



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών
Τμήμα Ιατρικής**



**Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών
Ακαδημίας Αθηνών
Κέντρο Βασικής Έρευνας**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ο ρόλος της myosrygn in vivo και η σημασία της
αλληλεπίδρασής της με τη δεσμίνη**

Τσούπρη Έλσα
Βιολόγος, MSc

Αθήνα, 2019



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών
Τμήμα Ιατρικής**



**Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών
Ακαδημίας Αθηνών
Κέντρο Βασικής Έρευνας**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ο ρόλος της myosrygn in vino και η σημασία της
αλληλεπίδρασής της με τη δεσμίνη**

Τσούπρη Έλσα
Βιολόγος, MSc

Αθήνα, 2019

Εργαστήριο Εκπόνησης Διδακτορικής Εργασίας:

Εργαστήριο Καθηγήτριας Γιασεμής Καπετανάκη, Ερευνήτρια Α΄, Αναπληρώτρια Διευθύντρια Κέντρου Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Επιστημονικώς Υπεύθυνη:

Καθηγήτρια Γιασεμή Καπετανάκη, Ερευνήτρια Α΄, Αναπληρώτρια Διευθύντρια Κέντρου Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σανούδου Δέσποινα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)

Καπετανάκη Γιασεμή: Καθηγήτρια και Ερευνήτρια Α΄, ΙΙΒΕΑΑ

Πάντος Κωνσταντίνος: Καθηγητής και Διευθυντής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σανούδου Δέσποινα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)

Καπετανάκη Γιασεμή: Καθηγήτρια και Ερευνήτρια Α΄, ΙΙΒΕΑΑ

Πάντος Κωνσταντίνος: Καθηγητής και Διευθυντής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ηλιοδρομίτης Ευστάθιος: Καθηγητής και Διευθυντής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Παπαπετρόπουλος Ανδρέας: Καθηγητής και Διευθυντής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Μαυροειδής Μανώλης: Ερευνητής Γ΄, ΙΙΒΕΑΑ

Βασιλάτης Δημήτριος: Ερευνητής Γ΄, ΙΙΒΕΑΑ

Ημερομηνία αιτήσεως της υποψήφιας: 19/01/2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 30/06/2011

Ημερομηνία ορισμού του θέματος της διατριβής: 27/07/2011

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 22/11/2019

Ημερομηνία υποστήριξης διδακτορικής διατριβής: 12/12/2019



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή χρηματοδοτήθηκε από την υποτροφία του ιδρύματος Μποδοσάκη στην Τσούπρη Έλσα και από τα ερευνητικά προγράμματα (PEP-ATT-39, ESPA SYNERGASIA SYN965, χορηγία Excellence II / ARISTEIA II 5342) στην Δρ. Γιασεμή Καπετανάκη, του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), στο εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Γιασεμής Καπετανάκη.

Με την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άτομα εκείνα που συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσά μου, Δρ. Γιασεμή Καπετανάκη, Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Κέντρου Βασικής Έρευνας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Καπετανάκη, καθώς η βοήθειά της και η καθοδήγησή της ήταν πολύτιμη και καθοριστική σε αυτό το μακρινό ταξίδι.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Δρ. Μανώλη Μαυροειδή, καθώς η βοήθειά του και η στήριξή του ήταν πολύ σημαντική σε διάφορα στάδια της παρούσας εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Ιωάννα Κωσταβασίλη, η οποία εκτός από την εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου μας ήταν πάντα φιλικά δίπλα μου σε ευχάριστες, αλλά και σε δύσκολες στιγμές. Επιπλέον, η βοήθεια της ήταν πολύτιμη σε διάφορα στάδια της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος επίσης τη Δρ. Δέσποινα Σανούδου, για τη βοήθεια και τη στήριξη όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Πολύ σημαντική υπήρξε για μένα η παρουσία στο εργαστήριο της Δρ. Στέλλας Τουρναβίτη, με την οποία συνεργάστηκα και ήταν πρόθυμη πάντα να με βοηθήσει, να μου μεταδώσει τις γνώσεις της, αλλά και να είναι πάντα φιλικά δίπλα μου σε αυτή τη διαδρομή. Με τη Δρ. Ζωή Γαλατά ήμασταν συνοδοιπόροι σε αυτό το μακρινό και δύσκολο ταξίδι και την ευχαριστώ για τη συμπαράσταση. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ. Ισμήνη Κλουκίνα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Δρ. Ελένη Βασιλάκη για την πολύτιμη συνεργασία, τη μεταλαμπάδευση τεχνικών των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, αλλά και τη φιλική διάθεση. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία, καθώς και τους διάφορους επιστήμονες του ΙΙΒΕΑΑ που είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ κατά τη διάρκεια των ερευνών.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, Δρ. Δέσποινα Σανούδου και Δρ. Κωνσταντίνο Πάντο, καθώς και της εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Ευστάθιο Ηλιοδρομίτη, Δρ. Ανδρέα Παπαπετρόπουλο, Δρ. Μανώλη Μαυροειδή και Δρ. Δημήτρη Βασιλάτη για το χρόνο που μου διέθεσαν για συζητήσεις και για τις συμβουλές τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο Ίδρυμα Μποδοσάκη για την οικονομική ενίσχυση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τη μητέρα μου και την αδερφή μου, το σύζυγό μου και την κορούλα μου, για τη θετική ενέργεια, την κατανόησή τους, την υπομονή τους, την υποστήριξη που μου παρείχαν ψυχολογική και όχι μόνο, καθώς και για τη συμπαράσταση στις δύσκολες στιγμές.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Περίληψη	14
Abstract	16
A. Εισαγωγή	18
Κεφάλαιο 1	
1. Καρδιαγγειακές παθήσεις	20
2. Μυοκαρδιοπάθειες	21
3. Ενδιάμεσα ινίδια	28
4. Ενδιάμεσα ινίδια και ασθένειες	29
5. Ασθένειες σχετιζόμενες με δεσμίνη-δεσμιοπάθειες	30
6. Ο μυς με έλλειψη δεσμίνης ως μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας	32
6.1 Η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε καρδιαγγειακές και σκελετικές ανωμαλίες	33
6.2 Η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο: ο ρόλος των μιτοχονδρίων	35
6.3 Προσεγγίσεις διάσωσης των διαταραχών του des-/- μυοκαρδίου	36
Κεφάλαιο 2	
7. Η δεσμίνη αλληλεπιδρά με την TRIM-like πρωτεΐνη myospryn	39
7.1 Το N-τελικό άκρο της δεσμίνης αλληλεπιδρά με την περιοχή SPRY της myospryn	41
7.2 Η myospryn συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη σε σχεδόν όλες τις μεμβράνες και τα μεμβρανώδη οργανίδια	42
8. Myospryn-δεσμίνη και λυσοσωμική σύνδεση	43
9. Η myospryn ως μυοειδική-AKAP πρωτεΐνη	45
9.1 PKA σηματοδότηση	45
9.2 Η μυοειδική AKAP myospryn	47
10. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της titin και calpain-3	48
11. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της calcineurin	49
12. Minispryn, ένα νέο παράλογο γονίδιο της myospryn	51
13. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη του υποδοχέα της ρυανοδίνης	52
14. Η εμπλοκή της myospryn σε ασθένειες	54
14.1 Η myospryn στη νόσο του καρδιακού μυός	54
14.2 Η myospryn στη νόσο του σκελετικού μυός	56
14.3 Η myospryn στη νευρωνική νόσο	57

Κεφάλαιο 3

15. Η οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών	61
16. Μεμβρανική μεταφορά	64
16.1 Ενδοκυττάρωση	64
16.2 Συμβατικό εκκριτικό μονοπάτι	66
17. Πρωτεΐνες Rab	68
18. Μη συμβατικό μονοπάτι έκκρισης πρωτεϊνών (UPS/ unconventional protein secretion)	69
19. Νέοι ρόλοι των ενδιάμεσων ινιδίων: εμπλοκή στη διαμετακίνηση κυστιδίων	71
19.1 Ενδοκυττάρωση και ενδιάμεσα ινίδια	72
19.2 Εξωκυττάρωση και ενδιάμεσα ινίδια	75
20. BLOC-1 σύμπλοκο	76
20.1 Το BLOC-1 και οι μηχανισμοί μεταφοράς συναπτικών κυστιδίων	77
20.2 Το BLOC-1 και οι κυτταροσκελετικοί μηχανισμοί	78
20.3 Το BLOC-1, η σύγκλιση και η σύντηξη μεμβρανών	79

