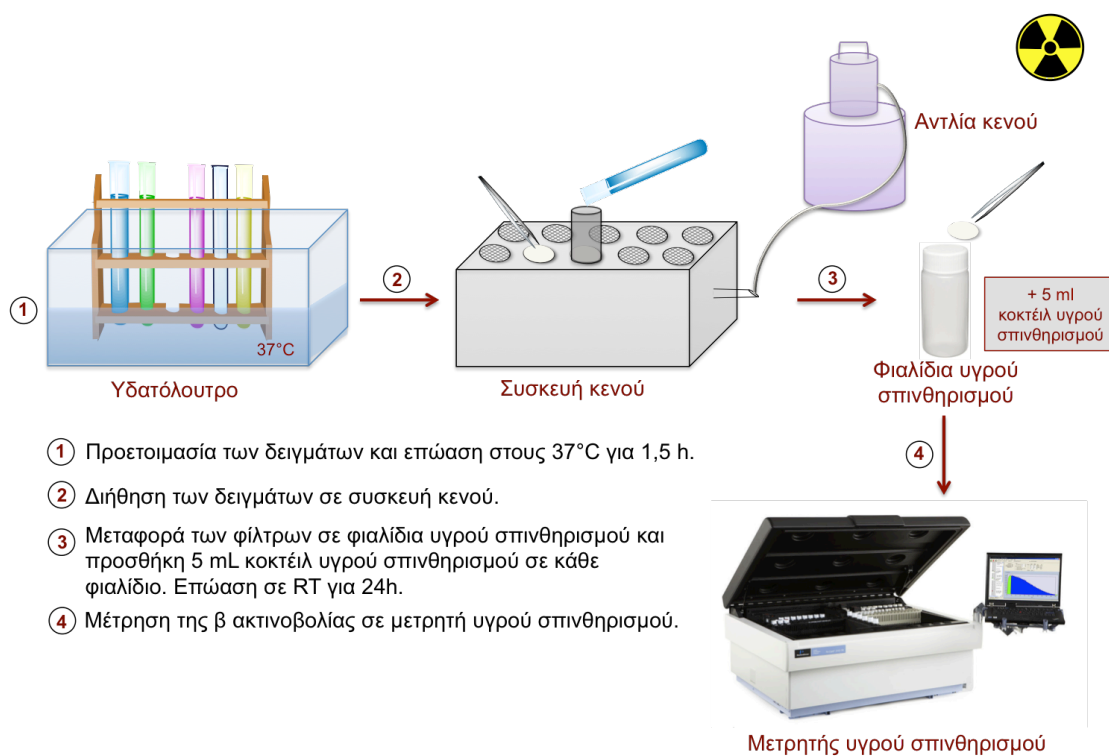
Πίνακας 2.5: Σύσταση των δειγμάτων στην μέθοδο της πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2.

Είδος πρόσδεσης της [³ H]ρυανοδίνης	Όγκος δ/τος (μL) EGTA ή pCa 8-3	Όγκος βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ (μL)	Όγκος master mix (μL)	Όγκος δ/τος ψυχρής ρυανοδίνης 1,5 mM (μL)	Όγκος διαλύματος CaM, τελικής συγκέντρωσης 1 μM (μL)	Όγκος κύριου ρυθμιστικού δ/τος (μL)
Ολική πρόσδεση	150	50	10	-	-	90
Ολική πρόσδεση παρουσία της CaM	150	50	10	-	x	90-x
Μη ειδική πρόσδεση	150	50	10	10	-	80
Μη ειδική πρόσδεση παρουσία της CaM	150	50	10	10	x	80-x

Αρχικά γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων, η σύσταση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 2.5. Τα 50 μL του μίγματος βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ αντιστοιχούν περίπου σε 1 μg RyR2. Όλες οι αντιδράσεις γίνονται σε τελικό όγκο 300 μL και εις διπλούν. Στην συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C για 1,5 h. Μετά την παρέλευση της 1,5 h, οι σωλήνες απομακρύνονται από το υδατόλουτρο και σε κάθε έναν προστίθενται 5 mL κύριου ρυθμιστικού διαλύματος, οπότε και διακόπτεται η αντίδραση. Ακολουθεί η διήθηση των δειγμάτων από φίλτρα

Whatman σε συσκευή κενού και τα φίλτρα εκπλένονται με 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Τέλος, τα φίλτρα τοποθετούνται σε φιαλίδια υγρού σπινθηρισμού, στα οποία προστίθενται 5 mL κοκτέιλ υγρού σπινθηρισμού και μετά απο 24 h μετρούνται τα επίπεδα της δέσμευσης [³H]ρυανοδίνης στο κάθε δείγμα (Σχήμα 2.10). Η μέτρηση της ραδιενέργειας εκφράζεται σε cpm (counts per min). Η μη ειδική πρόσδεση, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.5, υπολογίζεται μετά από προσθήκη περίσσειας ψυχρής ρυανοδίνης στο διάλυμα της αντίδρασης. Η ειδική πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2 υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Ειδική πρόσδεση} = \text{Ολική πρόσδεση} - \text{Μη ειδική πρόσδεση}$$



Σχήμα 2.10 Απεικόνιση των σταδίων του προσδιορισμού πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2.

2.5 Ανοσοποίηση πειραματοζώων

Η τεχνική των συνθετικών πεπτιδίων, που αποτελούν τμήματα της αμινοξικής αλληλουχίας μίας πρωτεΐνης για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων περιοχών ή και ολόκληρης της πρωτεΐνης έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον για έρευνα σε πολλούς τομείς. Στους παραπάνω τομείς

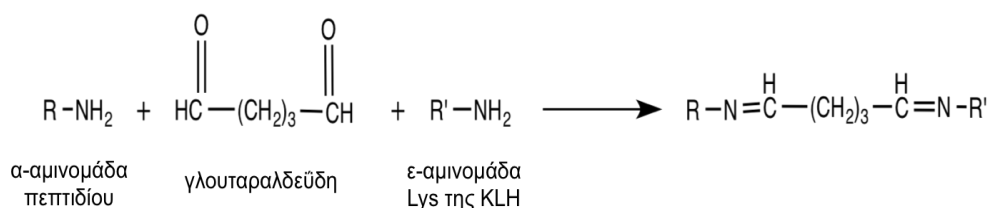
συμπεριλαμβάνονται η ανάπτυξη μορίων ανίχνευσης για ειδικές περιοχές της πρωτεΐνης και η ταυτοποίηση γονιδιακών προϊόντων που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί. Οι βασικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπ' όψιν για το σχεδιασμό πεπτιδίων, με στόχο τη χρήση τους σε πρωτόκολλα ανοσοποίησης είναι (α) η αλληλουχία του πεπτιδίου, (β) το μήκος του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί, (γ) εάν θα συζευχθεί το πεπτίδιο σε μία πρωτεΐνη-φορέα, και αν ναι, ο τύπος της πρωτεΐνης-φορέα και η αντίδραση της σύζευξης, (δ) ο τύπος ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ανοσοαπόκρισης και (ε) το πρωτόκολλο της ανοσοποίησης. Η αλληλουχία του πεπτιδίου μπορεί να εκτιμηθεί από κατάλληλα προγράμματα που έχουν αναπτυχθεί κατά καιρούς. Σχετικά με το μήκος των πεπτιδίων, πεπτίδια μικρού μήκους της τάξεως των 6 αμινοξέων είναι ικανά, υπό κατάλληλες συνθήκες, να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση αλλά συνήθως όχι τόσο ισχυρή όσο τα πεπτίδια μήκους π.χ. 12 αμινοξέων. Μεγαλύτερα πεπτίδια είναι ικανά να σχηματίσουν δευτεροταγή δομή η οποία μπορεί να μιμηθεί την δευτεροταγή δομή της ολόκληρης πρωτεΐνης ενισχύοντας την πιθανότητα η ανοσοαπόκριση έναντι του πεπτιδίου να είναι όμοια με εκείνης της πρωτεΐνης [176].

Το πρώτο στάδιο για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι συνθετικών πεπτιδίων, που πιθανόν να αναγνωρίζουν ολόκληρη την υπό εξέταση πρωτεΐνη είναι η επιλογή της κατάλληλης αμινοξικής αλληλουχίας για την διέγερση ανοσοαπόκρισης. Παρόλο που τα κριτήρια για την επιλογή αυτή δεν αποτελούν πανάκεια, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που λαμβάνονται υπ' όψη κατά τη θεωρητική πρόβλεψη της αντιγονικότητας συγκεκριμένων πεπτιδικών τμημάτων μίας πρωτεΐνης όπως η πρωτοταγής και η δευτεροταγής δομή, η υδροφιλικότητα, η ευκαμψία και η κινητικότητα [27, 177-180].

Από πλευράς ανοσογονικότητας, τα περισσότερα συνθετικά πεπτίδια εμπίπτουν στην κατηγορία των απενίων. Πιο συγκεκριμένα, τα συνθετικά πεπτίδια συνήθως δεν μπορούν, όταν χορηγηθούν ως έχουν σε έναν οργανισμό-ξενιστή, να προκαλέσουν την ανάπτυξη αντισωμάτων, εκτός εάν έχουν προηγουμένως συζευχθεί, ομοιοπολικά, σε ειδικό ανοσογονικό φορέα, τις περισσότερες φορές μία ανοσογονική πρωτεΐνη (πρωτεΐνη-φορέας).

Για την σύζευξη του συνθετικού πεπτιδίου με την πρωτεΐνη-φορέα χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια σύζευξης τα οποία συχνά διαθέτουν δύο δραστικές ομάδες που βρίσκονται συνήθως σε αντίθετα σημεία του μορίου. Τα αντιδραστήρια αυτά μπορεί να είναι ομοδιλειτουργικά, διαθέτοντας δύο πανομοιότυπες δραστικές ομάδες, ή ετεροδιλειτουργικά διαθέτοντας δύο δραστικές ομάδες. Η σύνδεση του συνθετικού πεπτιδίου με τους ανοσογονικούς φορείς γίνεται ομοιοπολικά, μέσω της N^α- ή των N^ε-αμινομάδων της πρωτεΐνης-φορέα. Ορισμένα από τα αντιδραστήρια σύζευξης είναι τα ακόλουθα:

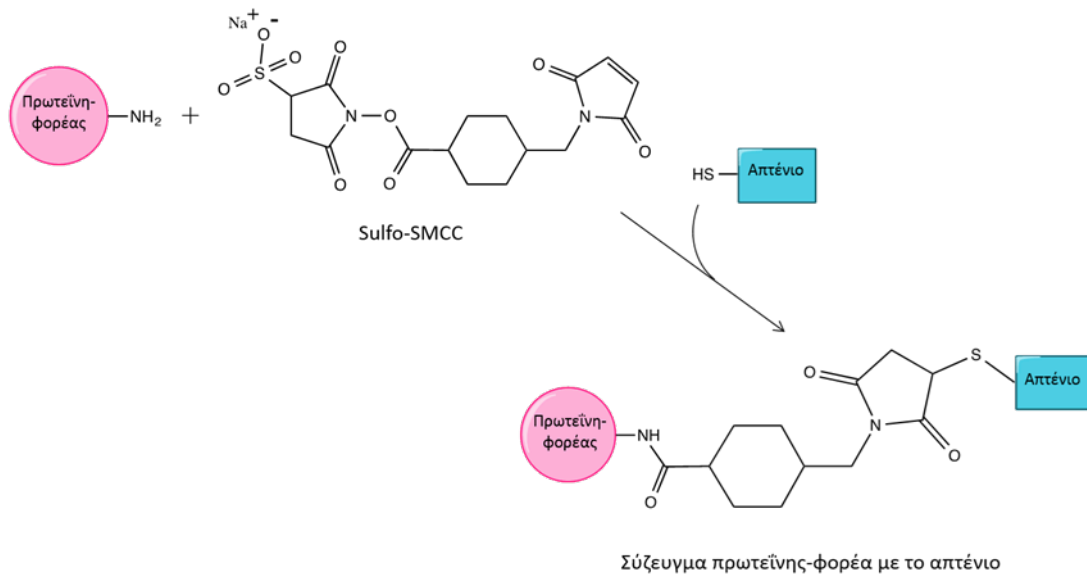
- ❖ *Η γλουταραλδεΐδη*: είναι ένα ομοδιλειτουργικό αντιδραστήριο σύζευξης που συνδέει δύο ενώσεις μέσω των αμινομάδων (-NH₂) τους, λόγω του ότι οι αμινομάδες σχηματίζουν εύκολα βάσεις Schiff με τις αλδεϋδομάδες της γλουταραλδεΐδης (Σχήμα 2.11).



Σχήμα 2.11: Σύζευξη πεπτιδίου-μεγαλοπρωτεΐνης μέσω γλουταραλδεΐδης

- ❖ *Ο μ-μηλειμιδοβενζοϋλο-N-υδροξυηλεκτριμίδο εστέρας (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, MBS)*: είναι ένα μη υδατοδιαλυτό ετεροδιλειτουργικό αντιδραστήριο σύζευξης, η ενεργή εστερική ομάδα NHS καθώς και η ενεργή ομάδα μηλειμιδίου του οποίου αντιδρούν με αμινομάδες (-NH₂) και σουλφυδρυλομάδες (-SH), αντίστοιχα, μέσω του μηχανισμού που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η αμινομάδα βρίσκεται συνήθως στην πλευρική αλυσίδα μίας λυσίνης (Lys) στο μόριο της πρωτεΐνης-φορέα, ενώ η σουλφυδρυλομάδα στην πλευρική αλυσίδα μίας κυστεΐνης (Cys) στο μόριο του συνθετικού πεπτιδίου. Αντίστοιχο του MBS αντιδραστήριο σύζευξης είναι το αντιδραστήριο Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), που κυκλοφορεί και ως σουλφο-παράγωγο (Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate, sSMCC). Το αντιδραστήριο sSMCC χαρακτηρίζεται από υψηλότερη

υδροφιλικότητα, σε σχέση με το SMCC, με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο συμβατή η χρησιμοποίησή του με τα υδατικά διαλύματα της πρωτεΐνης-φορέα. Η αντίδραση σύζευξης μέσω sSMCC φαίνεται παραστατικά στο Σχήμα 2.12.



Σχήμα 2.12: Σύζευξη πεπτιδίου-μεγαλοπρωτεΐνης μέσω sSMCC.

Υλικά και Όργανα

- Τα συνθετικά πεπτίδια:

P_A: hRyR2[4240-4254], T⁴²²⁰VRSALFALRYNILT⁴²⁵⁴

CysP_A: [Cys]-hRyR2[4240-4254], C-T⁴²²⁰VRSALFALRYNILT⁴²⁵⁴

LysP_A: [Lys]-hRyR2[4240-4254], K-T⁴²²⁰VRSALFALRYNILT⁴²⁵⁴

P_B: hRyR2[3584-3602], K³⁵⁸⁴AVWHKLLSKQRKRAVVAC³⁶⁰²

P_C: hRyR2[3907-3922], S³⁹⁰⁷KAIQVAKQVFNTLTE³⁹²²

CysP_C: [Cys]-hRyR2[3907-3922], C-S³⁹⁰⁷KAIQVAKQVFNTLTE³⁹²²

P_F: hRyR2[4255-4271], L⁴²⁵⁵MRMLSLKSLKKQMKKV⁴²⁷¹

CysP_F: [Cys]-hRyR2[4255-4271], C-L⁴²⁵⁵MRMLSLKSLKKQMKKV⁴²⁷¹

CysP₁: [Cys]-hCaM[134-148], C-G¹³⁴QVNYEEFVQMMTAK¹⁴⁸

CysP₂: [Cys]-hCaM[128-148], C-A¹²⁸DIDGDGQVNYEEFVQMMTAK¹⁴⁸

- Η πρωτεΐνη-φορέας, KLH, Sigma
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0,01 M, pH 7,4 (PB)

KH ₂ PO ₄	0,204 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,424 g
dH ₂ O	1 L
- Γλουταραλδεΐδη, φύσιγγες με υδατικό διάλυμα 25 %, Sigma
- Sulfo-SMCC (sulfo-succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate), Thermo Scientific
- Μembrάνη διαπίδωσης, 12 – 14 kDa MWCO, SceptumLabs
- Πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Freund's Complete Adjuvant, FCA), Difco Laboratories
- Ατελές ανοσοενισχυτικό Freund (Freund's Incomplete Adjuvant, FIA), Difco Laboratories
- Ομογενοποιητής, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Model Ultra Turrax T25
- Σύριγγες αιμοληψίας
- Φυγόκεντρος, Kubota Corporation, Model 2420
- Γυάλινοι σωλήνες φυγοκέντρου, 15 mL.

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, γένους θηλυκού, ηλικίας δύο μηνών.

Τα κουνέλια ανοσοποιήθηκαν εναντίον:

-Του συνθετικού πεπτιδίου P_A και LysP_A συζευγμένων στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (P_A/KLH ή LysP_A/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου CysP_A συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (CysP_A/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου P_B συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (P_B/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου CysP_B συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (CysP_B/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου P_C συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (P_C/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου CysP_C συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (CysP_C/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου P_F συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (P_F/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου CysP_F συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (CysP_F/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου CysP₁ συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (CysP₁/KLH)

-Του συνθετικού πεπτιδίου CysP₂ συζευγμένου στην πρωτεΐνη-φορέα KLH (CysP₂/KLH)

Σύζευξη πεπτιδίων με KLH

Πρωτόκολλο σύζευξης A:

Η σύζευξη των πεπτιδίων P_A, P_B, P_C, και P_F στην πρωτεΐνη-φορέα KLH έγινε μέσω των α- και των ε-NH₂ των πεπτιδίων αυτών, με τη βοήθεια του ομοδιλειουργικού αντιδραστηρίου γλουταραδεΰδη, το οποίο δρα ως γέφυρα μεταξύ του πεπτιδίου και της πρωτεΐνης, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.5. Για τη σύζευξη ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Σε γυάλινο φιαλίδιο με κωνικό πυθμένα προστίθενται:

- 100 μL διαλύματος KLH σε PB (10 mg/mL)
- 100 μL διαλύματος συνθετικού πεπτιδίου σε PB (1,5 μmol/mL)
- 180 μL PB
- 20 μL υδατικού διαλύματος γλουταραδεΰδης 25 % (προσθήκη στάγδην με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton)

Το διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει, υπό ήπια ανάδευση, επί 3 h σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα τοποθετείται σε ειδική μεμβράνη και

υφίσταται διαπίδυση έναντι H₂O επί 48 h. Στη συνέχεια, το διάλυμα παραλαμβάνεται από τη μεμβράνη, αραιώνεται με φυσιολογικό ορό (200 µg KLH/mL), κατανέμεται σε φιαλίδια ανά 0,5 mL και φυλάσσεται στους -30 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Πρωτόκολλο σύζευξης B:

Η σύζευξη των πεπτιδίων CysP_A, P_B, CysP_C, CysP_F, CysP₁, και CysP₂, στην πρωτεΐνη-φορέα KLH έγινε μέσω των -SH ομάδων των κυστεϊνών που τα πεπτίδια αυτά περιέχουν στο N-τελικό τους άκρο. Κατά τη σύζευξη χρησιμοποιήθηκε το ετεροδिलειτουργικό αντιδραστήριο sulfo-SMCC (sulfo-succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate), το οποίο δρα ως γέφυρα μεταξύ του πεπτιδίου και της πρωτεΐνης, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.5.

Για τη σύζευξη ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Σε γυάλινο φιαλίδιο με κωνικό πυθμένα προστίθενται:

- 100 µL διαλύματος KLH σε PB (10 mg/mL)
- 50 µL υδατικού διαλύματος sulfo-SMCC (10 mg/mL)
- 450 µL PB

Το διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει, υπό ήπια ανάδευση, επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια προστίθενται:

- 500 µL διαλύματος πεπτιδίου σε PB (1 mg/mL)

Ακολουθεί ήπια ανάδευση επί 1,5 h σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική μεμβράνη και υφίσταται διαπίδυση έναντι H₂O επί 48 h. Στη συνέχεια, το διάλυμα παραλαμβάνεται από τη μεμβράνη, αραιώνεται με φυσιολογικό ορό (200 µg KLH/mL), κατανέμεται σε φιαλίδια ανά 0,5 mL και φυλάσσεται στους -30 °C, έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Παρασκευή των ανοσογόνων

Για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι ενός ανοσογόνου από έναν οργανισμό, χορηγείται συνήθως, μαζί με το ανοσογόνο, κάποιο ανοσοενισχυτικό, με σκοπό την ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης. Τα

ανοσοενισχυτικά (adjuvants) διεγείρουν μη ειδικά την ανοσοαπόκριση. Παρόλο που η δράση τους δεν είναι πλήρως κατανοητή, τα περισσότερα ανοσοενισχυτικά περιέχουν δύο συστατικά. Το πρώτο συστατικό είναι μία ουσία που έχει σχεδιαστεί για να σχηματίζει ένα δυσδιάλυτο προϊόν, προστατεύοντας το αντιγόνο από τον ταχύ καταβολισμό μέσα στον οργανισμό, στον οποίο γίνεται η χορήγηση. Το δεύτερο συστατικό είναι μία ένωση ικανή να διεγείρει μη ειδική ανοσοαπόκριση. Οι ενώσεις αυτές δρουν με το αυξάνουν τα επίπεδα των λεμφοκινών, πεπτιδίων που διεγείρουν άμεσα την δράση των φαγοκυττάρων και προκαλούν τοπική φλεγμονώδη αντίδραση στο σημείο της έγχυσης. Το πλέον διαδεδομένο ανοσοενισχυτικό είναι το ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund (Incomplete Freund's Adjuvant) που αποτελείται από μίγμα ορυκτελαίων με έναν σταθεροποιητή, το οποίο με υδατικό διάλυμα του ανοσογόνου δίνει σταθερά γαλακτώματα νερού σε έλαιο. Το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund's Adjuvant) περιέχει επιπλέον εναιώρημα ανενεργοποιημένων μικροοργανισμών *Mycobacterium tuberculosis* στην ελαιώδη φάση. Άλλα ανοσοενισχυτικά είναι διάφορα παράγωγα του αργιλίου (οξειδία, υδροξειδία κ.α.) [181].

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, σε 0,5 mL διαλύματος από το κάθε σύζευγμα (P_A/KLH ή $LysP_A/KLH$, $CysP_A/KLH$, P_B/KLH , P_C/KLH , $CysP_C/KLH$, P_F/KLH , $CysP_F/KLH$, $CysP_1/KLH$ και $CysP_2/KLH$, 200 μg KLH/mL) προστίθεται ίσος όγκος ανοσοενισχυτικού Freund και το μείγμα γαλακτωματοποιείται σε ομογενοποιητή (13.500 rpm) για 60 sec. Το γαλάκτωμα είναι έτοιμο για χορήγηση στο ζώο-ξενιστή.

Χορήγηση των ανοσογόνων – παραλαβή των αντιορών

Τα γαλακτώματα, που παρασκευάστηκαν για κάθε σύζευγμα, χορηγούνται με ενδοδερμική ή υποδερμική ένεση, σε πολλαπλά σημεία, στη ράχη των πειραματοζώων [182]. Κατά την πρώτη χορήγηση, χρησιμοποιούνται γαλακτώματα του κάθε συζεύγματος με πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund, ενώ κατά τις επόμενες χορηγήσεις (αναμνηστικές), χρησιμοποιούνται γαλακτώματα του συζεύγματος με ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund. Η πρώτη αναμνηστική ένεση γίνεται έξι εβδομάδες μετά την 1^η χορήγηση, ενώ οι επόμενες ενέσεις γίνονται ανά διαστήματα τριών εβδομάδων.

Οι αιμοληψίες γίνονται από την περιφερική φλέβα του αυτιού 12 ημέρες μετά από κάθε αναμνηστική ένεση. Το αίμα μεταφέρεται σε γυάλινους σωλήνες φυγοκέντρου και αφήνεται επί ~3 h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να διαχωρισθεί ο αντιορός από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Μετά από δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (2.000 g, 10 min), παραλαμβάνεται ο αντιορός, ο οποίος κατανέμεται ανά 0,5 mL και φυλάσσεται στους -30 °C.

2.6 Μέθοδος ELISA

Υλικά και Όργανα

- χρησιμοποιήθηκαν οι αντιοροί εναντίον των P_A/KLH, P_B/KLH, P_C/KLH, P_F/KLH, CysP_A/KLH, CysP_C/KLH, CysP_F/KLH και CysP₁/KLH-CysP₂/KLH καθώς και μονοκλωνικό αντι-CaM αντίσωμα ποντικού (Abnova)
- διάφορες συγκεντρώσεις των συνθετικών πεπτιδίων που αναφέρονται στον Πίνακα 2.1 καθώς και διάφορες συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης CaM αγρίου τύπου
- ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-χλωριούχων (PBS) 0,1M, pH 7,4

KH₂PO₄ 0,204 g

Na₂HPO₄·2H₂O 1,424 g

KCl 0,201 g

NaCl 8,766 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 1 L dH₂O.

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0,01 M, pH 7,4 (PB)

KH₂PO₄ 0,204 g

Na₂HPO₄·2H₂O 1,424 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε ~800 mL H₂O, το pH ρυθμίζεται σε 7,4 και στη συνέχεια ο όγκος ρυθμίζεται σε 1 L με H₂O.

- διάλυμα έκπλυσης: 0,05 % v/v Tween-20 σε PBS 0,01 M, pH 7,4
- διάλυμα κορεσμού: διάλυμα έκπλυσης που περιέχει 2 % BSA

- διάλυμα αραίωσης: διάλυμα έκπλυσης που περιέχει 0,2 % BSA
- διάλυμα δεύτερου αντισώματος: εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα goat anti-rabbit IgG/HRP (Sigma) και goat anti-mouse IgG/HRP (Sigma) αραιωμένο 1:1.000 σε διάλυμα αραίωσης
- διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος:

Na₂HPO₄·2H₂O 8,900 g

Κιτρικό οξύ 10,537 g

Υπερβορικό νάτριο 0,241 g

Τα συστατικά αυτά διαλύονται σε ~400 mL H₂O, το pH ρυθμίζεται σε 4,4 με NaOH 1M και συμπληρώνεται ο όγκος, έως 500 mL με H₂O. Στην συνέχεια, προστίθενται 0,5 g ABTS (2,2'-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)) και το υγρό αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης του ABTS.

- πλακίδια μικροπιλοδότησης: Costar
- συσκευή έκπλυσης πλακιδίων ELISA, Model Multiwash II (Tricontinent)
- επωαστικός κλίβανος Precision, 4EG
- μετρητής οπτικής απορρόφησης πλακιδίων ELISA, Model Sirio S (Seac)

Η μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος προσδιορισμού) και ευρύτερα η μέθοδος EIA (Enzyme Immunoassay, ενζυμοανοσοανάλυση) αποτελούν μία βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για την ανίχνευση ενός αντιγόνου ή αντισώματος σε ένα δείγμα. Τα πρώτα δημοσιευμένα συστήματα EIA και ELISA αποτελούσαν τεχνικές που βασίζονταν στην γενική αρχή της ανοσοανάλυσης με χρήση ενός ενζύμου αντί της ραδιενέργειας ως μέσου ιχνηθέτησης [183]. Έτσι, το 1971 δύο ερευνητικές ομάδες (η μία με επικεφαλής τους Engvall και Perlmann [184] και η άλλη με επικεφαλής τους Weemen και Schuurs [185]) ανεξάρτητα και ταυτόχρονα, ανέπτυξαν την ιδέα αυτή και εκτέλεσαν τα απαραίτητα πειράματα για να αποδείξουν τις δυνατότητες εφαρμογής της. Οι τεχνικές αυτές υπερέχουν των γνωστών

ραδιοανοσοαναλύσεων, που ήταν η πρώτη μορφή ανοσοαναλυτικής τεχνικής, κυρίως στο ότι δεν δημιουργούν ραδιενεργά απόβλητα, ούτε εκθέτουν τους χειριστές σε δυνητικούς κινδύνους από τη χρήση ραδιενέργειας.

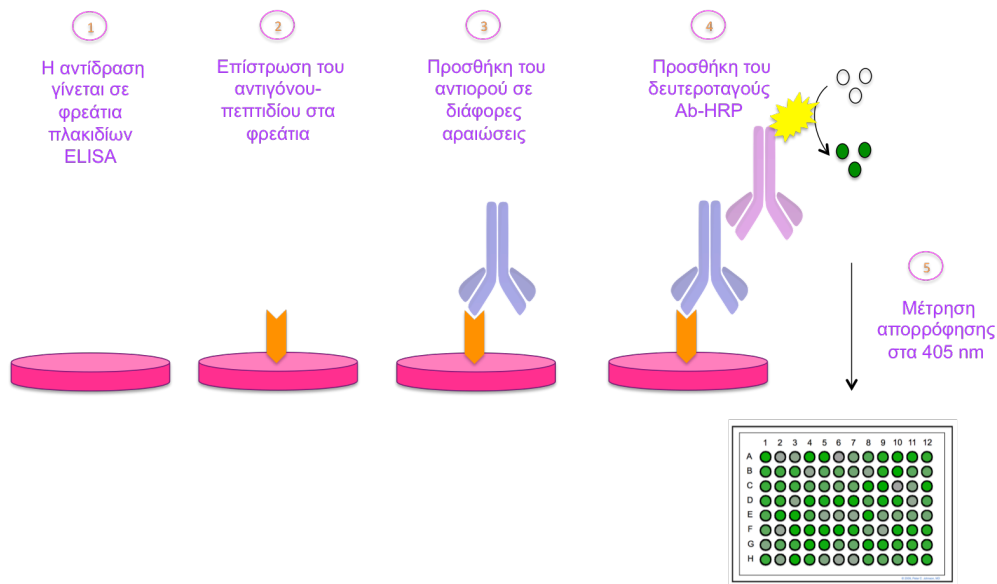
Στην παρούσα διατριβή η μέθοδος ELISA χρησιμοποιήθηκε τόσο για τον προσδιορισμό του τίτλου των αντι-πεπτιδικών αντισωμάτων (συμβατική μορφή) όσο και για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα του RyR2 με την CaM (τροποποιημένη μορφή).

Η αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.13.

Σύμφωνα με την μέθοδο, το αντιγόνο "ακίνητοποιείται" σε στερεά φάση και στη συνέχεια επωάζεται με σειρά διαλυμάτων των προς έλεγχο αντισωμάτων. Μετά από απόχυση και κατάλληλη έκπλυση, το ακίνητοποιημένο σύμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου, που έχει τυχόν σχηματισθεί, επωάζεται με περίσσεια ενζυμικά επισημασμένου δεύτερου αντισώματος και στην συνέχεια με κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα, οπότε δημιουργείται έγχρωμο προϊόν, η οπτική απορρόφηση του οποίου τελικώς μετράται. Εξ ορισμού τίτλος είναι η συγκέντρωση του διαλύματος των αντισωμάτων (ή αραιώση του αντιορού), η οποία αντιστοιχεί στο 50 % του υψηλότερου δυνατού να ληφθεί οπτικού σήματος. Για την ανάπτυξη διαφόρων ανοσολογικών δοκιμασιών ο προσδιορισμός του τίτλου είναι απαραίτητος ώστε να καθοριστεί η αραιώση του αντιορού που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί στη συγκεκριμένη δοκιμασία.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

Φρεάτια ELISA επικαλύπτονται με 100 μ L διαλύματος πεπτιδίου σε διάλυμα PB, pH 7,4 (10 μ g/mL) και παραμένουν όλη την νύχτα στους 37 °C. Την επόμενη ημέρα, αποχύνονται τα υγρά από τα φρεάτια, τα οποία εκπλένονται με PBS, pH 7,4, μία φορά. Στην συνέχεια οι ελεύθερες θέσεις δέσμευσης της στερεάς επιφάνειας επικαλύπτονται μετά από επώαση με διάλυμα κορεσμού (200 μ L) για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απόχυση των υγρών και έκπλυση των φρεατίων τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης.



Εικόνα 2.13: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ELISA για την αξιολόγηση των αντισωμάτων

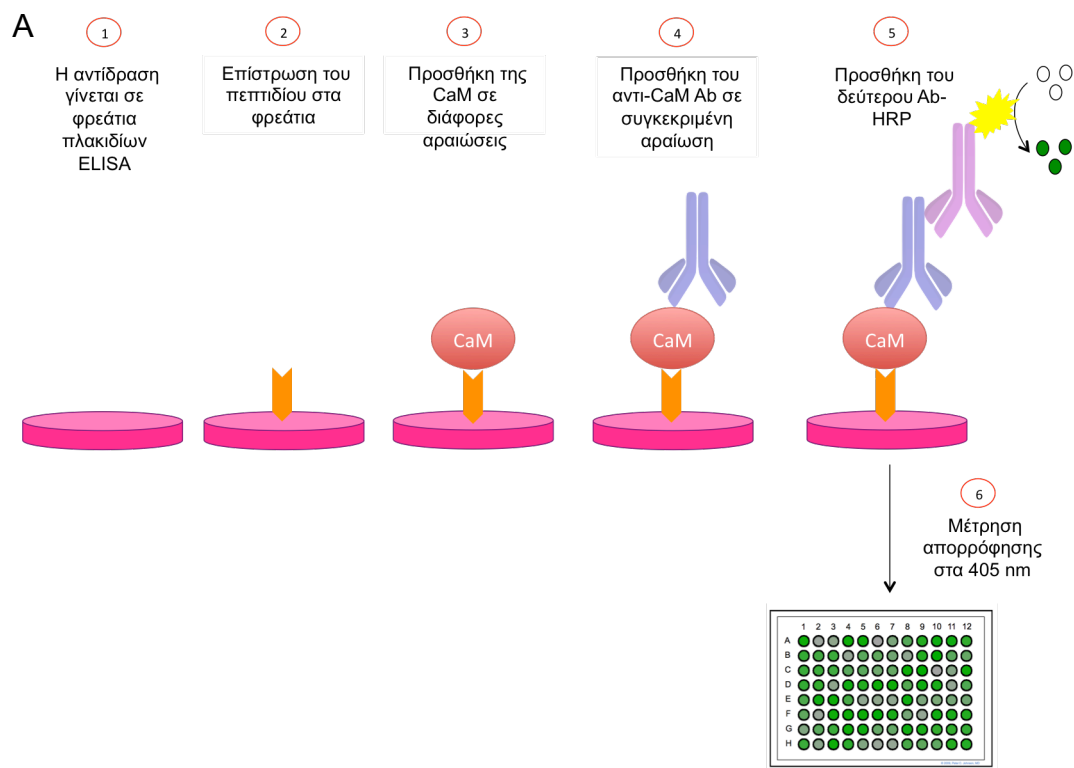
Παρασκευάζονται διαλύματα των αντιορών (αραίωση 1:1.000-1:50.000) και 100 μL από τα διαλύματα αυτά προστίθενται σε φρεάτια ELISA (εις τριπλούν). Επιπροσθέτως, σε κάποια από τα φρεάτια ELISA προστίθεται ορός που έχει παραληφθεί από τα πειραματόζωα πριν την ανοσοποίηση (προ-άνοσος ορός) καθώς και απλό διάλυμα αραίωσης, ως αρνητικοί μάρτυρες. Το πλακίδιο μικροπιλοδότησης επωάζεται για 2 h στους 37°C . Τα υγρά αποχύνονται από τα φρεάτια, τα οποία στην συνέχεια εκπλένονται τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης. Σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 100 μL διαλύματος ενζυμικά επισημασμένου δεύτερου αντισώματος και ακολουθεί και πάλι επώαση για 2 h στους 37°C , απόχυση και τρεις εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης. Σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 100 μL διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος και μετά από παραμονή για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την ανάπτυξη χρώματος, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 405 nm και σχεδιάζεται η καμπύλη τίτλου.

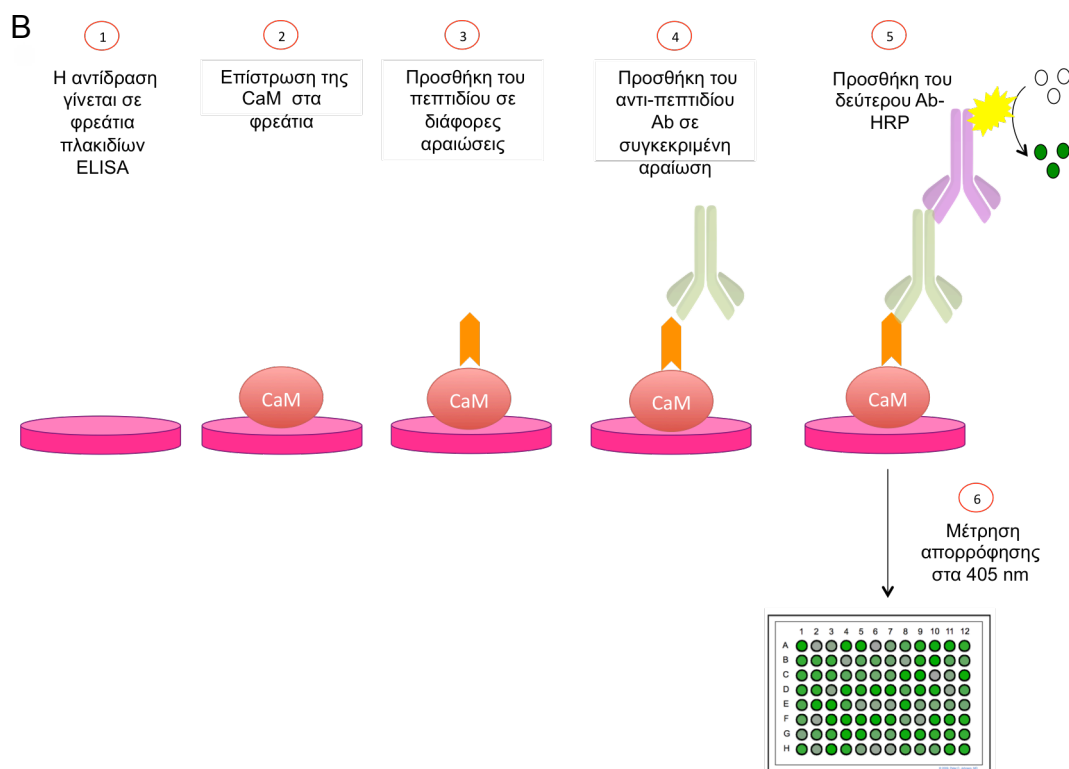
Η αρχή της μεθόδου ELISA (τροποποιημένη μορφή της συμβατικής μεθόδου ELISA) που χρησιμοποιείται για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων του RyR2 και της CaM παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.14 A.