Κεφάλαιο 4

21. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G (G-protein-coupled receptors/GPCRs)	82
22. Το αδρενεργικό ή συμπαθητικό νευρικό σύστημα (adrenergic nervous system/ANS)	85
23. Αδρενεργικοί υποδοχείς στην καρδιά	85
24. Αδρενεργικοί υποδοχείς στην καρδιακή ανεπάρκεια	87
25. Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης δεσμίνης-AKAP/myospryn στη ρύθμιση της PKA	90
26. Λειτουργίες των AKAPs στην καρδιά	91

Κεφάλαιο 5

27. Υπό συνθήκη αδρανοποίηση γονιδίων	98
28. Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος για την αδρανοποίηση του γονιδίου της myospryn	99
29. Τα συστήματα Tet-Off και Tet-On	100
29.1 Το Tet-off σύστημα	102
30. Αποσιωποητής της μεταγραφής (transcriptional terminator)	103
31. Ταυτόχρονη έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών - 2A ιικά πεπτίδια	106

Σκοπός	110
B. Υλικά και Μέθοδοι	
1. Μοριακή κλωνοποίηση	112
1.1 Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	112
1.2 Γέμισμα (fill in) των άκρων τμήματος DNA με το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I	113
1.3 Αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων του DNA με Antarctic φωσφατάση (Antarctic phosphatase)	113
1.4 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμλικής αλκοόλης	114
1.5 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	115
1.6 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε βακτηριακούς φορείς - Αντίδραση λιγάσης (ligation)	115
1.7 Δημιουργία δεκτικών στελεχών E. coli	118
1.8 Μετασχηματισμός δεκτικών στελεχών E.coli	119
1.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	119
1.10 Πιστοποίηση της κλωνοποιημένης αλληλουχίας (sequencing)	120
2. Ομόλογος ανασυνδυασμός με BAC κλώνο σε E.coli	121
2.1 Προσθήκη των περιοχών ομολογίας με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού σε βακτήρια	121
2.2 Προσθήκη περιοχών ομολογίας μήκους 50 βάσεων στην κασέτα 'tTA-PGK-neo-pA-term'	121
2.3 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση των βακτηρίων που φέρουν τον BAC κλώνο με το πλασμίδιο του Red/ET ανασυνδυασμού pSC101- BAD-gbaA	123
2.4 Ομόλογος ανασυνδυασμός των BAC κλώνων με την κασέτα '(2A)-tTA-PGK-neo-pA-term'	124
2.5 Απομόνωση DNA από BACs	125
2.6 Έλεγχος με PCR των ανασυνδυασμένων BAC κλώνων	126
3. Ομόλογος ανασυνδυασμός σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells/ESCs)	127
3.1 Εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts/MEFs)	127
3.2 Καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων	128
3.3 Ηλεκτρομετασχηματισμός και επιλογή ES κυττάρων	128
3.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από ES κύτταρα	130

3.5	Ενέσεις ES κυττάρων σε βλαστοκύστες και δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών	131
4.	Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών (founders)	131
5.	Τεχνικές Μοριακής Ανάλυσης	132
5.1	Απομόνωση γενωμικού DNA	132
5.2	Ανάλυση DNA	133
5.3	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	134
5.4	Ανάλυση κατά Southern	137
5.5	Σήμανση DNA με τη χρήση τυχαίων εναρκτήριων αλληλουχιών (random priming)	138
5.6	Απομόνωση RNA	140
5.7	Σύνθεση cDNA	141
5.8	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR, Q-PCR/quantitative PCR)	142
6.	Ανοσοαποτύπωση	144
6.1	Απομόνωση πρωτεϊνών	144
6.2	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	145
6.3	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)	146
6.4	Ηλεκτροφόρηση με αποδιατακτικούς παράγοντες (SDS PAGE)	147
6.5	Παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού (separation gel)	148
6.6	Παρασκευή του πηκτώματος επιστοίβαξης (stacking gel)	149
6.7	Προετοιμασία δειγμάτων	150
6.8	Μεταφορά σε μεμβράνη	150
6.9	Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)	151
7.	Ιστολογική Μελέτη	153
7.1	Έγκλειση ιστών σε παραφίνη και τμήση σε μικροτόμο	153
7.2	Τομές σε μικροτόμο παραφίνης	154
7.3	Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των ιστών	154
7.4	Χρώση με αιματοξυλίνη/εωζίνη	155
7.5	Χρώση Τριχρωμίας Masson	155
7.6	Μικροσκοπία	156
8.	Ανοσοϊστοχημεία/ ανοσοφθορισμός	156
8.1	Έγκλειση ιστών σε O.C.T (BDH) και παρασκευή τομών σε κρυοστάτη	156
8.2	Επώαση των τομών με πρώτα αντισώματα	157
8.3	Μικροσκοπία	159

9. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία	160
9.1 Μονιμοποίηση του ιστού και έγκληση σε μίγμα εποξικών ρητινών Epon/Araldite	160
10. Ηχοκαρδιογραφία και Ανάλυση Doppler	161
11. Πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από νεογέννητα ποντίκια	162
12. Το σύστημα Langendorff	164
12.1 Εμποτισμός της καρδιάς στη συσκευή Langendorff	165
13. Κυτταρομετρία Ροής (Flow cytometry)	166
14. Μέτρηση κυκλικού AMP (cAMP)	168
Γ. Αποτελέσματα	
Μελέτη του ρόλου της δεσμίνης και της AKAP-myospryn στη β-αδρενεργική σηματοδότηση με <i>in vitro</i> και <i>ex vivo</i> προσεγγίσεις	171
1. Μελέτη της έκφρασης των β1 και β2 αδρενεργικών υποδοχέων	171
2. Μελέτη της απόκρισης στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη, <i>in vitro</i> και <i>ex vivo</i>	173
2.1 Τα des-/- μυοκαρδιοκύτταρα έχουν υψηλό ρυθμό σύσπασης και δεν αποκρίνονται στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη	173
2.2 Οι des-/- <i>ex-vivo</i> καρδιές (3 μηνών) εμφανίζουν υψηλό καρδιακό παλμό και σύσπαση και δεν αποκρίνονται στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη	174
2.3 Ο υψηλός ρυθμός σύσπασης των des-/- μυοκαρδιοκυττάρων και η απευαισθητοποίηση στον β-αδρενεργικό αγωνιστή-ισοπροτερενόλη λαμβάνει χώρα πιθανόν μέσω των β2-ARs	176
3. Τα des-/- NCMC έχουν υψηλά επίπεδα c-AMP, τα οποία δεν μεταβάλλονται σημαντικά έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη	177
4. Η ανακύκλωση του β2 αδρενεργικού υποδοχέα είναι επηρεασμένη στα des-/- μυοκαρδιοκύτταρα	179
Δημιουργία μοντέλων ποντικών για τις <i>in vivo</i> μελέτες	183
5. Σύνοψη στρατηγικής για την απενεργοποίηση του γονιδίου της myospryn	183
5.1 Κατασκευή του φορέα στόχευσης της TIGRE σειράς διαγονιδιακών ποντικών	184
5.1.1 Κλωνοποίηση του τμήματος A του cDNA της myospryn στον TOPO XL φορέα	186
5.1.2 Κλωνοποίηση του τμήματος B του cDNA της myospryn στον TOPO XL/A φορέα	188
5.1.3 Κλωνοποίηση του τμήματος C του cDNA της myospryn στον TOPO XL A/B φορέα	190
6. Υποκλωνοποίηση του φορέα στόχευσης από τον TOPO XL στον pGlnZ φορέα	192