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης συνθετικών πεπτιδίων-τμημάτων του RyR2 με την CaM μέσω της μεθόδου ELISA, ακολουθείται η εξής πορεία: αρχικά επιστρώνονται τα φρεάτια της ELISA με 100 μL διαλύματος πεπτιδίου

σε διάλυμα PB, pH 7,4 (10 µg/mL) και παραμένουν όλη την νύχτα στους 37°C. Την επόμενη μέρα, αποχύνονται τα υγρά από τα φρεάτια, τα οποία εκπλένονται με PBS, pH 7,4, μία φορά. Στην συνέχεια, οι ελεύθερες θέσεις δέσμευσης της στερεάς επιφάνειας επικαλύπτονται μετά από επώαση με διάλυμα κορεσμού (200 µL) για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί απόχυση των υγρών και έκπλυση των φρεατίων τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης. Παρασκευάζονται διαλύματα ανασυνδυασμένης CaM αγρίου τύπου σε διάφορες συγκεντρώσεις (συνήθως 1, 10 και 20 µg/mL). Ακολούθως, 100 µL από τα διαλύματα αυτά προστίθενται στα φρεάτια (εις τριπλούν). Σε κάποια από τα φρεάτια είτε δεν γίνεται επίστρωση του πεπτιδίου ενώ προστίθενται τα διαλύματα της CaM, είτε επιστρώνεται το πεπτίδιο και αντί για το διάλυμα της CaM προστίθενται 100 µL διαλύματος αραιώσης (αρνητικοί μάρτυρες). Το πλακίδιο μικροπιλοδότησης επωάζεται για 3 h στους 37°C. Τα υγρά αποχύνονται από τα φρεάτια, τα οποία στην συνέχεια εκπλένονται τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης.





Σχήμα 2.14: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ELISA για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων του RyR2 με την CaM. Α) Το σύστημα της επίστρωσης των πεπτιδίων και στην συνέχεια της προσθήκης της CaM και του αντι-CaM Ab ως πρώτου Ab. Β) Το σύστημα της επίστρωσης της CaM και στην συνέχεια της προσθήκης των συνθετικών πεπτιδίων και των αντίστοιχών αντι-πεπτιδικών Abs ως πρώτων Abs.

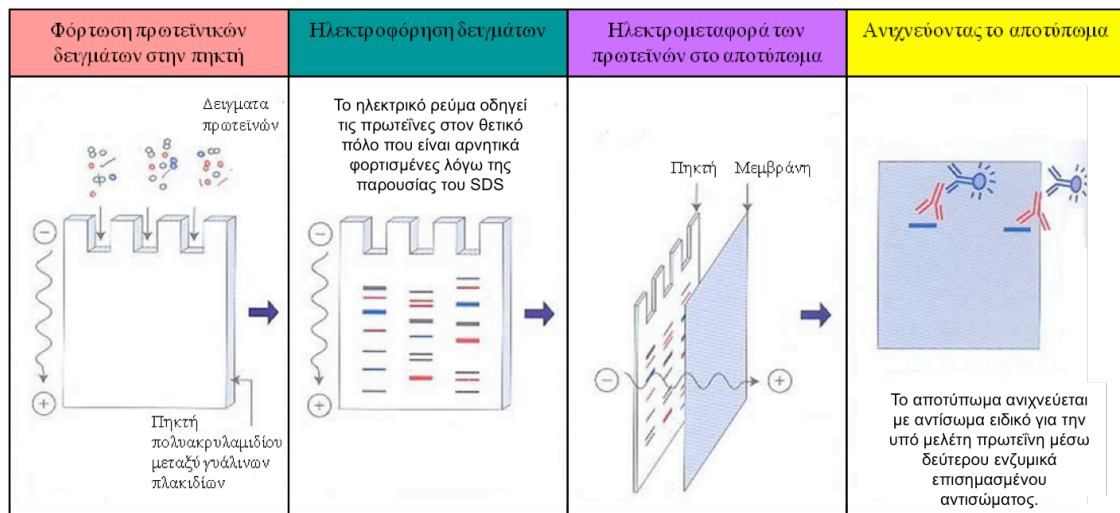
Στην συνέχεια, σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 100 μL διαλύματος αντιορού που περιέχει αντισώματα έναντι της CaM (είτε μονοκλωνικό, εμπορικά διαθέσιμο, είτε αντι-πεπτιδικό πολυκλωνικό, παρασκευασμένο στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.5) σε αραιώση 1:1.000 και το πλακίδιο επωάζεται για 2 h στους 37°C. Ακολουθεί απόχυση και έκπλυση τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης, ενώ ακολούθως σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 100 μL διαλύματος του αντίστοιχου, ενζυμικά επισημασμένου δευτέρου αντισώματος και ακολουθεί και πάλι επώαση για 2 h στους 37°C, απόχυση και τρεις εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης. Τέλος σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 100 μL διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος και μετά από παραμονή για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την ανάπτυξη χρώματος, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 405 nm.

Επίσης, για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης συνθετικών πεπτιδίων-τμημάτων του RyR2 με την CaM, ακολουθήθηκε μία επιπλέον μορφή της μεθόδου

ELISA, που περιγράφεται στο Σχήμα 2.14B. Στην μορφή αυτή, αρχικά, η CaM επιστρώνεται στα φρεάτια (100 $\mu\text{L}/1 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) και στην συνέχεια προστίθενται τα συνθετικά πεππίδια (100 $\mu\text{L}/1$, 10 και 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), οι αντιοροί έναντι των αντίστοιχων συνθετικών πεπτιδίων (1:1.000), το ενζυμικά επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα και τέλος το ενζυμικό υπόστρωμα. Οι χρόνοι επώασης είναι ακριβώς οι ίδιοι.

2.7 Ανοσοαποτύπωση

Η ανάγκη για την επίλυση ενός προβλήματος οδηγεί στην καινοτομία και έτσι, στα τέλη της δεκαετίας του '70 γεννήθηκε η ανάγκη για ανάπτυξη μίας τεχνικής που θα επέτρεπε τον προσδιορισμό της εξειδίκευσης ενός αντιορού. Η ανάγκη αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη μίας μεθόδου που επέτρεπε την παραγωγή ενός αντιγράφου πρωτεϊνών, οι οποίες είχαν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου, πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το αντίγραφο αυτό, στην συνέχεια, μπορούσε να εξεταστεί με αντιορό για την ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών [186] (Σχήμα 2.15). Τέτοια μέθοδος αναπτύχθηκε, ανεξάρτητα, από δύο ερευνητικές ομάδες, η μία μέθοδος με χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου-ουρίας [187] και η άλλη με χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου-δωδεκακυλο-θειικού νατρίου (SDS) [188] Η τελευταία μέθοδος αναφέρεται ως Western blotting. Μετέπειτα, η μέθοδος αυτή αναγνωρίστηκε ως ισχυρό εργαλείο για να μελετήσει την παρουσία, τη σχετική αφθονία, το σχετικό μοριακό βάρος και, υπό την μορφή της ανοσοκατακρήμνισης, την ειδική αλληλεπίδραση πρωτεϊνών [189].



Σχήμα 2.15: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου Western blotting.

2.7.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Υλικά και Όργανα

- ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Tris, 1,5 M, pH 8,8)
- ρυθμιστικό διάλυμα επιστίβαξης (Tris, 0,5 M, pH 6,8)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x running buffer) (15 g/L Tris, 72 g/L γλυκίνη, 5 g/L SDS)
- Δις-ακρυλαμίδιο [Acrylamide/Bis (37,5:1), 40%]
- Υπερθειϊκό αμμώνιο, 10%
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine)
- dH₂O
- εκμαγείο και χτένες (BioRad)
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- 5x διάλυμα φόρτωσης (0,3 M Tris-HCl pH 6,8, 10% w/v SDS, 50% v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- βαφή Coomassie (1 g coomassie, 480 mL methanol, 100 mL acetic acid, 420 mL H₂O)
- διάλυμα αγαρόζης σε dH₂O 1 % w/v

Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE) σε παράθεση με μάρτυρα μοριακών βαρών για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους. Η % σύσταση της πηκτής διαχωρισμού ήταν εξάρτηση του μεγέθους που αναμενόταν να έχει η υπό ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνη. Η παρασκευή της εκάστοτε πηκτής διαχωρισμού (4-15%) έγινε σύμφωνα με τη δοσολογία του Πίνακα 2.6. Το μίγμα εγχύθηκε με τη βοήθεια ακροφυσίου σε εκμαγείο (BioRad) μέχρι ορισμένου σημείου και το υπόλοιπο πληρώθηκε με νερό. Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής διαχωρισμού, παρασκευάστηκε η πηκτή επιστίβαξης αφού πρώτα αποχύθηκε το νερό και απομακρύνθηκαν με διηθητικό χαρτί τυχόν εναπομείναντα σταγονίδια. Το % ποσοστό της πηκτής επιστίβαξης ήταν πάντα 4% και η δοσολογία των αντιδραστηρίων για την παρασκευή της φαίνεται στον Πίνακα 2.7. Το μείγμα εγχύθηκε με τη βοήθεια ακροφυσίου πάνω από την πηκτή διαχωρισμού και ενσωματώθηκε χτένα για το σχηματισμό των φρεατίων.

Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστίβαξης, αφαιρέθηκε η χτένα και η διφασική πλέον πηκτή μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x Running buffer). Οι πρωτεΐνες αφού αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης και θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 min, εισήχθηκαν στα φρεάτια της πηκτής σε παράθεση με τον μάρτυρα μοριακών βαρών και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 140V, έως ότου η χρωστική που περιέχεται στο διάλυμα φόρτωσης να φτάσει στο κάτω άκρο της πηκτής. Στη συνέχεια, η πηκτή είτε χρώσθηκε με βαφή Coomassie, είτε μεταφέρθηκε σε μεμβράνη για την διεξαγωγή αποτύπωσης κατά Western.

Πίνακας 2.6: Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού

Πηκτή Διαχωρισμού	4%	8%	10%	12%	15%
Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Tris, 1,5 M, pH 8,8)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Acrylamide/Bis (37,5:1), 40%	1 mL	2 mL	2,5 mL	3 mL	3,75 mL
dH ₂ O	6,345 mL	5,345 mL	4,845 mL	4,345 mL	3,595 mL
Υπερθειικό αμμώνιο, 10%	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
TEMED	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
SDS 10 %	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
<p>Σημειώσεις:</p> <p>Στην περίπτωση παρασκευής πηκτής 4% SDS-PAGE με 0,5 % αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση του RyR2, η σύσταση είναι ίδια με την 1^η στήλη (4%) με την διαφορά ότι αντί για 6,345 mL dH₂O χρησιμοποιούμε 1,345 mL H₂O και 5 mL διαλύματος 1% αγαρόζης.</p>					

Πίνακας 2.7: Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής επιστίβαξης

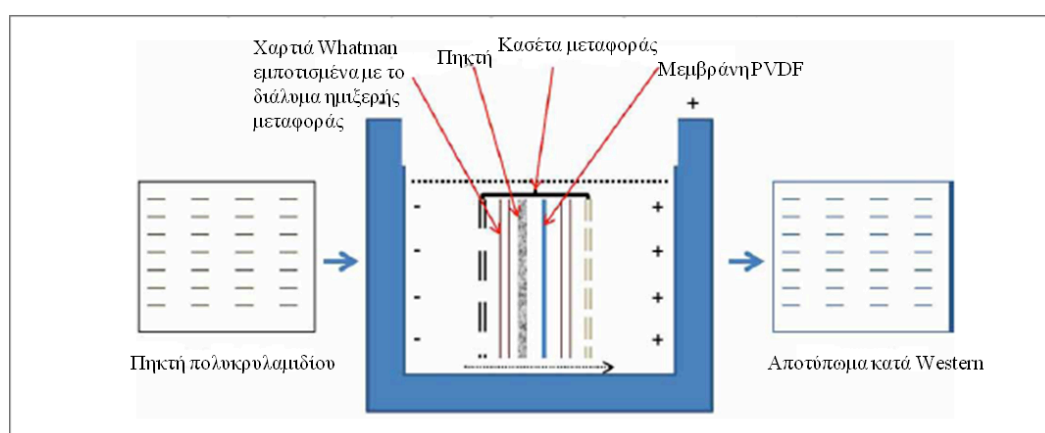
Πηκτή επιστίβαξης	4 %
Ρυθμιστικό διάλυμα επιστίβαση (Tris, 0,5 M, pH 6,8)	1, 25 mL
Acrylamide/Bis (37,5:1), 40%	0,5 mL
dH ₂ O	3,17 mL
Υπερθειικό αμμώνιο, 10%	25 μL
TEMED	2,5 μL
SDS 10%	50 μL

2.7.2 Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF

Υλικά και Όργανα

- μεμβράνη πολυβινυλοδιφθοριδίου (PVDF, Immobilon-P, Millipore)
- ρυθμιστικό διάλυμα ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer buffer) (48 mM Tris, 39 mM γλυκίνη, 0,0375 % w/v SDS, 20 % v/v μεθανόλη)
- 100 % μεθανόλη
- συσκευή ημίξηρης μεταφοράς (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad)

Η διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μία μεμβράνη PVDF επιτεύχθηκε με τη χρήση συσκευής ημίξηρης μεταφοράς. Τόσο η πηκτή, όσο και η μεμβράνη προεπώαστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer buffer) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, αφού προηγουμένως η μεμβράνη PVDF εμβαπτίστηκε σε μεθανόλη για 1 min. Στη συνέχεια, η πηκτή και η μεμβράνη τοποθετήθηκαν στη συσκευή με τη διάταξη του Σχήματος 2.16 και η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε σε 20 V για 1 h σε RT για την πρωτεΐνη CaM και 4 h στους 4°C για τον υποδοχέα RyR2.



Σχήμα 2.16: Η ενδεδειγμένη διάταξη της πηκτής πολυακρυλαμιδίου και της μεμβράνης PVDF στη συσκευή ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer).

2.7.3 Ανάλυση κατά Western

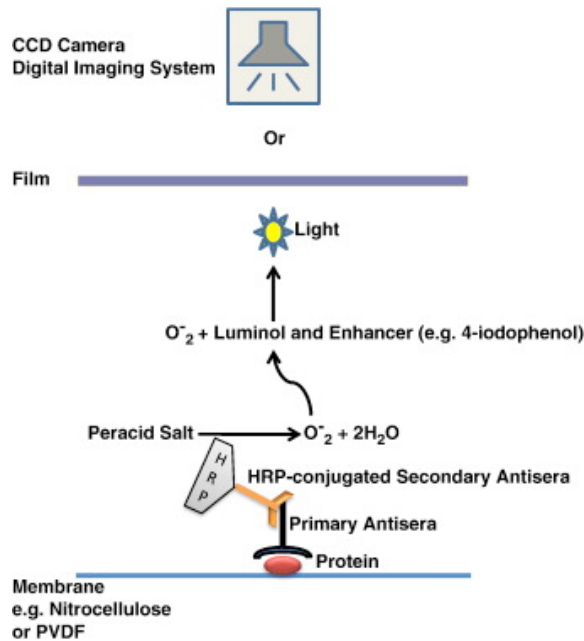
Υλικά και Όργανα

- ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T (0,2 M Tris, 1,37 M NaCl, pH 7,5)
- σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (Marvel)
- αντισώματα (Πίνακας 2.8)
- ECL Western Blotting Detection system (GE Health Care)
- κασέτα εμφάνισης
- Film (Kodak)
- Διαλύματα εμφάνισης (developer, fixer)

Πίνακας 2.8: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κατά Western

Πρώτο αντίσωμα	Μονοκλωνικό αντι-CaM Ab Πολυκλωνικό αντι-GST Ab Πολυκλωνικό αντι-RyR2 Ab1093
Ενζυμικά επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα	Goat anti-rabbit IgG/HRP (Sigma) Goat anti-mouse IgG/HRP (Sigma)

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη PVDF, αυτή επώαστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T που περιείχε 5% (w/v) σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (TBS-T/Marvel) για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν επώαση σε TBS-T/Marvel που περιείχε το αντίστοιχο, κάθε φορά, πρώτο αντίσωμα στους 4°C για 14 h, 3 εκπλύσεις των 10 min με TBS-T/Marvel, επώαση της μεμβράνης σε TBS-T/Marvel που περιείχε το αντίστοιχο, ενζυμικά επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h και άλλες τρεις εκπλύσεις των 10 min με TBS-T. Στη συνέχεια, η ανοσοανίχνευση έγινε με το σύστημα ανίχνευσης που αναφέρεται στα Υλικά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.17 και η φωτογραφία λήφθηκε με σαρωτή (scanner).



Σχήμα 2.17: Ο μηχανισμός της ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών με χημειοφωταύγεια.

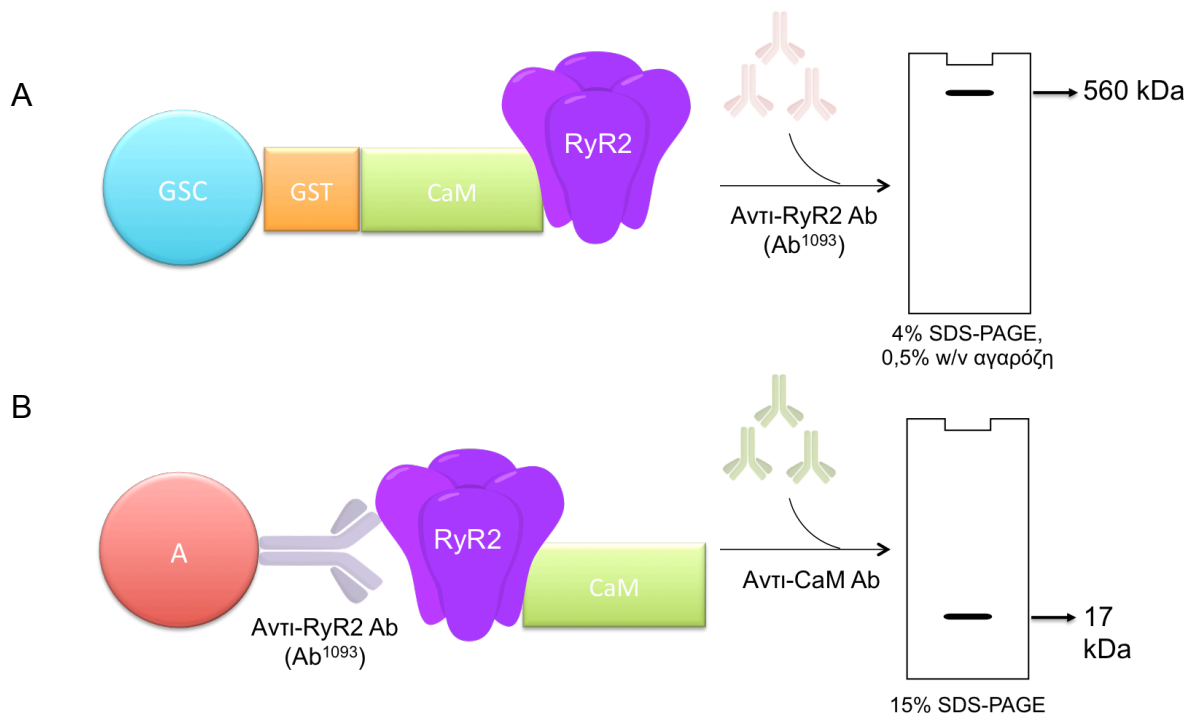
2.8 Μέθοδος συγκατακρήμνισης

Η μέθοδος της συγκατακρήμνισης επιλέχθηκε για την μελέτη της αλληλεπίδρασης ολόκληρου του μορίου του RyR2 με την CaM. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι συγκατακρήμνισης για να μελετήσουμε αυτήν την αλληλεπίδραση. Στον πρώτο τύπο (Σχήμα 2.18A), ως στερεά φάση επιλέχθηκαν μαγνητικά σφαιρίδια γλουταθειόνης για την πρόσδεση της ανασυνδυασμένης αγρίου τύπου CaM μέσω της ετικέτας GST (glutathione S-transferase). Στην συνέχεια, παρουσία βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ που έχουν υποστεί διαλυτοποίηση, και με την χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει εξειδικευμένα τον RyR2 σε ανοσοαποτύπωμα κατά Western, αξιολογείται η πρόσδεση του RyR2 στην CaM. Το ίδιο πειραματικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε και παρουσία των συνθετικών πεπτιδίων P_A, P_B και P_C (τα οποία αποτελούν τμήματα του RyR2) για να μελετηθεί τυχόν εμπλοκή τους στην αλληλεπίδραση του RyR2 με την CaM. Στον δεύτερο τύπο συγκατακρήμνισης (Σχήμα 2.18B), ως στερεά φάση επιλέχθηκαν σφαιρίδια πρωτεΐνης A για την πρόσδεση του RyR2 μέσω αντισώματος που αναγνωρίζει εξειδικευμένα τον RyR2. Παρουσία ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης CaM αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένων μορφών της CaM, και με την χρήση αντι-CaM αντισώματος σε ανοσοαποτύπωμα κατά Western, αξιολογείται η έμμεση πρόσδεση της CaM στον RyR2 καθώς και τυχόν αλλαγές στην

πρόσδεση των μεταλλαγμένων μορφών της CaM στον RyR2 σε σχέση με την αγρίου τύπου.

Υλικά και Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα IP, pH 7,4
 - Tris base 20 mM
 - NaCl 150 mM
 - CHAPS 0,4 % w/v
 - DTT 2 mM
 - dH₂O
- Διάλυμα αναστολέων πρωτεασών 25 φορές πυκνό
- Δείγματα βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιά χοίρου ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης 25-30 mg/mL
- Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-CaM, CaM^{WT} και μεταλλαγμένες μορφές CaM τελικής συγκέντρωσης στο διάλυμα της αντίδρασης 1 μM
- Τα συνθετικά πεππίδια P_A, P_B και P_C, τελικής συγκέντρωσης στο διάλυμα της αντίδρασης 1, 10 και 100 μM
- Διάλυματα CaCl₂ και EGTA αρχικής συγκέντρωσης 1 mM και 10 mM, αντίστοιχα
- Σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A, σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης



Σχήμα 2.18: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου συγκατακρήμνισης A) 1^{ου} τύπου και B) 2^{ου} τύπου

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 0,1 M, pH 7,4
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του RyR2 (Ab¹⁰⁹³), μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της CaM
- Eppendorfs όγκου 1 mL

Το πείραμα της ανοσοκατακρήμνισης διαρκεί 4 μέρες. Αρχικά θα γίνει η περιγραφή του πειράματος του 1^{ου} τύπου.

1^η μέρα

- 1. Διαλυτοποίηση του RyR2:** 5 μL παρασκευάσματος κυστιδίων-φορέων καρδιακού ΣΔ διαλυτοποιούνται σε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος IP σε eppendorfs του 1,5 mL. Ο αριθμός των σωλήνων eppendorfs είναι ίσος με τον αριθμό των διεγμάτων που θα απαιτηθούν συνολικά για την ολοκλήρωση του πειράματος (δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις CaM, Ca²⁺, συνθετικών πεπτιδίων).

2. Πρόσδεση της πρωτεΐνης GST-CaM στα σφαιρίδια γλουταθειόνης:

αρχικά, τα σφαιρίδια εκπλένονται με 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος IP υπό ήπια ανάμιξη, φυγοκεντρώνονται σε 1.500 g για 2 min στους 4°C και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το στάδιο εκπλυσης επαναλαμβάνεται 2 φορές. Στην συνέχεια προστίθενται 200 μL διαλύματος GST-CaM, τελικής συγκέντρωσης 1 μM , σε ρυθμιστικό διάλυμα IP. Ακολουθεί επώαση για 24 h στους 4°C.

2^η μέρα

1. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων του ΣΔ σε 20.000 g για 15 min στους 4°C και συλλογή του υπερκειμένου που αντιστοιχεί στο διαλυτό κλάσμα του ΣΔ, όπου περιέχεται και ο RyR2.
2. Φυγοκέντρηση των σφαιριδίων σε 1.500 g για 2 min στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου με λεπτό, μεγάλου μήκους ακροφύσιο.
3. Μεταφορά του διαλυτού κλάσματος του ΣΔ στα δείγματα των σφαιριδίων, στα οποία έχει προσδεθεί η GST-CaM. Σε ορισμένα από τα δείγματα προσθέτουμε και τα συνθετικά πεππίδια P_A, P_B ή P_C, σε τελικές συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 μM . Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για 6 h στους 4°C.
4. Ανάκτηση των σφαιριδίων με φυγοκέντρηση σε 1.500 g για 2 min στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και έκπλυση των σφαιριδίων για 10 min με 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος IP (2 φορές).
5. Μετά την τελευταία εκπλυση, απομακρύνεται σχεδόν όλο το υπερκείμενο (απομένουν περίπου 10 μL). Η έκλυση των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια γίνεται με την προσθήκη 10 μL διαλύματος φόρτωσης x5 και 10 μL dH₂O. Ακολουθεί ανακίνηση (vortex) και αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C.
6. Τέλος, παρασκευάζεται πηκτή σύστασης 4% SDS-PAGE 0,5% αγαρόζης και μία πηκτή σύστασης 15% SDS-PAGE και φυλάσσονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

3^η μέρα

1. Θέρμανση των δειγμάτων στους 85°C για 5 min.
2. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 14.000 g για 3 min και συλλογή του υπερκλειμένου που περιέχει τις εκλούόμενες πρωτεΐνες.
3. Φόρτωση των υπερκλειμένων στις πηκτές σύστασης 4% SDS-PAGE 0,5% αγαρόζης και 15% SDS-PAGE. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερό ρεύμα έντασης 20 mA.
4. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF. Οι συνθήκες μεταφοράς για την πηκτική σύστασης 4% SDS-PAGE 0,5% αγαρόζης, είναι 600 mA για 4 h στους 4°C, ενώ για την πηκτική σύστασης 15% SDS-PAGE, είναι 400 mA για 1 h σε RT. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες τοποθετούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T/Marvel και παραμένουν στους 4°C, υπό ήπια κίνηση για όλη τη νύχτα.

4^η μέρα

Ακολουθεί ανάλυση κατά Western. Στην μεμβράνη μεταφοράς των πρωτεϊνών της πηκτικής σύστασης 4% SDS-PAGE 0,5% αγαρόζης, θα ελέγξουμε την παρουσία του RyR2 στο δείγμα με την χρήση του Ab1093, ενώ στην άλλη μεμβράνη (που αντιστοιχεί στην πηκτική σύστασης 15% SDS-PAGE) θα ελέγξουμε έμμεσα την πρόσδεση της GST-CaM στα σφαιρίδια γλουταθειόνης με την χρήση του αντισώματος έναντι της CaM.

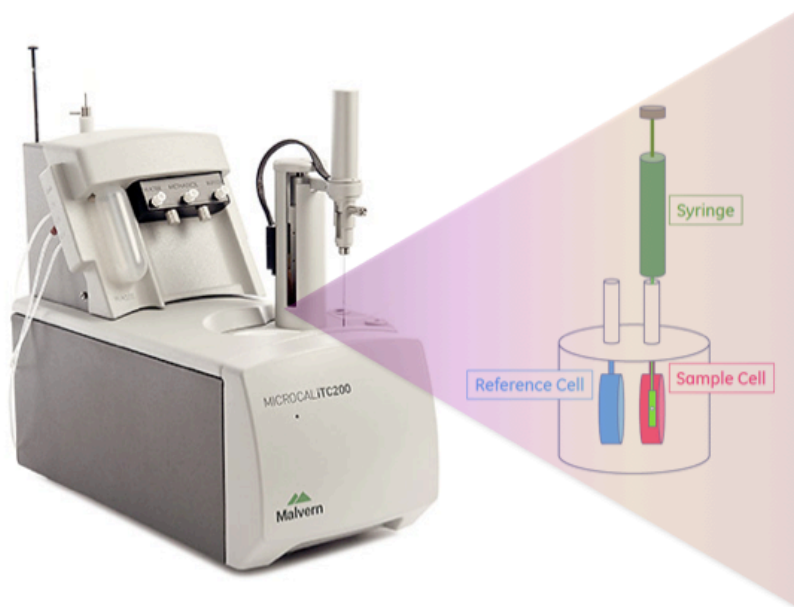
Το πρωτόκολλο του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης 2^{ου} τύπου είναι ίδιο με του 1^{ου} με τις εξής διαφορές:

1. Την πρώτη μέρα, στο στάδιο 2 χρησιμοποιούνται σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A (20 μL/δείγμα) και προστίθεται το Ab1093 (4 μL/δείγμα) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 0,1 M, pH 7,4.
2. Η ανασυνδυασμένη αγρίου τύπου CaM ή οι μεταλλαγμένες μορφές της, προστίθεται στο στάδιο 3 της 2^{ης} μέρας μαζί με το διαλυτό κλάσμα του ΣΔ σε τελική συγκέντρωση 1 μM.

3. Ο έλεγχος της αντίδρασης της ανοσοκατακρήμνισης γίνεται με την παρουσία της CaM στο τελικό στάδιο, με την χρήση αντι-CaM αντισώματος.

2.9 Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC)

Για την περιγραφή μίας βιοχημικής διαδικασίας δεν αρκεί να γνωρίζουμε μόνο δομικά χαρακτηριστικά. Για την πλήρη κατανόησή της είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των αλλαγών που συμβαίνουν στην κατάσταση του συστήματος. Σε μία διαδικασία ισορροπίας, όπως είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ βιομορίων, η μέτρηση βασικών θερμοδυναμικών παραμέτρων παρέχει μία πλήρη περιγραφή των ενεργειακών μεταβολών που παρατηρούνται κατά την μετάβαση από την ελεύθερη στην δεσμευμένη κατάσταση. Η μέθοδος ITC αποτελεί μία αναλυτική τεχνική όπου καταγράφονται οι θερμοδυναμικές παράμετροι (μεταβολή ενθαλπίας, μεταβολή εντροπίας και η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs) της αλληλεπίδρασης μικρών μορίων (προσδέτης, π.χ. συνθετικό πεπτίδιο) και κατάλληλων υποδοχέων τους (συνήθως πρωτεϊνών) σε μορφή διαλύματος. Τα κύρια τμήματα της συσκευής ITC₂₀₀ είναι η σύριγγα, στην οποία τοποθετούμε το διάλυμα του συνθετικού πεπτιδίου και ένας θερμικά μονωμένος χώρος, στο εσωτερικό του οποίου βρίσκονται δύο πανομοιότυπα κελιά μικρού όγκου (~ 200 μ L): το κελί αναφοράς, το οποίο συμπληρώνεται με νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα και το κελί του δείγματος, στο οποίο προστίθεται το διάλυμα της πρωτεΐνης (Σχήμα 2.19).



Σχήμα 2.19: Η συσκευή ITC₂₀₀ και σε σχηματική απεικόνιση το κελί που γίνεται η αντίδραση.

Αρχικά γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων της CaM και των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2. Τα υπό εξέταση μόρια πρέπει να βρίσκονται ακριβώς στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης, καθώς διαφορές στη σύσταση προκαλούν θερμικό «θόρυβο» εξαιτίας των ενθαλπικών ανάμιξης ανόμοιων συστατικών (artifacts). Στη συνέχεια, με μία σύριγγα Hamilton προσθέτουμε στο κελί του δείγματος της συσκευής 280 μL από το διάλυμα της CaM. Προσέχουμε ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες στην σύριγγα. Με το τρόπο αυτό εμφανίζεται υπερχειλίση του δείγματος στο κελί και η επιπλέον ποσότητα απομακρύνεται έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι πάντα 200 μL . Ακολουθεί το γέμισμα της σύριγγας τιτλοδότησης με το δείγμα του συνθετικού πεπτιδίου, το οποίο γίνεται με αυτοματοποιημένο τρόπο μέσω ειδικής αντλίας. Η χωρητικότητα της σύριγγας αυτής είναι 40 μL .

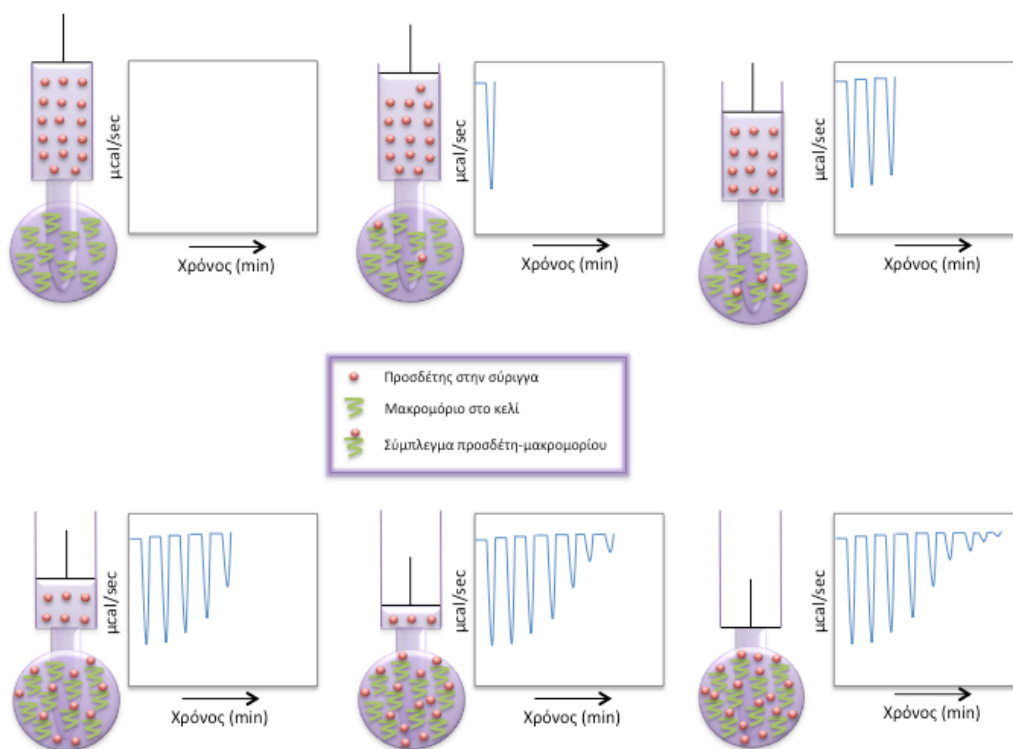
Τέλος, η σύριγγα τοποθετείται μέσα στο κελί του δείγματος, ρυθμίζονται οι παράμετροι του πειράματος σύμφωνα με τον Πίνακα 2.9 και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει στην επιλεγμένη πειραματική θερμοκρασία. Ο χώρος των κελιών είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε το κελί να μην μπορεί να ανταλλάσσει θερμότητα με το περιβάλλον και η θερμοκρασία του ρυθμίζεται και σταθεροποιείται στην επιθυμητή θερμοκρασία μέσω ενός συστήματος ψύξης/θέρμανσης. Το όργανο καταγράφει συνεχώς τις ροές θερμότητας που

πρέπει να απορροφά ή να παρέχει στα δύο κελιά ώστε η θερμοκρασία τους να παραμένει σταθερή και προβάλλει τη διαφορά τους ως γραμμή αναφοράς του πειράματος (baseline) σε ένα διάγραμμα ισχύος-χρόνου.

Σε ένα τυπικό πείραμα ITC, με τη βοήθεια ενός ρομποτικού βραχίονα πραγματοποιείται αυτόματα και με ακρίβεια η σταδιακή προσθήκη μικρών ποσοτήτων του διαλύματος της σύριγγας στο κελί του δείγματος όπου βρίσκεται το διάλυμα της πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.20, πριν την προσθήκη του προσδέτη (συνθετικό πεπτιδίο), στο κελί του δείγματος υπάρχει μόνο το διάλυμα του υποδοχέα (πρωτεΐνη). Με την πρώτη έγχυση, σχεδόν όλη η ποσότητα του προσδέτη που εισέρχεται στο κελί συνδέεται στον υποδοχέα καθώς ο τελευταίος βρίσκεται σε περίσσεια. Καθώς το σύστημα μεταπηδά σε μία καινούρια ενεργειακή κατάσταση, υπάρχει έκλυση ή απορρόφηση θερμότητας την οποία αντισταθμίζει κατάλληλα το όργανο ρυθμίζοντας τη παροχή ισχύος στο κελί με τέτοιο τρόπο ώστε η θερμοκρασία του να παραμένει πάντα σταθερή. Όταν η σύνδεση ολοκληρωθεί, δεν υπάρχουν πλέον καινούργιες ροές θερμότητας και η παροχή ισχύος από το όργανο επιστρέφει στην τιμή αναφοράς (baseline) μετά από μικρό χρονικό διάστημα. Η διαδικασία αυτή αποτυπώνεται στο διάγραμμα ισχύος-χρόνου σαν μία διακριτή κορυφή, το εμβαδόν της οποίας είναι ανάλογο του ποσού θερμότητας που εισέρρευσε ή απομακρύνθηκε από το σύστημα. Οι εξώθερμες αντιδράσεις εμφανίζουν κορυφές κάτω από τη στάθμη αναφοράς, ενώ αντίθετα οι ενδόθερμες αντιδράσεις εμφανίζουν τις κορυφές τους πάνω από αυτή. Ακολουθεί μία δεύτερη έγχυση, όπου και πάλι σχεδόν όλη η ποσότητα του προσδέτη συνδέεται με τον υποδοχέα καθώς υπάρχουν ακόμα πολλές ελεύθερες θέσεις σύνδεσης (δεύτερη κορυφή στο γράφημα, όμοιου μήκους). Όσο όμως οι εγχύσεις συνεχίζονται και η ολική συγκέντρωση του προσδέτη γίνεται παραπλήσια με αυτή του υποδοχέα, οι διαθέσιμες θέσεις σύνδεσης λιγοστεύουν, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται όλο και λιγότερα συμπλέγματα υποδοχέα-προσδέτη όσο προχωρά η τιτλοδότηση με αποτέλεσμα το σύστημα να φτάσει σε κορεσμό. Η κατάσταση αυτή στο διάγραμμα ισχύος-χρόνου αποτυπώνεται από διαδοχικές κορυφές μειούμενου ύψους (λιγότερη πρόσδεση ισοδυναμεί με μειωμένο ποσό θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται, άρα και με μειωμένο εμβαδόν κορυφών στο

γράφημα) έως ότου φτάσουμε σε μικρές κορυφές σταθερού ύψους που σηματοδοτούν το τέλος της τιτλοδότησης και αντιστοιχούν στη θερμότητα διάλυσης του προσδέτη. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι που υπολογίζονται από ένα και μόνο πείραμα ITC, μετά από κατάλληλη επεξεργασία του γραφήματος, είναι η σταθερά συγγένειας (K_d), η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH) και της εντροπίας (ΔS) κατά τη σύνδεση καθώς και ο αριθμός των θέσεων δέσμησης (στοιχειομετρία, n).

Μετά το τέλος του πειράματος ακολουθεί αυτοματοποιημένη πλύση της σύριγγας τιτλοδότησης και του κελιού του δείγματος ώστε να είναι άμεσα διαθέσιμα για ένα νέο πείραμα. Τα δεδομένα αναλύονται με την βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος MicroCal Origin 7, εξοπλισμένου με κατάλληλα θερμοδομετρικά μοντέλα από τον κατασκευαστή του οργάνου (Malvern Instruments).