7. Δημιουργία της TIGRE διαγονιδιακής σειράς - tetOmyo	196
8. Κατασκευή του φορέα στόχευσης της myospryn knock out σειράς ποντικών	197
8.1 Κατασκευή του φορέα στόχευσης μέσω ανασυνδυασμού σε BAC κλώνους	197
8.2 Κατασκευή του φορέα στόχευσης μέσω μοριακής κλωνοποίησης	198
8.2.1 Κλωνοποίηση της 5kb περιοχής ομολογίας της myospryn στον TOPO XL φορέα	200
8.2.2 Κλωνοποίηση της 3kb περιοχής ομολογίας της myospryn στον TOPO XL/5ARM φορέα	202
8.2.3 Κλωνοποίηση της κασέτας έκφρασης (CST) στον TOPO XL 5/3 ARM φορέα	203
9. Ομόλογος ανασυνδυασμός του φορέα στόχευσης της myospryn knock out σειράς στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES)	206
10. Δημιουργία της Knock-out σειράς/ Myospryn+/- και Myospryn-/-	208
11. Πιστοποίηση της δημιουργίας των myosp+/- και myosp-/- ποντικών	211
12. Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων και των μεταγράφων στα διάφορα μοντέλα ποντικών	212
13. Η απουσία της myospryn προκαλεί διατακτική μυοκαρδιοπάθεια	214
13.1 Η απουσία της myospryn προκαλεί ίνωση στο μυοκάρδιο και ανωμαλίες στους θαλάμους της myosp-/- καρδιάς	214
13.2 Λειτουργικές διαταραχές της myosp-/- καρδιάς	217
14. Η απουσία της myospryn δεν επηρεάζει την οργάνωση της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων	225
15. Ο απεντοπισμός του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2) στο myosp-/- μυοκάρδιο	228
16. Η απουσία της myospryn οδηγεί σε αλλοίωση της δομής των εμβόλιμων δίσκων	230
17. Το μυοκάρδιο των myosp-/- ποντικών εμφανίζει σοβαρές δομικές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια	232
18. Η υπερδομή των μεμβρανών του σαρκοπλασματικού δικτύου και των T-σωληνίσκων είναι διαταραγμένη στο μυοκάρδιο των myosp-/- ποντικών	235
19. Η υπερδομή των πυρήνων στο μυοκάρδιο των myosp+/- και myosp-/- ποντικών είναι επηρεασμένη	236
20. Οι σκελετικοί μύες των myosp-/- ποντικών εμφανίζουν σοβαρές δομικές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια	237
21. Μελέτη της βιογένεσης των μιτοχονδρίων στα myosp-/- ποντικά	239

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
1. Η έλλειψη της <i>myospryn</i> δεν προκαλεί εμβρυονική θνησιμότητα στα ποντίκια	242
2. Τεχνικές προκλήσεις για τη δημιουργία του <i>myospryn</i> null μοντέλου	243
3. Το νεοδημιουργηθέν <i>myospryn</i> null μοντέλο διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας	244
4. Η <i>myospryn</i> δεν είναι απαραίτητη για την οργάνωση της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων	246
5. Η απουσία της <i>myospryn</i> επηρεάζει τον εντοπισμό του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2)	248
6. Η υπερδομή των <i>myospryn</i> null μεμβρανικών οργανιδίων είναι διαταραγμένη	249
6.α Μιτοχονδριακές ανωμαλίες	249
6.β Ανωμαλίες σαρκοπλασματικού δικτύου και T-σωληνίσκων	251
7. Πιθανή σύνδεση της <i>myospryn</i> με τις MAMs	252
8. Νέοι ρόλοι των TRIM πρωτεϊνών στην αυτοφαγία	257
9. Το ικρίωμα δεσμίνης-AKAP/ <i>myospryn</i> στη β-AR σηματοδότηση	260
Ε. Συμπεράσματα - Καινοτομίες	264
ΣΤ. Προτεινόμενο μοντέλο του ικρίωματος <i>myospryn</i>-δεσμίνης στην εναρμόνιση ζωτικής σημασίας διεργασιών των μυοκαρδιοκυττάρων	267
Z. Βιβλιογραφία	269
Η. Παράρτημα	301
Θ. Αναρτημένες παρουσιάσεις	327
Ι. Δημοσιεύσεις	327

Περίληψη

Η TRIM-like πρωτεΐνη myospryn αποτελεί μια αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της δεσμίνης και αρχικά αναγνωρίστηκε ως συνδεδεμένος συνεργάτης της πρωτεΐνης dysbindin του BLOC-1 (Biogenesis of Lysosomes Related Organelles Complex 1), εμπλέκοντάς την στη διαμετακίνηση κυστιδίων και τη βιογένεση και/ή την τοπολόγηση οργανιδίων. Η myospryn αντιπροσωπεύει επίσης μια μυοειδική πρωτεΐνη AKAP (πρωτεΐνη πρόσδεσης στην κινάση), αυξάνοντας την πιθανότητα ότι μαζί με τη δεσμίνη και άλλα κυτταροσκελετικά και σηματοδοτικά μόρια θα μπορούσε να συμμετάσχει στην υποκυτταρική στόχευση της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) στο γραμμωτό μυ. Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα δεδομένα, επιδιώξαμε να διαλευκάνουμε τον ρόλο της myospryn στην καρδιά και τη βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης myospryn-δεσμίνης. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιήσαμε τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* στρατηγικές. Με *in vitro* προσεγγίσεις μελετήσαμε τη σημασία της αλληλεπίδρασης δεσμίνης-AKAP/myospryn στη ρύθμιση του PKA μονοπατιού. Χρησιμοποιήσαμε πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων και δείξαμε ότι η έλλειψη της δεσμίνης επηρεάζει τουλάχιστον τον ρυθμό σύσπασης, την ανακύκλωση του β2 αδρενεργικού υποδοχέα και τη συσσώρευση του cAMP, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο της δεσμίνης και της αλληλεπίδρασης δεσμίνης-AKAP/myospryn στην ορθή σύζευξη β-AR/αδενυλικής κυκλάσης και στην απευαισθητοποίηση του υποδοχέα που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας λόγω έλλειψης της δεσμίνης. Με *in vivo* προσεγγίσεις, διασαφήνισαμε περαιτέρω το ρόλο της myospryn στην καρδιά και τη βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης myospryn-δεσμίνης. Αδρανοποιήσαμε τη myospryn στα ποντίκια μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESC) και η επιτυχία του ομόλογου ανασυνδυασμού ήταν μόλις 0,9%. Η μελέτη μας είναι η πρώτη παγκόσμια περιγραφή της δημιουργίας του myospryn knockout μοντέλου ποντικίου, αποδεικνύοντας ότι, η απουσία της myospryn δεν προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα στα ποντίκια. Η έλλειψη της myospryn προκαλεί διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, η οποία χαρακτηρίζεται από λεπύνση των τοιχωμάτων και διάταση του ιστού, ανωμαλίες στους θαλάμους της καρδιάς (αμφικολπική διάταση), ίνωση και διαταραχή της καρδιακής λειτουργίας. Η ανάλυση της υπερδομής ανέδειξε ότι η οργάνωση των σαρκομεριδίων δεν επηρεάζεται εμφανώς, με τα μυοϊνίδια να είναι καλά πακεταρισμένα και

οργανωμένα, ωστόσο, η ακεραιότητα των εμβόλιμων δίσκων (ID) είναι αλλοιωμένη. Το πιο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι οι σοβαρές ανωμαλίες στην υπερδομή των μιτοχονδρίων στον καρδιακό και σκελετικό μυ των *myosp-/-* ποντικών, με περίεργα ενδομιτροχονδριακά έγκλειστα κυστίδια και εκτεταμένο εκφυλισμός των πτυχώσεων που συχνά συνοδεύονται από διόγκωση του σαρκοπλασματικού δικτύου (ΣΔ) και των T-σωληνίσκων, χωρίς να αποκλείεται η ανώμαλη μιτοφαγία. Συνολικά, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν έναν πιθανό ρόλο της *myosp* μαζί με τη δεσμίνη στη φυσική και λειτουργική σύνδεση του ΣΔ δικτύου και των μιτοχονδρίων μέσω των MAMs (mitochondrial-associated ER membranes).