Σχήμα 2.20: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της αλληλεπίδρασης μεταξύ προσδέτη και μακρομορίου κατά την διάρκεια ενός πειράματος ITC.

Υλικά και Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης, pH 6,5
HEPES 50 mM
KCl 150 mM
β-μερκαπτοαιθανόλη 10 mM
CaCl₂ 10 mM
dH₂O
- Ανασυνδυασμένη αγρίου τύπου CaM συγκέντρωσης 0,145 mM σε διάλυμα διαπίδυσης
- Τα συνθετικά πεπτίδια P_A, P_B, P_{B ext}, P_D, P_F και P_{F, scrambled} συγκέντρωσης 2,5 mM σε διάλυμα διαπίδυσης
- Θερμιδόμετρο ισόθερμης τιτλοδότησης ITC₂₀₀
- Υπολογιστής με ειδικό πρόγραμμα συνδεδεμένος με την συσκευή ITC₂₀₀

Πίνακας 2.9: Ρύθμιση των παραμέτρων του πειράματος ITC

Παράμετρος	Τιμή
Αριθμός ενέσεων	10
Θερμοκρασία κελιού (°C)	25
Χρόνος ανάμεσα στις ενέσεις (sec)	300
Συγκέντρωση δείγματος στην σύριγγα (mM)	2,5
Συγκέντρωση δείγματος στο κελί (mM)	0,145
Ταχύτητα ανάδευσης (rpm)	1000

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

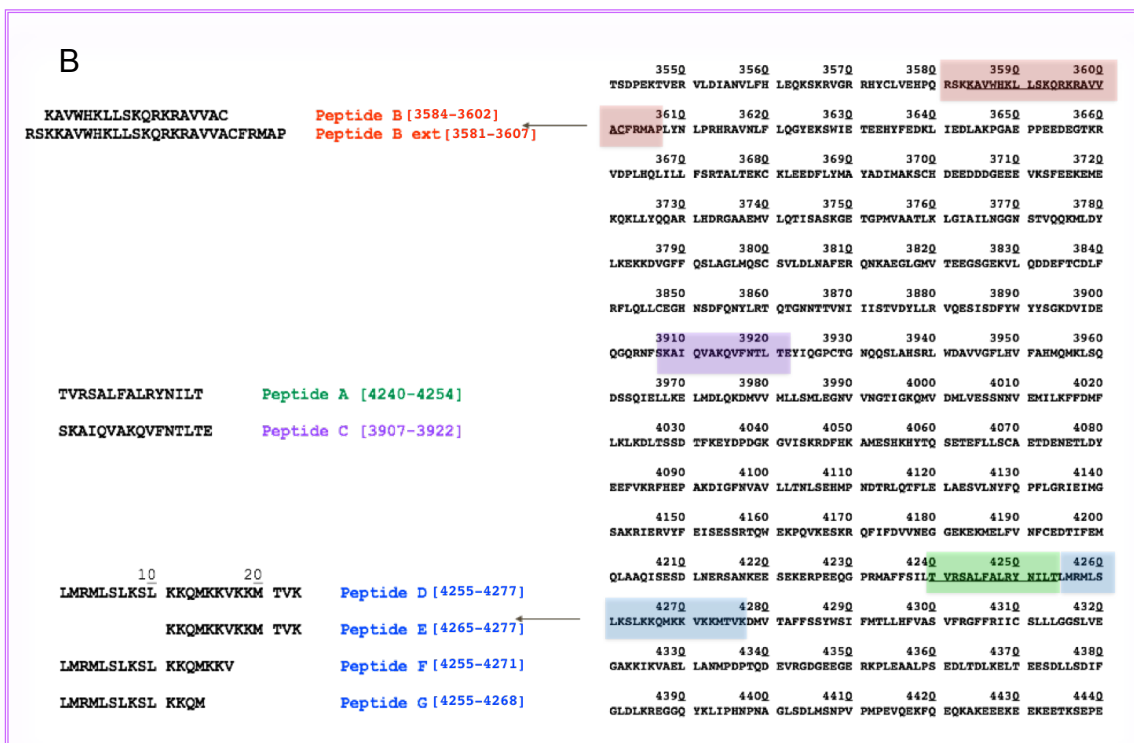
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Σύνθεση πεπτιδικών τμημάτων του RyR2 και της CaM και ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων εναντίον των συνθετικών πεπτιδίων

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αρχικά βάσει της βιβλιογραφίας [190, 191], επιλέχθηκαν και συντέθηκαν τα πεπτίδια P₁ και P₂ που αποτελούν τμήματα της C-τελικής περιοχής της CaM (Σχήμα 3.1A) για την παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος ικανού να αναγνωρίζει κυρίως ολόκληρο το μόριο της CaM. Το αντίσωμα αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα τύπου ELISA για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 και της CaM.

Επιπλέον, έλαβε χώρα η παραγωγή τμημάτων από την C-τελική περιοχή του RyR2 με την μορφή συνθετικών πεπτιδίων (Σχήμα 3.1B). Η επιλογή των τμημάτων αυτών έγινε βάσει της βιβλιογραφίας, που πρότεινε τα τμήματα αυτά ως πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM [110, 124, 125]. Τα P_B και P_{B extended} ανήκουν στην μέχρι στιγμής κοινώς αποδεκτή, κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2, ενώ τα συνθετικά πεπτίδια P_A, P_C, P_D, P_E, P_F, και P_G αποτελούν τις υπό εξέταση πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM. Τα συνθετικά πεπτίδια P_B, P_A, P_C και P_F καθώς και παράγωγά τους, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων, ενώ όλα τα συνθετικά πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την αγρίου τύπου CaM σε διάφορες βιοχημικές και φυσικοχημικές μελέτες.

A	
	10 20 30 40 50 60
	MADQLTEEQI AEFKEAFSLF DKDGDGTITT KELGTVMRSL GQNPTAEELQ DMINEVDADG
GQVNYEEFVQMMTAK Peptide 1 [134-148]	70 80 90 100 110 120
ADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK Peptide 2 [128-148]	NGTIDFPFEL TMMARKMKDT DSEEEIREF RVFDKDGNGY ISAAELRHVM TNLGEKLTDE
	130 140 148
	EVDEMIREAD IDGDGQVNYE EFVQMMTAK



Σχήμα 3.1: Η πρωτοταγής δομή A) ολόκληρου του μορίου της CaM και B) της C-τελικής περιοχής του RyR2. Τα έγχρωμα πλαίσια υποδεικνύουν τις θέσεις των συνθετικών πεπτιδίων.

3.1.1 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίων του hRyR2 και της hCaM καθώς και παραγώγων τους

Αρχικά έγινε η σύνθεση των πεπτιδίων καθώς και παραγώγων τους με την τεχνική της SPPS εφαρμόζοντας την μεθοδολογία Fmoc, η αρχή της οποίας περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των πεπτιδίων είναι ρητίνη Rink-amide παρασκευασμένη στο εργαστήριο [192], με βαθμό υποκατάστασης 0,6 mmol/g και μάζα 500 mg/πεπτίδιο. Η σύνθεση των παραγώγων των πεπτιδίων που φέρουν μία επιπλέον Cys, Lys, ή βιοτίνη (Biot) στο N-τελικό τους άκρο, έλαβε χώρα μετά την σύνθεση των αντίστοιχων πεπτιδίων με την προσθήκη των αντίστοιχων αμινοξέων ή βιοτίνης σε 200 mg ρητίνης-πεπτιδίου. Στην περίπτωση των πεπτιδίων pSer₄₂₆₀P_F και pSer₄₂₆₃P_F ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την σύνθεση του P_F, με την διαφορά ότι αντί για το αμινοξύ Ser προστέθηκε το τροποποιημένο αμινοξύ pSer στις θέσεις 4260 και 4263, αντίστοιχα.

Μετά την προσθήκη και την αποπροστασία και του τελευταίου αμινοξέος από κάθε πεπτίδιο (εκτός των βιοτινυλιωμένων πεπτιδίων, όπου, επειδή η Biot δεν

είναι Fmoc προστατευμένη, παρακάμπτεται το στάδιο της αποπροστασίας), ακολούθησε το στάδιο της αποκοπής. Στο στάδιο αυτό γίνεται η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων καθώς και η αποκοπή των πεπτιδίων από την ρητίνη. Για κάθε πεπτιδίο χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μίγματα αποκοπής, η επιλογή των οποίων έγινε ανάλογα με την αμινοξική αλληλουχία του κάθε πεπτιδίου (Πίνακας 3.1), βάσει βιβλιογραφικών πληροφοριών αλλά και προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου.

Πίνακας 3.1: Α) Η αμινοξική αλληλουχία, η σύσταση των μιγμάτων αποκοπής και η % απόδοση καθαρισμού των συνθετικών πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα των RγR και CaM, καθώς και Β) παραγώγων τους.

A

Κωδική Ονομασία	Αμινοξική αλληλουχία (hRγR2)	Μίγμα αποκοπής	% Απόδοση καθαρισμού
P _A	TVRSALFALRYNILT	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v	30
P _B	KAVWHKLLSKQRKRAVVAC	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v	25
P _{B extended}	RSKKAVWHKLLSKQRKRAVVACFRMAP	TFA/Thioanisole/Anisole/EDT 90/5/2/3% v/v Bu ₄ NBr (30 eq) (Αντιδραστήριο R)	25
P _C	SKAIQVAKQVFNTLTE	TFA/H ₂ O/TIS, 95/2,5/2,5% v/v	30
P _D	LMRMLSLKSLKKQMKKVKKMTVK	Αντιδραστήριο R	25
P _E	KKQMKKVKKMTVK	Αντιδραστήριο R	30
P _F	LMRMLSLKSLKKQMKKV	Αντιδραστήριο R	25
P _{F scrambled}	KSLKQRKMLKMLKVLMS	Αντιδραστήριο R	25
P _G	LMRMLSLKSLKKQM	Αντιδραστήριο R	30
Κωδική Ονομασία	Αμινοξική αλληλουχία (hCaM)	Μίγμα αποκοπής	% Απόδοση καθαρισμού
P ₁	GQVNYEEFVQMMTAK	Αντιδραστήριο R	20
P ₂	ADIDGGQVNYEEFVQMMTAK	Αντιδραστήριο R	15

B

Κωδική Ονομασία	Αμινοξική αλληλουχία (hRyR2)	Μίγμα αποκοπής	% Απόδοση καθαρισμού
CysP _A	<u>C</u> TVRSALFALRYNILT	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v	30
LysP _A	<u>K</u> TVRSALFALRYNILT	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v	30
BiotP _A	Biot TVRSALFALRYNILT	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v	25
BiotP _B	Biot KAVWHKLLSKQRKRAVVAC	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v	25
CysP _C	<u>C</u> SKAIQVAKQVFNTLTE	TFA/H ₂ O/EDT/TIS, 93/2,5/2,5/2 % v/v	20
CysP _F	<u>C</u> LMRMLSLKSLKKQMKKV	Αντιδραστήριο R	25
BiotP _F	Biot LMRMLSLKSLKKQMKKV	Αντιδραστήριο R	25
pSer ₄₂₆₀ P _F	LMRML(pS)LKSLKKQMKKV	Αντιδραστήριο R	15
pSer ₄₂₆₃ P _F	LMRMLSLK(pS)LKKQMKKV	Αντιδραστήριο R	15

Κωδική Ονομασία	Αμινοξική αλληλουχία (hCaM)	Μίγμα αποκοπής	% Απόδοση καθαρισμού
CysP ₁	<u>C</u> GQVNYEEFVQMMTAK	Αντιδραστήριο R	20
CysP ₂	<u>C</u> ADIDGGQVNYEEFVQMMTAK	Αντιδραστήριο R	15

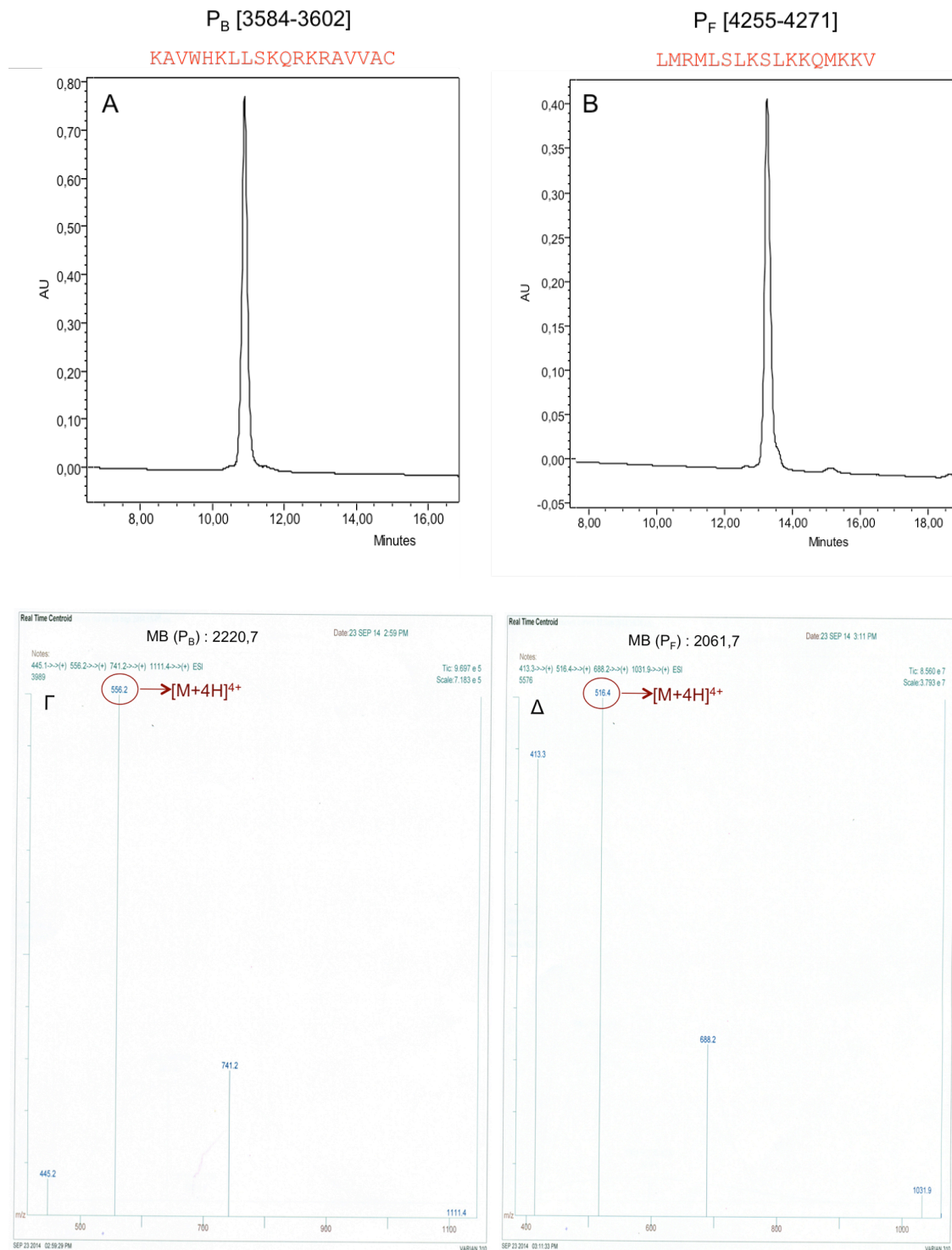
Στην συνέχεια, τα πεπτίδια καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC υπό τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων και αντιστοιχούσαν στην κύρια κορυφή του χρωματογραφήματος, συνενώθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν. Οι % αποδόσεις καθαρισμού των πεπτιδίων και των παραγώγων τους, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1, υπολογίζονται από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Απόδοση}_{\text{καθαρού πεπτιδίου}} = \frac{\text{Βάρος καθαρού προϊόντος (g)}}{\text{Βάρος ακατέργαστου προϊόντος (g)}} \times 100$$

Η καθαρότητα όλων των πεπτιδίων μελετήθηκε με αναλυτική RP-HPLC υπό τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Όπως προέκυψε όλα τα πεπτίδια είχαν καθαρότητα πάνω από 95%. Στο Σχήμα 3.2 φαίνονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα της αναλυτικής RP-HPLC καθώς και τα φάσματα ESI-MS για τα συνθετικά πεπτίδια P_B και P_F. Χρωματογραφήματα παραπλήσιας καθαρότητας παίρνουμε για όλα τα παραπάνω πεπτίδια.

Πίνακας 3.2: Συνθήκες καθαρισμού και χαρακτηρισμού των πεπτιδίων με ημιπαρασκευαστική και αναλυτική RP-HPLC, αντίστοιχα

	Πεπτίδιο	Γραμμική μεταβολή σύστασης του διαλύματος έκλουσης
Ημιπαρασκευαστική	P _B	0% B → 40% (97 min)
	P _F , CysP _F	0% B → 50% (97 min)
	pSer ₄₂₆₀ P _F pSer ₄₂₆₃ P _F P ₂ , CysP ₂	0% B → 60% (97 min)
	P _{extended} , Biot-P _F P _F scrambled	0% B → 70% (97 min)
	P ₁ , CysP ₁	0% B → 80% (97 min)
	P _E , P _G	0% B → 40% (47 min)
	P _D	0% B → 60% (47 min)
	Στήλη: 10 Nucleosil 7 C18 (250 x 12,7 mm ID) Διαλύτες έκλουσης: A (0,05% TFA σε H ₂ O) και B (60% CH ₃ CN σε διάλυμα A) Ταχύτητα Ροής: 3 ml/min	
Αναλυτική	Όλα τα πεπτίδια	0% B → 60% (22 min)
Στήλη: LiChrospher RP C18 (250 x 4,6 mm ID) Διαλύτες έκλουσης: A (0,05% TFA σε H ₂ O) και B (90% CH ₃ CN σε διάλυμα A) Ταχύτητα Ροής: 1 ml/min		



Σχήμα 3.2: Χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC (A, B) και φάσματα ESI-MS (Γ, Δ) για τα συνθετικά πεπτιδία P_B και P_F, αντίστοιχα.

Τέλος, η ταυτοποίηση των πεπτιδίων έγινε με φασματομετρία μαζών με την μέθοδο ιοντισμού με ψεκασμό (ESI-MS). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν

προέκυψαν αποκλίσεις από την σύγκριση των τιμών των μοριακών μαζών των πεπτιδίων βάσει των πειραματικών δεδομένων των φασμάτων ESI-MS (Σχήμα 3.2Γ, Δ) και των θεωρητικών δεδομένων βάσει της πρωτοταγούς τους δομής (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Πειραματική και θεωρητική μοριακή μάζα των συνθετικών πεπτιδίων

Πεπτίδιο	Πειραματική τιμή	Θεωρητική τιμή	Πεπτίδιο	Πειραματική τιμή	Θεωρητική τιμή
P _A	1737,0	1737,0	CysP _A	1841,5	1841,0
P _B	2221,0	2220,7	LysP _A	2350,0	2349,7
P _{B extended}	3195,0	3194,9	BiotP _A	1964,0	1963,3
P _C	1776,5	1776,0	BiotP _B	2447,0	2447,0
P _D	2778,0	2777,6	CysP _C	1880,5	1880,0
P _E	1605,2	1604,1	CysP _F	2266,0	2165,8
P _F	2061,5	2061,7	BiotP _F	2288,0	2288,0
P _{F scrambled}	2061,7	2061,7	pSer ₄₂₆₀ P _F	2141,0	2141,7
P _G	1706,0	1706,2	pSer ₄₂₆₃ P _F	2142,0	2141,7
P ₁	1775,0	1774,2	CysP ₁	1878,0	1878,2
P ₂	2360,0	2359,7	CysP ₂	2464,0	2463,7

3.1.2 Ανάπτυξη αντισωμάτων εναντίον των συνθετικών πεπτιδίων και αξιολόγηση των αντισωμάτων με μέθοδο ELISA

Λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας ανοσοποιήθηκαν έναντι συζευγμάτων των πεπτιδίων με την ανοσογονική πρωτεΐνη keyhole limpet hemocyanin (KLH), τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4. Ειδικά για την CaM, έγινε επίσης ανοσοποίηση κουνελιών εναντίον μίγματος 1:1, εμπορικά διαθέσιμων μορφών ανασυνδυασμένης και απομονωμένης CaM, χωρίς προηγούμενη σύζευξη σε KLH.

Σε όλες τις περιπτώσεις τα ανοσογόνα χορηγήθηκαν υπό τη μορφή γαλακτώματος σε FCA (αρχική ανοσοποίηση) ή σε FIA (αναμνηστικές ανοσοποιήσεις). Αρχικά, για κάθε ανοσογόνο έγινε μία πρώτη ανοσοποίηση χωρίς να ακολουθήσει το στάδιο της αιμοληψίας (λόγω παρουσίας κυρίως IgM αντισωμάτων) στον αντιορό, μετά την αρχική ανοσοποίηση. Μετά από

διάστημα 6 εβδομάδων ακολούθησε η 1^η αναμνηστική ένεση. Σε χρονικό διάστημα 12 ημερών μετά την 1^η αναμνηστική ένεση έγινε η 1^η αιμοληψία και ακολούθησε αξιολόγηση των αντισωμάτων με την μέθοδο ELISA. Ακολούθησαν διαδοχικές αναμνηστικές ανοσοποιήσεις ανά 3 εβδομάδες και παραλαβή αντιορού μετά από κάθε ανοσοποίηση. Για τα ανοσογόνα CysP_A, P_B (σύζευξη με την KLH μέσω γλουταραλδεϋδης), P_C και P_F έγιναν μόνο δύο αναμνηστικές ανοσοποιήσεις, επειδή στους αντίστοιχους αντιορούς δεν αναπτύχθηκαν αντισώματα ειδικά για το πεπτίδιο, όπως φάνηκε μετά από αξιολόγησή τους με την μέθοδο ELISA. Αντιθέτως, για τα υπόλοιπα ανοσογόνα του Πίνακα 3.4, η ανάπτυξη αντισωμάτων εναντίον των πεπτιδίων ήταν επιτυχής, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου ELISA, και επομένως ακολούθησαν περισσότερες αναμνηστικές ανοσοποιήσεις στα αντίστοιχα κουνέλια.

Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικός πίνακας των αντιορών που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής

hRyR2 ανοσογόνο	Τρόπος σύζευξης στην KLH	Αντιορός N*	Επιτυχής ανάπτυξη Abs
CysP _A /KLH	μέσω sulfo-SMCC	39N	x
P _A /KLH & LysP _A /KLH	μέσω γλουταραλδεϋδης	41N	✓
P _B /KLH	μέσω sulfo-SMCC	72N	✓
P _B /KLH	μέσω γλουταραλδεϋδης	42N	x
P _C /KLH	μέσω γλουταραλδεϋδης	67N	✓
CysP _C /KLH	μέσω sulfo-SMCC	68N	x
P _F /KLH	μέσω γλουταραλδεϋδης	73N	x
CysP _F /KLH	μέσω sulfo-SMCC	77N	✓
hCaM ανοσογόνο	Τρόπος σύζευξης στην KLH	Αντιορός N*	Επιτυχής ανάπτυξη Abs
CysP ₁ /KLH CysP ₂ /KLH	μέσω sulfo-SMCC	76N	✓
Ανασυνδυσασμένη και απομονωμένη CaM	-	74N	✓
*N: ο αριθμός που αναφέρεται στην σειρά των διαδοχικών αιμοληψιών (1 έως 6, ανάλογα με το ανοσογόνο).			

Η αξιολόγηση των αντισωμάτων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έγινε με την μέθοδο ELISA. Στην περίπτωση των αντισωμάτων, που αναπτύχθηκαν εναντίον συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 (αντιοροί 39N, 41N, 72N, 42N, 67N,

68N, 73N και 77N) ως αντιγόνα επίστρωσης χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτιδία. Στην περίπτωση των αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν είτε εναντίον των συνθετικών πεπτιδίων της CaM (αντιοροί 76N) είτε ολόκληρου του μορίου της CaM (αντιοροί 74N), ως αντιγόνα επίστρωσης στην μέθοδο ELISA, χρησιμοποιήθηκαν είτε τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτιδία (P₁ και P₂) είτε ολόκληρο το μόριο της CaM (εμπορικά διαθέσιμη απομονωμένη πρωτεΐνη, CaM Hystest, ή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, CaM Acris). Κατά την αξιολόγηση των αντισωμάτων για την CaM, χρησιμοποιήθηκε επίσης, ως θετικός μάρτυρας, ένα εμπορικά διαθέσιμο μονοκλωνικό αντισώματος εναντίον της CaM.

Ο όρος τίτλος αντισώματος είναι ενδεικτικός της σχετικής συγκέντρωσης εξειδικευμένων αντισωμάτων που είναι παρόντα σε ένα δείγμα αντιορού ή άλλου παρασκευάσματος που περιέχει αντισώματα. Υψηλός τίτλος (δηλαδή μεγάλη αραίωση του αρχικού παρασκευάσματος που περιέχει τα αντισώματα) συνεπάγεται, συνήθως, καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά για το υπό έλεγχο αντίσωμα. Ως τίτλος αντισώματος λαμβάνεται η αραίωση εκείνη για την οποία η τιμή οπτικής απορρόφησης στο σύστημα ELISA, που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση, είναι το 50% της μέγιστης δυνατής τιμής. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τόσο φρεάτια στα οποία προστέθηκε προ-άνοσος ορός (pre-immune serum) όσο και φρεάτια, που δεν είχαν επικαλυφθεί με το αντίστοιχο πεπτιδίο (ή την αντίστοιχη πρωτεΐνη, στην περίπτωση της CaM).

Αξιολόγηση των αντισωμάτων έναντι των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με μέθοδο ELISA

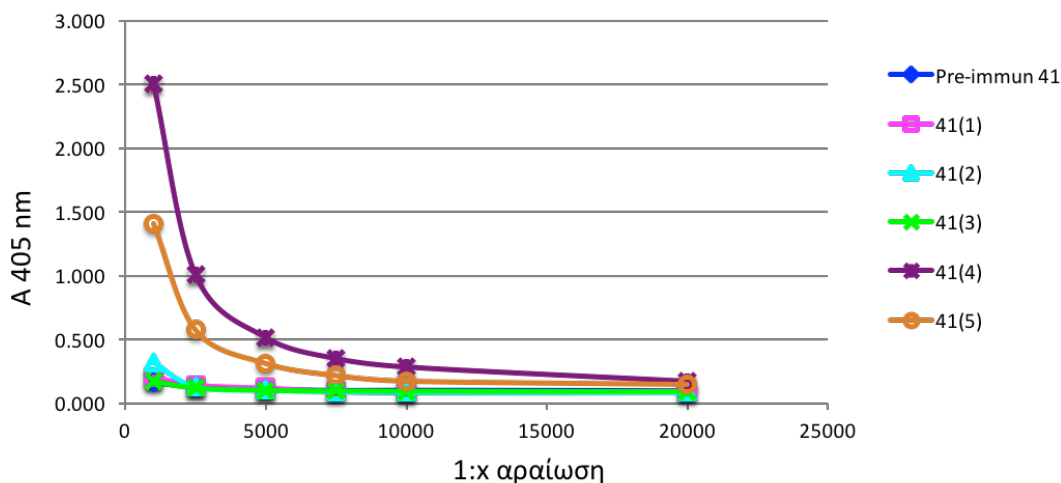
Για τον προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων (αντισώματα G, IgG) έναντι των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2, ακολουθήθηκε η μέθοδος ELISA που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Από τους αντιορούς του Πίνακα 3.4 που αφορούν τον RyR2, μόνο οι αντιοροί 41N, 67N και 72N ήταν ικανοί να αναγνωρίσουν τα συνθετικά πεπτιδία P_A, P_C και P_B, αντίστοιχα, ενώ για τον αντιορό 77N (που αντιστοιχεί στο συνθετικό πεπτιδίο P_F) τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στην συνέχεια. Συνολικά παρελήφθησαν 5 αντιοροί εναντίον των συζευγμάτων P_A/KLH και P_B/KLH (41(1)-41(5) και 72(1)-72(5)) καθώς και 4 αντιοροί έναντι του συζεύγματος P_C/KLH (67(1)-67(4)). Για κάθε

έναν από τους αντιορούς 41(1-5), 72(1-5) και 67(1-4) ελήφθησαν οι καμπύλες τίτλου και εκτόπισης. Στα πειράματα εκτόπισης το συνθετικό πεπτιδίο, που έχει ακινητοποιηθεί στα φρεάτια της ELISA μετά από επώαση των φρεατίων με διάλυμα του πεπτιδίου σε σταθερή συγκέντρωση (10 µg/ml), ανταγωνίζεται το ίδιο πεπτιδίο που βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα (σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις) ως προς την ικανότητα πρόσδεσης των δύο μορφών με το ειδικό αντίσωμα, που χρησιμοποιείται σε περιορισμένη συγκέντρωση, αντίστοιχη του τίτλου του. Η εξειδίκευση των αντισωμάτων που περιέχονται στους αντιορούς αξιολογείται έμμεσα, με την σταδιακή μείωση της οπτικής απορρόφησης ως απόκριση στην προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης ελεύθερου πεπτιδίου.

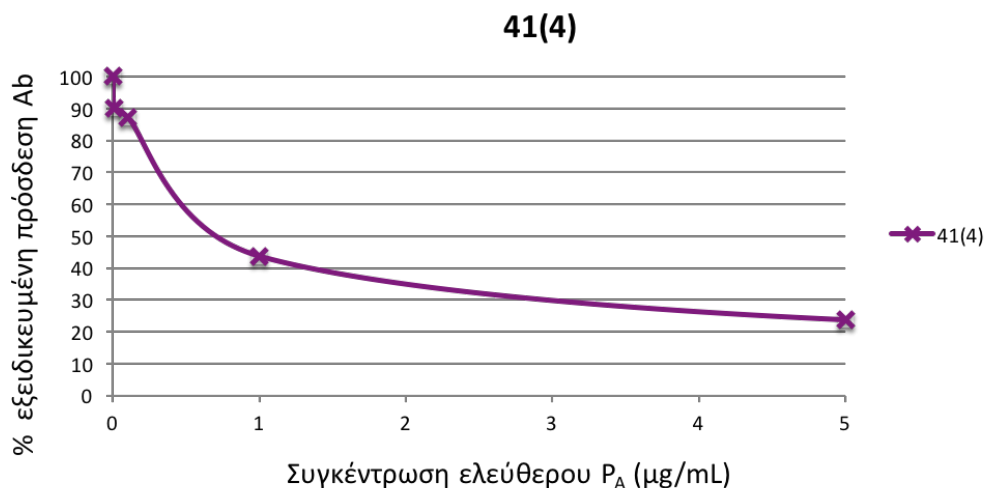
Όπως φαίνεται από τις καμπύλες τίτλου του Σχήματος 3.3A, ο αντιορός 41(4) φέρει τον υψηλότερο τίτλο για το πεπτιδίο P_A, με τιμή 1:2.500 ενώ όπως παρουσιάζεται στην καμπύλη εκτόπισης του Σχήματος 3.3B, ο αντιορός 41(4) περιέχει εξειδικευμένα ως προς το πεπτιδίο P_A αντισώματα εφόσον είναι ικανός να αναγνωρίζει το πεπτιδίο P_A, όταν αυτό βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα.

Οι καμπύλες τίτλου των αντιορών 67N παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.4A. Όπως φαίνεται, ο αντιορός 67(4) έχει τον υψηλότερο τίτλο (1:20.000). Η καμπύλη εκτόπισης του αντιορού 67(4), που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4B, υποδεικνύει ότι ο αντιορός περιέχει εξειδικευμένα αντισώματα για το πεπτιδίο P_C.

A



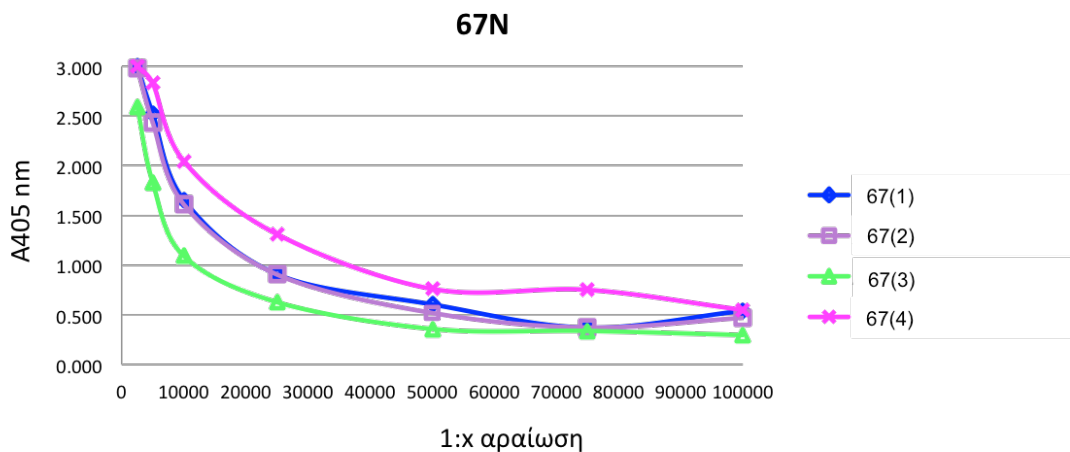
B



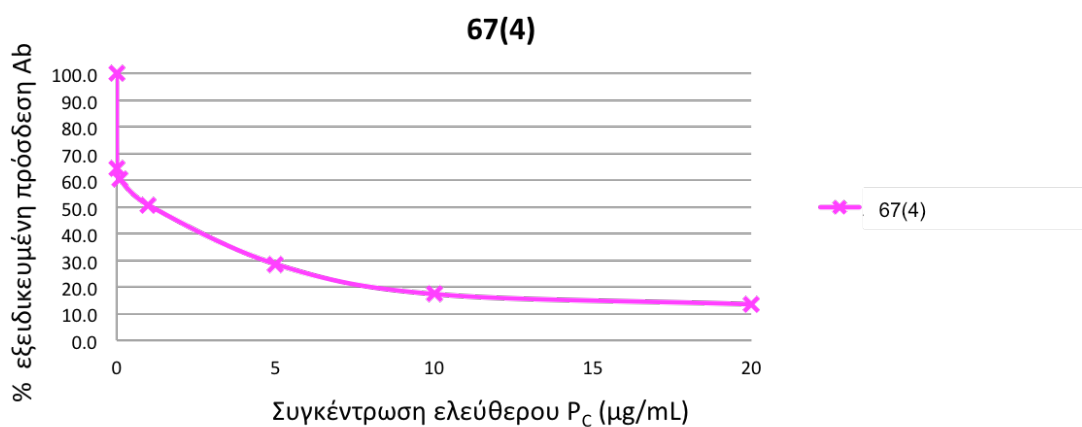
Σχήμα 3.3: A) Καμπύλες τίτλου των αντισωρών 41N εναντίον του συνθετικού πεπτιδίου P_A . B) Καμπύλη εκτόπισης του αντισωρού 41(4), στην αραίωση του τίτλου (1:2.000), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του πεπτιδίου P_A , σε ελεύθερη μορφή.

Οι καμπύλες τίτλου για τους αντισωρούς 72N είτε ως προς το P_B είτε ως προς το $P_{B \text{ extended}}$ εμφανίζονται στα Σχήματα 3.5A και B, αντίστοιχα. Για το πεπτίδιο P_B , ο αντισωρός 72(2) εμφάνισε τον μεγαλύτερο τίτλο (1:15.000). Για το πεπτίδιο $P_{B \text{ extended}}$ μόνον ο αντισωρός 72(5) έδωσε μετρήσιμη τιμή τίτλου (1:5.000). Σύμφωνα με τις καμπύλες εκτόπισης του αντισωρού 72(5) (Σχήμα 3.5 Γ) παρουσία των πεπτιδίων P_B και $P_{B \text{ extended}}$ στην ελεύθερη μορφή τους, ο αντισωρός φαίνεται να αναγνωρίζει τόσο το πεπτίδιο P_B όσο και το πεπτίδιο $P_{B \text{ extended}}$ στην ελεύθερη μορφή τους.

A



B

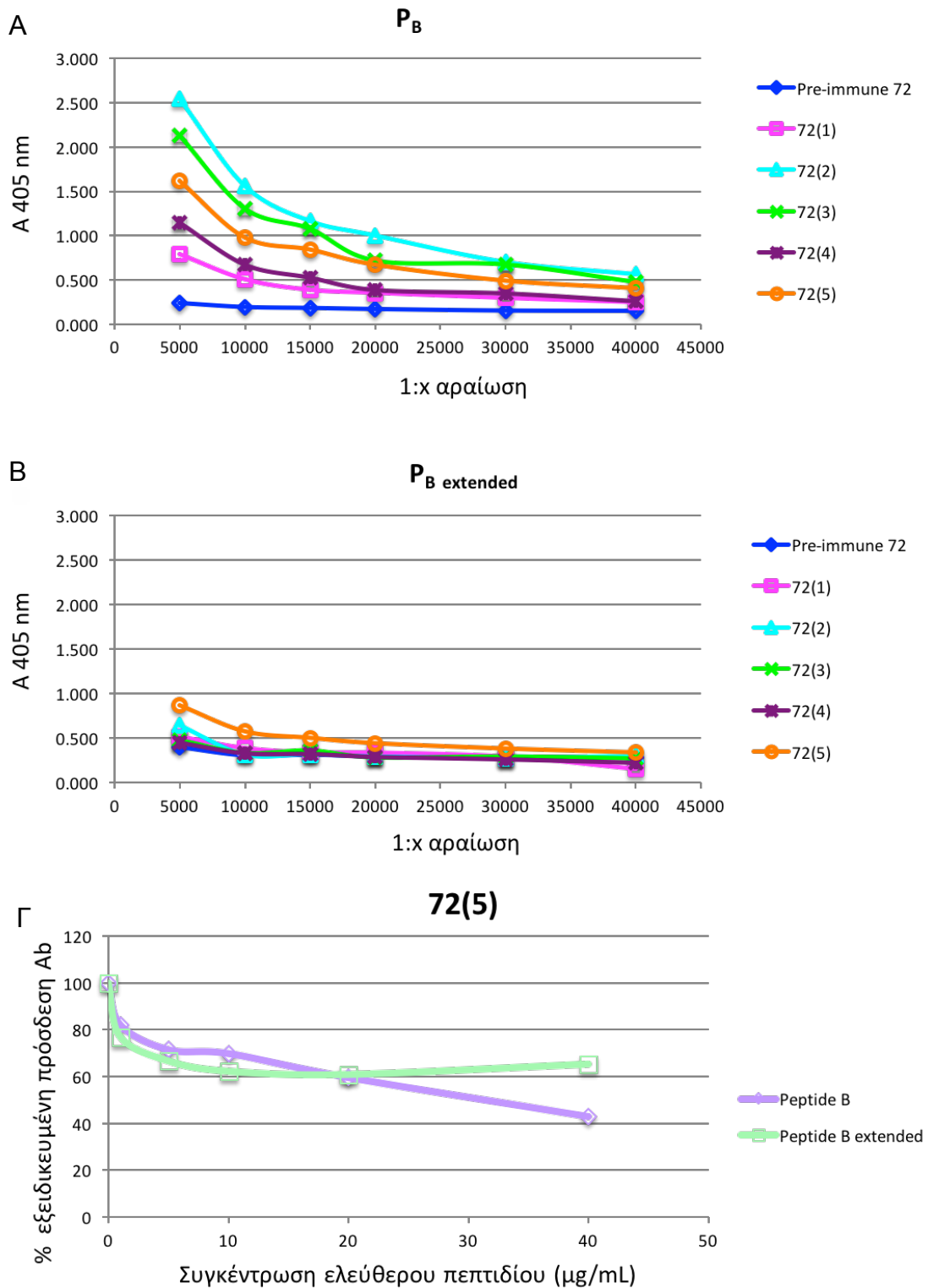


Σχήμα 3.4: A) Καμπύλες τίτλου των αντισωρών 67N εναντίον του συνθετικού πεπτιδίου P_C. B) Καμπύλη εκτόπισης του αντισωρού 67(4) στην αραίωση του τίτλου (1:20.000), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του πεπτιδίου P_C, σε ελεύθερη μορφή.