Abstract

The TRIM-like protein myospryn is a desmin associated protein, initially identified as an associated partner to the BLOC-1 (Biogenesis of Lysosomes Related Organelles Complex 1) protein dysbindin, implicating its potential involvement in vesicle trafficking and organelle biogenesis and/or positioning. Myospryn is also an AKAP protein (A Kinase Anchoring Protein) raising the possibility that together with desmin and other cytoskeletal and signaling proteins, it could participate in the subcellular targeting of protein kinase A (PKA) activity in striated muscle. Considering the previous data, we sought to unveil the role of myospryn in heart and the biological significance of myospryn-desmin association. To address this we have used both *in vivo* and *in vitro* strategies. With *in vitro* approaches we have studied the importance of desmin-AKAP/myospryn interaction in the regulation of PKA pathway. We used neonatal cardiomyocytes and showed that desmin deficiency affects at least the beating rate, the recycling of the β_2 adrenergic receptor and cyclic-AMP accumulation, suggesting a potential role of desmin and desmin-AKAP/myospryn association in proper β -AR/adenylate cyclase coupling and receptor desensitization that might contribute to heart failure development due to desmin deficiency. With *in vivo* approaches, we further elucidated the role of myospryn in heart and the biological significance of myospryn-desmin association. We genetically inactivated myospryn in mice via homologous recombination in embryonic stem cells (ESCs) with the efficiency of homologous recombination being only 0,9%. This is the first worldwide description of the generation of myospryn knockout mouse, which by itself demonstrated that, the absence of myospryn does not cause embryonic lethality in mice. The absence of myospryn causes dilated cardiomyopathy, characterized by wall thinning and dilation, abnormalities in heart chambers (by-atrial dilation), fibrosis and compromised cardiac function. Ultrastructural analyses revealed that the sarcomere organization is not obviously affected, with the myofibrils being well packaged and organized, however, intercalated disk (ID) integrity is impaired. The most important finding of the present study is the severe mitochondrial defects with abnormal internal mitochondrial vacuoles and extensive cristolysis, often accompanied by swollen sarcoplasmic reticulum (SR) and T-tubules, without excluding abnormal mitophagy. Overall, our data imply a potential

link of myospryn together with desmin to SR-mitochondrial physical and functional cross-talk through MAMs (mitochondrial-associated ER membranes).

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κεφάλαιο 1

- 1. Καρδιαγγειακές παθήσεις**
- 2. Μυοκαρδιοπάθειες**
- 3. Ενδιάμεσα ινίδια**
- 4. Ενδιάμεσα ινίδια και ασθένειες**
- 5. Ασθένειες σχετιζόμενες με δεσμίνη-δεσμινοπάθειες**
- 6. Ο μυς με έλλειψη δεσμίνης ως μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας**
 - 6.1 Η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε καρδιαγγειακές και σκελετικές ανωμαλίες*
 - 6.2 Η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο: ο ρόλος των μιτοχονδρίων*
 - 6.3 Προσεγγίσεις διάσωσης των διαταραχών του des-/- μυοκαρδίου*

1. Καρδιαγγειακές παθήσεις

Η καρδιαγγειακή νόσος (Cardiovascular disease/CVD) αποτελεί μια ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων. Πρόκειται για την πιο κοινή αιτία θανάτου στο Δυτικό κόσμο, αλλά και την κύρια αιτία θανάτου σε ολόκληρο τον κόσμο, καθώς οι περισσότεροι άνθρωποι πεθαίνουν ετησίως από καρδιαγγειακά νοσήματα, από ό,τι από οποιαδήποτε άλλη αιτία. Σύμφωνα με τις στατιστικές, κυρίως από την Ευρώπη (Timmis A et al. 2018) και τις ΗΠΑ (Benjamin EJ et al. 2018), παρόλο που παρατηρείται μείωση της θνησιμότητας, λόγω καρδιαγγειακής νόσου, παραμένει η κύρια αιτία θανάτου στις ΗΠΑ και αντιπροσωπεύει το 74,2% όλων των εγγεγραμμένων θανάτων. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization/WHO), υπολογίζεται ότι 17,9 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από καρδιαγγειακά νοσήματα το 2016, που αντιστοιχούσαν στο 31% όλων των θανάτων παγκοσμίως. Από αυτούς τους θανάτους, το 85% οφείλεται σε καρδιακή προσβολή και εγκεφαλικό επεισόδιο.

Στην Ευρώπη, κάθε χρόνο οι καρδιαγγειακές νόσοι προκαλούν πάνω από 4,3 εκατομμύρια θανάτους και στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2015 οι θάνατοι ανήρθαν σε 1,91 εκατομμύρια. Πιο συγκεκριμένα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 36,7% όλων των θανάτων προκαλείται από καρδιαγγειακές νόσους - σημαντικά υψηλότερο από τη δεύτερη μεγαλύτερη αιτία θανάτου, τον καρκίνο (κακοήθη νεοπλασμάτα, 25,4%) (Timmis A et al. 2018; Cardiovascular disease statistics/Eurostat 2018; http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/). Οι νόσοι αυτοί επιβαρύνουν σημαντικά τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης και τους κρατικούς προϋπολογισμούς, με το συνολικό κόστος να υπολογίζεται περίπου στα 169 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως (ή κατά μέσο όρο 372 ευρώ ανά κάτοικο) σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία των καρδιαγγειακών νόσων στην Ευρώπη (Cardiovascular disease statistics/Eurostat 2018).

Στην Ελλάδα σύμφωνα με τα στοιχεία από την ελληνική καρδιολογική εταιρεία, ο ρυθμός θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα είναι κατά μέσο όρο 485 θάνατοι ανά 100.000 άνδρες και 391 θάνατοι ανά 100.000 γυναίκες (Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση 2018).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η πιο συχνή μακροπρόθεσμη επιπλοκή των καρδιαγγειακών νόσων και η κύρια αιτία θανάτου είναι η καρδιακή ανεπάρκεια (Heart Failure/HF). Πιο συγκεκριμένα, η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα κλινικό

σύνδρομο που προκαλείται από δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες στο μυοκάρδιο, με αποτέλεσμα την εξασθένηση της κοιλιακής πλήρωσης ή της εξώθησης του αίματος (Inamdar AA and Inamdar AC, 2016).

Εύλογα προκύπτει, ότι το κόστος σε ανθρώπινες ζωές, αλλά και για την οικονομία είναι τεράστιο και δυσβάσταχτο. Τα στοιχεία εντείνουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της αιτίας πρόκλησης των καρδιαγγειακών παθήσεων για την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων για έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία.

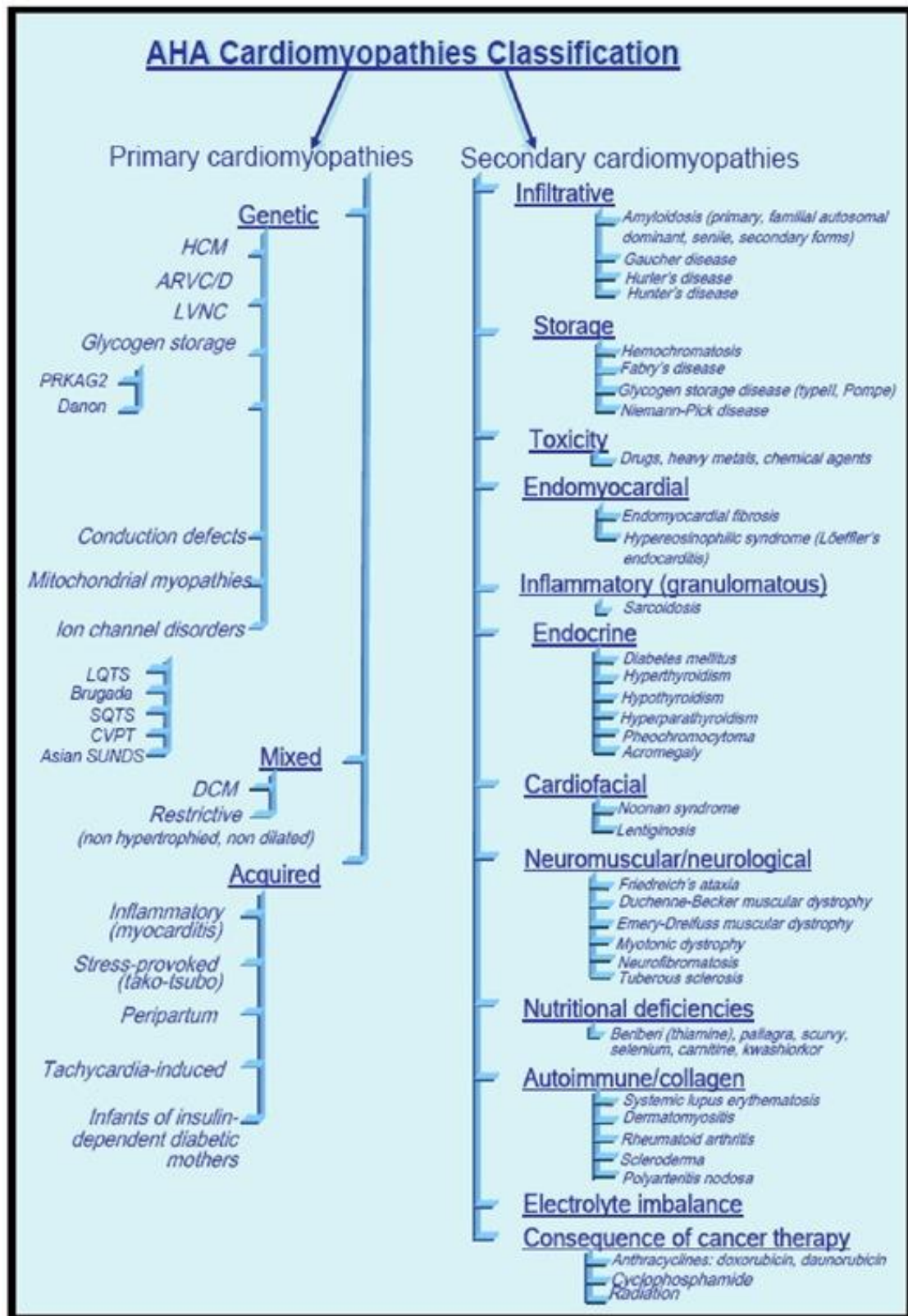
2. Μυοκαρδιοπάθειες

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων καρδιακής ανεπάρκειας προέρχεται από διαταραχές στη λειτουργία του καρδιακού μυ και χαρακτηρίζονται ως μυοκαρδιοπάθειες. Ειδικότερα, οι μυοκαρδιοπάθειες αποτελούν μια ομάδα ετερογενών καρδιακών παθήσεων που επηρεάζουν τόσο τη συστολική, όσο και τη διαστολική λειτουργία της καρδιάς και μπορεί να προκαλέσουν χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Οι μυοκαρδιοπάθειες κυριαρχούν στο γενικό πληθυσμό, με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας και συμβάλλουν σχεδόν στο 20% των αιφνίδιων καρδιακών θανάτων σε νεαρά άτομα (Li CJ et al. 2019). Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Καρδιολογική Ένωση, οι μυοκαρδιοπάθειες κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με το όργανο που επηρεάζεται, τις πρωτοπαθείς και τις δευτεροπαθείς (Πίνακας 1). Οι πρωτοπαθείς μυοκαρδιοπάθειες, είναι αυτές οι οποίες περιορίζονται είτε αποκλειστικά, είτε κυρίως στον καρδιακό μυ και είναι σχετικά λιγότερες σε αριθμό. Οι δευτεροπαθείς μυοκαρδιοπάθειες παρουσιάζουν παθολογική εμπλοκή του μυοκαρδίου, ως μέρος ενός μεγάλου αριθμού και ποικιλίας πολυσυστημικών διαταραχών. Οι πρωτοπαθείς μυοκαρδιοπάθειες κατατάσσονται περαιτέρω σε γενετικές, μικτού τύπου και επίκτητες. Οι δευτεροπαθείς μυοκαρδιοπάθειες χωρίζονται στις διηθητικές, εναποθέσεως, τοξικότητας, ενδομυοκαρδίου, φλεγμονώδεις, ενδοκρινικές, cardio-facial σύνδρομο, νευρομυϊκές/νευρολογικές, διατροφικές ανεπάρκειες, αυτοάνοσες/κολλαγόνου, ανισορροπίας ηλεκτρολυτών και σε μυοκαρδιοπάθειες έπειτα από θεραπεία για καρκίνο (ΑΗΑ).

Η κατηγοριοποίηση των μυοκαρδιοπαθειών, όπως αυτή έχει γίνει από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τις κατατάσει στις ακόλουθες 5 κατηγορίες: 1) Διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (Dilated cardiomyopathy/DCM), 2) Υπερτροφική (Hypertrophic cardiomyopathy/HCM), 3) Περιοριστική (Restrictive cardiomyopathy/RCM), 4) Αρρυθμογενής δυσπλασία δεξιάς κοιλίας (Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy/ ARVD/C) και 5) Μη ταξινομημένη μυοκαρδιοπάθεια. Η πιο κοινή από τις προαναφερθείσες μυοκαρδιοπάθειες είναι η Υπερτροφική (HCM) (60% του συνόλου) και η πιο σπάνια η περιοριστική (RCM) (5% του συνόλου) (WHO, Braunwald E, 2017).

Το 2013, ο Arbustini και οι συνεργάτες πρότειναν την ταξινόμηση MOGE(S) για τις μυοκαρδιοπάθειες, που υιοθετήθηκε από την Παγκόσμια Ομοσπονδία Καρδιάς (World Heart Federation). Το σύστημα αυτό στοχεύει στην περιγραφή μυοκαρδιοπαθειών με την ενσωμάτωση πληροφοριών για το φαινότυπο, την εξωκαρδιακή συμμετοχή, το πρότυπο μετάδοσης και το γονότυπο. Πιο συγκεκριμένα, το Μ αναφέρεται στον φαινότυπο (π.χ. DCM, HCM), το Ο αναφέρεται στην εμπλοκή οργάνων (πχ. με/χωρίς εξωκαρδιακή εμπλοκή), το G αναφέρεται στη γενετική μετάδοση (πχ. αυτοσωματικό επικρατές ή υπολειπόμενο), το E αναφέρεται στην παθογένεση (πχ. γενετική με γονίδιο ασθένειας και μετάλλαξη, εάν είναι γνωστή) και το S αναφέρεται στο στάδιο της νόσου. Κάθε γράμμα στην ταξινόμηση MOGE(S) έχει σαφώς καθορισμένους δείκτες, οι οποίοι παρέχουν χρήσιμες λεπτομέρειες (Arbustini E et al. 2013; Rizzo S et al. 2019).

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των μυοκαρδιοπαθειών σύμφωνα με την Αμερικάνικη Καρδιολογική Ένωση.



Τα τελευταία 20 χρόνια, έχει καταστεί σαφής ο ρόλος πολυάριθμων πρωτεϊνών που προκαλούν μυοκαρδιοπάθειες και ως εκ τούτου καρδιακή ανεπάρκεια. Στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται τα γονίδια-στόχοι μεταλλάξεων σε διάφορες μυοκαρδιοπάθειες (Πίνακες 2, 3, 4, 5 και 6). Η γενετική ποικιλομορφία των μυοκαρδιοπαθειών και οι αλληλεπικαλυπτόμενες εκδηλώσεις τους, έχουν επισημάνει τους τρέχοντες περιορισμούς της συμβατικής μορφολογικής ταξινόμησης. Μπορούμε να εκμεταλευτούμε αυτή τη μεταβλητότητα της έκφρασης και του φαινοτύπου, για να κατανοήσουμε τους τροποποιητές της νόσου.