Τέλος, στο Σχήμα 3.6A παρουσιάζονται οι καμπύλες τίτλου του αντισωρού 77(3) ως προς τα πεπτίδια P_F και P_D. Για την ανάπτυξη του αντισωρού 77(3) ως ανοσογόνο έχει χρησιμοποιηθεί το σύζευγμα CysP_F/KLH. Το πεπτίδιο P_D με αα 4255-4277 αποτελεί εκτεταμένη, ως προς το C-τελικό άκρο, περιοχή του πεπτιδίου P_F με αα 4255-4271. Επομένως, πιθανόν ο αντισωρός 77(3) να αναγνωρίζει το πεπτίδιο P_D. Όπως προκύπτει από τις καμπύλες τίτλου του αντισωρού 77(3) έναντι των πεπτιδίων P_F και P_D, ο αντισωρός 77(3) αναγνωρίζει οριακά το πεπτίδιο P_D ενώ δεν φαίνεται να αναγνωρίζει το πεπτίδιο P_F, όταν αυτά επιστρώνονται στα φρεάτια της ELISA. Επιπλέον, ο αντισωρός 77(3) δεν αναγνωρίζει ούτε το βιοτινυλιωμένο παράγωγο του πεπτιδίου P_F (Biot- P_F) σε σύστημα ELISA στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (αποτελέσματα που δεν

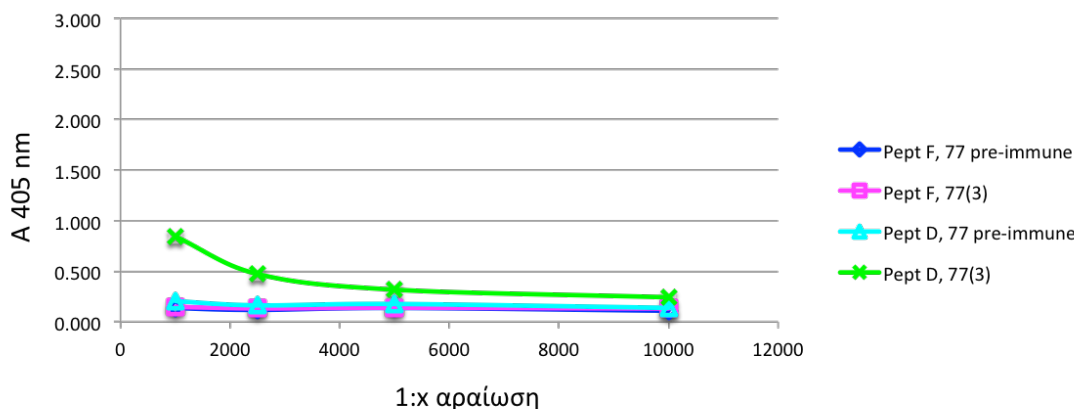
παρουσιάζονται). Αντίθετα, βάσει των καμπύλων εκτόπισης του αντιορού 77(3) (επιστρώνοντας στα φρεάτια της ELISA το πεπτιδίο P_D) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πεπτιδίων P_F και P_D, ο αντιορός 77(3) φαίνεται να περιέχει αντισώματα που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα και τα δύο αυτά πεπτιδία, όταν βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των καμπύλων τίτλου και εκτόπισης του αντιορού 77(3) έναντι του πεπτιδίου P_F, ο αντιορός 77(3) αναγνωρίζει την ελεύθερη στο διάλυμα μορφή του πεπτιδίου P_F ενώ δεν αναγνωρίζει την μορφή του πεπτιδίου που έχει ακινητοποιηθεί στα φρεάτια είτε μέσω προσρόφησης είτε ως βιοτινυλιωμένο παράγωγο, μέσω της ισχυρής αλληλεπίδρασης στρεπταβιδίνης-βιοτίνης.

Οι αντιοροί 41(4) και 67(4) ελέγχθηκαν και ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν ολόκληρο το μόριο του RyR2 με πειράματα Western blot με αρνητικά αποτελέσματα.

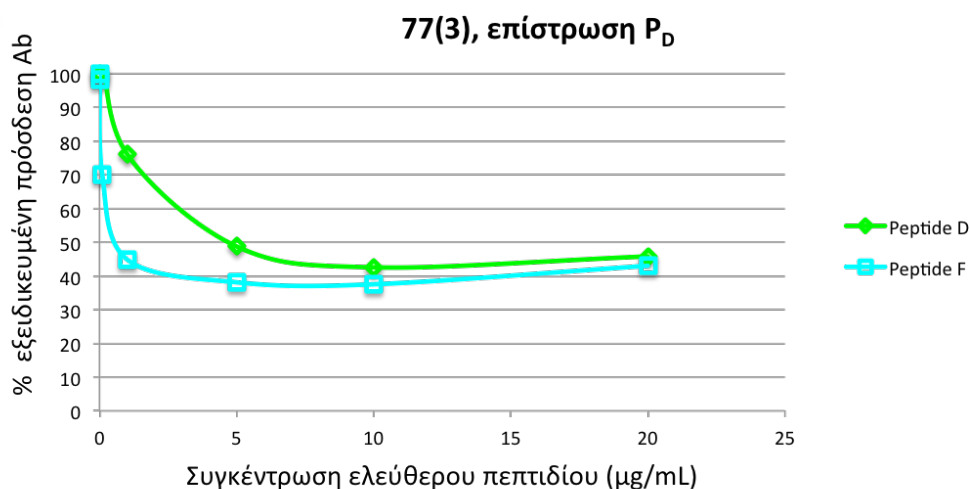


Σχήμα 3.5: Καμπύλες τίτλου των αντισωρών 72N ως προς τα συνθετικά πεπτιδίδια P_B (A) και P_B extended (B). Γ Καμπύλες εκτόπισης του αντισώρου 72(5) στην αραιώση του τίτλου (1:10.000), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πεπτιδίων P_B και P_B extended, σε ελεύθερη μορφή (επίστρωση φρεατίων με το πεπτιδίδια P_B).

A



B

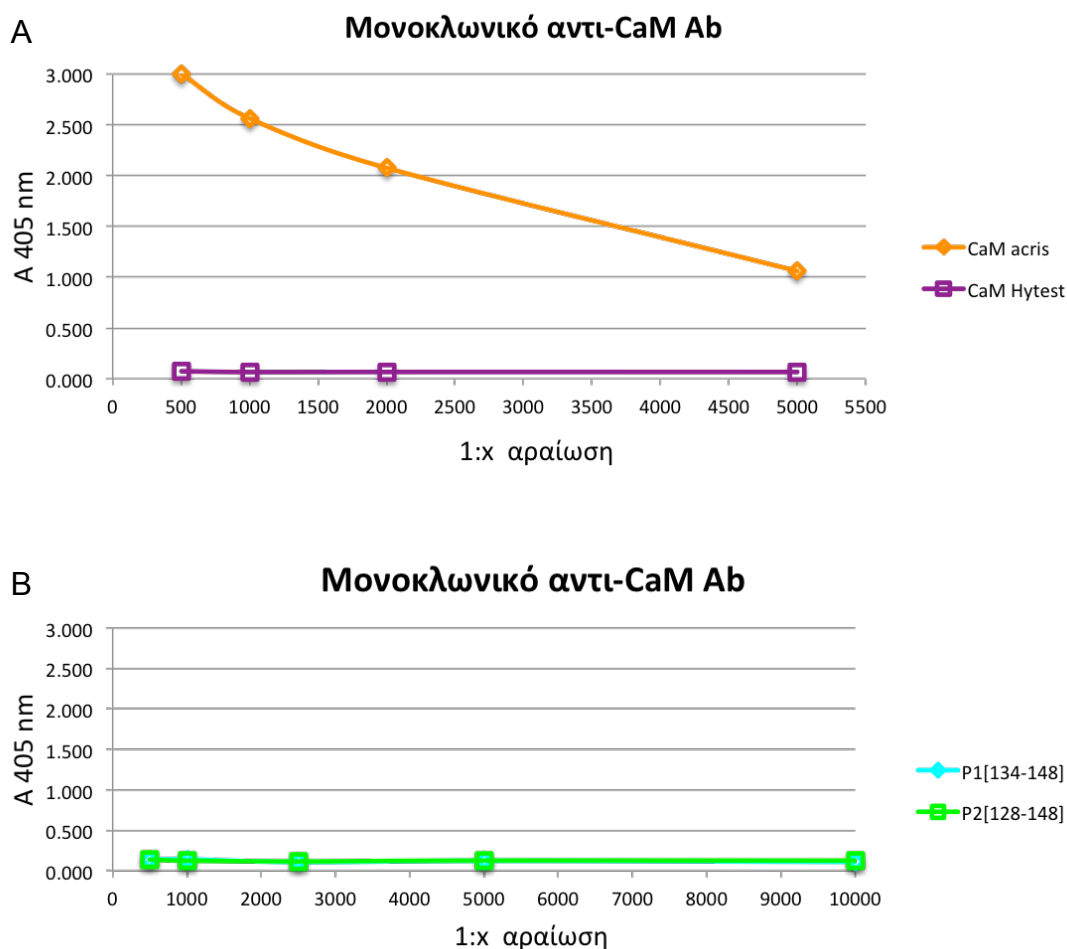


Σχήμα 3.6: A) Καμπύλες τίτλου του αντιορού 77(3) ως προς τα συνθετικά πεπτιδίδια P_F και P_D. B) Καμπύλες εκτόπισης του αντιορού 77(3) στην αραιώση του τίτλου (1:500) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πεπτιδίων P_F και P_D (επίστρωση φρεατίων με το πεπτιδίδιο P_D).

Αξιολόγηση των αντισωμάτων εναντίον των συνθετικών πεπτιδίων της CaM με μέθοδο ELISA

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM με τροποποιημένη μορφή της μεθόδου ELISA ήταν απαραίτητη η χρήση αντισώματος, ικανού να αναγνωρίζει ολόκληρο το μόριο της CaM. Σαν μία πρώτη προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικά διαθέσιμο μονοκλωνικό αντι-CaM αντίσωμα, το οποίο σε πειράματα ELISA ήταν ικανό να αναγνωρίζει την εμπορικά διαθέσιμη ανασυνδυασμένη CaM (CaM Acris) ενώ δεν ήταν ικανό να αναγνωρίσει την εμπορικά διαθέσιμη απομονωμένη CaM (CaM Hytest) (Σχήμα 3.7A), τουλάχιστον στο σύστημά μας. Ο επίτοπος του μονοκλωνικού αυτού αντισώματος δεν είναι γνωστός. Ωστόσο στο πλαίσιο

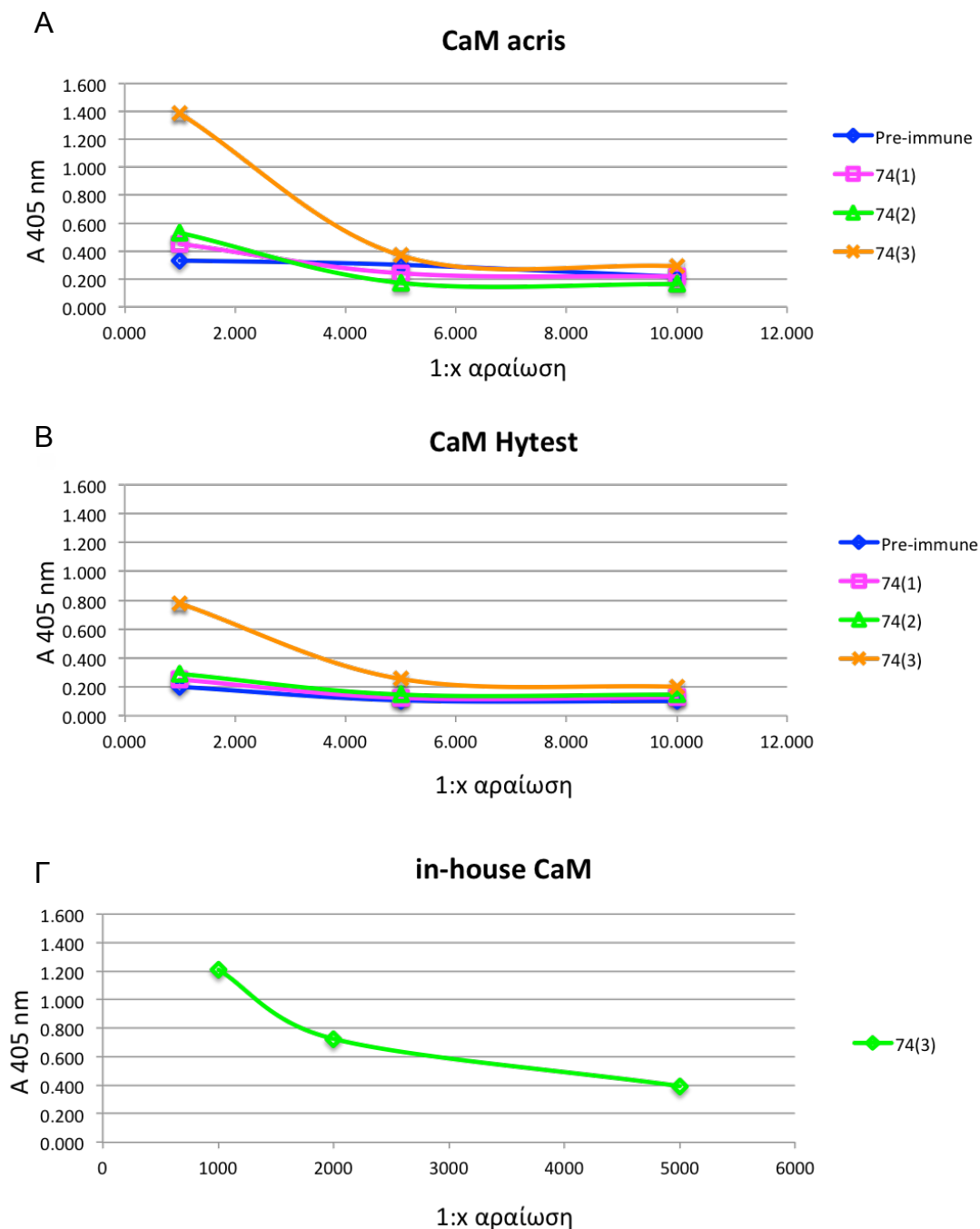
της παρούσας διατριβής βρέθηκε ότι το αντίσωμα αυτό δεν αναγνωρίζει τα P₁ και P₂, που αποτελούν τμήματα της C-τελικής περιοχής της CaM, σε πειράματα ELISA (Σχήμα 3.7B).



Σχήμα 3.7: Καμπύλες τίτλου του μονοκλωνικού αντι-CaM αντισώματος ως προς την εμπορικά διαθέσιμη CaM, διαφορετικής προέλευσης (CaM Acris και CaM Hytest) (A) και ως προς τα συνθετικά πεπτίδια P₁ και P₂ (B).

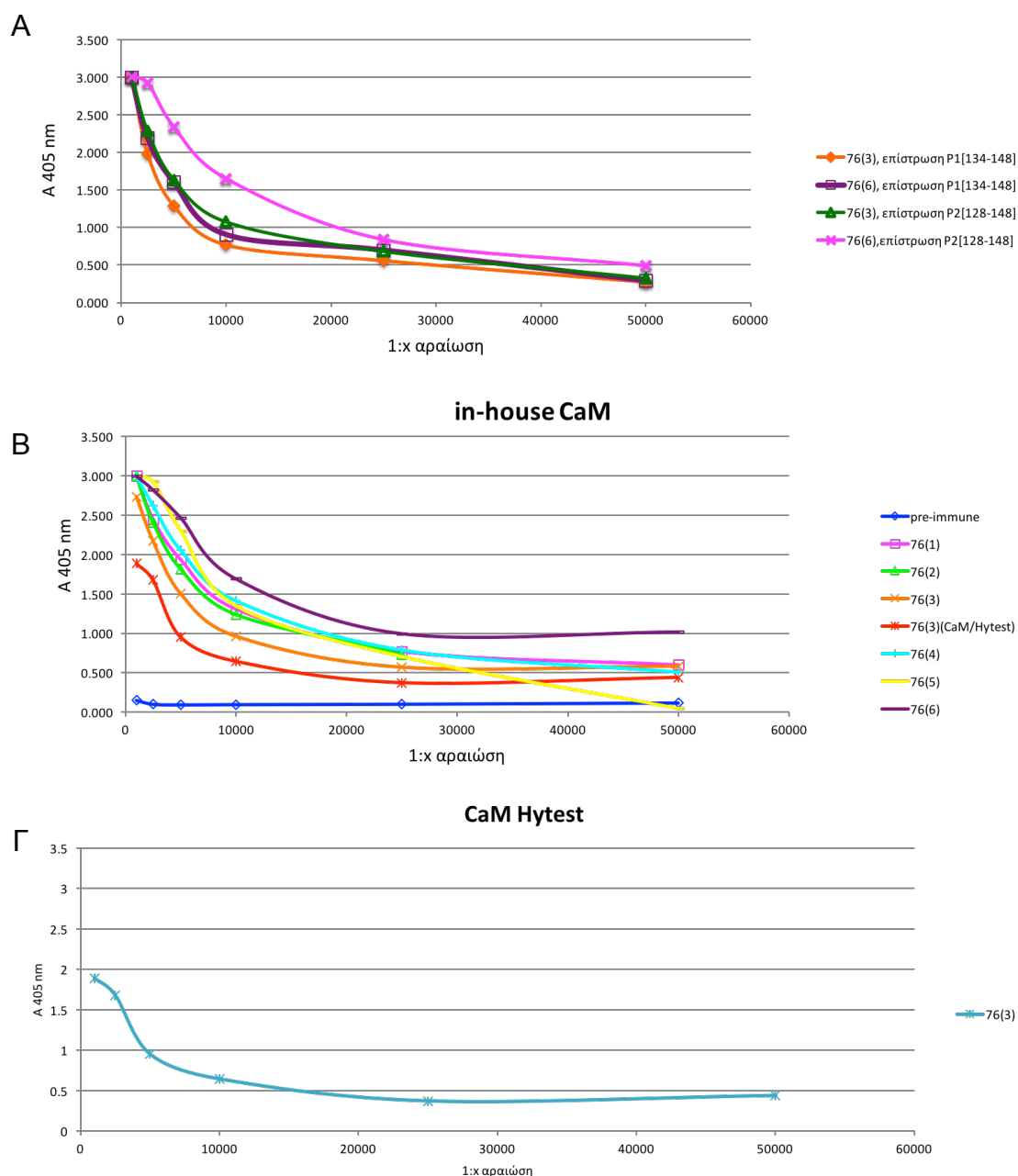
Στην συνέχεια, κυρίως λόγω του μεγάλου κόστους του μονοκλωνικού αντι-CaM αντισώματος, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης πολυκλωνικού αντι-CaM αντισώματος σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας χορηγώντας ως ανοσογόνο μίγμα CaM Acris/ CaM Hytest σε αναλογία 1:1. Η αξιολόγηση των αντιορών αυτών (74N) έγινε με την μέθοδο της ELISA χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο επίστρωσης την εμπορικά διαθέσιμη (CaM Acris ή CaM Hytest) καθώς και την ανασυνδυασμένη CaM αγρίου τύπου, που παρασκευάσαμε και καθάρισαμε στο εργαστήριο (in-house CaM, βλ. 3.2.2). Από τις καμπύλες τίτλου

προκύπτει ότι ο αντιορός 74(3) αναγνωρίζει και τις τρεις μορφές CaM, αλλά με σχετικά χαμηλούς τίτλους (1:2.000-3.000) (Σχήμα 3.8A, Β, Γ).



Σχήμα 3.8: Καμπύλες τίτλου των πολυκλωνικών αντι-CaM αντιορών 74N ως προς την εμπορικά διαθέσιμη CaM [CaM Acris (A) και CaM Hystest (B)]. Καμπύλη τίτλου του αντιορού 74(3) ως προς την παρασκευασμένη στο εργαστήριο CaM (in-house CaM) (Γ).

Τέλος, λόγω του χαμηλού τίτλου των αντιορών 74N, που πιθανόν να οφείλεται στο ότι το μόριο της CaM είναι υψηλά συντηρημένο ανάμεσα στα θηλαστικά, έλαβε χώρα η ανάπτυξη αντι-πεπτιδικού πολυκλωνικού αντι-CaM αντισώματος σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας. Ως ανοσογόνα χρησιμοποιήθηκαν τα συζεύγματα CysP₁/KLH και CysP₂/KLH (Πίνακας 3.4).



Σχήμα 3.9: A) Καμπύλες τίτλου των αντιορών 76(3) και 76(6) ως προς τα συνθετικά πεπτιδικά P₁ και P₂. B) Καμπύλες τίτλου των αντιορών 76N ως προς την in-house CaM. Γ) Καμπύλη τίτλου του αντιορού 76(3) ως προς την CaM Hystest.

Αρχικά χορηγήθηκε το σύζευγμα CysP₁/KLH, πραγματοποιήθηκε η πρώτη αιμοληψία (αντιορός 76(1)) και στην συνέχεια οι υπόλοιπες ανοσοποιήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας ως ανοσογόνο το μίγμα CysP₁/KLH και CysP₂/KLH σε αναλογία 1:1. Συνολικά παραλήφθηκαν 6 αντιοροί (76(1-6)). Οι αντιοροί 76N φάνηκε να αναγνωρίζουν τα συνθετικά πεπτίδια P₁ και P₂ σε πειράματα ELISA. Ενδεικτικά, στο Σχήμα 3.8A, παρουσιάζονται οι καμπύλες τίτλου των αντιορών 76(3) και 76(6) έναντι των P₁ και P₂, βάσει των οποίων και οι δύο αντιοροί φαίνεται να αναγνωρίζουν καλύτερα το P₂. Τέλος, οι αντιοροί 76N φαίνεται να αναγνωρίζουν την in-house CaM σύμφωνα με τις καμπύλες τίτλου του Σχήματος 3.9B. Μεγαλύτερο τίτλο (~ 1:15.000) έχει ο αντιορός 76(6). Σε αντίθεση με το μονοκλωνικό anti-CaM αντίσωμα, οι αντιοροί 76N αναγνωρίζουν και την CaM Hytest στο σύστημα ELISA: ενδεικτικά παρουσιάζεται η καμπύλη τίτλου του αντιορού 76(3) (Σχήμα 3.9B). Η ικανότητα των αντιορών 76N να αναγνωρίζουν ολόκληρο το μόριο της CaM επιβεβαιώθηκε και με πειράματα εκτόπισης ELISA, (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται).

Συνοψίζοντας, στην προσπάθεια ανάπτυξης πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της CaM, οι αντιοροί με τους υψηλότερους τίτλους ήταν αυτοί που αναπτύχθηκαν έναντι των συνθετικών πεπτιδίων P₁ και P₂ (76N). Οι αντιοροί 76N μπορούν να αξιοποιηθούν στην μελέτη της αλληλεπίδρασης της CaM με τα συνθετικά πεπτίδια του RyR2, με τροποποιημένη μορφή της μεθόδου ELISA. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των αντιορών 76N σε σχέση με το μονοκλωνικό anti-CaM αντίσωμα είναι ότι παραλαμβάνονται σε μεγάλες ποσότητες, έχουν μικρό κόστος, ενώ επίσης είναι γνωστός ο επίτοπός τους (αναγνωρίζουν την C-τελική περιοχή της CaM), μία επιπλέον πληροφορία που μπορεί να αξιοποιηθεί στην μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την CaM.

3.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM

Στα πλαίσια της μελέτης του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης μεταξύ του RyR2 και της αγρίου τύπου CaM, αναπτύχθηκαν τρεις μέθοδοι και συγκεκριμένα:

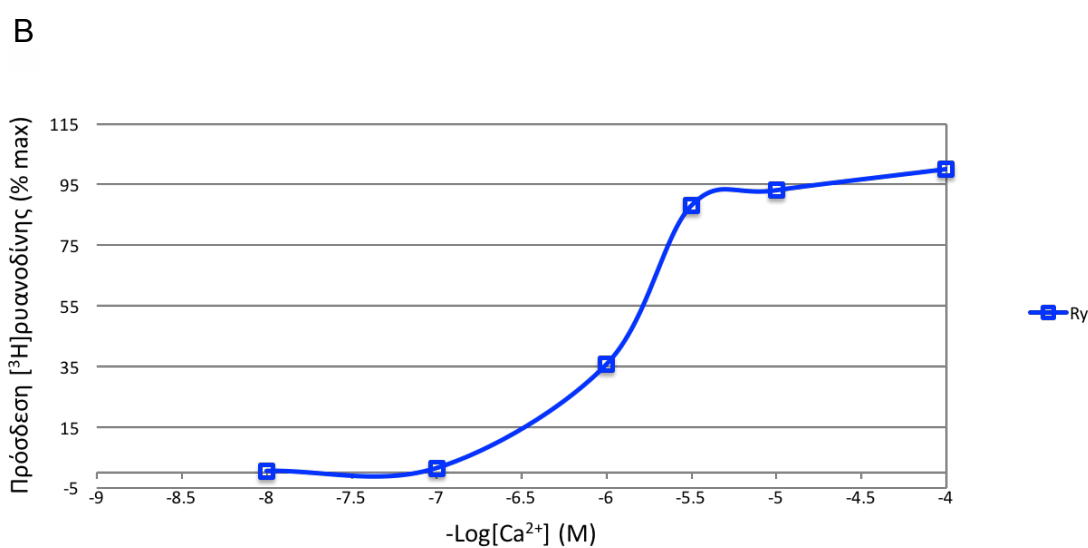
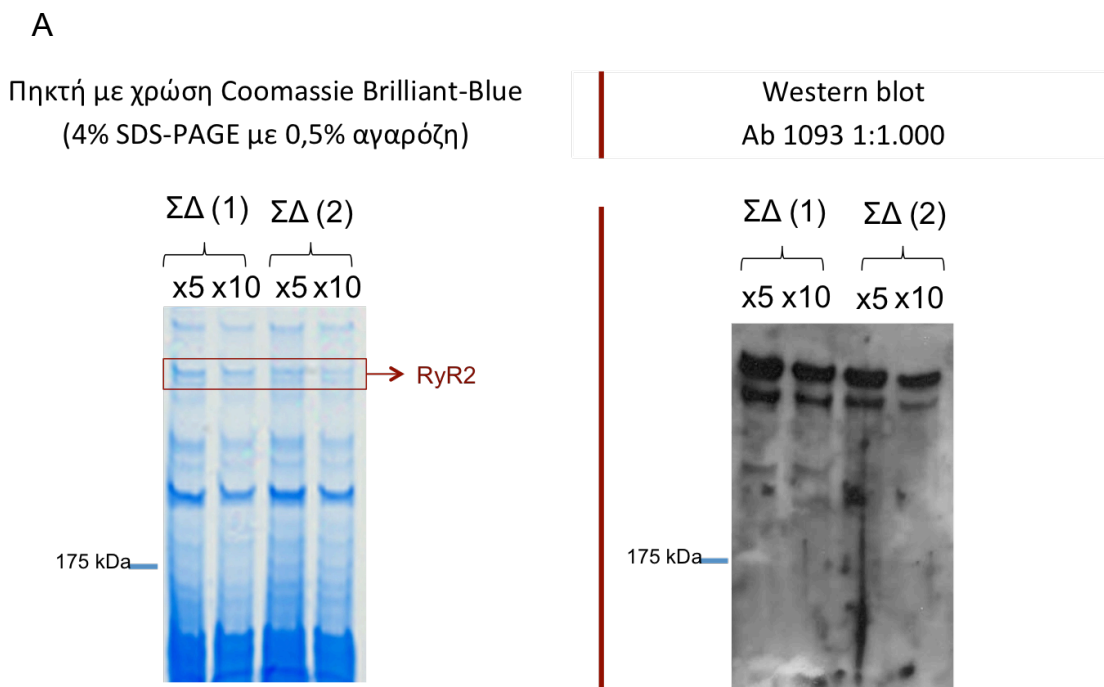
- ✓ η μέθοδος της συγκατακρήμνισης τύπου 1 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), του RyR2 με την CaM, τόσο απουσία όσο και παρουσία των συνθετικών πεπτιδίων του hRyR2 (P_A , P_B και P_C) για να μελετηθεί έμμεσα πιθανή συμμετοχή των αντίστοιχων περιοχών του υποδοχέα στην αλληλεπίδραση RyR2-CaM.
- ✓ Τροποποιημένη μορφή της μεθόδου ELISA για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 (P_A , P_B , $P_{B \text{ extended}}$, P_C , P_D , P_E , P_F και P_G) με την CaM, με στόχο τον εντοπισμό πιθανών περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR2, πέραν της κύριας περιοχής πρόσδεσης (που αντιστοιχεί στα συνθετικά πεππίδια P_B και $P_{B \text{ extended}}$).
- ✓ η μέθοδος ITC για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM, ως μία διαφορετική προσέγγιση εντοπισμού πιθανών περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR2.

Για την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων έλαβε χώρα η έκφραση και ο καθαρισμός ανασυνδυασμένης GST-CaM και CaM (απουσία πρωτεΐνης-συνοδού), η παρασκευή βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ χοίρου (που περιέχει τον επιθυμητό RyR2) καθώς και η σύνθεση πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα του RyR2 (P_A , P_B , $P_{B \text{ extended}}$, P_C , P_D , P_E , P_F και P_G). Τα συνθετικά πεππίδια P_B και $P_{B \text{ extended}}$ ανήκουν στην κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Τέλος, τα συνθετικά πεππίδια P_A , P_C και P_D αποτελούν τις υπό μελέτη πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR2, ενώ τα P_E , P_F και P_G , αποτελούν υπο-περιοχές του P_D .

3.2.1 Παρασκευή βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ χοίρου και έλεγχος της περιεκτικότητάς τους σε λειτουργικό RyR2

Η μέθοδος της παρασκευής βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ο έλεγχος της παρουσίας του RyR2 στα παρασκευάσματα αυτά γίνεται με την μέθοδο Western blot με την χρήση πολυκλωνικού αντισώματος που αναγνωρίζει ειδικά τον RyR2 (Ab 1093) (Σχήμα 3.10A), ενώ η λειτουργικότητα του υποδοχέα ελέγχεται με την μέθοδο της πρόσδεσης [^3H]ρυανοδίνης στον RyR2 σε διάφορες συγκεντρώσεις ελεύθερων Ca^{2+} , όπου αναμένεται η χαρακτηριστική καμπύλη της αυξανόμενης πρόσδεσης της [^3H]ρυανοδίνης με

αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} μέχρι 1 mM, εάν ο υποδοχέας είναι λειτουργικός (Σχήμα 3.10B). Σύμφωνα με το Σχήμα 3.10, τα παρασκευάσματά

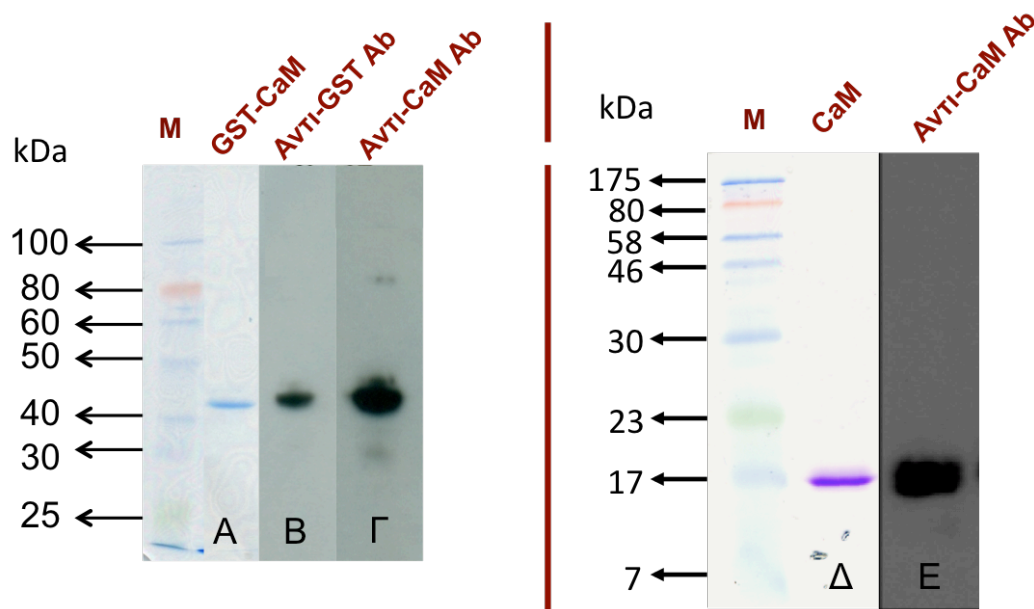


Σχήμα 3.10: **A)** Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 4% με 0,5% αγαρόζη με δύο παρασκευάσματα βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ από καρδιακό μυ χοίρων, 5 και 10 φορές αραιωμένα, μετά από SDS-PAGE και χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue (αριστερό πλαίσιο) και το αντίστοιχο αποτύπωμα κατά Western με το αντι-RyR2 αντίσωμα Ab1093 σε αραιώση 1:1000 (δεξί πλαίσιο). **B)** Καμπύλη πρόσδεσης της $[\text{}^3\text{H}]$ ρυανοδίνης στον RyR2 εκφρασμένης ως % της μέγιστης πειραματικής τιμής (% max) συναρτήσει της συγκέντρωσης Ca^{2+} .

μας περιέχουν τον RyR2 και μάλιστα σε λειτουργική μορφή και επομένως, είναι κατάλληλα για την αξιοποίησή τους σε πειράματα που απαιτούν την παρουσία RyR2. Η ολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα παρασκευάσματα των βαρέων κυστιδίων-φορέων ΣΔ μετρήθηκε με την μέθοδο BCA και υπολογίσθηκε σε ~ 25-30 mg/mL.

3.2.2 Έκφραση και καθαρισμός των GST-CaM και CaM

Για την έκφραση των πρωτεϊνών GST-CaM και CaM, έγινε μετασχηματισμός των κυττάρων BL21-Codon Plus (DE3)-RILP με τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Η επαγωγή της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών στις κυτταρικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε σε 1 mM IPTG στους 16 °C για 18 h. Ακολούθησε η λύση των βακτηριακών κυττάρων και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών GST-CaM και CaM με χρωματογραφία συγγένειας, από όπου οι πρωτεΐνες ελήφθησαν σε διαλυτή μορφή και σε υψηλή καθαρότητα.

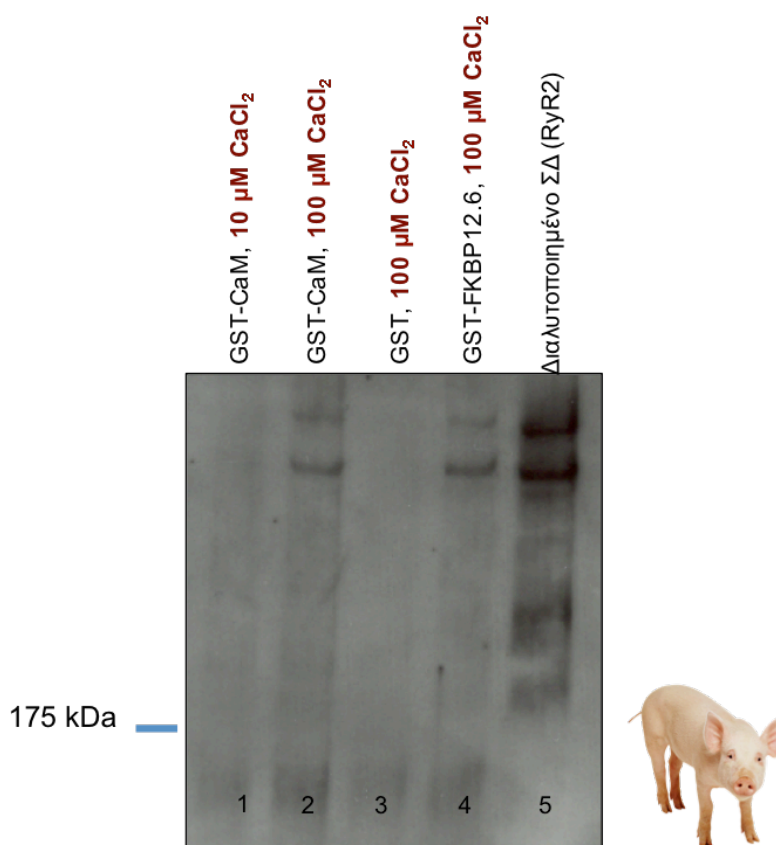


Σχήμα 3.11: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% με GST-CaM (A) και CaM (Δ), μετά από SDS-PAGE και χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue. Η διαδρομή που υποδεικνύεται με το γράμμα M αντιστοιχεί σε μάρτυρα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών. Αποτύπωμα κατά Western της πηκτής πολυακρυλαμιδίου A με το αντι-GST αντίσωμα (B) και το αντι-CaM αντίσωμα (Γ) καθώς και της πηκτής πολυακρυλαμιδίου Δ με το αντι-CaM αντίσωμα (E).

Οι καθαρισμένες πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ακολούθησε είτε η χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant-Blue είτε η μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF, όπου ακολούθησε αποτύπωση κατά Western με την χρήση αντι-GST αντισώματος (στην περίπτωση της GST-CaM) ή/και αντι-CaM αντισώματος (Σχήμα 3.11).

3.2.3 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την CaM αγρίου τύπου με μέθοδο συγκατακρήμνισης

Η μέθοδος της συγκατακρήμνισης, που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM, είναι η τύπου 1, όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Συγκεκριμένα, γίνεται η πρόσδεση της GST-CaM (1 μM) στα σφαιρίδια της γλουταθειόνης.