Πίνακας 2: Γονίδια-στόχοι μεταλλάξεων που ευθύνονται για τη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια
(Cahill TJ et al. 2013; Dal Ferro M et al. 2019; Li CJ et al. 2019).

<i>Disease Genes</i>	<i>Official symbol</i>
Force generation/regulation	
Actin, α , cardiac muscle 1	ACTC1
Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, α	MYH6
Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, β	MYH7
Myosin-binding protein C3	MYBPC3
Troponin T type 2 (cardiac)	TNNT2
Troponin I type 3 (cardiac)	TNNI3
Troponin C type 1 (slow)	TNNC1
Tropomyosin 1	TPM1
Myopalladin	MYPN
Phospholamban	PLN
Force transduction/mechanosensing	
Titin	TTN
Dystrophin	DMD
Sarcoglycan, Δ (35kDa dystrophin associated glycoprotein)	SGCD
Desmin	DES
Filamin-C	FLNC
Nexilin	NEXN
Nebulette	NEBL
Plakophilin-2	PKP2
Desmoplakin	DSP
Desmocollin-2	DSC2
Desmoglein-2	DSG2
Junction plakoglobin	JUP
Nuclear proteins/transcription	
Lamin A/C	LMNA
Other	
RNA-binding motif protein 20	RBM20
Implicated but not yet supported by linkage/co-segregation	
Actinin, $\alpha 2$	ACTN2
Vinculin	VCL
Thymopoetin	TMPO
Titin-cap	TCAP
BCL2-associated athanogene 3	BAG3
LIM-domain binding 3	LDB3
Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	ANKRD1
Ion channel-related genes	
Ryanodine Receptor 2	RyR2
Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5	SCN5A

Πίνακας 3: Επιπλέον, γονίδια-στόχοι μεταλλάξεων που ευθύνονται για τη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (Li CJ et al. 2019).

<i>Disease Genes</i>	<i>Official symbol</i>
EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4	EYA4
Cysteine and glycine rich protein 3	CSRP3
Integrin linked kinase	ILK
PDZ and LIM domain 3	PDLIM3
ATP binding cassette subfamily C member 9	ABCC9
Laminin subunit alpha 4	LAMA4
Cardiotrophin 1	CTF1
DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C19	DNAJC19
Crystallin alpha B	CRYAB
Emerin	EMD
Four and a half LIM domains 2	FHL2
Fukutin	FKTN
Forkhead box D4	FOXD4
Lysosomal associated membrane protein 2	LAMP2
Presenilin 1	PSEN1
Presenilin 2	PSEN2
Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	SDHA
Spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1	SYNE1
Spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2	SYNE2
Tafazzin	TAZ

Πίνακας 4: Γονίδια-στόχοι μεταλλάξεων που ευθύνονται για την υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια (Cahill TJ et al. 2013; Florescu C 2018; Li CJ et al. 2019).

<i>Disease Genes</i>	<i>Official symbol</i>
Sarcomeric	
Actin, α , cardiac muscle 1	ACTC1
Actinin, $\alpha 2$	ACTN2
Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, α	MYH6
Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, β	MYH7
Myosin-binding protein C3	MYBPC3
Troponin T type 2 (cardiac)	TNNT2
Troponin I type 3 (cardiac)	TNNI3
Troponin C type 1 (slow)	TNNC1
Tropomyosin 1	TPM1
Myosin, light chain 2, regulatory, cardiac slow	MYL2
Myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	MYL3
Myosin light chain kinase 2	MYLK2
Titin	TTN
Telethonin	TCAP
Vinculin	VCL
Crystallin alpha B	CRYAB
Myozenin 2	MYOZ2
Nexilin	NEXN
Ankyrin repeat domain 1	ANKRD1
Non-Sarcomeric	
Cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	CSRP3
LIM domain binding 3	LDB3
Caveolin 3	CAV3
Cytochrome c oxidase assembly homolog	COX15
Junctophilin 2	JPH2
Phospholamban	PLN

Hypertrophic cardiomyopathy phenocopies	
Protein kinase, AMP-activated, γ 2 noncatalytic subunit	PRKAG2
Lysosomal-associated membrane protein 2	LAMP2
Galactosidase, α	GLA
Four-and-a-half LIM domains 1	FHL1

Πίνακας 5: Γονίδια-στόχοι μεταλλάξεων που ευθύνονται για την αρρυθμογενή μυοκαρδιοπάθεια
(Cahill TJ et al. 2013; Vimalanathan AK et al. 2018; Li CJ et al. 2019).

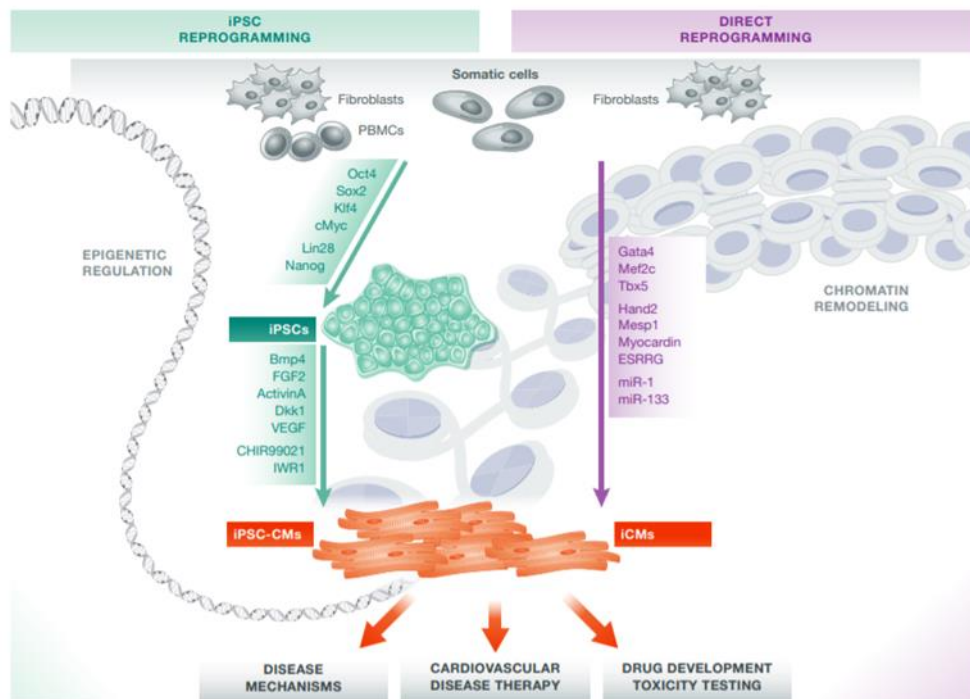
<i>Disease Genes</i>	<i>Subcellular localization</i>	<i>Official symbol</i>
Plakoglobin	Desmosome	JUP
Desmoplakin	Desmosome	DSP
Plakophilin-2	Desmosome	PKP2
Desmoglein-2	Desmosome	DSG2
Desmocollin-2	Desmosome	DSC2
N-Cadherin	Area composita	CDH2
Alpha-T-catenin	Area composita	CTNNA3
Desmin	Intermediate filament	DES
Titin	Sarcomere	TTN
Lamin A/C	Nuclear envelope	LMNA
Transmembrane protein 43	Nuclear envelope	TMEM43
Phospholamban	Sarcoplasmic reticulum	PLN
Ryanodine receptor 2	Sarcoplasmic reticulum	RyR2
Sodium voltage-gated channel alpha subunit 5	Sodium channel	SCN5A
Transforming growth factor β 3	Growth factor	TGFB3
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 3		ARVC3
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 6		ARVC6

Πίνακας 6: Γονίδια-στόχοι μεταλλάξεων που ευθύνονται για την περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια
(Kostareva A et al. 2016; Wang S and Peng D, 2017; Li CJ et al. 2019).

<i>Disease genes</i>	<i>Official symbol</i>
Troponin I	TNNI3
Troponin T	TNNT2
α -Cardiac actin	ACTC
α -Tropomyosin	TPM1
β -Myosin heavy chain	MYH7
Ventricular myosin essential light chain	MYL3
Ventricular myosin regulatory light chain	MYL2
Myosin-binding protein C	MYBPC3
Titin	TTN
Myopalladin	MYPN
Desmin	DES
α B-crystallin	CRYAB
Transthyretin	TTR
Lysosomal-associated membrane protein 2	LAMP2
Filamin C	FLNC
Lamin A/C	LMNA
Vitamin B6 transporter	TPN1

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing/NGS) θα οδηγήσει στον εντοπισμό επιπλέον γενετικών παραλλαγών που τροποποιούν τον φαινότυπο των μυοκαρδιοπαθειών (Parikh VN and Ashley EA, 2017). Έτσι, ενώ οι εξελίξεις στη μοριακή γενετική των καρδιαγγειακών παθήσεων μεταβάλλουν σταδιακά την κλασική κατανόηση των μυοκαρδιοπαθειών και τη φαινοτυπική προσέγγιση στην κλινική πράξη, προς το παρόν είναι απίθανο να οδηγήσουν σε μια πλήρη εναλλαγή από θεραπείες που βασίζονται στο φαινότυπο, σε θεραπείες που βασίζονται στο γονότυπο.

Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη μια ολοκληρωμένη κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της παθογένειας, με την ενσωμάτωση των γενετικών, επιγενετικών, μεταγραφικών και πρωτεϊνικών τροποποιήσεων που οδηγούν στην ασθένεια και η ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών στρατηγικών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας. Προς την κατεύθυνση αυτή, τα ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (hPSCs), ιδιαίτερα τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells/iPSCs), έχουν λάβει τεράστια προσοχή στην καρδιαγγειακή αναγεννητική ιατρική, λόγω της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε λειτουργικά μυοκαρδιοκύτταρα και άλλους καρδιαγγειακούς κυτταρικούς τύπους (Ebert AD et al. 2015; Chen H et al. 2018). Παρά τις πιθανές εφαρμογές τους για αναγέννηση ιστών σε ασθενείς που πάσχουν από καρδιαγγειακή νόσο, παραμένει ασαφές αν οι θεραπείες με βάση τα κύτταρα αυτά μπορεί να είναι ασφαλείς και αποτελεσματικές, καθώς λείπουν στοιχεία από κλινικές δοκιμές. Οι κρίσιμοι παράγοντες που περιορίζουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα είναι ο βαθμός ωριμότητας και καθαρότητας των διαφοροποιημένων απογόνων προερχόμενων από τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, οι ανοσολογικές παρενέργειες και ο ογκογονικός κίνδυνος που σχετίζεται με υπολειμματικά αδιαφοροποίητα κύτταρα (Ebert AD et al. 2015; Chen H et al. 2018). Αυτές οι προκλήσεις μπορούν να ξεπεραστούν με τον άμεσο επαναπρογραμματισμό (direct reprogramming), επίσης γνωστό ως μεταδιαφοροποίηση (trans-differentiation), των διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων σε μια διαφορετική, διακριτή σωματική μοίρα, χωρίς να περάσει πρώτα μέσω μιας πολυδύναμης κατάστασης (Ebert AD et al. 2015).



Εικόνα 1: Δημιουργία και εφαρμογές των μυοκαρδιοκυττάρων του ίδιου του ασθενή (**patient specific**). Από απομονωμένα κύτταρα από τον ίδιο τον ασθενή, όπως ινοβλάστες από το δέρμα ή μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells/PBMCs), μπορούν να δημιουργηθούν μυοκαρδιοκύτταρα, μέσω iPSC επαναπρογραμματισμού και την επακόλουθη διαφοροποίηση σε iPSC-CMs (induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes) ή μέσω της μεταδιαφοροποίησης σε iCMs (induced cardiomyocytes) (Ebert AD et al. 2015).

3. Ενδιάμεσα ινίδια

Ο κυτταροσκελετός των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελείται από τρία συστήματα ινιδίων: τα μικροϊνίδια ακτίνης, τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα ινίδια. Τα τρία συστήματα ινιδίων, μαζί με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτά, καθώς και άλλα μόρια συνδέτες (cytolinkers) δημιουργούν ένα σύνθετο δίκτυο υπεύθυνο για τη μηχανική ακεραιότητα του κυττάρου, αλλά και για πολλές άλλες λειτουργίες και ιδιότητες, όπως η κυτταρική διαίρεση, η κινητικότητα, η ελαστικότητα, η μεταφορά και η διάταξη των οργανιδίων (Houseweart MK and Cleveland DW, 1998; Fuchs E and Karakesisoglou I, 2001).

Τα ενδιάμεσα ινίδια εκφράζονται σε ένα πρότυπο ειδικό για τον ιστό και το κυτταρικό διαμέρισμα (Fuchs E and Cleveland DW, 1998). Υπάρχουν περισσότερες

από 75 διαφορετικές πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων, οι οποίες ταξινομούνται σε έξι ομάδες (τύπους) σύμφωνα με την ομολογία της αλληλουχίας τους (sequence homology class: SHC) (Sanghvi-Shah R and Weber GF, 2017). Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων παρουσιάζεται παρακάτω, στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Κατηγορίες πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων (Sanghvi-Shah R and Weber GF, 2017).

Τύπος ενδιάμεσων ινιδίων	Γενική κατηγοριοποίηση	Πρωτεΐνες μέλη ενδιάμεσων ινιδίων
Τύπου I	Κερατίνες όξινες	28 μέλη
Τύπου II	Κερατίνες βασικές	26 μέλη
Τύπου III	Ειδικά σε μυς και νευρώνες ή καθολικά	Δεσμίνη, GFAP, peripherin, vimentin syncoilin
Τύπου IV	Κυρίως σε νευρώνες και σε κάποιους μυς	Νευροινίδια, nestin, synemin a, synemin b, a-internexin
Τύπου V	Ενδιάμεσα ινίδια του πυρήνα	Lamins (A, B1, B2, C1, C2)
Τύπου VI	Ενδιάμεσα ινίδια φακού οφθαλμού	Phakinin (CP49), filensin

4. Ενδιάμεσα ινίδια και ασθένειες

Οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων είναι κρίσιμοι ρυθμιστές στην υγεία και στις ασθένειες. Η ανακάλυψη εκατοντάδων μεταλλάξεων σε γονίδια των ενδιάμεσων ινιδίων και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν συνδεθεί με πληθώρα ανθρώπινων ασθενειών, όπως, μεταξύ άλλων, μυοκαρδιοπάθειες, μυϊκές δυστροφίες, προγηρία, ασθένειες με φλύκταινες της επιδερμίδας και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Κατά την τελευταία ενημέρωση της βάσης δεδομένων ενδιάμεσων ινιδίων στον άνθρωπο, 119 διαφορετικές ασθένειες έχουν συνδεθεί με την οικογένεια γονιδίων των ενδιάμεσων ινιδίων στον άνθρωπο (<http://www.interfil.org/index.php>, Ιούλιος 2019).

Η κλινική εκδήλωση των διαφόρων ασθενειών εξαρτάται από τη διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων. Επιπλέον, η θέση της μετάλλαξης μέσα στη πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της σοβαρότητας της ασθένειας. Οι αιτίες των ασθενειών των ενδιάμεσων ινιδίων καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα γενετικών αλλαγών, περιλαμβάνοντας μεταλλάξεις χωρίς νόημα (non-sense mutation) ή μεταλλάξεις που αλλοιώνουν την αλληλουχία των αμινοξέων (missense mutation),

διαγραφές και διπλασιασμούς γονιδίων ή ακόμα και συνδυασμούς αυτών. Οι μεταλλάξεις γενικά περιλαμβάνουν πολλά αμινοξέα που καλύπτουν ολόκληρο το μόριο, ενώ υπάρχουν μερικά σημεία όπου συμβαίνουν πολλές μεταλλάξεις.