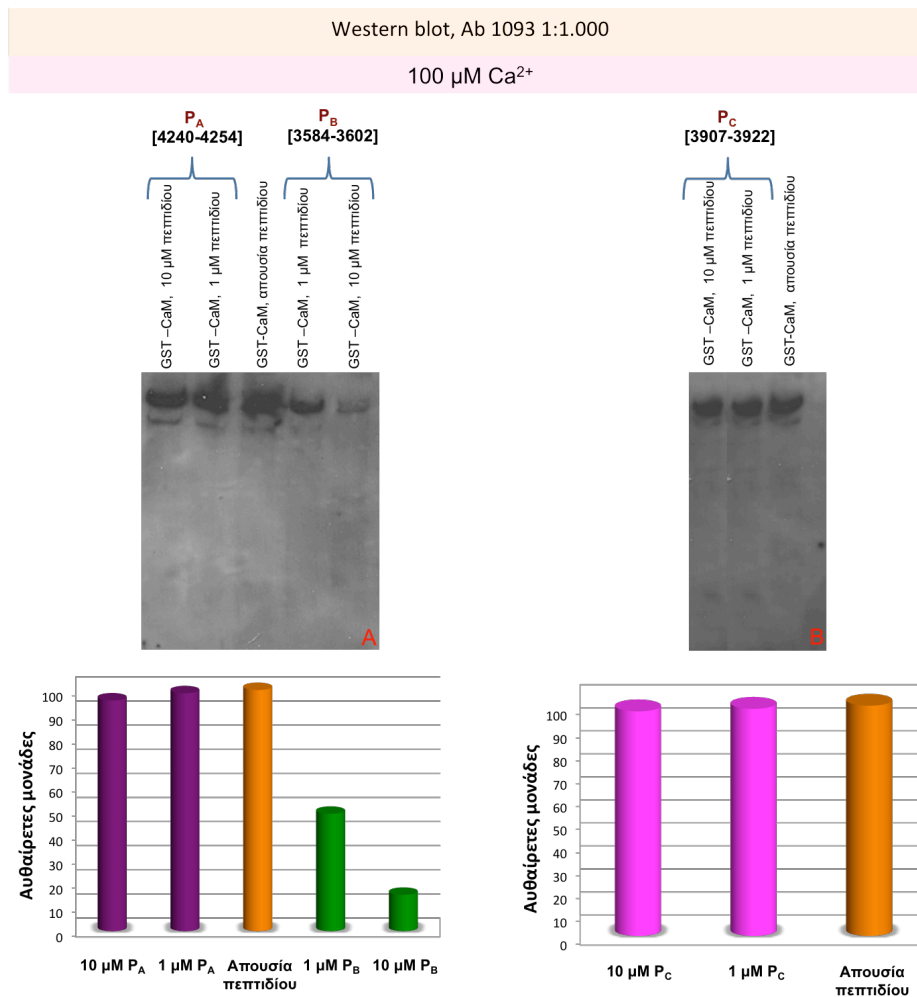


Σχήμα 3.12: Αποτύπωμα κατά Western του συγκατακρημνισμένου με την GST-CaM RyR2 με χρήση ειδικού αντι-RyR2 αντισώματος (Ab1093). Διαδρομή 1 και 2: συγκατακρήμνιση του RyR2 με την GST-CaM σε 10 και 100 μM CaCl₂. Διαδρομή 3: συγκατακρήμνιση του RyR2 με την GST σε 100 μM CaCl₂ (αρνητικός μάρτυρας, δεν παρατηρείται συγκατακρήμνιση). Διαδρομή 4: συγκατακρήμνιση του RyR2 με την GST-FKBP12.6 σε 100 μM CaCl₂ (θετικός μάρτυρας). Διαδρομή 5: διαλυτοποιημένο κλάσμα του ΣΔ (8 μL)

Στην συνέχεια, στο σύμπλεγμα σφαιριδίων/GST-CaM προστίθεται το διαλυτοποιημένο κλάσμα των βαρέων κυστιδίων-φορέων του ΣΔ (που περιέχει τον RyR2), παρουσία δύο συγκεντρώσεων CaCl_2 (10 και 100 μM). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 4% με 0,5% αγαρόζη και γίνεται η μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με ειδικό αντι-RyR2 αντίσωμα (Ab1093).

Η παρουσία χαρακτηριστικής ζώνης στο MB που αντιστοιχεί στο μονομερές του RyR2 (~545 kDa) στο αποτύπωμα κατά Western μαρτυρά την αλληλεπίδραση του RyR2 με την CaM. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε, αντί της GST-CaM, η GST-FKBP12.6 (πρωτεΐνη-ρυθμιστής του RyR2), ενώ ως αρνητικός μάρτυρας η πρωτεΐνη-συνοδός GST, σε συγκεντρώσεις 1 μM . Όπως προκύπτει και από το Σχήμα 3.12, η μέθοδος της συγκατακρήμνισης του RyR2 με την CaM έδωσε ευκρινή αποτελέσματα κυρίως στην συγκέντρωση των 100 μM CaCl_2 , συνθήκη που επιλέχθηκε να ακολουθηθεί και στα πειράματα που περιγράφονται στην συνέχεια.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η τυχόν επιρροή των συνθετικών πεπτιδίων P_A , P_B και P_C στην αλληλεπίδραση RyR2 και αγρίου τύπου CaM με την μέθοδο της συγκατακρήμνισης. Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο με την διαφορά ότι η συγκατακρήμνιση του RyR2 με την CaM έγινε παρουσία των συνθετικών πεπτιδίων σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (1 και 10 μM) και σε 100 μM CaCl_2 . Ακολούθησε με πικνομετρία η μέτρηση της έντασης της κάθε ζώνης του αποτυπώματος κατά Western. Βάσει των αποτελεσμάτων, φαίνεται ότι το P_B , και στις δύο συγκεντρώσεις παρεμποδίζει την συγκατακρήμνιση του RyR2 με την CaM με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, πιθανόν λόγω πρόσδεσής του στην CaM. Αντιθέτως, τα P_A και P_C φαίνεται να μην επηρεάζουν την αλληλεπίδραση RyR2 και αγρίου τύπου CaM στην μέθοδο της συγκατακρήμνισης (Σχήμα 3.13).



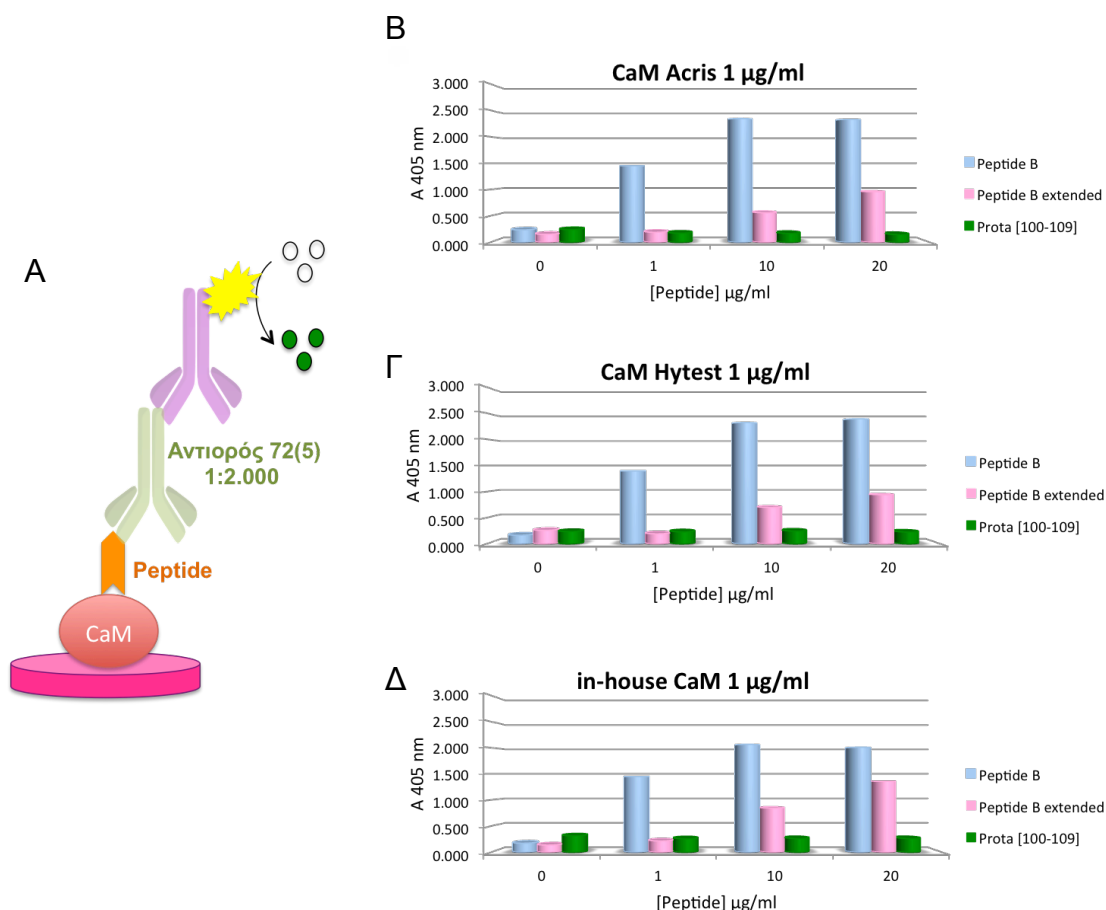
Σχήμα 3.13: Αποτύπωμα κατά Western του συγκατακρημισμένου με την GST-CaM RyR2, με χρήση του αντι-RyR2 αντισώματος Ab1093, παρουσία των P_A, P_B και P_C. Τα διαγράμματα της πυκνομετρίας, από αριστερά προς τα δεξιά, αντιστοιχούν στα αποτυπώματα κατά Western A και B, αντίστοιχα.

3.2.4 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM αγρίου τύπου με τροποποιημένη μέθοδο ELISA

Για την περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM, και συγκεκριμένα για τον εντοπισμό πιθανών περιοχών του RyR2 που δρουν ως περιοχές πρόσδεσης της αγρίου τύπου CaM, εκτός της κύριας περιοχής με αα 3583-3601 στην οποία αντιστοιχούν τα P_B και P_B extended, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της CaM με μία σειρά από συνθετικά πεπτιδία που αποτελούν τμήματα του RyR2 (P_A, P_C, P_D, P_E, P_F και P_G), με τροποποιημένη μέθοδο ELISA. Τα συνθετικά πεπτιδία P_B και P_B extended αποτελούν την κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Στο σύστημα της ELISA που

αναπτύξαμε αρχικά, μελετήθηκαν και τα τρία είδη CaM (Acris, Hytest και in-house CaM) με στόχο να περιοριστούμε τελικά στην χρήση της in-house CaM, την οποία μπορούμε να παρασκευάζουμε σε μεγάλες ποσότητες στο εργαστήριο και με μικρό σχετικά κόστος. Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν αρχικά ήταν τα P_B και $P_{B\ extended}$ διότι αποτελούν τους θετικούς μάρτυρες ως αποδεκτές περιοχές πρόσδεσης της CaM και επιπλέον έχουμε αναπτύξει αντισώματα, με ικανοποιητικό τίτλο, εναντίον αυτών (αντιορός 72N), στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Επίστρωση των φρεατίων με 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CaM (Acris, Hytest ή in-house).
Ακολουθούν εκπλύσεις.



Σχήμα 3.14: Παράσταση της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης των P_B , $P_{B\ extended}$ και Prota στο σύστημα ELISA, που παρουσιάζεται σχηματικά στο **A**. Η επίστρωση των πλακιδίων έγινε με CaM Acris (**B**), CaM Hytest (**Γ**) και εργαστηριακά παρασκευασμένης CaM (**Δ**). Χρησιμοποιήθηκε ο αντιορός 72(5).

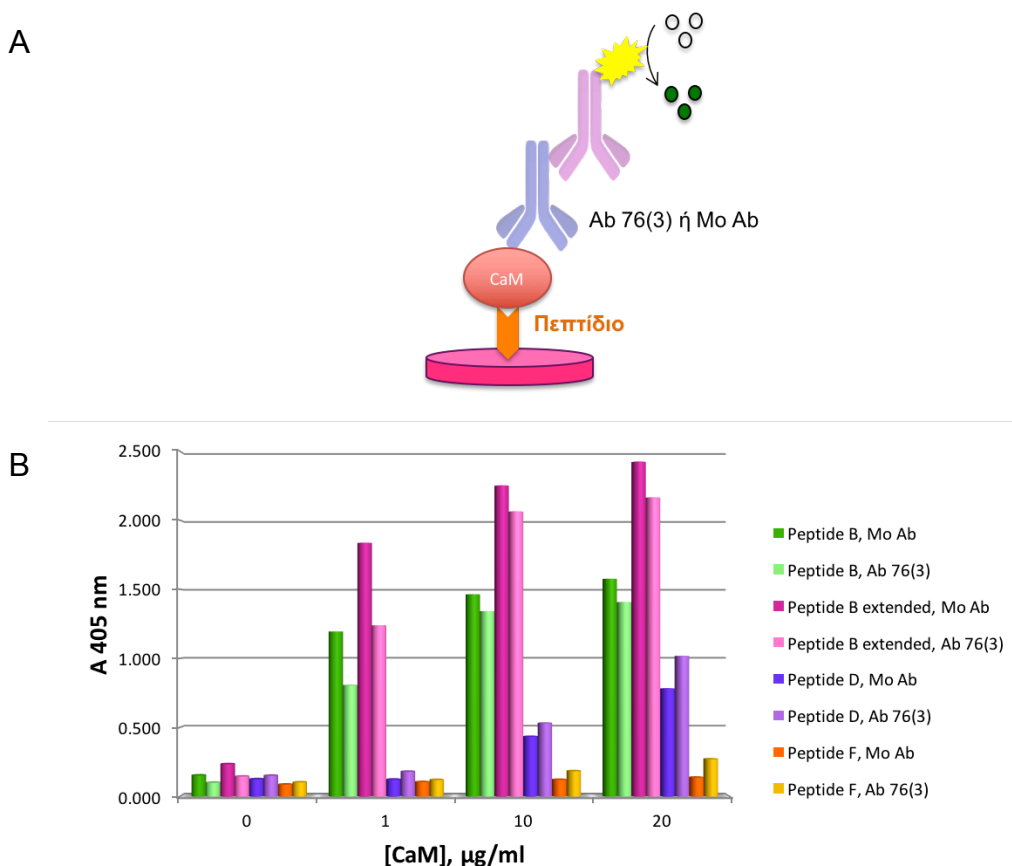
2. Τρίωρη επώαση με τα πεπτίδια P_B και $P_{B \text{ extended}}$ σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 20 $\mu\text{g/ml}$. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο που αποτελεί τμήμα της πρωτεΐνης προθυμοσίνης με αα 100-109 (Proto [100-109]). Ακολουθούν εκπλύσεις.
3. Δίωρη επώαση με τον αντιορό 72(5) σε αραίωση 1:2.000 στα φρεάτια επώασης με τα P_B και $P_{B \text{ extended}}$ ή με το αντίσωμα έναντι του πεπτιδίου Proto σε αραίωση 1:2.000 στα φρεάτια επώασης με το Proto [100-109]. Ακολουθούν εκπλύσεις.
4. Δίωρη επώαση με επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit IgG/HRP) σε αραίωση 1:1.000. Ακολουθούν εκπλύσεις.
5. Προσθήκη προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.14, τα P_B και $P_{B \text{ extended}}$ αλληλεπιδρούν επιτυχώς και με τα 3 είδη CaM, σε αντίθεση με τον αρνητικό μάρτυρα Proto [100-109] που δεν αλληλεπιδρά. Το P_B οδηγεί σε υψηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης από ό,τι το $P_{B \text{ extended}}$ στο συγκεκριμένο σύστημα ELISA, πιθανόν λόγω του ό,τι ο αντιορός 72(5) αναγνωρίζει ισχυρότερα το πεπτίδιο P_B από ότι το $P_{B \text{ extended}}$. Λόγω των παρόμοιων αποτελεσμάτων και του χαμηλότερου κόστους, η in-house CaM επιλέχθηκε ως η λειτουργική αγρίου τύπου πρωτεΐνη για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM στα πειράματα τύπου ELISA, που ακολούθησαν.

Στην συνέχεια, αναπτύχθηκε το αντίστροφο σύστημα ELISA, όπου αρχικά επιστρώνονται τα συνθετικά πεπτίδια P_A , P_B , $P_{B \text{ extended}}$, P_C , P_D , P_E , P_F και P_G σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/mL}$. Στην συνέχεια, ακολουθεί 3ωρη επώαση με την in-house CaM σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 10 και 20 $\mu\text{g/ml}$) και 2ωρη επώαση με τον αντιορό 76(3) ή το μονοκλωνικό αντι-CaM Ab (αραίωση 1:1.000) (Σχήμα 3.15A). Το πλεονέκτημα του αντίστροφου συστήματος ELISA έναντι του κανονικού είναι ότι δεν απαιτείται η χρήση αντισωμάτων έναντι όλων των συνθετικών πεπτιδίων του hRyR2. Αρκεί ένα πρώτο αντίσωμα (αυτό έναντι της CaM) για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μίας σειράς πεπτιδίων του RyR2 με την CaM. Στο σύστημα αυτό, επίσης αξιοποιούνται

πλήρως τα καλύτερα, από πλευράς τίτλου, πολυκλωνικά αντισώματα που αναπτύξαμε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, δηλ. τα πολυκλωνικά αντι-CaM αντισώματα (αντιοροί 75N, εναντίον των συνθετικών πεπτιδίων P₁ και P₂).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.15B, καλύτερη αλληλεπίδραση με την CaM, στο “αντίστροφο” σύστημα ELISA με χρήση του αντιορού 76(3) ως πρώτου αντισώματος, εμφανίζει το P_{B extended}. Μικρότερη αλληλεπίδραση παρουσιάζει το P_B, ενώ το P_D φαίνεται επίσης να αλληλεπιδρά με την CaM, ιδίως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε (20 µg/mL). Τα πεπτίδια P_A, P_C και P_F δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την CaM στο συγκεκριμένο σύστημα ELISA (Σχήμα 3.15B), ενώ επίσης δεν αλληλεπιδρούν τα πεπτίδια P_E και P_G (αποτέσματα που δεν παρουσιάζονται).



Σχήμα 3.15: Παράσταση της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης της CaM στο σύστημα ELISA, που παρουσιάζεται σχηματικά στο A (B). Η επίστρωση των πλακιδίων έγινε με το αντίστοιχο συνθετικό πεπτίδιο (P_B, P_{B extended}, P_D και P_F). Χρησιμοποιήθηκε ο αντιορός 76(3) ή το εμπορικά διαθέσιμο μονοκλωνικό αντι-CaM αντίσωμα.

Συνοψίζοντας, αναπτύχθηκε μεθοδολογία τύπου ELISA για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μίας σειράς συνθετικών πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα του RyR2, με την CaM αγρίου τύπου. Στη μεθοδολογία αυτή, αξιοποιήθηκε μία σειρά τόσο αντισωμάτων (72N και 76N) όσο και πεπτιδίων ή πρωτεϊνών (συνθετικά πεπτίδια και CaM) που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο και αποτελούν ειδικά εργαλεία για την μελέτη της αλληλεπίδρασης RyR2-CaM σε διάφορες βιοχημικές και φυσικοχημικές τεχνικές. Βάσει των αποτελεσμάτων της μεθοδολογίας τύπου ELISA, η CaM αλληλεπιδρά με τα P_B και $P_{B\text{ extended}}$, εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία, αλλά και με το P_D , που αντιστοιχεί σε μία υπό μελέτη περιοχή πρόσδεσης της CaM στο μόριο του RyR2.

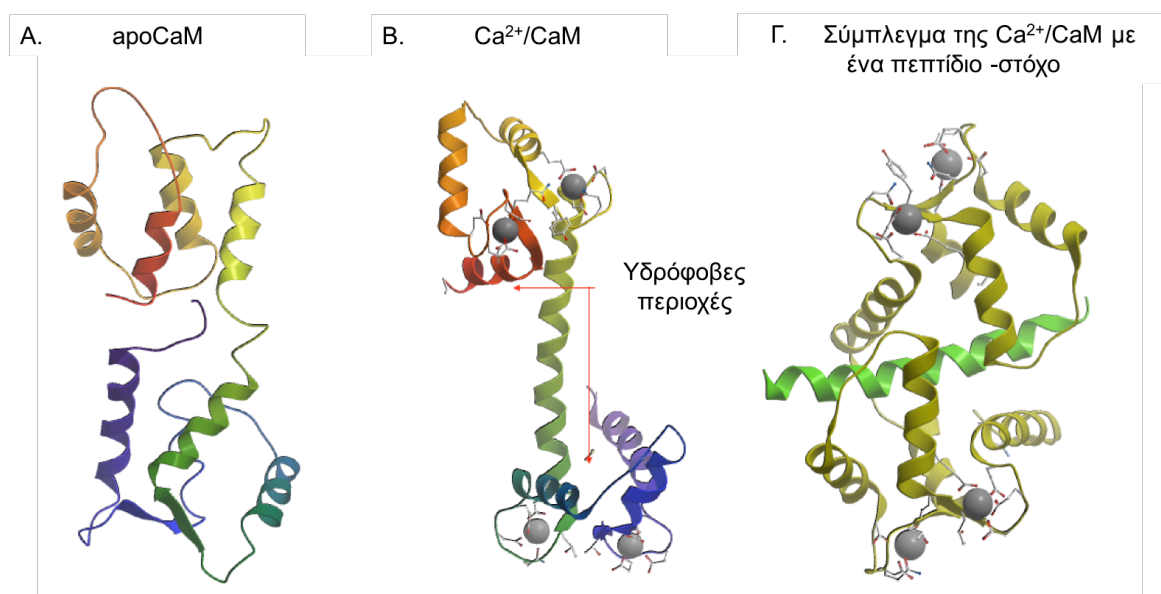
3.2.5 Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM αγρίου τύπου με μέθοδο ITC

Για την καλύτερη μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη τεχνική ITC η οποία περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η μέθοδος ITC αποτελεί την κατ' εξοχήν μέθοδο για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικρών μορίων-προσδετών (όπως π.χ. συνθετικά πεπτίδια) και κατάλληλων υποδοχέων τους (συνήθως πρωτεΐνες), καθώς από μία μέτρηση παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την σταθερά διάστασης (K_d), την στοιχειομετρία (N) και την ενθαλπία (ΔH) της αντίδρασης. Από τις θερμοδυναμικές αυτές παραμέτρους υπολογίζονται οι μεταβολές στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG) και την εντροπία του συστήματος (ΔS), ενώ παράλληλα συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με τη φύση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα (υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου ή/και γέφυρες άλατος).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στο υποκεφάλαιο 1.6.2, η CaM φέρει δύο διαμορφώσεις ανάλογα με το αν είναι προσδεμένη (Ca^{2+}/CaM) ή όχι (apoCaM) με ασβέστιο. Βάσει της δομής της apoCaM με ακτίνες X και NMR μελέτες, η πρόσδεση του Ca^{2+} στην apoCaM οδηγεί σε εκτεταμένες δομικές ανακατατάξεις του μορίου της CaM, που έχουν ως αποτέλεσμα την έκθεση

δύο υδρόφοβων περιοχών πλούσιων σε μεθειονίνες, κοντά στις θέσεις πρόσδεσης του Ca^{2+} (Σχήμα 3.16A και B). Οι υδρόφοβες αυτές περιοχές επιτρέπουν στην $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ να αλληλεπιδρά με πλήθος ενδοκυτταρικών ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται σε μία ποικιλία διαφορετικών βιοχημικών διεργασιών.

Μία συγκριτική ανάλυση γνωστών κρυσταλλικών δομών της CaM με πεπτιδία που αποτελούν τμήματα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την CaM, αποκαλύπτει ότι οι αμινοξικές ακολουθίες που αναγνωρίζουν την CaM, έχουν συνήθως μήκος 15-30 αμινοξέα, σχηματίζουν αμφιπαθείς α -έλικες, περιέχουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα που διασπείρονται ανάμεσα σε υδροφοβικά αμινοξέα και τέλος έχουν καθαρό θετικό φορτίο και μέτρια υδροφιλικότητα. Η πρόσδεση των πεπτιδίων-στόχων στην διαμόρφωση της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, διευκολύνεται από μία ευέλικτη κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία επιτρέπει στο μόριο, μέσω των υδροφοβικών της περιοχών, να «αγκαλιάζει» το πεπτιδίδιο σχηματίζοντας ένα σφαιρικό σταθερό σύμπλεγμα (Σχήμα 3.16Γ).



Σχήμα 3.16: Κρυσταλλική δομή της apoCaM (A), της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (B) και του συμπλέγματος της $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ με ένα πεπτιδίδιο-στόχο (Γ).

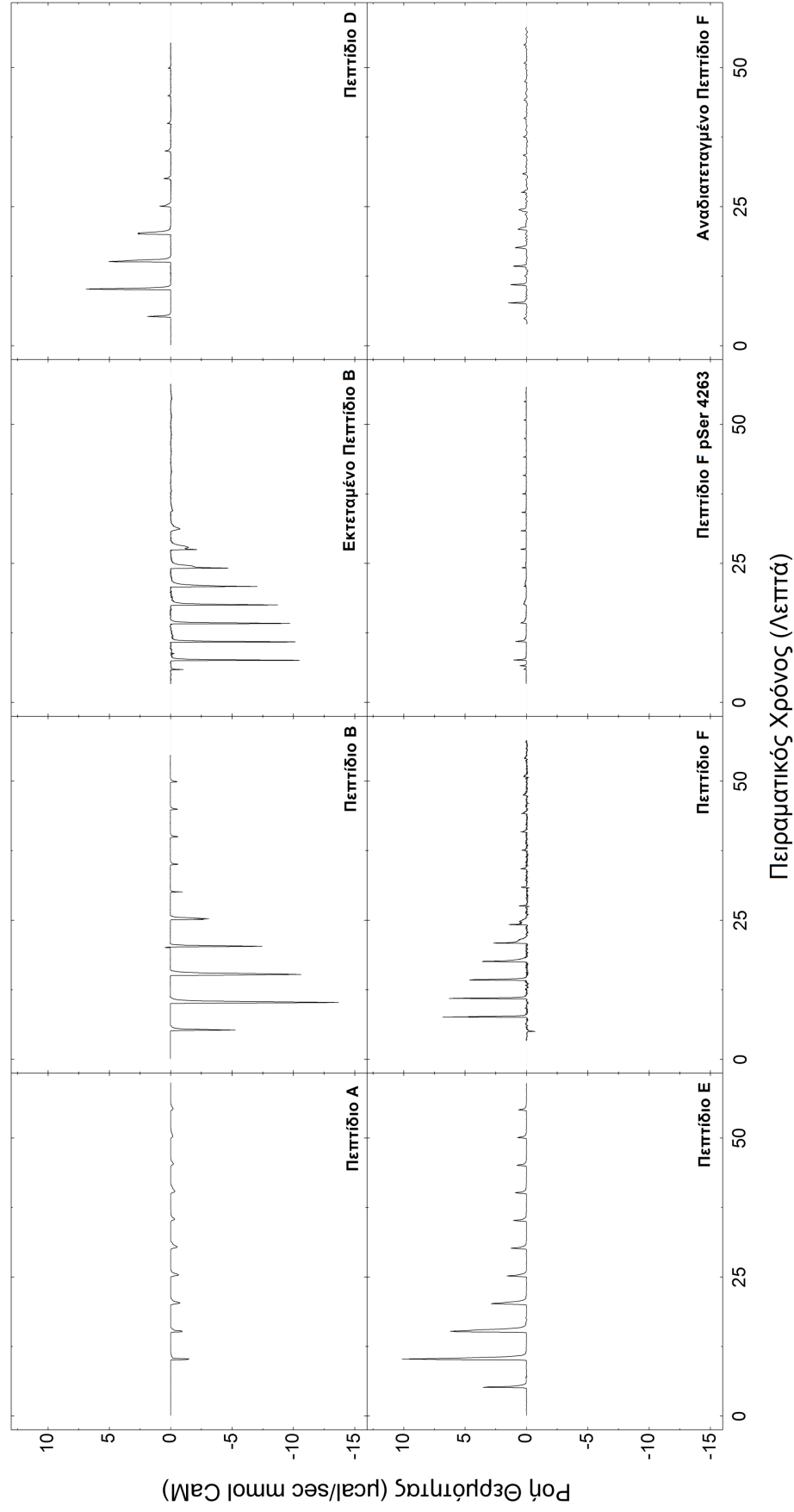
Το γεγονός ότι πολλά διαφορετικά πεπτιδία-στόχοι, που φέρουν πολύ μικρό ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους, είναι ικανά να σχηματίσουν σύμπλοκα υψηλής συγγένειας με την CaM, υποδεικνύει ότι οι υδροφοβικές

αλληλεπιδράσεις παίζουν τον κύριο ρόλο στην αλληλεπίδραση αυτή. Τυπικές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις απομονώνουν μη πολικές ομάδες από τον διαλύτη και μειώνουν την οργάνωση της υδατικής στοιβάδας της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε θερμοδυναμικά σταθερά συμπλέγματα που χαρακτηρίζονται από αύξηση της εντροπίας. Ενθαλπικά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις, όπως γέφυρες άλατος και δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα σε όξινα αμινοξέα της CaM και βασικά αμινοξέα των πεπτιδίων-στόχων μπορούν επίσης να παίξουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου.

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση συνθετικών πεπτιδίων του RyR2, και συγκεκριμένα των P_A (πεπτίδιο A), P_B (πεπτίδιο B), P_{B extended} (εκτεταμένο πεπτίδιο B), P_D (πεπτίδιο D), P_E (πεπτίδιο E), P_F (πεπτίδιο F), pSer₄₂₆₃P_F (πεπτίδιο F pSer4263) και P_{F scrambled} (αναδιατεταγμένο πεπτίδιο F), με την αγρίου τύπου CaM με την μέθοδο ITC. Το pSer₄₂₆₃P_F, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην θέση 4263 φέρει μία φωσφορυλιωμένη Ser αντί για Ser και συντέθηκε τόσο για την μελέτη της επίδρασης του φορτίου στην αλληλεπίδραση αυτή, καθώς διατηρείται ακέραια η πρωτοταγής δομή του πεπτιδίου ενώ μειώνεται το θετικό φορτίο, όσο και κατά πόσο εμπλέκονται μηχανισμοί φωσφορυλίωσης στην αναγνώριση των πεπτιδίων-στόχων. Επιπλέον, το P_{F scrambled}, που αποτελείται από τα ίδια ακριβώς αμινοξέα σε σχέση με το P_F τοποθετημένα με διαφορετική σειρά, χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί κατά πόσο τυχόν αλληλεπίδραση με την CaM είναι ειδική ως προς την αμινοξική αλληλουχία.

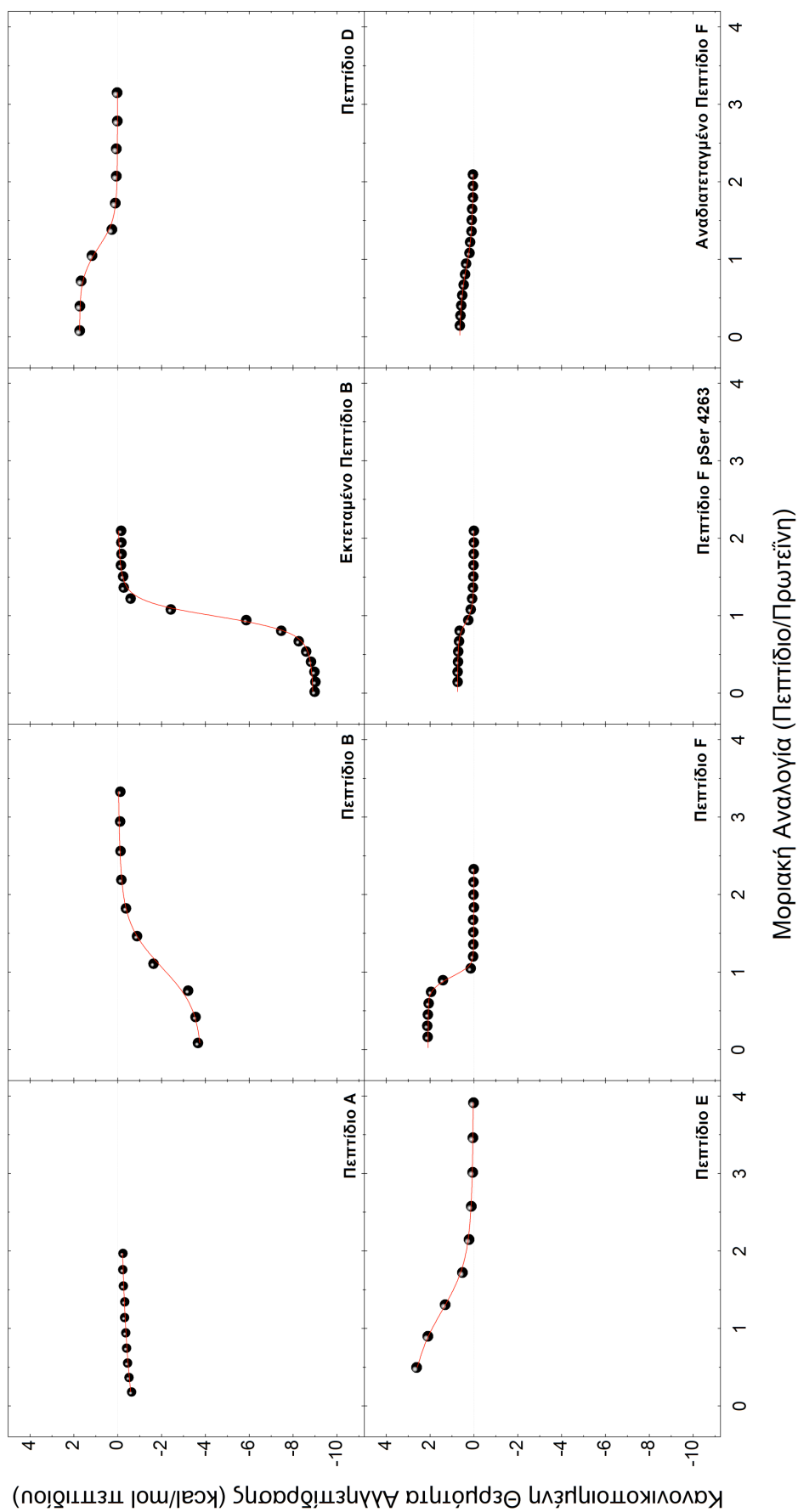
Στο Σχήμα 3.17 παρουσιάζονται συνοπτικά τα θερμικά ίχνη αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR με την αγρίου τύπου CaM υπό ίδια θερμοκρασία (25°C) και ίδια σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 10 mM CaCl₂). Κάθε θερμικό ίχνος αποτυπώνει την ισχύ που παρέχεται ή απορροφάται από το πειραματικό κελί, έτσι ώστε η θερμοκρασία του να παραμένει σταθερή καθ'όλη την διάρκεια της μέτρησης, συναρτήσει του χρόνου. Οι ροές αυτές της θερμότητας είναι κανονικοποιημένες ως προς την συγκέντρωση της CaM, που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα, έτσι ώστε να επιτρέπεται η απευθείας σύγκριση των πειραματικών δεδομένων. Βάσει των δεδομένων αυτών είναι

Αλληλεπιδράσεις Καλμοδουλίνης - Πεπτιδίων Παρουσία Ασβεστίου



Σχήμα 3.17: Κορυφές τιλοδότησης ITC, κανονικοποιημένες ως προς την συγκέντρωση πρωτεΐνης, για την αλληλεπίδραση των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM.

Αλληλεπιδράσεις Καλμοδουλίνης - Πεπτιδίων Παρουσία Ασβεστίου



Σχήμα 3.18: Θερμότητες αλληλεπιδράσεως κανονικοποιημένες ως προς την συγκέντρωση πεπτιδίου (●) και καμπύλες προσαρμογής των δεδομένων αυτών σε θερμοδυναμικό μοντέλο σύνδεσης μίας θέσης (—).

φανερό ότι οι αλληλεπιδράσεις της CaM με τα συνθετικά πεπτίδια P_B , $P_{B \text{ extended}}$, P_D , P_E και P_F παράγουν πολύ μεγαλύτερα θερμικά σήματα σε σχέση με τις αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις των P_A , $P_{F \text{ scrambled}}$ και $pSer_{4263}P_F$.

Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα P_B και $P_{B \text{ extended}}$ παράγουν αρνητικά θερμικά ίχνη (εξώθερμες αλληλεπιδράσεις), ενώ όλα τα υπόλοιπα πεπτίδια παράγουν θετικά θερμικά ίχνη (ενδόθερμες αλληλεπιδράσεις), γεγονός που υποδηλώνει διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με την CaM.

Η ολοκλήρωση των κορυφών κάθε τιτλοδότησης ως προς τον χρόνο, αποφέρει την θερμότητα που απορροφάται ή εκλύεται κατά την αλληλεπίδραση των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM, και στην συνέχεια κανονικοποιείται ως προς την συγκέντρωση του διαλύματος των συνθετικών πεπτιδίων που προστέθηκε. Καθώς το πείραμα πραγματοποιείται υπό σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, η θερμότητα αυτή ισοδυναμεί με την ολική μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH) κατά την αλληλεπίδραση. Από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της καμπύλης και με την προσαρμογή σε ένα κατάλληλο θερμοδυναμικό μοντέλο μπορούμε να αποκτήσουμε το ενεργειακό αποτύπωμα κάθε αλληλεπίδρασης. Το Σχήμα 3.18 απεικονίζει τις κανονικοποιημένες θερμότητες αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM, προσαρμοσμένες σε ένα απλό μοντέλο σύνδεσης της μορφής $A+B \rightleftharpoons AB$ και οι θερμοδυναμικές παράμετροι συνοψίζονται στον Πίνακα 3.5.

Αρχικά όλα τα πεπτίδια του RyR2 που μελετήθηκαν εμφανίζουν στοιχειομετρία αλληλεπίδρασης με την CaM 1:1. Μικρότερη σταθερά διάστασης (και επομένως μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης) εμφανίζουν τα $P_{B \text{ extended}}$ και P_F ($K_d = 0,56$ και $0,10 \mu M$, αντίστοιχα). Εκτός από το P_A , όλα τα άλλα πεπτίδια εμφανίζουν μετρήσιμη αλληλεπίδραση με την CaM, με το P_F και $P_{B \text{ extended}}$ να έχουν την ισχυρότερη. Για τα P_B (3584-3602) και $P_{B \text{ extended}}$ (3581-3607) αναμένεται ισχυρή αλληλεπίδραση με την CaM καθώς ανήκουν στην μέχρι στιγμής κοινώς αποδεκτή κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Τα P_F (4255-4271) και P_E (4265-4277), καθώς και το P_D (4255-4277), που περιέχει τα P_F και P_E , αποτελούν τις υπό εξέταση πιθανές δευτερεύουσες περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Και τα τρία αυτά πεπτίδια αλληλεπιδρούν με την CaM σε πειράματα ITC και ειδικά το P_F

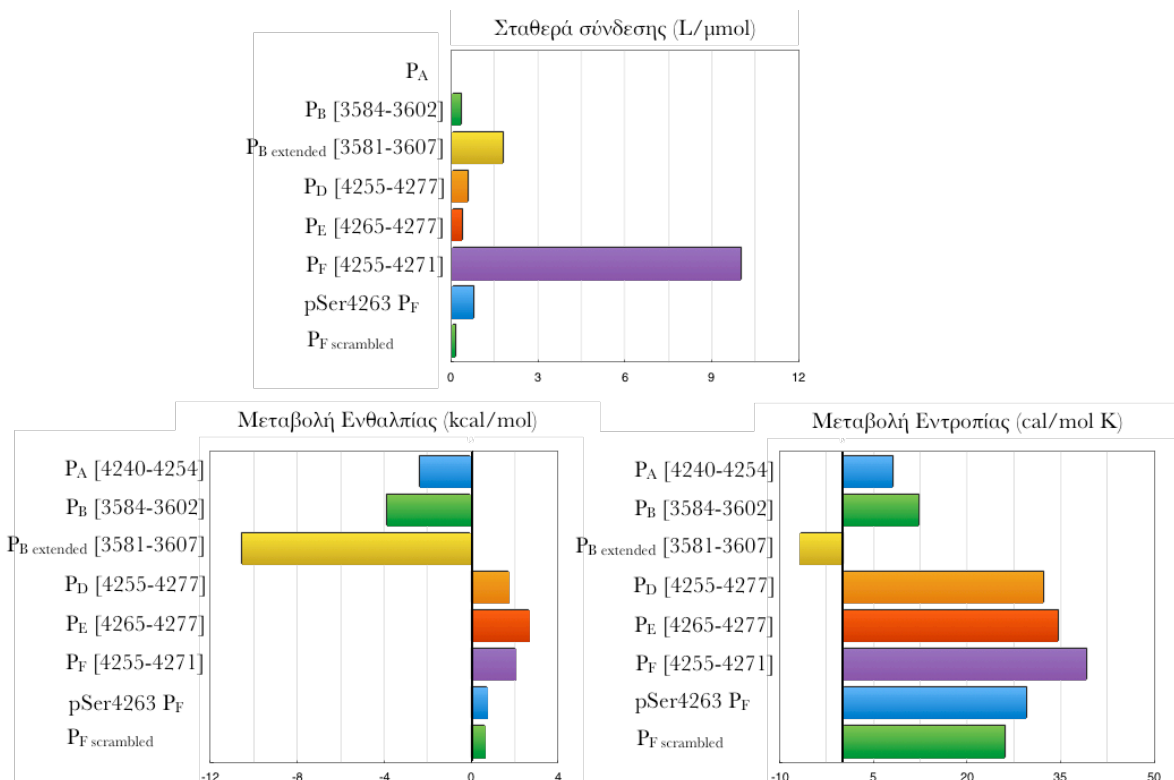
αλληλεπιδρά ~ 6 φορές ισχυρότερα με την CaM από ότι το P_B extended, υποδηλώνοντας πιθανό βιολογικό ρόλο της περιοχής αυτής ως δεύτερη περιοχή πρόσδεσης της CaM.

Όπως προκύπτει από την θερμική ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της CaM με τα συνθετικά πεπτιδία του RyR2, οι αλληλεπιδράσεις των P_B και P_B extended με την CaM είναι εξώθερμες, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις των P_F και P_D που είναι ενδόθερμες. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει έναν διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης για τις δύο αυτές ευρύτερες περιοχές του RyR2 (αα 3581-3607 και 4255-4277), καθώς εξώθερμες αντιδράσεις συνδέονται με τη δημιουργία πολλαπλών δεσμών μεταξύ πρωτεΐνης και πεπτιδίου (περίπτωση πεπτιδίων P_B και P_B extended, που ανήκουν στην ευρύτερη περιοχή 3581-3607), ενώ ενδόθερμες αντιδράσεις σχετίζονται με την απόκρυψη υδρόφιλων επιφανειών από τον διαλύτη χωρίς την δημιουργία δεσμών υδρογόνου ή γέφυρες άλατος (περίπτωση πεπτιδίων P_F και P_D , που ανήκουν στην ευρύτερη περιοχή 4255-4277). Αποτελεί επίσης ενδιαφέρον ότι η αλληλεπίδραση του P_B extended με την CaM εμφανίζει αρνητική μεταβολή εντροπίας ($\Delta S < 0$, Σχήμα 3.19), γεγονός που υποδηλώνει την ανάπτυξη ισχυρών δεσμών με την πρωτεΐνη και την απώλεια βαθμών ελευθερίας (δονητικών και περιστροφικών) του πεπτιδίου κατά την πρόσδεση. Το P_D , που αποτελεί μία εκτεταμένη περιοχή του P_F και σε πειράματα ELISA φαίνεται να αλληλεπιδρά με την CaM, εμφανίζει ασθενέστερη αλληλεπίδραση με την CaM από ότι το P_F σε πειράματα ITC και αυτό πιθανόν λόγω του ότι το P_D έχει ισχυρότερο καθαρό φορτίο από το P_F (+8 αντι για +6) καθώς είναι και πιο υδρόφιλο, γεγονός που αυξάνει το ενεργειακό κόστος της απομάκρυνσης της στοιβάδας διαλύτωσης του πεπτιδίου κατά την πρόσδεσή του με την CaM.

Εφόσον από τα υπό εξέταση συνθετικά πεπτιδία του RyR2 ως πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM (P_A , P_D , P_E , και P_F), ισχυρότερη αλληλεπίδραση με την CaM εμφανίζει το P_F σε πειράματα ITC, έλαβε χώρα περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτής. Συγκεκριμένα, για να μελετήσουμε κατά πόσο το φορτίο ή η αμινοξική αλληλουχία παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση P_F -CaM, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του $pSer_{4263}P_F$ (η παρουσία της φωσφορικής ομάδας υποβαθμίζει το θετικό φορτίο του P_F) και

Πίνακας 3.5: Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του Ryr2 με την CaM αγρίου τύπου όπως προκύπτουν από την προσαρμογή με ελαχιστοποίηση τετραγώνων των πειραματικών δεδομένων στο θερμοδυναμικό μοντέλο μίας θέσης σύνδεσης.

	Binding Constant (K_b) M^{-1}	Error ($\pm 2K_b$) M^{-1}	Disociation Constant (K_d) μM	Error ($\pm 2K_d$) μM	Free Energy Change (ΔG) kcal/mol	Error ($\pm \Delta G$) kcal/mol	Binding Enthalpy (ΔH) kcal/mol	Error ($\pm \Delta H$) kcal/mol	Entropy Change (ΔS) cal/mol K	Error ($\pm \Delta S$) kcal/mol K	Stoichiometry (N) Guest/Host	Error ($\pm N$) Guest/Host
Πεπτίδιο A	2920	87	342.47	10.20	-4.73	0.02	-2.35	0.01	7.97	0.07	0.86	0.01
Πεπτίδιο B	343000	27630	2.92	0.23	-7.55	0.05	-3.89	0.08	12.28	0.31	0.86	0.01
Εκτεταμένο Πεπτίδιο B	1770000	116000	0.56	0.04	-8.52	0.04	-10.56	0.14	-6.83	0.49	0.94	0.01
Πεπτίδιο D	565000	95200	1.77	0.30	-7.85	0.10	1.76	0.02	32.22	0.34	0.99	0.01
Πεπτίδιο E	369000	20300	2.71	0.15	-7.59	0.03	2.69	0.02	34.50	0.13	0.87	0.01
Πεπτίδιο F	9990000	802000	0.10	0.01	-9.55	0.05	2.09	0.02	39.04	0.17	0.86	0.01
Πεπτίδιο F ββα14263	778000	52300	1.29	0.09	-8.04	0.04	0.75	0.03	29.47	0.17	0.84	0.01
Ανοδοτεταγμένο Πεπτίδιο F	154000	2000	6.49	0.08	-7.08	0.01	0.69	0.01	26.05	0.04	0.91	0.01



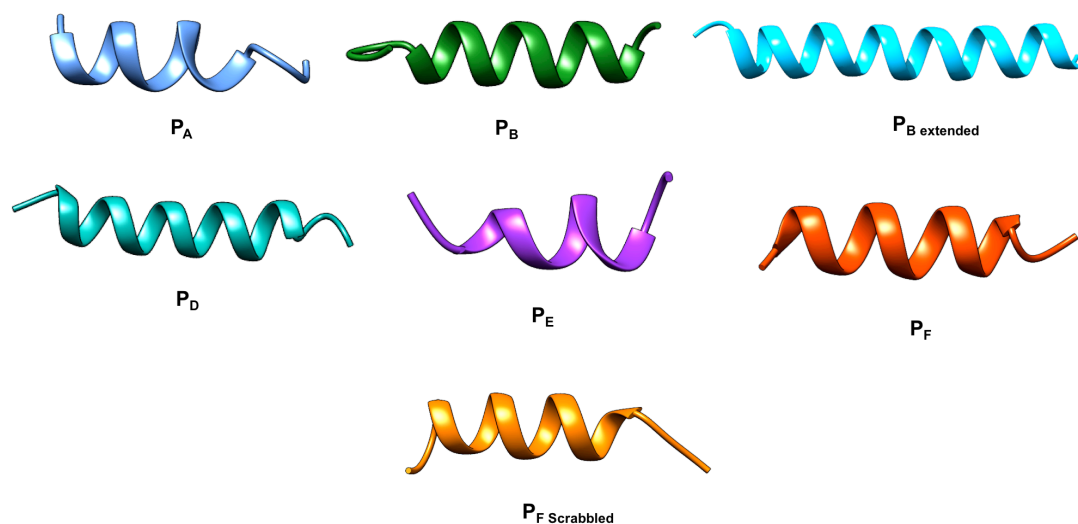
Σχήμα 3.19: Ραβδογράμματα σύγκρισης των θερμοδυναμικών παραμέτρων αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM

του P_F scrambled (πεπτιδίον αποτελούμενο από τον ίδιο αριθμό καθώς και από τα ίδια αμινοξέα με το P_F τοποθετημένα με διαφορετική σειρά) με την CaM.

Βάσει των τιμών της σταθεράς σύνδεσης το $pSer_{4263}P_F$ αλληλεπιδρά ασθενέστερα (~13 φορές λιγότερο) από το P_F ενώ το P_F scrambled αλληλεπιδρά ~ 65 φορές λιγότερο από το P_F . Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αμινοξική αλληλουχία και το θετικό φορτίο του P_F αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την ισχυρή και εξειδικευμένη αλληλεπίδραση του πεπτιδίου αυτού με την CaM.

Τέλος, για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ITC σχετικά με την αλληλεπίδραση των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 με την CaM μελετήθηκε κατά πόσο τα συνθετικά αυτά πεπτιδία πληρούν τα γενικά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων που αλληλεπιδρούν με την CaM, όπως αυτά αναφέρονται αυτά στην αρχή της παρούσας υποενότητας. Συγκεκριμένα, έγινε πρόβλεψη της δομής των πεπτιδίων *de novo* με την βοήθεια της μεθόδου SA-HMM (Hidden Markov Model Structural Alphabet), βάσει της οποίας προβλέπεται η τρισδιάστατη δομή ενός πεπτιδίου από την μονοδιάστατη αμινοξική αλληλουχία του. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.20, όλα τα συνθετικά

πεπτιδία φαίνεται να έχουν μορφή α-έλικας. Επιπλέον, βάσει της ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής των συνθετικών πεπτιδίων με την βοήθεια του προγράμματος InnoVagen, όλα τα συνθετικά πεπτιδία έχουν υψηλό θετικό καθαρό φορτίο και μέτρια υδροφιλικότητα καθώς και εναλλαγές μεταξύ θετικά φορτισμένων και υδροφοβικών αμινοξέων.



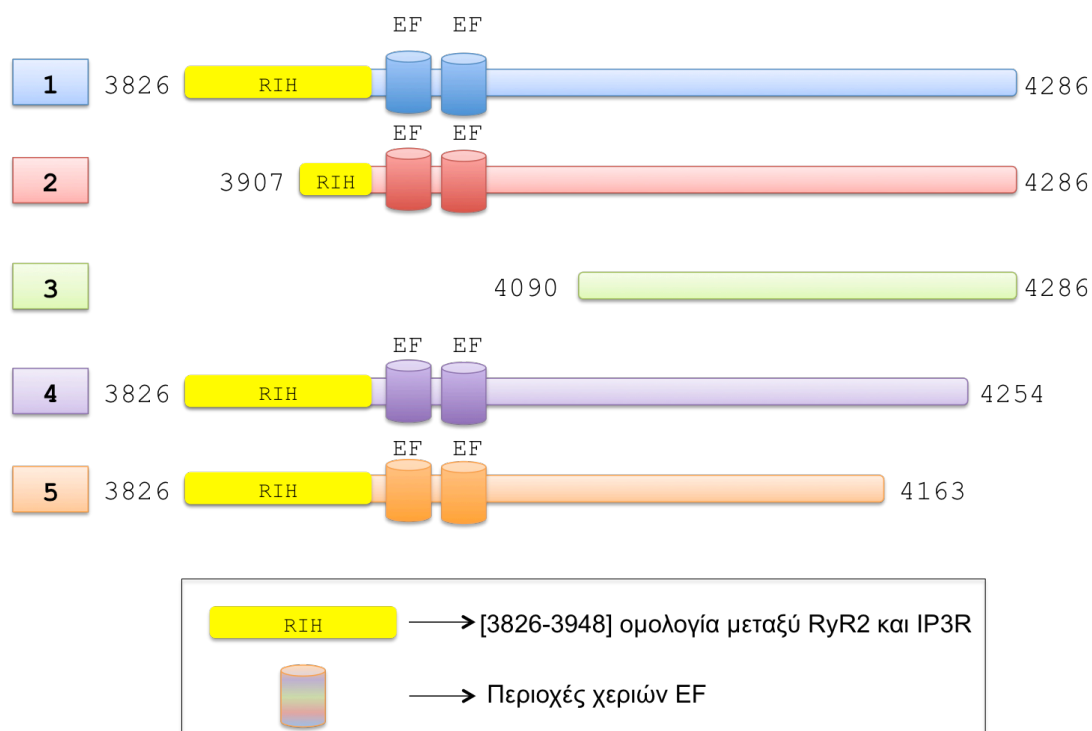
Σχήμα 3.20: Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των συνθετικών πεπτιδίων του RyR2 βάσει του προγράμματος SA-HMM.

3.2.6 Προσέγγιση της παραγωγής πρωτεϊνικών τμημάτων της C-τελικής περιοχής του RyR2 με μεθόδους μοριακής βιολογίας

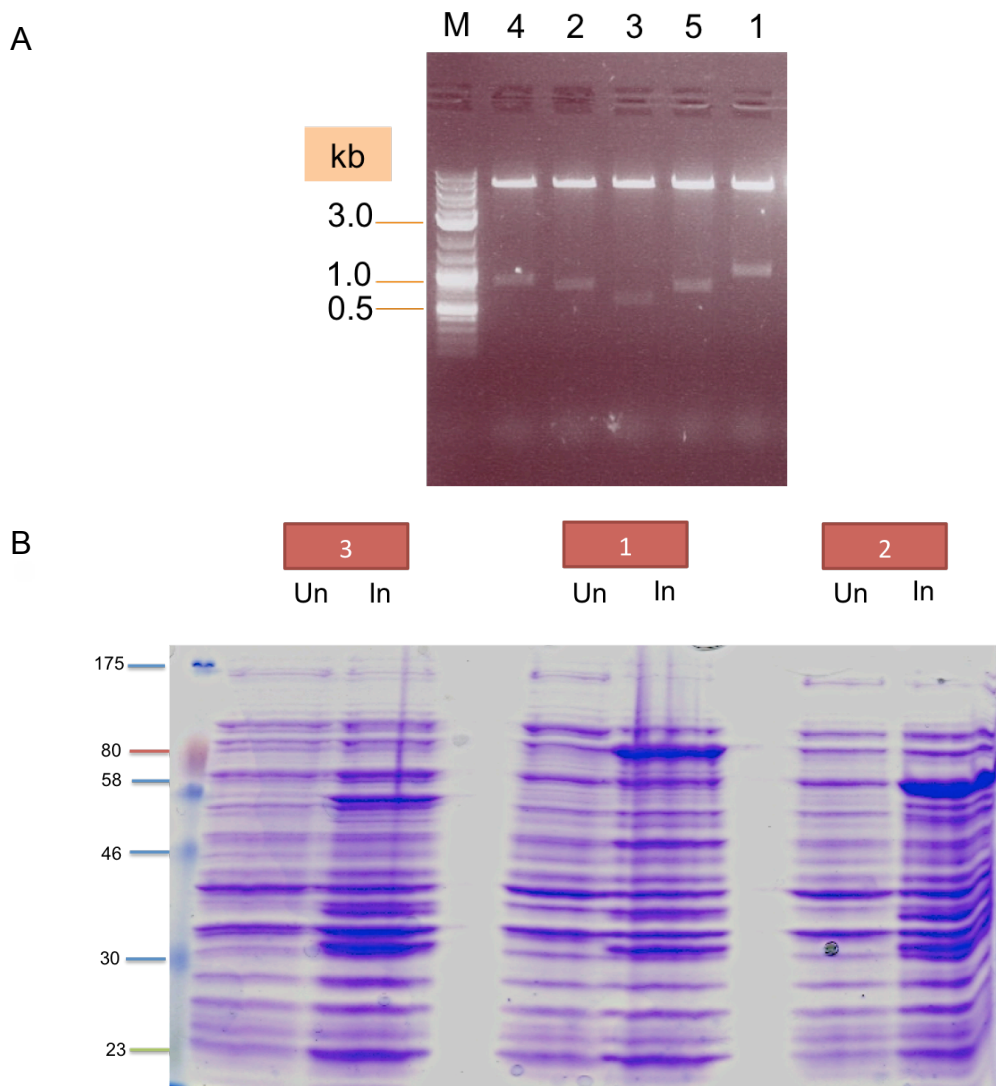
Στο σημείο αυτό, θα γίνει αναφορά στην προσπάθεια έκφρασης πρωτεϊνικών τμημάτων του C-τελικού άκρου του RyR2 με μεθόδους μοριακής βιολογίας, η οποία έγινε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Οι λόγοι που επιχειρήσαμε την προσέγγιση αυτή είναι πολλοί. Αρχικά, δίνεται η δυνατότητα παραγωγής πολύ μεγαλύτερων πεπτιδικών τμημάτων, ξεπερνώντας τον περιορισμό της σύνθεσης μικρού σχετικά μήκους πεπτιδίων με την μέθοδο της SPPS (συνήθως μέχρι 30-40 αμινοξέα), αφού η απόδοση μειώνεται σημαντικά, τις περισσότερες φορές, κατά τη σύνθεση πεπτιδίων μεγαλύτερου μήκους. Επιπλέον, με την βοήθεια των συνοδών-πρωτεϊνών, τα υπό έκφραση πρωτεϊνικά τμήματα αναδιπλώνονται στον χώρο και αποκτούν τριτοταγή δομή προσεγγίζοντας με αυτό τον τρόπο την δομή των τμημάτων αυτών όπως είναι σε ολόκληρο το μόριο του RyR2. Τα παραπάνω πρωτεϊνικά τμήματα του RyR2 θα μπορούσαν, στη συνέχεια, να χρησιμοποιηθούν στις μεθόδους που

ήδη έχουμε αναπτύξει για τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτίδια με στόχο την περαιτέρω αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης CaM-RyR2.

Στο Σχήμα 3.21 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των πρωτεϊνικών τμημάτων των οποίων έγινε προσπάθεια παραγωγής παρουσία των συνοδών-πρωτεϊνών Trx και NusA. Στόχος ήταν η μελέτη ενός μεγάλου πρωτεϊνικού τμήματος με αα 3826-4286 (περιοχή 1) καθώς και μικρότερων τμημάτων της αλληλουχίας αυτής. Η επιλογή αυτού του τμήματος είχε αρχικά ως στόχο το τμήμα να περιέχει τα συνθετικά πεπτίδια P_A, P_C και P_D. Επιπλέον, η επιλογή βασίστηκε και σε μελέτες από την βιβλιογραφία, σχετικά με πιθανές περιοχές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση CaM-RyR2 (αα 4261-4286) [124] καθώς και σε μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν στο πανεπιστήμιο του Cardiff. Τέλος, το συγκεκριμένο πεπτιδικό τμήμα περιέχει σημαντικές δομικές περιοχές που μπορεί να παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση CaM-RyR2, όπως τα δομικά μοτίβα EF (αα 3991-4089) καθώς και το τμήμα του RyR2 που εμφανίζει ομολογία με τους IP₃R (αα 3826-3948, RIH).



Σχήμα 3.21: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών τμημάτων της C-τελικής περιοχής του RyR2, των οποίων έγινε προσπάθεια παραγωγής με μεθόδους μοριακής βιολογίας.



Σχήμα 3.22: Α) Πηκτή αγαρόζης 1% με τα προϊόντα πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pETTM20, που περιέχουν τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις περιοχές 1, 2, 3, 4 και 5 του RyR2, με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Β) Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8 % με τα προϊόντα λύσης των βακτηριακών κυττάρων BL21, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις περιοχές 1, 2 και 3, μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Διαδρομή Un: δείγμα καλλιέργειας βακτηρίων πριν την προσθήκη IPTG, διαδρομή In: δείγμα καλλιέργειας βακτηρίων μετά την προσθήκη IPTG.

Το πρωτεϊνικό τμήμα 3907-4286 (περιοχή 2) αποτελεί μία υπο-περιοχή του μητρικού πρωτεϊνικού τμήματος που έχει ως N-τελικό άκρο το πεπτιδίο P_C, ενώ το πρωτεϊνικό τμήμα 4090-4286 (περιοχή 3) δεν περιέχει την RIH, τα δομικά μοτίβα EF και το πεπτιδίο P_C. Από την άλλη πλευρά, τα πρωτεϊνικά τμήματα 3826-4254 και 3826-4163 (περιοχές 4 και 5, αντίστοιχα) αποτελούν μικρότερα τμήματα του μητρικού, που φέρουν εξαλείψεις στο C-τελικό άκρο.

Συγκεκριμένα το τμήμα 3826-4254 (περιοχή 4) δεν περιέχει ούτε το πεπτιδίο P_D ούτε και την περιοχή 4261-4286, ενώ το τμήμα 3826-4163 (περιοχή 5) δεν περιέχει, επιπλέον, ούτε το πεπτιδίο P_A (Σχήμα 3.21).

Αρχικά, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις περιοχές 1, 2, 3, 4, και 5 του RyR2 ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα το cDNA ολόκληρου του RyR2 και τους κατάλληλους εκκινήτες. Στην συνέχεια, τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pETMM20 (στην περίπτωση έκφρασης των περιοχών με την συνοδό-πρωτεΐνη Ttx). Η κλωνοποίηση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τις περιοχές 1, 2, 3, 4 και 5 του RyR2 στον πλασμιδιακό φορέα pETMM20 ήταν επιτυχής. Ενδεικτικά παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.22A η επιβεβαίωση της κλωνοποίησης με περιοριστικά ένζυμα και για τις 5 περιοχές στην περίπτωση του πλασμιδιακού φορέα pETMM20. Για την έκφραση των περιοχών 1, 2, 3, 4, και 5 του RyR2, ακολούθησε μετασχηματισμός δύο κυτταρικών σειρών *E.coli*, και συγκεκριμένα κυττάρων BL21 (DE3) και Rosetta (DE3) με τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Στην συνέχεια, έγινε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης στις κυτταρικές καλλιέργειες με IPTG για 8 h στους 16°C και ανάλυση του ομογενοποιημένου των βακτηριακών κυττάρων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant-Blue (Σχήμα 3.22B), για να διαπιστωθεί η έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνικών τμημάτων. Ακολούθησε λύση των βακτηριακών κυττάρων και καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας. Ενώ όλες οι περιοχές (περιοχές 1-5) εκφράστηκαν επιτυχώς στα βακτηριακά κύτταρα, μετά το στάδιο του καθαρισμού δεν λαμβάνονταν σε διαλυτή μορφή.

Τέλος, ακολουθήθηκε η ίδια πορεία για την κλωνοποίηση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τις περιοχές 1, 2, 3, 4 και 5 με την συνοδεία της πρωτεΐνης NusA στον πλασμιδιακό φορέα pETMM60 καθώς και η έκφρασή τους στα βακτηριακά κύτταρα BL21. Τόσο η κλωνοποίηση όσο και η έκφραση των περιοχών αυτών ήταν επιτυχής. Μετά το στάδιο, όμως, του καθαρισμού οι επιθυμητές περιοχές δεν λαμβάνονταν σε διαλυτή μορφή.

Συνοψίζοντας, οι περιοχές 1, 2, 3, 4 και 5 του RyR2, παρά την επιτυχή κλωνοποίηση των αλληλουχιών cDNA που τις κωδικοποιούν στους πλασμιδιακούς φορείς pETMM20 και pETMM60 και τον μετασχηματισμό

βακτηριακών κυττάρων BL21 ή/και Rossetta με τα ανασυνδυασμένα αυτά πλασμίδια, δεν παραλήφθηκαν σε διαλυτή μορφή και επομένως δεν ήταν διαθέσιμες για την αξιοποίησή τους σε διάφορες μεθόδους, με στόχο την περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης CaM-RyR2.

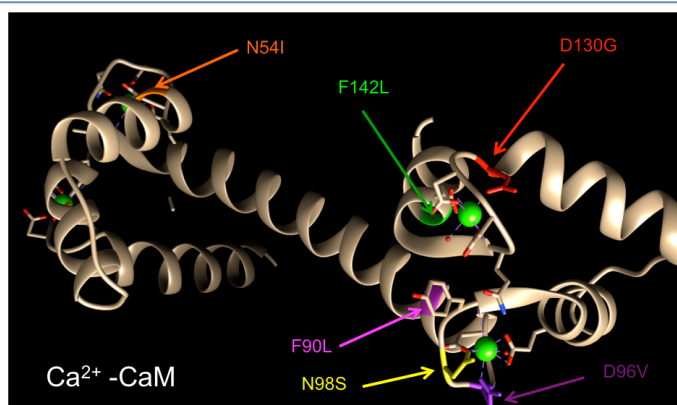
3.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με μεταλλαγμένες μορφές της CaM, που συνδέονται με καρδιακή δυσλειτουργία

Την τελευταία 5ετία έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο μόριο της CaM, σε ασθενείς που πάσχουν από καρδιακές παθήσεις όπως οι CPVT, LQTS και IVF. Στην προσπάθειά μας να μελετήσουμε κατά πόσο οι μεταλλάξεις της CaM συνδέονται με πιθανή μη λειτουργική ρύθμιση του RyR2, μελετήθηκαν έξι από τις μεταλλάξεις αυτές (CaM^{D54I}, CaM^{N90L}, CaM^{D96V}, CaM^{N98S}, CaM^{D130G} και CaM^{F142L}) ως προς τον τρόπο που ρυθμίζουν την λειτουργία του RyR2 καθώς και ως προς την ικανότητά τους να συνδέονται με τον υποδοχέα.

A

Μετάλλαξη	Γονίδιο	Θέση στην CaM	Πάθηση
N54I	CALM1	N-λοβός: στην περιοχή πρόσδεσης των Ca ²⁺ II, στην εκτεθειμένη στον διαλύτη επιφάνεια της πρώτης α-έλικας	CPVT
F90L	CALM1	C-λοβός	IVF
D96V	CALM2	C-λοβός: στην περιοχή χεριού EF III –περιοχή άμεσης αλληλεπίδρασης με τα Ca ²⁺	LQTS
N98S	CALM1	C-λοβός: στην περιοχή πρόσδεσης των Ca ²⁺ III, ένα από τα αμινοξέα που συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με τα Ca ²⁺	CPVT
D130G	CALM1	C-λοβός: στην περιοχή χεριού EF IV –περιοχή άμεσης αλληλεπίδρασης με τα Ca ²⁺	LQTS
F142L	CALM1	C-λοβός: κοντά στην περιοχή χεριού EF IV	LQTS

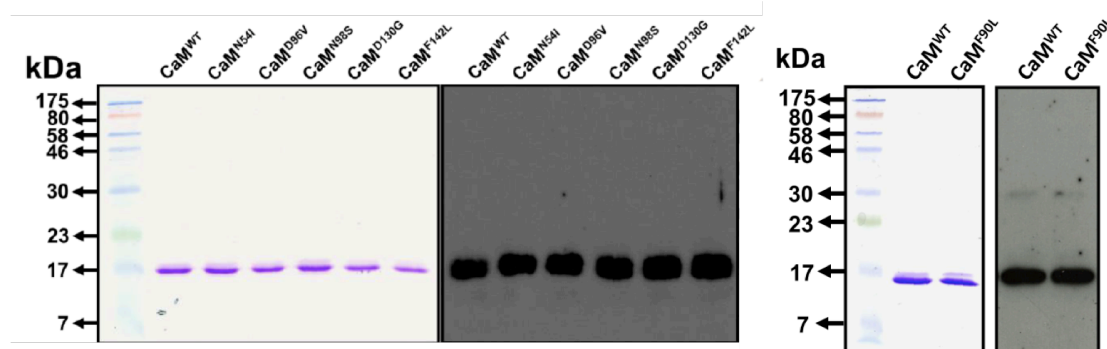
B



Σχήμα 3.23. Α) Πίνακας με χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων στο μόριο της CaM. Β) Θέση των μεταλλάξεων στην τριτοταγή δομή της CaM.

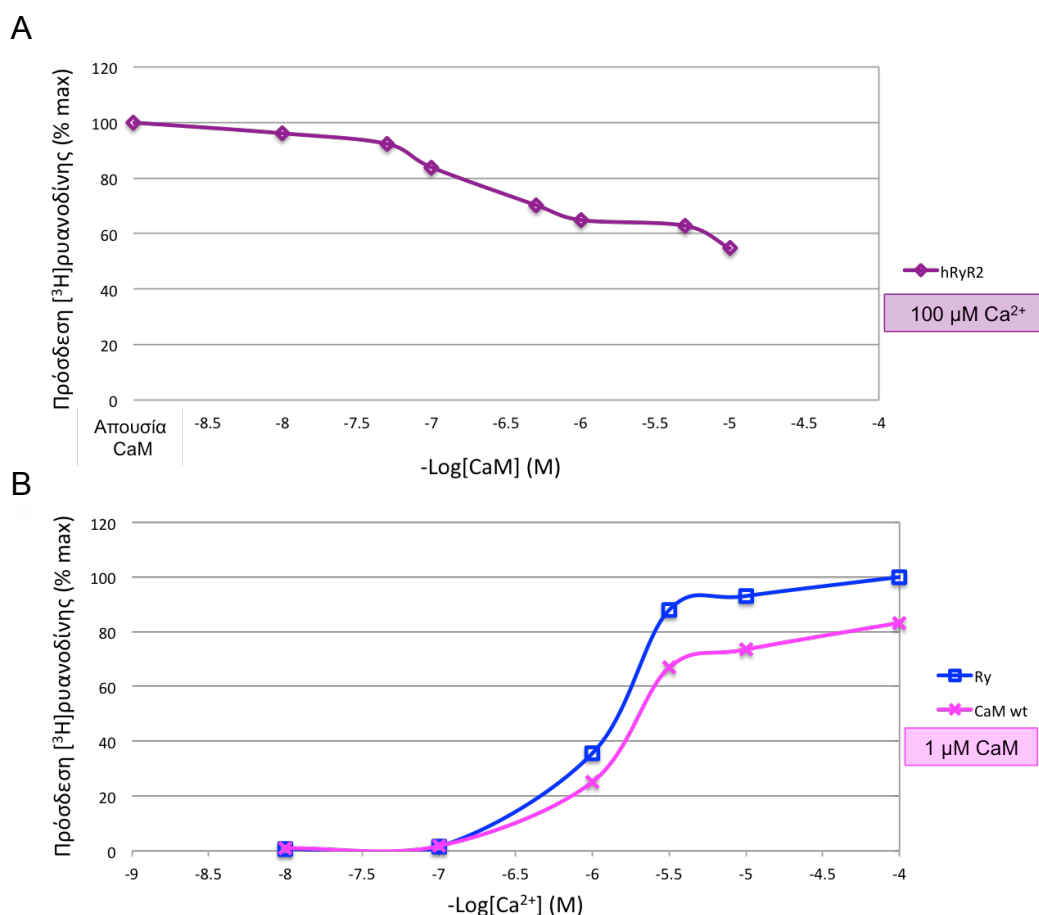
Η μελέτη έγινε μέσω των μεθόδων πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης και της συγκατακρήμνισης, αντίστοιχα. Στον Πίνακα Α του Σχήματος 3.23 παρουσιάζονται κάποια χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων αυτών (θέση στο μόριο της CaM, γονίδιο στο οποίο έχει γίνει η μετάλλαξη και το είδος της ασθένειας) καθώς και η θέση τους στην τριτοταγή δομή του μορίου (Σχήμα 3.23B).

Αρχικά έλαβε χώρα η έκφραση και ο καθαρισμός της CaM αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της. Μετά το στάδιο του καθαρισμού, όλες οι πρωτεΐνες ελήφθησαν σε υψηλή καθαρότητα όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.24A. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με την μέθοδο Western blot, με την χρήση μονοκλωνικού αντι-CaM αντισώματος (Σχήμα 3.24B).



Σχήμα 3.24: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% με CaM αγρίου τύπου (CaM^{WT}) και με τις μεταλλαγμένες μορφές της CaM (CaM^{N54I}, CaM^{D96V}, CaM^{N98S}, CaM^{D130G}, CaM^{F142L} και CaM^{F90L}), μετά από SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (αριστερό πλαίσιο). Τα αντίστοιχα αποτυπώματα κατά Western των CaM^{WT} και CaM^{F90L} με το αντι-CaM αντίσωμα (δεξιό πλαίσιο).

Στην συνέχεια, με την μέθοδο της πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης, μελετήθηκε η ρύθμιση του RyR2 από την CaM^{WT} καθώς και από τις έξι μεταλλαγμένες μορφές της CaM. Η CaM^{WT}, ως αναστολέας του RyR2 σε όλες τις συγκεντρώσεις Ca²⁺, αναμένεται να μειώνει την πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, καθώς ενισχύει την κλειστή διαμόρφωση του διαύλου, ενώ είναι γνωστό ότι η ρυανοδίνη προσδένεται εκλεκτικά στην ανοιχτή διαμόρφωση του RyR2.



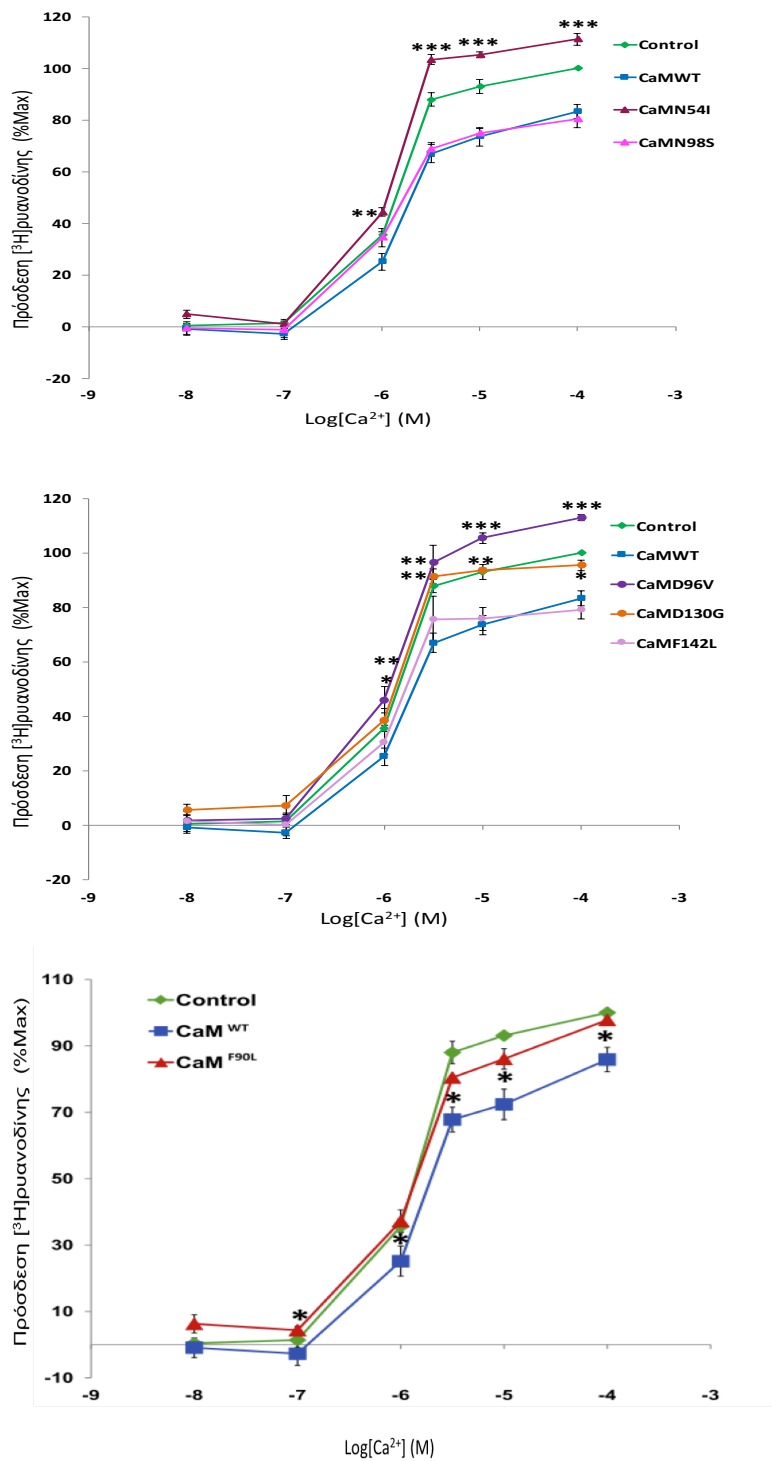
Σχήμα 3.25: A) Καμπύλη πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, εκφρασμένης ως % της μέγιστης δέσμευσης (% max), συναρτήσεως της συγκέντρωσης CaM παρουσία 100 μM Ca²⁺. **B)** Καμπύλη πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον RyR2 εκφρασμένης ως % της μέγιστης δέσμευσης (% max), συναρτήσεως της συγκέντρωσης Ca²⁺, απουσία CaM (μπλε καμπύλη) και παρουσία 1 μM CaM (ροζ καμπύλη).

Αρχικά, μελετήθηκε η πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2 σε 100 μM [Ca²⁺], παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CaM^{WT}, ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη συγκέντρωση της CaM. Σύμφωνα με στο Σχήμα 3.25A, ως βέλτιστη συγκέντρωση της CaM στην μέθοδο αυτή, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 1 μM. Πράγματι, σε συγκέντρωση 1 μM CaM στην μέθοδο της πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης, η CaM μειώνει την πρόσδεση της ρυανοδίνης στον RyR2 σε όλες τις [Ca²⁺] (Σχήμα 3.25B).

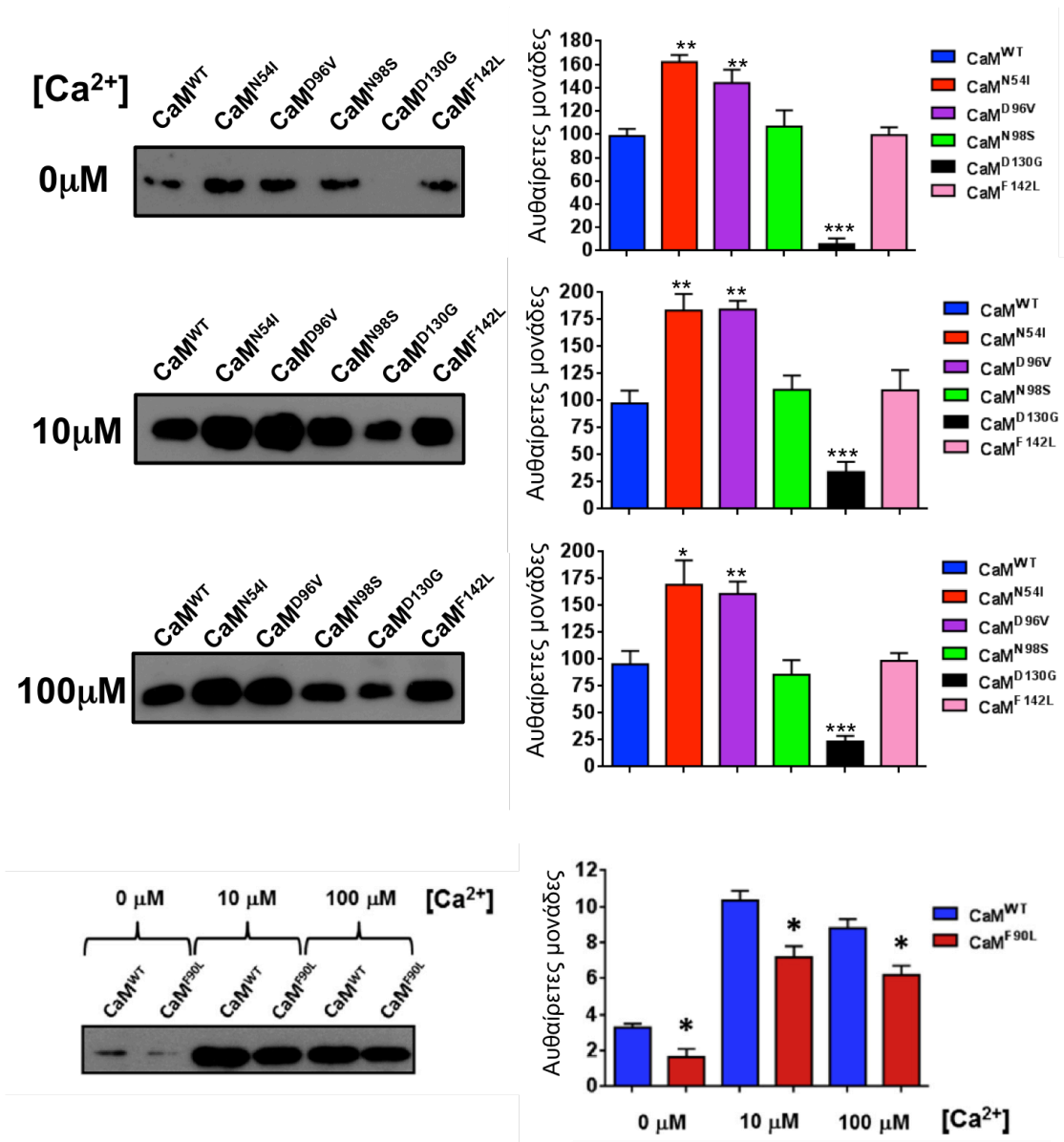
Τέλος, μελετήθηκε η λειτουργική δράση των μεταλλαγμένων μορφών της CaM (CaM^{D54I}, CaM^{N90L}, CaM^{N98S}, CaM^{D96V}, CaM^{D130G} και CaM^{F142L}) στον RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT}, με την μέθοδο της πρόσδεσης της [³H]ρυανοδίνης σε συγκεντρώσεις Ca²⁺ από 10 nM έως 100 μM. Μέγιστη πρόσδεση της ρυανοδίνης στον RyR2 επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση 100 μM Ca²⁺. Όπως

φαίνεται από τις καμπύλες του Σχήματος 3.26, η CaM^{WT} έχει την ικανότητα να μειώνει σημαντικά την πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, σε ποσοστό ~20% σε σχέση με τον μάρτυρα (πρόσδεση απουσία της CaM). Οι μεταλλάξεις CaM^{N98S} και CaM^{F142L} παρουσιάζουν όμοια παρεμπόδιση στην πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT}, ενώ η CaM^{D130G} χάνει τελείως την φυσιολογική ανασταλτική δράση της CaM. Επιπλέον, η CaM^{F90L} μειώνει την πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2 κατά 65-85%, σε σχέση με την CaM^{WT}, ενώ οι CaM^{N54I} και CaM^{D96V} ενισχύουν την πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, σε ποσοστό ~15%. Συνολικά, βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου πρόσδεσης της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, οι μεταλλάξεις CaM^{N98S} και CaM^{F142L} φαίνεται να ενισχύουν την κλειστή διαμόρφωση του διαύλου, οι μεταλλάξεις CaM^{F90L} και CaM^{D130G} φαίνεται να χάνουν μέρος ή και το σύνολο της ανασταλτικής δράσης της CaM^{WT}, ενώ οι μεταλλάξεις CaM^{N54I} και CaM^{D96V} πιθανόν να ενισχύουν την ανοιχτή λειτουργική διαμόρφωση του RyR2.

Για την περαιτέρω μελέτη της πρόσδεσης της CaM^{WT} και των μεταλλαγμένων μορφών της στον RyR2, αναπτύχθηκε η μέθοδος συγκατακρήμνισης τύπου 2, όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Συγκεκριμένα, γίνεται ανοσοκατακρήμνιση του RyR2 από το ΣΔ καρδιακού μυός χοίρου με αντίσωμα εξειδικευμένο για τον RyR2 (Ab1093), παρουσία της CaM^{WT} και των μεταλλαγμένων μορφών της, τόσο απουσία όσο και παρουσία Ca²⁺ (10 και 100 μM). Το σύμπλεγμα της CaM^{WT} και των μεταλλαγμένων μορφών της με τον RyR2 με SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 15% και το ανοσοαποτύπωμα ανιχνεύεται με αντίσωμα έναντι της CaM. Ακολουθεί ανάλυση του αντίστοιχου ανοσοαποτυπώματος με πυκνομετρία (Σχήμα 3.27). Βάσει των αποτελεσμάτων της πυκνομετρίας, οι μεταλλαγμένες μορφές CaM^{N98S} και CaM^{F142L} δεν εμφανίζουν διαφορά στην πρόσδεσή τους με τον RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT} σε όλες τις [Ca²⁺]. Επιπλέον, η CaM^{F90L} παρουσιάζει μειωμένη πρόσδεση στον RyR2, σε ποσοστό 30-50%, ενώ η CaM^{D130G} εμφανίζει σημαντικά μειωμένη πρόσδεση (>70%) στον RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT}. Τέλος, οι μεταλλαγμένες μορφές CaM^{N54I} και CaM^{D96V} εμφανίζουν σημαντικά ισχυρότερη πρόσδεση στον RyR2 από ό,τι CaM^{WT}.



Σχήμα 3.26: Καμπύλες πρόσδεσης [^3H]ρυανοδίνης στον RyR2, εκφρασμένης ως % της μέγιστης δέσμευσης (% max), συναρτήσει της συγκέντρωσης Ca^{2+} , παρουσία της CaM^{WT} και των μεταλλαγμένων μορφών της. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί σε απουσία CaM . Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με αστερίσκους (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).



Σχήμα 3.27: Αποτύπωμα κατά Western της συγκατακρημισμένης με τον RyR2 CaM^{WT} καθώς και μεταλλαγμένων μορφών της με χρήση μονοκλωνικού αντι-CaM αντισώματος (αραίωση 1:7.500), τόσο απουσία όσο και παρουσία 10 και 100 μM Ca²⁺ (αριστερή στήλη). Παράσταση των αποτελεσμάτων των αντίστοιχων αποτυπωμάτων κατά Western μετά από ανάλυση με πυκνομετρία (δεξιά στήλη). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με αστερίσκους (*P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου συγκατακρήμνισης έρχονται σε συμφωνία με αυτά της μεθόδου πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης. Συγκεκριμένα, οι μεταλλαγμένες μορφές που παρουσιάζουν μειωμένη πρόσδεση στον RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT} (CaM^{F90L} και CaM^{D130G}) στα πειράματα συγκατακρήμνισης, εμφανίζουν μειωμένη ανασταλτική δράση στον RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT} στα πειράματα πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης. Αντιθέτως, οι μεταλλαγμένες μορφές CaM^{N54I} και CaM^{D96V} φαίνεται να ενισχύουν την ανοιχτή διαμόρφωση του διαύλου πιθανόν μέσω ισχυρότερης πρόσδεσης στον RyR2 από ό,τι η CaM^{WT}. Τέλος, οι μεταλλαγμένες μορφές CaM^{N98S} και CaM^{F142L} δεν φαίνεται να εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης στον RyR2 ώστε να ρυθμίζουν διαφορετικά τη λειτουργικότητα του υποδοχέα σε σχέση με την CaM^{WT}.

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο RyR2 είναι μέλος της οικογενείας των υποδοχέων ρυανοδίνης (RyRs) που αποτελούν διαύλους απελευθέρωσης Ca^{2+} του ΣΔ/ΕΔ και εντοπίζεται κυρίως στον καρδιακό μυ διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο στον μηχανισμό της σύζευξης διέγερσης-συστολής (excitation-contraction coupling) [9]. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια ενός καρδιακού παλμού, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα ένα σχετικά μεγάλο ποσό ασβεστίου από το ΣΔ των μυοκαρδιακών κυττάρων, το οποίο αποτελεί κύρια ενδοκυτταρική αποθήκη ασβεστίου, μέσω του RyR2, αυξάνοντας μέχρι και 10 φορές την συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα ($[Ca^{2+}]_i$), γεγονός που πυροδοτεί την μυϊκή συστολή της καρδιάς [15]. Από δομικής άποψης, οι RyRs είναι ίσως οι μεγαλύτεροι σε μέγεθος ιοντικοί δίαυλοι με μοριακό βάρος ~ 2,2 MDa και εντοπίζονται με την μορφή ομοτετραμερών συμπλεγμάτων. Ως διαμεμβρανικοί δίαυλοι, το μεγαλύτερο μέρος τους (4/5) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (κυτταροπλασματική περιοχή, CY) και ένα μικρό ποσοστό (1/5) διαμεμβρανικά (διαμεμβρανική περιοχή, TM). Επιπλέον, η ρύθμισή τους ελέγχεται από μία πληθώρα πρωτεϊνών, μικρών μορίων και ιόντων τόσο από την πλευρά του κυτταροπλάσματος όσο και από την πλευρά του αυλού του ΣΔ [33].

Η καλμοδουλίνη (CaM) είναι βασικός ρυθμιστής του RyR2 από την πλευρά του κυτταροπλάσματος. Αποτελεί μία πρωτεΐνη πανταχού παρούσα σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, με σχετικά μικρό μοριακό βάρος (~17 kDa), είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών με δομικό μοτίβο EF και λειτουργεί ως αισθητήρας ασβεστίου. Βάσει της κρυσταλλικής της δομής, η CaM υιοθετεί μία διαμόρφωση τύπου αλτήρα (dumbbell) με δύο σφαιρικές δομικές περιοχές στην αμινο- και την καρβοξυ-τελική περιοχή του μορίου (N- και C- λοβοί, αντίστοιχα), οι οποίες συνδέονται μέσω μίας εύκαμπτης α-έλικας. Κάθε λοβός αποτελείται από δύο δομικά μοτίβα EF, όπου κάθε μοτίβο προσδένει ένα Ca^{2+} . Ο N- και ο C-λοβός εμφανίζουν 10 φορές διαφορά στην συγγένεια με το Ca^{2+} , με K_d περίπου 10 και 1 μM , αντίστοιχα [193]. Η CaM υιοθετεί δύο διαμορφώσεις ανάλογα με το αν είναι προσδεμένη (Ca^{2+}/CaM) ή όχι (apoCaM) με ασβέστιο-ανεξάρτητα όμως από τη διαμόρφωσή της, η CaM παραμένει ικανή να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες [87]. Στα θηλαστικά,

η CaM κωδικοποιείται από τρία μη αλληλόμορφα γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, και συγκεκριμένα στον άνθρωπο από τα γονίδια *CALM1*, *CALM2* και *CALM3*, τα οποία κωδικοποιούν μία πανομοιότυπη πρωτεΐνη [82].

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η CaM αποτελεί κύριο ρυθμιστή του RyR2. Συγκεκριμένα, η CaM δρα ως αναστολέας του RyR2 τόσο σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$ (της τάξης των nM, όπου βρίσκεται στην διαμόρφωση apoCaM) όσο και σε υψηλές $[Ca^{2+}]$ (της τάξης των μ M, όπου βρίσκεται στην διαμόρφωση Ca^{2+}/CaM) στο κυτταρόπλασμα [88, 92]. Βάσει της δράσης της ως αναστολέας, η CaM εμπλέκεται στον τερματισμό απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΣΔ. Το μοτίβο δημιουργίας σπινθήρων Ca^{2+} κατά την σύζευξη διέγερσης-συστολής τερματίζεται όταν το περιεχόμενο του ΣΔ σε Ca^{2+} μειώνεται πέραν ενός ορίου, γνωστό ως όριο τερματισμού [100]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αγρίου τύπου CaM σε ειδικά *in vitro* πειράματα αυξάνει το όριο τερματισμού, διευκολύνοντας τον τερματισμό των σπινθήρων Ca^{2+} , ενώ μεταλλάξεις της CaM σε θέσεις που αποτρέπουν την πρόσδεση του ασβεστίου στον C-λοβό, μειώνουν το όριο τερματισμού, προκαλώντας καθυστέρηση στον τερματισμό της απελευθέρωσης Ca^{2+} [102].

Την τελευταία 5ετία, βάσει γενετικών μελετών έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα γονίδια της CaM σε ασθενείς που πάσχουν από διάφορες μορφές διαταραχών της καρδιακής ρύθμισης, όπως οι CPVT (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia), LQTS (long QT-syndrome) και IVF (idiopathic ventricular fibrillation) [83, 150-152].

Από τα παραπάνω, είναι εμφανής η ανάγκη κατανόησης του μηχανισμού ρύθμισης του RyR2 από την CaM, μηχανισμός που μέχρι στιγμής δεν είναι πλήρως γνωστός. Αυτό που είναι γνωστό και κοινώς αποδεκτό είναι η κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στους RyR1 (σκελετικός RyR) και RyR2, που εντοπίζεται στις αμινοξικές αλληλουχίες (aa) 3614-3643 και 3583-3603, αντίστοιχα, περιοχή γνωστή ως CaMBD (CaM-binding domain). Οι apo- και Ca^{2+}/CaM προσδένονται σε αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές, με μικρή μεταξύ τους μετατόπιση, τόσο στον RyR1 όσο και στον RyR2. Η CaMBD στους RyR1 και RyR2 παρουσιάζει υψηλή ομολογία πρωτοταγούς δομής, γεγονός που διευκολύνει την μελέτη της αλληλεπίδρασης RyR2-CaM από

δεδομένα που έχουν προκύψει από την μελέτη της αλληλεπίδρασης RyR1-CaM. Βάσει πληροφοριών που προήλθαν από την κρυσταλλογραφική δομή του συμπλέγματος Ca^{2+}/CaM με το πεπτίδιο 3614-3643 του RyR1, προκύπτει ότι η Ca^{2+}/CaM προσδένεται αντιπαράλληλα στο πεπτίδιο, οι δύο λοβοί (N- και C- λοβοί) δεν έρχονται σε επαφή ο ένας με τον άλλον κατά την αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο και ο C-λοβός αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το πεπτίδιο από ό,τι ο N-λοβός και μάλιστα προσδένεται στο πεπτίδιο ακόμη και απουσία του N-λοβού [29]. Πιθανόν κατά την πρόσδεση της CaM στο πλήρες μόριο του RyR1 ο N-λοβός να εκτοπίζεται από μία ανταγωνιστική περιοχή πρόσδεσης του RyR1, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανότητα εμπλοκής μίας επιπλέον παρακείμενης περιοχής του υποδοχέα στον μηχανισμό αλληλεπίδρασης CaM-RyR.

Γενικά, βάσει μοτίβων πρόσδεσης της Ca^{2+}/CaM και σε άλλες πρωτεΐνες πέραν των RyRs, η περιοχή πρόσδεσης της Ca^{2+}/CaM χαρακτηρίζεται από μήκος ~15-30 αμινοξέων και υψηλή πυκνότητα σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα, ενώ επιπλέον, περιέχει δύο ισχυρώς υδροφοβικά αμινοξέα αγκυροβόλησης, η απόσταση μεταξύ των οποίων ποικίλλει (π.χ. 1-10 στην CaMKII, 1-14 στην κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και 1-17 στους RyR1, RyR2). Ένα επιπλέον αρχαιοτυπικό είδος μοτίβου πρόσδεσης της CaM, που αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως περιοχή πρόσδεσης της apoCaM, είναι το γνωστό ως IQ μοτίβο (IQXXRGGXXR). Το μοτίβο αυτό είναι ισχυρώς υδροφοβικό και θετικά φορτισμένο, με αποτέλεσμα να θεωρείται ότι μπορεί να προσδένει και την Ca^{2+}/CaM . Από την άλλη πλευρά, η CaM φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες-στόχους μέσω μίας μεγάλης ποικιλίας περιοχών πρόσδεσης που δεν ανταποκρίνονται στα κλασικά μοτίβα πρόσδεσης της CaM [194].

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε ο μηχανισμός ρύθμισης του RyR2 από την CaM και συγκεκριμένα η ύπαρξη επιπλέον περιοχών του RyR2, πέραν της κύριας CaMBD, που πιθανόν να εμπλέκονται στην πρόσδεση της CaM στον RyR2. Επιπλέον, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του RyR2 με μεταλλαγμένες μορφές της CaM που σχετίζονται με καρδιακές παθήσεις.

Αρχικά, για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του RyR2 με την αγρίου τύπου CaM και στο πλαίσιο εντοπισμού πιθανών περιοχών που εμπλέκονται στον

μηχανισμό αυτό, έλαβε χώρα η σύνθεση οκτώ πεπτιδικών τμημάτων του RyR2 (ανθρώπινη αλληλουχία, hRyR2), που αναφέρονται ως P_A, P_B, P_{B extended}, P_C, P_D, P_E, P_F, P_G. Δύο από τα συνθετικά αυτά πεπτίδια, και συγκεκριμένα τα P_B και P_{B extended} (με αα 3584-3602 και 3581-3607, αντίστοιχα) ανήκουν στην κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM (3583-3603) ή σε μία διευρυμένη μορφή της. Τα δύο αυτά συνθετικά πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν είτε ως θετικοί μάρτυρες στις βιοχημικές και φυσικοχημικές τεχνικές που αναπτύξαμε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης CaM-RyR2, είτε ως αντιγόνα, μέσω της σύζευξής τους σε μία πρωτεΐνη-φορέα (KLH), για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων, με στόχο τα αντισώματα αυτά να αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτίδια ή και ολόκληρο το μόριο του RyR2. Σχετικά με την επιλογή των πεπτιδίων P_A, P_C και P_D (με αα 4240-4254, 3907-3922 και 4255-4277, αντίστοιχα) ως πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM πέραν της κύριας περιοχής (P_B και P_{B extended}), αυτή έγινε κυρίως βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων και προηγούμενης εργαστηριακής εμπειρίας. Συγκεκριμένα, τα P_A και P_D εντοπίζονται στην C-τελική περιοχή του υποδοχέα και ειδικά στην περιοχή διαφοροποίησης 1 μεταξύ των RyR1 και RyR2 (DR1), ενώ ειδικά το P_D ανήκει στην περιοχή 4261-4286, η οποία έχει προταθεί ως πιθανή δευτερεύουσα περιοχή πρόσδεσης της CaM [88, 110]. Η επιλογή του P_C, το οποίο ανήκει επίσης στην C-τελική περιοχή του RyR2, βασίστηκε κυρίως σε πειράματα που είχαν γίνει στο παρελθόν από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή F. Anthony Lai στο Πανεπιστήμιο Cardiff. Το γεγονός ότι τα P_A και P_D επιλέχθηκαν από την περιοχή διαφοροποίησης DR1 βασίζεται στον ακόλουθο συλλογισμό: δεδομένου ότι η apoCaM δρα ως ενεργοποιητής του RyR1 και ως αναστολέας του RyR2 και δεδομένου ότι η κύρια περιοχή πρόσδεσης στους RyR1 και RyR2 εμφανίζει υψηλή ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας στις δύο ισομορφές του υποδοχέα, πιθανόν ο διαφορετικός τρόπος δράσης της apoCaM να οφείλεται στην ύπαρξη μίας δεύτερης περιοχής πρόσδεσης που βρίσκεται σε περιοχή διαφοροποίησης των δύο ισομορφών. Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, κατά την πρόσδεση του Ca²⁺ στην CaM, η CaM μετατοπίζεται προς το N-τελικό άκρο της κύριας θέσης πρόσδεσης κατά ~ 30 Å, μετατόπιση αρκετά μεγάλη για να συμβαίνει στην ίδια περιοχή πρόσδεσης (αυτή της κύριας) και αρκετά μικρή για να συμβαίνει σε περιοχή αρκετά απομακρυσμένη από την κύρια περιοχή

πρόσδεσης της CaM. Για το λόγο αυτό, όλα τα υπό εξέταση πεπτίδια βρίσκονται στην C-τελική περιοχή του υποδοχέα, όπως και η κύρια περιοχή πρόσδεσης. Τέλος, τα P_E, P_F και P_G αποτελούν υπο-περιοχές του P_D, δίνοντας έμφαση στη περιοχή αυτή και εξετάζοντας την πιθανότητα κάποια από τα επί μέρους αυτά πεπτίδια να παρουσιάζουν ισχυρή πρόσδεση με την CaM. Ειδικά το P_F, χρησιμοποιήθηκε και υπό τη μορφή του παραγώγου CysP_F ως αντιγόνο, μέσω της σύζευξής του με την KLH, για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Για την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης της αγρίου τύπου CaM με τα συνθετικά πεπτίδια που αποτελούν τμήματα του RyR2, αναπτύχθηκαν τρεις μέθοδοι και συγκεκριμένα, η μέθοδος της συγκατακρήμνισης, μία τροποποιημένη μορφή μεθόδου ELISA και η μέθοδος ITC. Τα P_B και P_{B extended} αλληλεπιδρούν με την CaM και με τις τρεις μεθόδους, επιβεβαιώνοντας ότι τα πεπτίδια αυτά αποτελούν την κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Τα P_A και P_C δεν φαίνεται να έχουν ούτε έμμεση επίδραση στην αλληλεπίδραση της CaM με τον RyR2 σε πειράματα συγκατακρήμνισης, ούτε άμεση αλληλεπίδραση με την CaM σε πειράματα ELISA και ITC. Αντίθετα, το P_D φαίνεται να αλληλεπιδρά με την CaM, σε μικρότερο βαθμό από τα P_B και P_{B extended}, σε πειράματα ELISA και ITC, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία για την εμπλοκή της ευρύτερης περιοχής 4261-4286 ως πιθανής περιοχής πρόσδεσης της CaM, τόσο με κλασσικές βιοχημικές μεθόδους [88, 110], όσο και με μεθόδους FRET [124] και ITC [125]. Επιπλέον, σε πειράματα ITC, από όλα τα πεπτίδια που μελετήθηκαν, καλύτερη αλληλεπίδραση με την CaM παρουσία Ca²⁺ φαίνεται να έχει το P_F (4255-4271), το οποίο όπως ήδη αναφέρθηκε είναι τμήμα του P_D, και μάλιστα αλληλεπιδρά ~ 6 φορές ισχυρότερα από ό,τι το P_{B extended}, που βρίσκεται στην κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι από την θερμική ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της CaM με τα συνθετικά πεπτίδια με την μέθοδο ITC, οι αλληλεπιδράσεις των P_B και P_{B extended} με την CaM είναι εξώθερμες, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις των P_D και P_F που είναι ενδόθερμες, υποδηλώνοντας έναν τελείως διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με την CaM για τις δύο αυτές ευρύτερες περιοχές του RyR2 (αα 3581-3607 και 4255-4277). Σε πειράματα ELISA, το P_F, σε αντίθεση με το

P_D , δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με την CaM. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι το P_F δεν φαίνεται να επιστρώνεται στα φρεάτια ELISA καθώς ο αντιορός 77(3) (αντιορός που αναπτύχθηκε έναντι του Cys P_F) δεν φαίνεται αναγνωρίζει τόσο την ακινητοποιημένη μορφή του πεπτιδίου (πειράματα τιτλοδότησης όσο την ελεύθερη μορφή του P_F (πειράματα εκτόπισης).

Σχετικά με την προσπάθεια ανάπτυξης πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των P_A , P_C , P_B και P_F , αναπτύχθηκαν επιτυχώς οι αντιοροί 41N, 67N, 72N και 77N, αντίστοιχα, ικανοί να αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα συνθετικά πεπτίδια, όχι όμως και ολόκληρο το μόριο του RyR2. Κάποια από τα αντισώματα αυτά αξιοποιήθηκαν σε πειράματα τύπου ELISA για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των αντίστοιχων πεπτιδίων του RyR2 με την CaM, ενώ στο μέλλον μπορούν να αξιοποιηθούν για την αναγνώριση ευρύτερων περιοχών του RyR2, εκφρασμένων με τη μορφή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, συμβάλλοντας στην περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης CaM-RyR2. Επιπλέον, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, έλαβε χώρα η σύνθεση πεπτιδίων που αποτελούν τμήματα της C- τελικής περιοχής της CaM (P_1 και P_2), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα για την ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων ικανών να αναγνωρίζουν ολόκληρο το μόριο της CaM. Τα αντισώματα αυτά (αντιοροί 76N) αξιοποιήθηκαν στην τροποποιημένη μέθοδο ELISA για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης CaM-RyR2 καθώς αποτελούν ισχυρό εργαλείο αναγνώρισης της CaM. Με τον τρόπο αυτό μειώθηκε σημαντικά το κόστος των πειραμάτων, στα οποία εμπλέκεται η χρήση αντισώματος έναντι της CaM, καθώς τα πολυκλωνικά μας αντισώματα αντικατέστησαν αντι-CaM αντισώματα του εμπορίου, διαθέσιμα σε μικρές ποσότητες και σε υψηλό κόστος.

Τέλος, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έγινε μία πρώτη προσέγγιση της μελέτης της αλληλεπίδρασης έξι μεταλλαγμένων μορφών της CaM (CaM^{D54I}, CaM^{F90L}, CaM^{D96V}, CaM^{N98S}, CaM^{D130G} και CaM^{F142L}), που σχετίζονται με διάφορες μορφές διαταραχών της καρδιακής ρύθμισης [83, 150-152], με τον RyR2. Δύο από τις μεταλλαγμένες μορφές της CaM (CaM^{D54I} και CaM^{N98S}) έχουν εμφανισθεί σε ασθενείς με φαινότυπο ασθένειας CPVT, τρεις σε ασθενείς με φαινότυπο LQTS (CaM^{D96V}, CaM^{D130G} και CaM^{F142L}) και μία έχει συσχετισθεί με φαινότυπο IVF (CaM^{F90L}). Η αλληλεπίδραση της τελευταίας

(CaM^{F90L}) με τον RyR2 μελετήθηκε για πρώτη φορά από την ερευνητική μας ομάδα [165]. Σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις αφορούν το γονίδιο *CALM1* της CaM και μόνο η CaM^{D96V} το γονίδιο *CALM2*, ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι η μετάλλαξη D130G αφορά στο γονίδιο *CALM1* και στο γονίδιο *CALM3* [195].

Οι δομικές αλλαγές στις οποίες υπόκεινται οι παραπάνω μεταλλαγμένες μορφές της CaM καθώς και η ικανότητα να προσδένουν Ca²⁺ έχουν μελετηθεί πρόσφατα με διάφορες μεθόδους [83, 150, 165, 166]. Βάσει φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD), δεν παρατηρούνται δομικές αλλαγές στην τριτοταγή δομή τους τόσο απουσία όσο και παρουσία Ca²⁺ [165, 166, 196]. Η μείωση της θερμικής σταθερότητας σε σχέση με την αγρίου τύπου CaM (CaM^{WT}) αποτελεί χαρακτηριστικό των περισσότερων υπό μελέτη μεταλλαγμένων μορφών της CaM. Επιπλέον, καμία μετάλλαξη της CaM δεν επηρεάζει την πρόσδεση του Ca²⁺ στον N-λοβό. Αντιθέτως, σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις της CaM οδηγούν σε μείωση της πρόσδεσης του Ca²⁺ στον C-λοβό, σε διαφορετικό βαθμό κάθε φορά, με εξαίρεση την μετάλλαξη N54I, η οποία εντοπίζεται στην θηλιά μεταξύ των δομικών μοτίβων EF-1 και -2 του N-λοβού [83, 150-152, 164, 166, 196].

Στα καρδιακά κύτταρα, η CaM μπορεί να θεωρηθεί ως περιοριστικός παράγοντας στο μηχανισμό της σύζευξης διέγερσης-συστολής καθώς δρα σε μία σειρά πρωτεϊνών που αποτελούν μόρια-κλειδιά στον κύκλο αυτό, συμπεριλαμβανομένων του RyR2, των τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου και καλίου και του L-τύπου διαύλου ασβεστίου, με τρόπο που οδηγεί σε μείωση του ρυθμού του μηχανισμού αυτού. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των έξι μεταλλαγμένων μορφών της CaM, σε σχέση με την αγρίου τύπου (CaM^{WT}), τόσο στην λειτουργικότητα του RyR2, μέσω πειραμάτων πρόσδεσης [³H]ρυανοδίνης στον υποδοχέα, όσο και στην πρόσδεσή τους στον RyR2, μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας πρόσδεσης των μεταλλαγμένων μορφών της CaM στον RyR2 με την επίδρασή τους στην λειτουργικότητα του RyR2. Πιο συγκεκριμένα, η CaM^{WT}, ως αναστολέας του RyR2, έχει την ικανότητα να μειώνει σημαντικά την πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2. Οι CaM^{N98S} και CaM^{F142L} παρουσιάζουν όμοια παρεμπόδιση στην πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον

RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT}, ενώ δεν εμφανίζουν διαφορά στην πρόσδεσή τους με τον RyR2, σε σχέση με την CaM^{WT}, και στις τρεις συγκεντρώσεις Ca²⁺ που μελετήθηκαν (0, 10 και 100 μM). Οι CaM^{F90L} και CaM^{D130G} χάνουν μέρος ή τελείως την ανασταλτική δράση της CaM, ενώ επίσης εμφανίζουν αισθητά μειωμένη πρόσδεση στον RyR2 σε σχέση με την CaM^{WT}. Αντιθέτως, οι CaM^{N54I} και CaM^{D96V} ενισχύουν την πρόσδεση της [³H]ρυανοδίνης στον RyR2, ενώ παράλληλα εμφανίζουν σημαντικά ισχυρότερη πρόσδεση στον RyR2 από ό,τι η CaM^{WT}.

Η ισχυρή πρόσδεση της CPVT-σχετιζόμενης CaM^{N54I} στον RyR2 καθώς και η ενίσχυση της ενεργότητας του RyR2 από την μεταλλαγμένη αυτή μορφή της CaM έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πρόσφατης έρευνας [164]. Σε ασυμφωνία με την μελέτη αυτή είναι, ωστόσο, τα αποτελέσματά μας σχετικά με την CPVT-σχετιζόμενη CaM^{N98S}, που δείχνουν παρόμοια συμπεριφορά της μεταλλαγμένης αυτής μορφής με την CaM^{WT}. Αντίθετα, η παραπάνω μελέτη της βιβλιογραφίας [164] δείχνει ισχυρότερη πρόσδεση της CaM^{N98S} με τον RyR2 σε σχέση με την CaM^{WT} και ενεργοποίηση του υποδοχέα, συνδέοντας τις CPVT-σχετιζόμενες μεταλλάξεις (CaM^{D54I} και CaM^{N98S}) με ενεργοποίηση του RyR2. Το γεγονός ότι ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης της CaM^{WT} με τον RyR2 δεν είναι πλήρως γνωστός δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον μηχανισμό που οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του RyR2 (αντίστροφη δράση από την φυσιολογική) από μεταλλαγμένες μορφές της CaM, που βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής μπορεί να είναι είτε CPTV-σχετιζόμενες (CaM^{N54I}), είτε LQTS-σχετιζόμενες (CaM^{D96V}). Να σημειωθεί ότι η αroCaM ενεργοποιεί άλλους ιοντικούς διαύλους, όπως τον δίαυλο Ca²⁺ τύπου L [197] και τους τασεοελεγχόμενους διαύλους νατρίου [159]. Πιθανόν, η παρατήρηση ότι οι μεταλλάξεις N54I και D96V της CaM μπορούν να ενεργοποιήσουν τον RyR2 να αποκαλύπτει έναν παρόμοιο, αν και άγνωστο μέχρι στιγμής, μηχανισμό ρύθμισης. Είναι επίσης πιθανόν, καθώς φαίνεται να υπάρχουν αρκετές πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR2, μέσω του C- και του N- λοβού, μία μεταλλαγμένη μορφή της CaM να προσδένεται άτυπα σε μία εναλλακτική περιοχή πρόσδεσης της CaM που προκαλεί ενεργοποίηση.

Από την άλλη πλευρά, οι LQTS-σχετιζόμενες μεταλλάξεις (N96V, D130G και F142L) φαίνεται να επιδρούν διαφορετικά στην πρόσδεση των αντίστοιχων, μεταλλαγμένων μορφών της CaM στον RyR2 και στην ενεργότητα του υποδοχέα, αφού, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η N96V μετάλλαξη οδηγεί σε ενίσχυση της ενεργότητας, η μετάλλαξη D130G σε απώλεια της ενεργότητας και η μετάλλαξη F142L δεν φαίνεται να οδηγεί σε διαφορετική επίδραση στην ενεργότητα του υποδοχέα, σε σχέση με την CaM^{WT}. Σε κάθε περίπτωση, οποιαδήποτε επίδραση των N96V, D130G και F142L στην ενεργότητα του RyR2 *in vitro* δεν υποδηλώνει ότι η δυσλειτουργία του RyR2 μπορεί να προκαλέσει *in vivo* LQTS, φαινότυπο ασθένειας που συνδέεται με δυσλειτουργία των διαύλων καλίου (KCNQ1 και 2) και νατρίου (SCN5A) [154-156]. Αντίθετα, υποδηλώνει ότι μέσα στο πολύπλοκο κυτταρικό περιβάλλον, οποιαδήποτε επίδραση στον RyR2 μπορεί να είναι δευτερεύουσας σημασίας και να επισκιάζεται από μία μεγαλύτερη επίδραση των μεταλλαγμένων αυτών μορφών της CaM στην ρύθμιση άλλων συμπλεγμάτων, με ιοντικούς διαύλους πέραν του RyR2.

Περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταλλαγμένων μορφών της CaM και του RyR2, με την αξιοποίηση των συμπερασμάτων και με τη βοήθεια των μοριακών εργαλείων και των τεχνικών που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, θα ενισχύσει την κατανόηση των μηχανισμών που σχετίζονται με την εμφάνιση διαταραχών της καρδιακής λειτουργίας. Απώτερος στόχος των σχετικών μελετών θα είναι, μεταξύ άλλων, η ανάδειξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Δ. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

αα	Αμινοξική αλληλουχία
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ATP	Adenosin triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CaM	Calmodulin
CaMBD	Calmodulin-binding domain
CaMBP	Calmodulin-binding peptide
CaMKII	Calmodulin-dependent protein kinase II
CaMLD	Calmodulin-like domain
CD	Cluster of differentiation
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
CICR	Ca ²⁺ -επαγόμενη απελευθέρωση Ca ²⁺
CPVT	Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
Cryo-EM	Cryo-electron microscopy
CSQ	Calsequestrin
CY	Cytoplasmic
DCM	Dichloromethane
DHPRs	Dihydropyridine receptors
dH ₂ O	Distilled water
DIC	N,N'-diisopropylcarbodiimide

DIEA	Diisopropylethylamine
DMF	N,N'-dimethylformamide
DTT	Dithiothreitol
ECC	Excitation-contraction coupling
EDTA	Ethylenediaminetetra Acetate
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
EF	Elongation Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI-MS	ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GST	Glutathione-5-transferase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIS	Histidine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulins
IP	Immunoprecipitation
IP ₃ R	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IVF	Idiopathic ventricular fibrillation

KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LQTS	Long-QT syndrome
MBS	Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester
MWCO	Molecular weight cut off
MW	Molecular weight
NCX	Sodium-calcium exchanger
NMR	Nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriacetic acid
NTD	N-terminal domains
NusA	N-utilization substance A
PCR	Polymerase chain reaction
PKA	Protein kinase A
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RP-HPLC	Reversed-phase high performance liquid chromatography
rpm	Revolutions per minute
RyRs	Ryanodine receptors
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SPPS	Solid-phase peptide synthesis
SR	Sarcoplasmic reticulum

Sulfo-SMCC	sulfo-succinimidyl maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) 4-[N-
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBS	Tert-butyldimethylsilyl
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenediamine
TEV	Tabacco etch virus
TFA	Trifluoroacetic acid
TIS	Triisopropyl-silane
TM	Transmembrane
Trx	Thioredoxin
UV	Ultraviolet

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zalk, R., Lehnart, S. E. & Marks, A. R. (2007) Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium, *Annual review of biochemistry*. **76**, 367-85.
2. Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q. Y. & Meissner, G. (1988) Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle, *Nature*. **331**, 315-9.
3. Meissner, G., Darling, E. & Eveleth, J. (1986) Kinetics of rapid Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides, *Biochemistry*. **25**, 236-44.
4. Lai, F. A., Misra, M., Xu, L., Smith, H. A. & Meissner, G. (1989) The ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for a cooperatively coupled, negatively charged homotetramer, *The Journal of biological chemistry*. **264**, 16776-85.
5. Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. et al. (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor, *Nature*. **339**, 439-45.
6. Neylon, C. B., Richards, S. M., Larsen, M. A., Agrotis, A. & Bobik, A. (1995) Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are expressed in vascular smooth muscle, *Biochemical and biophysical research communications*. **215**, 814-21.
7. Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M. & Sorrentino, V. (1995) The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues, *The Journal of cell biology*. **128**, 893-904.
8. Marks, A. R., Tempst, P., Hwang, K. S., Taubman, M. B., Inui, M., Chadwick, C., Fleischer, S. & Nadal-Ginard, B. (1989) Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**, 8683-7.

9. Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M. & MacLennan, D. H. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry*. **265**, 13472-83.
10. Lai, F. A., Dent, M., Wickenden, C., Xu, L., Kumari, G., Misra, M., Lee, H. B., Sar, M. & Meissner, G. (1992) Expression of a cardiac Ca(2+)-release channel isoform in mammalian brain, *The Biochemical journal*. **288 (Pt 2)**, 553-64.
11. Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. & Imoto, K. (1992) Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain, *FEBS letters*. **312**, 229-35.
12. O'Brien, J., Meissner, G. & Block, B. A. (1993) The fastest contracting muscles of nonmammalian vertebrates express only one isoform of the ryanodine receptor, *Biophysical journal*. **65**, 2418-27.
13. Oyamada, H., Murayama, T., Takagi, T., Lino, M., Iwabe, N., Miyata, T., Ogawa, Y. & Endo, M. (1994) Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle, *The Journal of biological chemistry*. **269**, 17206-14.
14. Tunwell, R. E., Wickenden, C., Bertrand, B. M., Shevchenko, V. I., Walsh, M. B., Allen, P. D. & Lai, F. A. (1996) The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis, *The Biochemical journal*. **318 (Pt 2)**, 477-87.
15. Bers, D. M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling, *Nature*. **415**, 198-205.
16. Cannell, M. B., Cheng, H. & Lederer, W. J. (1995) The control of calcium release in heart muscle, *Science*. **268**, 1045-9.
17. Cheng, H., Lederer, M. R., Xiao, R. P., Gomez, A. M., Zhou, Y. Y., Ziman, B., Spurgeon, H., Lakatta, E. G. & Lederer, W. J. (1996) Excitation-contraction coupling in heart: new insights from Ca²⁺ sparks, *Cell calcium*. **20**, 129-40.
18. Carl, S. L., Felix, K., Caswell, A. H., Brandt, N. R., Ball, W. J., Jr., Vaghy, P. L., Meissner, G. & Ferguson, D. G. (1995) Immunolocalization of

sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium, *The Journal of cell biology*. **129**, 673-82.

19. Tung, C. C., Lobo, P. A., Kimlicka, L. & Van Petegem, F. (2010) The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule, *Nature*. **468**, 585-8.

20. Amador, F. J., Liu, S., Ishiyama, N., Plevin, M. J., Wilson, A., MacLennan, D. H. & Ikura, M. (2009) Crystal structure of type I ryanodine receptor amino-terminal beta-trefoil domain reveals a disease-associated mutation "hot spot" loop, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**, 11040-4.

21. Lobo, P. A. & Van Petegem, F. (2009) Crystal structures of the N-terminal domains of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors: insights into disease mutations, *Structure*. **17**, 1505-14.

22. Lau, K. & Van Petegem, F. (2014) Crystal structures of wild type and disease mutant forms of the ryanodine receptor SPRY2 domain, *Nature communications*. **5**, 5397.

23. Kimlicka, L., Lau, K., Tung, C. C. & Van Petegem, F. (2013) Disease mutations in the ryanodine receptor N-terminal region couple to a mobile intersubunit interface, *Nature communications*. **4**, 1506.

24. Yuchi, Z., Lau, K. & Van Petegem, F. (2012) Disease mutations in the ryanodine receptor central region: crystal structures of a phosphorylation hot spot domain, *Structure*. **20**, 1201-11.

25. Radermacher, M., Rao, V., Grassucci, R., Frank, J., Timmerman, A. P., Fleischer, S. & Wagenknecht, T. (1994) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle, *The Journal of cell biology*. **127**, 411-23.

26. Serysheva, I., Ludtke, S. J., Baker, M. L., Cong, Y., Topf, M., Eramian, D., Sali, A., Hamilton, S. L. & Chiu, W. (2008) Subnanometer-resolution electron cryomicroscopy-based domain models for the cytoplasmic region of skeletal

muscle RyR channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**, 9610-5.

27. Zalk, R., Clarke, O. B., des Georges, A., Grassucci, R. A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W. A., Frank, J. & Marks, A. R. (2015) Structure of a mammalian ryanodine receptor, *Nature*. **517**, 44-9.

28. Efremov, R. G., Leitner, A., Aebersold, R. & Raunser, S. (2015) Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor, *Nature*. **517**, 39-43.

29. Maximciuc, A. A., Putkey, J. A., Shamoo, Y. & Mackenzie, K. R. (2006) Complex of calmodulin with a ryanodine receptor target reveals a novel, flexible binding mode, *Structure*. **14**, 1547-56.

30. Kobe, B. & Kajava, A. V. (2000) When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures, *Trends in biochemical sciences*. **25**, 509-15.

31. Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N. M., Lai, F. A., Meissner, G. & MacLennan, D. H. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry*. **265**, 2244-56.

32. Yin, C. C., Blayney, L. M. & Lai, F. A. (2005) Physical coupling between ryanodine receptor-calcium release channels, *Journal of molecular biology*. **349**, 538-46.

33. Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D. & Hamilton, S. L. (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **2**, a003996.

34. Fessenden, J. D., Feng, W., Pessah, I. N. & Allen, P. D. (2004) Mutational analysis of putative calcium binding motifs within the skeletal ryanodine receptor isoform, RyR1, *The Journal of biological chemistry*. **279**, 53028-35.

35. Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B. & Bax, A. (1995) Solution structure of calcium-free calmodulin, *Nature structural biology*. **2**, 768-76.
36. Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. & Catterall, W. A. (2005) Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily, *Pharmacological reviews*. **57**, 387-95.
37. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel, *Nature*. **475**, 353-8.
38. Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy, *Nature*. **504**, 107-12.
39. Miyazaki, J., Jozaki, M., Nakatani, N., Watanabe, T., Saba, R., Nakada, K., Hirabayashi, T. & Yonemura, I. (1999) The structure of the avian fast skeletal muscle troponin T gene: seven novel tandem-arranged exons in the exon x region, *Journal of muscle research and cell motility*. **20**, 655-60.
40. Orlova, E. V., Serysheva, I., van Heel, M., Hamilton, S. L. & Chiu, W. (1996) Two structural configurations of the skeletal muscle calcium release channel, *Nature structural biology*. **3**, 547-52.
41. Samsó, M., Wagenknecht, T. & Allen, P. D. (2005) Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM, *Nature structural & molecular biology*. **12**, 539-44.
42. Samsó, M., Feng, W., Pessah, I. N. & Allen, P. D. (2009) Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating, *PLoS Biology*. **7(4)**, e1000085.
43. Marks, A. R. (1996) Cellular functions of immunophilins, *Physiological reviews*. **76**, 631-49.
44. Chelu, M. G., Danila, C. I., Gilman, C. P. & Hamilton, S. L. (2004) Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins, *Trends in cardiovascular medicine*. **14**, 227-34.
45. Collins, J. H. (1991) Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C

inhibitor, *Biochemical and biophysical research communications*. **178**, 1288-90.

46. Timerman, A. P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks, A. R. & Fleischer, S. (1993) The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry*. **268**, 22992-9.

47. Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S. E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosemblyt, N., Warren, M. S., He, K. L., Yi, G. H., Wang, J., Burkhoff, D., Vassort, G. & Marks, A. R. (2003) PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure, *The Journal of cell biology*. **160**, 919-28.

48. Mayrleitner, M., Timerman, A. P., Wiederrecht, G. & Fleischer, S. (1994) The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein: effect of FKBP-12 on single channel activity of the skeletal muscle ryanodine receptor, *Cell calcium*. **15**, 99-108.

49. Xiao, R. P., Valdivia, H. H., Bogdanov, K., Valdivia, C., Lakatta, E. G. & Cheng, H. (1997) The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca²⁺ release channel closure in rat heart, *The Journal of physiology*. **500 (Pt 2)**, 343-54.

50. Kaftan, E., Marks, A. R. & Ehrlich, B. E. (1996) Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels from cardiac muscle, *Circulation research*. **78**, 990-7.

51. Barg, S., Copello, J. A. & Fleischer, S. (1997) Different interactions of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors with FK-506 binding protein isoforms, *The American journal of physiology*. **272**, C1726-33.

52. Timerman, A. P., Onoue, H., Xin, H. B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G. & Fleischer, S. (1996) Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor, *The Journal of biological chemistry*. **271**, 20385-91.

53. Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosembliit, N. & Marks, A. R. (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts, *Cell*. **101**, 365-76.
54. Masumiya, H., Wang, R., Zhang, J., Xiao, B. & Chen, S. R. (2003) Localization of the 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6) binding site to the NH₂-terminal domain of the cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor), *The Journal of biological chemistry*. **278**, 3786-92.
55. Zissimopoulos, S. & Lai, F. A. (2005) Interaction of FKBP12.6 with the cardiac ryanodine receptor C-terminal domain, *The Journal of biological chemistry*. **280**, 5475-85.
56. Meissner, G. (1994) Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors, *Annual review of physiology*. **56**, 485-508.
57. Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Valdivia, H. H., Escobar, A. L., Györke, S. (2002) Luminal Ca²⁺ Controls Termination and Refractory Behavior of Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release in Cardiac Myocytes, *Circulation research*. **91**, 414-20.
58. Laver, D. R., Baynes, T. M. & Dulhunty, A. F. (1997) Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: evidence for two independent mechanisms, *The Journal of membrane biology*. **156**, 213-29.
59. Meissner, G. (2002) Regulation of mammalian ryanodine receptors, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **7**, d2072-80.
60. Suko, J., Maurer-Fogy, I., Plank, B., Bertel, O., Wyskovsky, W., Hohenegger, M. & Hellmann, G. (1993) Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor-calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase, *Biochimica et biophysica acta*. **1175**, 193-206.
61. Hain, J., Nath, S., Mayrleitner, M., Fleischer, S. & Schindler, H. (1994) Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle, *Biophysical journal*. **67**, 1823-33.

62. Igami, K., Yamaguchi, N. & Kasai, M. (1999) Regulation of depolarization-induced calcium release from skeletal muscle triads by cyclic AMP-dependent protein kinase, *The Japanese journal of physiology*. **49**, 81-7.
63. Sutherland, E. W. (1972) Studies on the mechanism of hormone action, *Science*. **177**, 401-8.
64. Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C. & Jones, L. R. (1991) Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity, *The Journal of biological chemistry*. **266**, 11144-52.
65. Ono, K., Yano, M., Ohkusa, T., Kohno, M., Hisaoka, T., Tanigawa, T., Kobayashi, S., Kohno, M. & Matsuzaki, M. (2000) Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) release in heart failure, *Cardiovascular research*. **48**, 323-31.
66. Lokuta, A. J., Rogers, T. B., Lederer, W. J. & Valdivia, H. H. (1995) Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism, *The Journal of physiology*. **487 (Pt 3)**, 609-22.
67. Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R. & Marks, A. R. (2004) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor, *Circulation research*. **94**, e61-70.
68. Meissner, G., Conner, G. E. & Fleischer, S. (1973) Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca²⁺ - pump and Ca²⁺ -binding proteins, *Biochimica et biophysica acta*. **298**, 246-69.
69. Wang, S., Trumble, W. R., Liao, H., Wesson, C. R., Dunker, A. K. & Kang, C. H. (1998) Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *Nature structural biology*. **5**, 476-83.
70. Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M. & Jones, L. R. (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane, *The Journal of biological chemistry*. **272**, 23389-97.

71. Kawasaki, T. & Kasai, M. (1994) Regulation of calcium channel in sarcoplasmic reticulum by calsequestrin, *Biochemical and biophysical research communications*. **199**, 1120-7.
72. Wei, L., Hanna, A. D., Beard, N. A. & Dulhunty, A. F. (2009) Unique isoform-specific properties of calsequestrin in the heart and skeletal muscle, *Cell calcium*. **45**, 474-84.
73. Gyorke, I., Hester, N., Jones, L. R. & Gyorke, S. (2004) The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium, *Biophysical journal*. **86**, 2121-8.
74. Jones, L. R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A. O. & Kelley, J. (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry*. **270**, 30787-96.
75. Guo, W., Jorgensen, A. O. & Campbell, K. P. (1994) Characterization and ultrastructural localization of a novel 90-kDa protein unique to skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry*. **269**, 28359-65.
76. Wei, L., Gallant, E. M., Dulhunty, A. F. & Beard, N. A. (2009) Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin, *The international journal of biochemistry & cell biology*. **41**, 2214-24.
77. Fan, G. C., Yuan, Q., Zhao, W., Chu, G. & Kranias, E. G. (2007) Junctin is a prominent regulator of contractility in cardiomyocytes, *Biochemical and biophysical research communications*. **352**, 617-22.
78. Callaway, C., Seryshev, A., Wang, J.P., Slavik, K.J., Needleman, D.H., (1994) Localization of the high and low affinity [3H]ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel, *The Journal of biological chemistry*. **269**, 15876-84.
79. Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q. Y. & Meissner, G. (1988) Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by

caffeine and related compounds, *Archives of biochemistry and biophysics*. **267**, 75-86.

80. Krebs, J. (1981) A survey of structural studies on calmodulin, *Cell calcium*. **2**, 295-311.

81. Kretsinger, R. H. (1972) Gene triplication deduced from the tertiary structure of a muscle calcium binding protein, *Nature New Biology*. **240**, 85-8.

82. Berchtold, M. W., Egli, R., Rhyner, J. A., Hameister, H. & Strehler, E. E. (1993) Localization of the human bona fide calmodulin genes *CALM1*, *CALM2*, and *CALM3* to chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3, *Genomics*. **16**, 461-5.

83. Crotti, L., Johnson, C. N., Graf, E., De Ferrari, G. M., Cuneo, B. F., Ovadia, M., Papagiannis, J., Feldkamp, M. D., Rathi, S. G., Kunic, J. D., Pedrazzini, M., Wieland, T., Lichtner, P., Beckmann, B. M., Clark, T., Shaffer, C., Benson, D. W., Kaab, S., Meitinger, T., Strom, T. M., Chazin, W. J., Schwartz, P. J. & George, A. L., Jr. (2013) Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants, *Circulation*. **127**, 1009-17.

84. Berg J. M., Tymoczko. J. L., Stryer L. (2005) *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

85. Tadross, M. R., Dick, I. E. & Yue, D. T. (2008) Mechanism of local and global Ca²⁺ sensing by calmodulin in complex with a Ca²⁺ channel, *Cell*. **133**, 1228-40.

86. Swindells, M. B. & Ikura, M. (1996) Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs, *Nature structural biology*. **3**, 501-4.

87. Chin, D. & Means, A. R. (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor, *Trends in Cell Biology*. **10**, 322-8.

88. Balshaw, D. M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D. A. & Meissner, G. (2001) Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor), *The Journal of biological chemistry*. **276**, 20144-53.

89. Buratti, R., Prestipino, G., Menegazzi, P., Treves, S. & Zorzato, F. (1995) Calcium dependent activation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by calmodulin, *Biochemical and biophysical research communications*. **213**, 1082-90.
90. Tripathy, A., Xu, L., Mann, G. & Meissner, G. (1995) Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor), *Biophysical journal*. **69**, 106-19.
91. Yang, H. C., Reedy, M. M., Burke, C. L. & Strasburg, G. M. (1994) Calmodulin interaction with the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium channel protein, *Biochemistry*. **33**, 518-25.
92. Fruen, B. R., Bardy, J. M., Byrem, T. M., Strasburg, G. M. & Louis, C. F. (2000) Differential Ca(2+) sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin, *American Journal Physiology Cell Physiology*. **279**, C724-33.
93. Protasi, F. (2002) Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **7**, d650-8.
94. Sham, J. S., Cleemann, L. & Morad, M. (1995) Functional coupling of Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**, 121-5.
95. Fill, M. (2003) Mechanisms that turn-off intracellular calcium release channels, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **8**, d46-54.
96. Zima, A. V., Picht, E., Bers, D. M. & Blatter, L. A. (2008) Termination of cardiac Ca²⁺ sparks: role of intra-SR [Ca²⁺], release flux, and intra-SR Ca²⁺ diffusion, *Circulation research*. **103**, e105-15.
97. Sobie, E. A., Dilly, K. W., dos Santos Cruz, J., Lederer, W. J. & Jafri, M. S. (2002) Termination of cardiac Ca(2+) sparks: an investigative mathematical model of calcium-induced calcium release, *Biophysical journal*. **83**, 59-78.
98. Lukyanenko, V., Wiesner, T. F. & Gyorke, S. (1998) Termination of Ca²⁺ release during Ca²⁺ sparks in rat ventricular myocytes, *The Journal of physiology*. **507 (Pt 3)**, 667-77.

99. Niggli, E. (2009) How to shut down Ca²⁺-induced Ca²⁺ release?, *The Journal of physiology*. **587**, 5003-4.
100. Domeier, T. L., Blatter, L. A. & Zima, A. V. (2009) Alteration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release termination by ryanodine receptor sensitization and in heart failure, *The Journal of physiology*. **587**, 5197-209.
101. Yang, Y., Guo, T., Oda, T., Chakraborty, A., Chen, L., Uchinoumi, H., Knowlton, A. A., Fruen, B. R., Cornea, R. L., Meissner, G. & Bers, D. M. (2014) Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound, and reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure, *Circulation research*. **114**, 295-306.
102. Tian, X., Tang, Y., Liu, Y., Wang, R. & Chen, S. R. (2013) Calmodulin modulates the termination threshold for cardiac ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release, *The Biochemical journal*. **455**, 367-75.
103. Harris, A. S., Croall, D. E. & Morrow, J. S. (1988) The calmodulin-binding site in alpha-fodrin is near the calcium-dependent protease-I cleavage site, *The Journal of biological chemistry*. **263**, 15754-61.
104. Buschmeier, B., Meyer, H. E. & Mayr, G. W. (1987) Characterization of the calmodulin-binding sites of muscle phosphofructokinase and comparison with known calmodulin-binding domains, *The Journal of biological chemistry*. **262**, 9454-62.
105. Brandt, N. R., Caswell, A. H., Brandt, T., Brew, K. & Mellgren, R. L. (1992) Mapping of the calpain proteolysis products of the junctional foot protein of the skeletal muscle triad junction, *The Journal of membrane biology*. **127**, 35-47.
106. Marks, A. R., Fleischer, S. & Tempst, P. (1990) Surface topography analysis of the ryanodine receptor/junctional channel complex based on proteolysis sensitivity mapping, *The Journal of biological chemistry*. **265**, 13143-9.
107. Nakai, J., Imagawa, T., Hakamat, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H. & Numa, S. (1990) Primary structure and functional expression from cDNA of

the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel, *FEBS letters*. **271**, 169-77.

108. Menegazzi, P., Larini, F., Treves, S., Guerrini, R., Quadroni, M. & Zorzato, F. (1994) Identification and characterization of three calmodulin binding sites of the skeletal muscle ryanodine receptor, *Biochemistry*. **33**, 9078-84.

109. Guerrini, R., Menegazzi, P., Anacardio, R., Marastoni, M., Tomatis, R., Zorzato, F. & Treves, S. (1995) Calmodulin binding sites of the skeletal, cardiac, and brain ryanodine receptor Ca²⁺ channels: modulation by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase?, *Biochemistry*. **34**, 5120-9.

110. Chen, S. R. & MacLennan, D. H. (1994) Identification of calmodulin-, Ca(2+)-, and ruthenium red-binding domains in the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry*. **269**, 22698-704.

111. Moore, C. P., Rodney, G., Zhang, J. Z., Santacruz-Toloza, L., Strasburg, G. & Hamilton, S. L. (1999) Apocalmodulin and Ca²⁺ calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel, *Biochemistry*. **38**, 8532-7.

112. Rodney, G. G., Moore, C. P., Williams, B. Y., Zhang, J. Z., Krol, J., Pedersen, S. E. & Hamilton, S. L. (2001) Calcium binding to calmodulin leads to an N-terminal shift in its binding site on the ryanodine Receptor, *The Journal of biological chemistry*. **276**, 2069-74.

113. Samsó, M. & Wagenknecht, T. (2002) Apocalmodulin and Ca²⁺-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor, *The Journal of biological chemistry*. **277**, 1349-53.

114. Wagenknecht, T., Radermacher, M., Grassucci, R., Berkowitz, J., Xin, H. B. & Fleischer, S. (1997) Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor, *The Journal of biological chemistry*. **272**, 32463-71.

115. Samsó, M., Trujillo, R., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H. & Wagenknecht, T. (1999) Three-dimensional location of the imperatoxin A binding site on the ryanodine receptor, *The Journal of cell biology*. **146**, 493-9.
116. Huang, X., Fruen, B., Farrington, D. T., Wagenknecht, T. & Liu, Z. (2012) Calmodulin-binding locations on the skeletal and cardiac ryanodine receptors, *The Journal of biological chemistry*. **287**, 30328-35.
117. Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D. A., Evans, K. E. & Meissner, G. (2003) Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor), *The Journal of biological chemistry*. **278**, 23480-6.
118. Xiong, L. W., Newman, R. A., Rodney, G. G., Thomas, O., Zhang, J. Z., Persechini, A., Shea, M. A. & Hamilton, S. L. (2002) Lobe-dependent regulation of ryanodine receptor type 1 by calmodulin, *The Journal of biological chemistry*. **277**, 40862-70.
119. Zhu, X., Ghanta, J., Walker, J. W., Allen, P. D. & Valdivia, H. H. (2004) The calmodulin binding region of the skeletal ryanodine receptor acts as a self-modulatory domain, *Cell calcium*. **35**, 165-77.
120. Zhang, H., Zhang, J. Z., Danila, C. I. & Hamilton, S. L. (2003) A noncontiguous, intersubunit binding site for calmodulin on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel, *The Journal of biological chemistry*. **278**, 8348-55.
121. Zhang, J. Z., Wu, Y., Williams, B. Y., Rodney, G., Mandel, F., Strasburg, G. M. & Hamilton, S. L. (1999) Oxidation of the skeletal muscle Ca²⁺ release channel alters calmodulin binding, *The American journal of physiology*. **276**, C46-53.
122. Porter Moore, C., Zhang, J. Z. & Hamilton, S. L. (1999) A role for cysteine 3635 of RYR1 in redox modulation and calmodulin binding, *The Journal of biological chemistry*. **274**, 36831-4.
123. Hussain, S. A., Dey, D., Chakraborty, S., Saha, J., Roy, A .D., Chakraborty, S., Debnath, P. & Bhattacharjee, D. (2014) Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) sensor, *Journal of Spectroscopy and Dynamics*, 1-16.

124. Huang, X., Liu, Y., Wang, R., Zhong, X., Liu, Y., Koop, A., Chen, S. R., Wagenknecht, T. & Liu, Z. (2013) Two potential calmodulin-binding sequences in the ryanodine receptor contribute to a mobile, intra-subunit calmodulin-binding domain, *Journal of Cell Science*. **126**, 4527-35.
125. Lau, K., Chan, M. M. & Van Petegem, F. (2014) Lobe-specific calmodulin binding to different ryanodine receptor isoforms, *Biochemistry*. **53**, 932-46.
126. Xiong, L., Zhang, J. Z., He, R. & Hamilton, S. L. (2006) A Ca²⁺-binding domain in RyR1 that interacts with the calmodulin binding site and modulates channel activity, *Biophysical journal*. **90**, 173-82.
127. Gangopadhyay, J. P. & Ikemoto, N. (2006) Role of the Met3534-Ala4271 region of the ryanodine receptor in the regulation of Ca²⁺ release induced by calmodulin binding domain peptide, *Biophysical journal*. **90**, 2015-26.
128. Gangopadhyay, J. P. & Ikemoto, N. (2008) Interaction of the Lys(3614)-Asn(3643) calmodulin-binding domain with the Cys(4114)-Asn(4142) region of the type 1 ryanodine receptor is involved in the mechanism of Ca²⁺/agonist-induced channel activation, *The Biochemical journal*. **411**, 415-23.
129. Tomaselli, G. F., Beuckelmann, D. J., Calkins, H. G., Berger, R. D., Kessler, P. D., Lawrence, J. H., Kass, D., Feldman, A. M. & Marban, E. (1994) Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization, *Circulation*. **90**, 2534-9.
130. Nass, R. D., Aiba, T., Tomaselli, G. F. & Akar, F. G. (2008) Mechanisms of disease: ion channel remodeling in the failing ventricle, *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. **5**, 196-207.
131. Shannon, T. R. & Lew, W. Y. (2009) Diastolic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum: a potential target for treating triggered arrhythmias and heart failure, *Journal of American Collage of Cardiology*. **53**, 2006-8.
132. Shan, J., Betzenhauser, M. J., Kushnir, A., Reiken, S., Meli, A. C., Wronska, A., Dura, M., Chen, B. X. & Marks, A. R. (2010) Role of chronic

ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and beta-adrenergic receptor blockade in mice, *Journal of Clinical Investigation*. **120**, 4375-87.

133. Kho, C., Lee, A. & Hajjar, R. J. (2012) Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling--targets for heart failure therapy, *Nature Reviews Cardiology*. **9**, 717-33.

134. Sainte Beuve, C., Allen, P. D., Dambrin, G., Rannou, F., Marty, I., Trouve, P., Bors, V., Pavie, A., Gandgjbakch, I. & Charlemagne, D. (1997) Cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in control and cardiomyopathic human hearts: mRNA and protein contents are differentially regulated, *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. **29**, 1237-46.

135. Hain, J., Onoue, H., Mayrleitner, M., Fleischer, S. & Schindler, H. (1995) Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle, *The Journal of biological chemistry*. **270**, 2074-81.

136. Xiao, B., Jiang, M. T., Zhao, M., Yang, D., Sutherland, C., Lai, F. A., Walsh, M. P., Warltier, D. C., Cheng, H. & Chen, S. R. (2005) Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure, *Circulation research*. **96**, 847-55.

137. Valdivia, H. H., Kaplan, J. H., Ellis-Davies, G. C. & Lederer, W. J. (1995) Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation, *Science*. **267**, 1997-2000.

138. Mackrill, J. J. (2010) Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets, *Biochemical Pharmacology*. **79**, 1535-43.

139. Lompre, A. M., Hajjar, R. J., Harding, S. E., Kranias, E. G., Lohse, M. J. & Marks, A. R. (2010) Ca²⁺ cycling and new therapeutic approaches for heart failure, *Circulation*. **121**, 822-30.

140. Wehrens, X. H., Lehnart, S. E. & Marks, A. R. (2005) Intracellular calcium release and cardiac disease, *Annual review of physiology*. **67**, 69-98.

141. Yano, M., Okuda, S., Oda, T., Tokuhisa, T., Tateishi, H., Mochizuki, M., Noma, T., Doi, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ikeda, Y., Ohkusa, T.,

Ikemoto, N. & Matsuzaki, M. (2005) Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure, *Circulation*. **112**, 3633-43.

142. Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M. & Pogwizd, S. M. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure, *Circulation research*. **97**, 1314-22.

143. Lemmens, K., Segers, V. F., Demolder, M. & De Keulenaer, G. W. (2006) Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk, *The Journal of biological chemistry*. **281**, 19469-77.

144. Gao, R., Zhang, J., Cheng, L., Wu, X., Dong, W., Yang, X., Li, T., Liu, X., Xu, Y., Li, X. & Zhou, M. (2010) A Phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure, *Journal of American College of Cardiology*. **55**, 1907-14.

145. Priori, S. G., Napolitano, C., Tiso, N., Memmi, M., Vignati, G., Bloise, R., Sorrentino, V. & Danieli, G. A. (2001) Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation*. **103**, 196-200.

146. Cerrone, M., Colombi, B., Santoro, M., di Barletta, M. R., Scelsi, M., Villani, L., Napolitano, C. & Priori, S. G. (2005) Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor, *Circulation research*. **96**, e77-82.

147. Yamaguchi, N., Takahashi, N., Xu, L., Smithies, O. & Meissner, G. (2007) Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel, *Journal of Clinical Investigation*. **117**, 1344-53.

148. Arnaiz-Cot, J. J., Damon, B. J., Zhang, X. H., Cleemann, L., Yamaguchi, N., Meissner, G. & Morad, M. (2013) Cardiac calcium signalling pathologies associated with defective calmodulin regulation of type 2 ryanodine receptor, *The Journal of physiology*. **591**, 4287-99.

149. Xu, X., Yano, M., Uchinoumi, H., Hino, A., Suetomi, T., Ono, M., Tateishi, H., Oda, T., Okuda, S., Doi, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ikeda, Y., Ikemoto, N. & Matsuzaki, M. (2010) Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction, *Biochemical and biophysical research communications*. **394**, 660-6.
150. Makita, N., Yagihara, N., Crotti, L., Johnson, C. N., Beckmann, B. M., Roh, M. S., Shigemizu, D., Lichtner, P., Ishikawa, T., Aiba, T., Homfray, T., Behr, E. R., Klug, D., Denjoy, I., Mastantuono, E., Theisen, D., Tsunoda, T., Satake, W., Toda, T., Nakagawa, H., Tsuji, Y., Tsuchiya, T., Yamamoto, H., Miyamoto, Y., Endo, N., Kimura, A., Ozaki, K., Motomura, H., Suda, K., Tanaka, T., Schwartz, P. J., Meitinger, T., Kaab, S., Guicheney, P., Shimizu, W., Bhuiyan, Z. A., Watanabe, H., Chazin, W. J. & George, A. L., Jr. (2014) Novel calmodulin mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility, *Circulation Cardiovascular Genetics*. **7**, 466-74.
151. Marsman, R. F., Barc, J., Beekman, L., Alders, M., Dooijes, D., van den Wijngaard, A., Ratbi, I., Sefiani, A., Bhuiyan, Z. A., Wilde, A. A. & Bezzina, C. R. (2014) A mutation in CALM1 encoding calmodulin in familial idiopathic ventricular fibrillation in childhood and adolescence, *Journal of the American College of Cardiology*. **63**, 259-66.
152. Nyegaard, M., Overgaard, M. T., Sondergaard, M. T., Vranas, M., Behr, E. R., Hildebrandt, L. L., Lund, J., Hedley, P. L., Camm, A. J., Wettrell, G., Fosdal, I., Christiansen, M. & Borglum, A. D. (2012) Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death, *American Journal of Human Genetics*. **91**, 703-12.
153. Blayney, L. M. & Lai, F. A. (2009) Ryanodine receptor-mediated arrhythmias and sudden cardiac death, *Pharmacology & Therapeutics*. **123**, 151-77.
154. Cordeiro, J. M., Perez, G. J., Schmitt, N., Pfeiffer, R., Nesterenko, V. V., Burashnikov, E., Veltmann, C., Borggrefe, M., Wolpert, C., Schimpf, R. & Antzelevitch, C. (2010) Overlapping LQT1 and LQT2 phenotype in a patient with long QT syndrome associated with loss-of-function variations in KCNQ1

and KCNH2, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **88**, 1181-90.

155. Ghosh, S., Nunziato, D. A. & Pitt, G. S. (2006) KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin, *Circulation research*. **98**, 1048-54.

156. Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A. & Keating, M. T. (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome, *Cell*. **80**, 805-11.

157. Wemhoner, K., Friedrich, C., Stallmeyer, B., Coffey, A. J., Grace, A., Zumhagen, S., Seebohm, G., Ortiz-Bonnin, B., Rinne, S., Sachse, F. B., Schulze-Bahr, E. & Decher, N. (2015) Gain-of-function mutations in the calcium channel CACNA1C (Cav1.2) cause non-syndromic long-QT but not Timothy syndrome, *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. **80**, 186-95.

158. Fukuyama, M., Wang, Q., Kato, K., Ohno, S., Ding, W. G., Toyoda, F., Itoh, H., Kimura, H., Makiyama, T., Ito, M., Matsuura, H. & Horie, M. (2014) Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes, *Europace*. **16**, 1828-37.

159. Chagot, B. & Chazin, W. J. (2011) Solution NMR structure of Apo-calmodulin in complex with the IQ motif of human cardiac sodium channel NaV1.5, *Journal of molecular biology*. **406**, 106-19.

160. Yus-Najera, E., Santana-Castro, I. & Villarroel, A. (2002) The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels, *The Journal of biological chemistry*. **277**, 28545-53.

161. Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C. & Keating, M. T. (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism, *Cell*. **119**, 19-31.

162. Knollmann, B. C., Chopra, N., Hlaing, T., Akin, B., Yang, T., Etensohn, K., Knollmann, B. E., Horton, K. D., Weissman, N. J., Holinstat, I., Zhang, W., Roden, D. M., Jones, L. R., Franzini-Armstrong, C. & Pfeifer, K. (2006) Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Journal of Clinical Investigation*. **116**, 2510-20.
163. Fernandez-Velasco, M., Rueda, A., Rizzi, N., Benitah, J. P., Colombi, B., Napolitano, C., Priori, S. G., Richard, S. & Gomez, A. M. (2009) Increased Ca²⁺ sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation research*. **104**, 201-9.
164. Hwang, H. S., Nitu, F. R., Yang, Y., Walweel, K., Pereira, L., Johnson, C. N., Faggioni, M., Chazin, W. J., Laver, D., George, A. L., Jr., Cornea, R. L., Bers, D. M. & Knollmann, B. C. (2014) Divergent regulation of ryanodine receptor 2 calcium release channels by arrhythmogenic human calmodulin missense mutants, *Circulation research*. **114**, 1114-24.
165. Nomikos, M., Thanassoulas, A., Beck, K., Vassilakopoulou, V., Hu, H., Calver, B. L., Theodoridou, M., Kashir, J., Blayney, L., Livaniou, E., Rizkallah, P., Nounesis, G. & Lai, F. A. (2014) Altered RyR2 regulation by the calmodulin F90L mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation and early sudden cardiac death, *FEBS letters*. **588**, 2898-902.
166. Sondergaard, M. T., Sorensen, A. B., Skov, L. L., Kjaer-Sorensen, K., Bauer, M. C., Nyegaard, M., Linse, S., Oxvig, C. & Overgaard, M. T. (2015) Calmodulin mutations causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia confer opposing functional and biophysical molecular changes, *FEBS Journal*. **282**, 803-16.
167. Limpitikul, W. B., Dick, I. E., Joshi-Mukherjee, R., Overgaard, M. T., George, A. L., Jr. & Yue, D. T. (2014) Calmodulin mutations associated with long QT syndrome prevent inactivation of cardiac L-type Ca(2+) currents and promote proarrhythmic behavior in ventricular myocytes, *Journal of Molecular Cell Cardiology*. **74**, 115-24.

168. Merrifield, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide., *Journal of the American Chemical Society*. **85**, 2149-54.
169. Chang, C. D., Waki, M., Ahmad, M., Meienhofer, J., Lundell, E. O. & Haug, J. D. (1980) Preparation and properties of Nalpha-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert.-butyl side chain protection, *International Journal of Peptide and Protein Research*. **15**, 59-66.
170. Huang, H. & Rabenstein, D. L. (1999) A cleavage cocktail for methionine-containing peptides, *Journal of Peptide Research*. **53**, 548-53.
171. Lim, C. K. (1986) HPLC of small molecules, a practical approach, *IRL press*.
172. L. Konermann, E. A., A.D. Rodriguez, S. Vahidi (2013) Unrevealing the mechanism of electrospray ionization, *Analitical Chemistry*. **85**, 2-9.
173. Wang, Z., Li, N., Wang, Y., Wu, Y., Mu, T., Zheng, Y., Huang, L. & Fang, X. (2012) Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification, *Protein Expresion and Purification*. **82**, 174-8.
174. Sperelakis, N. (1989) Physiology and Pathophysiology of the Heart, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers.
175. Meissner, G. (1975) Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles, *Biochimica et biophysica acta*. **389**, 51-68.
176. Howard, G. C., Bethell, D. R. (2000) Basic methods in antibody production and characterization, *CRC Press*.
177. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. **47**, 45-148.
178. Garnier, J., Osguthorpe, D. J. & Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins, *Journal of molecular biology*. **120**, 97-120.

179. Hopp, T. P. & Woods, K. R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **78**, 3824-8.
180. Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *Journal of molecular biology*. **157**, 105-32.
181. Ed Harlow, D. L. (1988) Antibodies, a laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory*.
182. Vaitukaitis, J. L. (1981) Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. *Methods in Enzymology*. **73**, 46-52.
183. Lequin, R. M. (2005) Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clinical Chemistry*. **51**, 2415-8.
184. Engvall, E. & Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry*. **8**, 871-4.
185. Van Weemen, B. K. & Schuurs, A. H. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS letters*. **15**, 232-236.
186. MacPhee, D. J. (2010) Methodological considerations for improving Western blot analysis, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **61**, 171-7.
187. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **76**, 4350-4.
188. Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Analytical Biochemistry*. **112**, 195-203.
189. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. (2009) Introduction to protein blotting, *Methods in Molecular Biology*. **536**, 9-22.

190. Van Eldik, L. J., Fok, K. F., Erickson, B. W. & Watterson, D. M. (1983) Engineering of site-directed antisera against vertebrate calmodulin by using synthetic peptide immunogens containing an immunoreactive site, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **80**, 6775-9.
191. Sacks, D. B., Porter, S. E., Ladenson, J. H. & McDonald, J. M. (1991) Monoclonal antibody to calmodulin: development, characterization, and comparison with polyclonal anti-calmodulin antibodies, *Analytical Biochemistry*. **194**, 369-77.
192. Ferderigos, N. & Zikos, C. (2011) Essays on Contemporary Peptide Science, *Research Signpost*.
193. VanScyoc, W.S., Sorensen, B. R., Rusinova, E., Laws, W.R., Ross, J.B. & Shea, M.A. (2002) Calcium binding to calmodulin mutants monitored by domain-specific intrinsic phenylalanine and tyrosine fluorescence, *Biophysical journal*. **83**, 2767-80.
194. Yamniuk, A. & Vogel, H. (2004) Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides, *Molecular Biotechnology*. **27**, 739-742.
195. Reedy, G. J., Boczek N.J., Etheridge, S.P. & Ackerman, M.J. (2015) CALM3 mutation associated with long QT syndrome, *Heart Rhythm*. **12(2)**, 419-422.
196. Vassilakopoulou, V., Calver, B. L., Thanassoulas, A., Beck, K., Hu, H., Buntwal, L., Smith, A., Theodoridou, M., Kashir, J., Blayney, L., Livaniou, E., Nounesis, G., Lai, F. A. & Nomikos, M. (2015) Distinctive malfunctions of calmodulin mutations associated with heart RyR2-mediated arrhythmic disease, *Biochimica et biophysica acta*. **1850**, 2168-76.
197. Kim, E. Y., Rumpf, C. H., Fujiwara, Y., Cooley, E. S., Van Petegem, F., Minor, Jr., D. L. (2008) Structures of CaV2 Ca²⁺/CaM-IQ domain complexes reveal binding modes that underlie calcium-dependent inactivation and facilitation, *Structure*. **16**, 1455-67.