Οι κυριότερες πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων που έχουν συνδεθεί με μυοκαρδιοπάθειες και καρδιακή ανεπάρκεια είναι η δεσμίνη και η πυρηνική λαμίνη, μεταλλάξεις των οποίων προκαλούν δεσμινοπάθειες και λαμινοπάθειες αντίστοιχα. Οι μελέτες τόσο στην υγιή, όσο και στην παθολογική καρδιά, έχουν αποδείξει τη σημασία των δικτύων αυτών των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων στην ενδοκυτταρική και διακυτταρική ενσωμάτωση της δομής και της λειτουργίας, της μηχανικής μεταγωγής και της γονιδιακής ενεργοποίησης, της διαφοροποίησης και επιβίωσης των μυοκαρδιοκυττάρων, της μιτοχondριακής ομοιόστασης και της ρύθμισης του μεταβολισμού. Ο υψηλός συντονισμός όλων αυτών των διεργασιών είναι μεγάλης σημασίας για τη διατήρηση της σωστής, διαρκούς και συνεχούς συστολής του εξαιρετικά οργανωμένου καρδιακού μυός και κατά συνέπεια μιας υγιούς καρδιάς (Omary MB, 2009; Capetanaki Y et al. 2015; Tsikitis M et al. 2018).

5. Ασθένειες σχετιζόμενες με δεσμίνη-δεσμινοπάθειες

Η μυοπάθεια που σχετίζεται με δεσμίνη ή η δεσμινοπάθεια (Desmin-related myopathy/DRM or desminopathy) είναι μια αυτοσωμική κληρονομούμενη μυοπάθεια του σκελετικού και καρδιακού μυός, που προκαλείται από την ύπαρξη δυσλειτουργικού δικτύου της δεσμίνης, κυρίως λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο της ή λόγω μετά μεταφραστικών τροποποιήσεων στην πρωτεΐνη (Dalakas MC et al. 2000). Η δεσμινοπάθεια θεωρείται ως μια υποομάδα μίας γενετικά ετερογενούς ομάδας νευρομυϊκών διαταραχών που ονομάζονται μυοϊνώδεις μυοπάθειες (myofibrillar myopathies/MFM) (Selcen D, 2011) και εκτός από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο της δεσμίνης, προκαλούνται επίσης από μεταλλάξεις στην αB-κρυσταλλίνη, στη δυστροφίνη, στη filamin-C, στη myotilin, στις ZASP, BAG3, FHL1, VCP, plectin και nebulin (Vicart P et al. 1998; Selcen D and Engel AG, 2003; Goldfarb LG et al. 2008; Goldfarb LG and Dalakas MC, 2009; Hernandez DA et al. 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι χαρακτηρίζονται από την αποδιοργάνωση του δικτύου της δεσμίνης και την παρουσία σαρκοπλασματικών συσσωματωμάτων που περιέχουν δεσμίνη με εκφυλιστικές μεταβολές στο δίκτυο των μυοϊνιδίων (Schroder R and Schoser B,

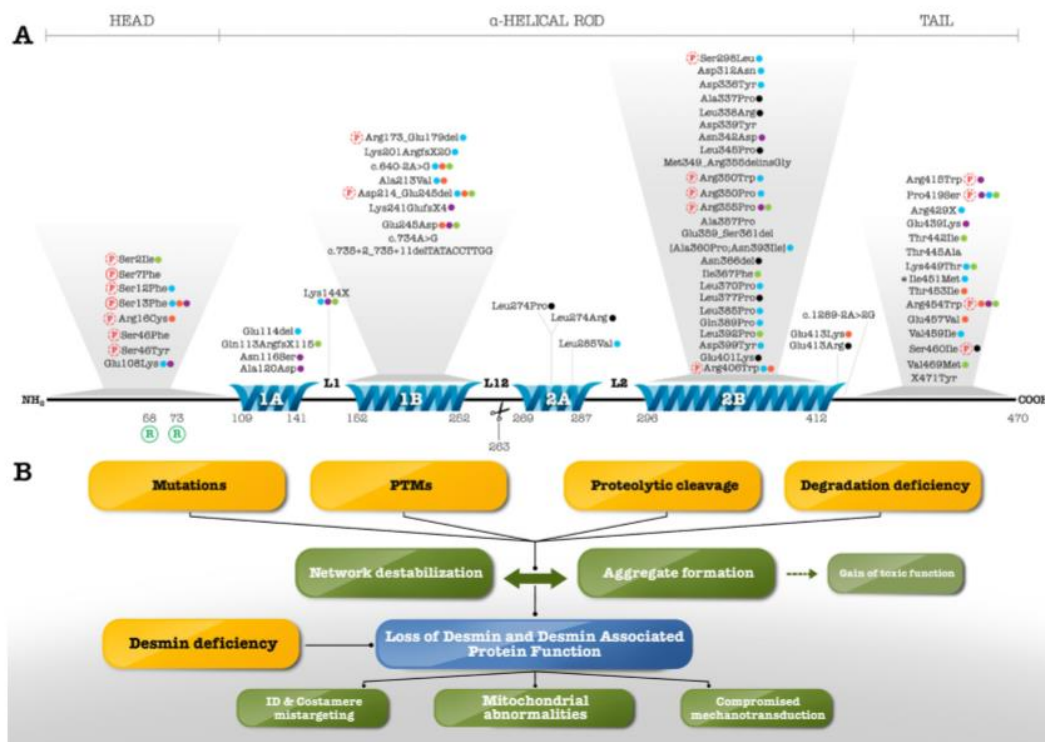
2009; Selcen D, 2011), οι οποίες φαίνεται να είναι δευτερεύουσες του θανάτου των μυοκυττάρων που προκαλούνται στις περισσότερες περιπτώσεις από μιτοχονδριακά ελαττώματα (Capetanaki Y et al. 2007; Capetanaki Y et al. 2015).

Έχουν ταυτοποιηθεί 73 μεταλλάξεις της δεσμίνης, οι οποίες σχετίζονται με δεσμινοπάθειες (Clemen CS et al. 2013; Capetanaki Y et al. 2015; Tsikitis M et al. 2018). Οι μεταλλάξεις αυτές συνοψίζονται στην Εικόνα 2, όπου φαίνεται ότι η πλειοψηφία τους έχει βρεθεί στην κεντρική ραβδόμορφη περιοχή και λιγότερες στην κεφαλή και την ουρά του μορίου. Η πλειονότητα των μεταλλάξεων (53 μεταλλάξεις από τις 73) στο γονίδιο της δεσμίνης είναι σημειακές παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations) που οδηγούν σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος (Εικόνα 2). Μια μετα-ανάλυση συσχετισμού φαινοτύπου-γονότυπου έδειξε ότι ασθενείς με κυρίαρχη μετάλλαξη στο τμήμα της έλικας “rod 2B” της δεσμίνης εμφάνισαν ανωμαλίες των σκελετικών και καρδιακών μυών (90%), ενώ οι περισσότεροι ασθενείς με απομονωμένα καρδιολογικά προβλήματα είχαν μετάλλαξη στην κεφαλή ή στην ουρά (65%) (van Spaendonck-Zwarts KY et al. 2011). Τέλος, μια μετα-ανάλυση 159 ασθενών με 40 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της δεσμίνης (van Spaendonck-Zwarts KY et al. 2011) έδειξε ότι το 50% των φορέων μεταλλάξεων της δεσμίνης είχαν μυοκαρδιοπάθεια, κυρίως DCM (17%), RCM (12% και HCM (6%) και σε μικρότερο βαθμό ARVC (1%) και περίπου το 60% είχαν ασθένεια του συστήματος αγωγιμότητας ή αρρυθμίες με κολποκοιλιακό αποκλεισμό.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των δεσμινοπαθειών είναι τα συσσωματώματα πρωτεϊνών θετικά για δεσμίνη, καθώς και τα κοκκοϊνώδη και άμορφα υλικά. Επιπρόσθετα, μοντέλα δεσμινοπαθειών παρουσιάζουν υπερτροφία των μυοκυττάρων, αποδιοργάνωση των μυοϊνιδίων, διαταραγμένο πυρηνικό σχήμα των μυοκυττάρων, εκφυλισμό των κυστιδίων του κυτταροπλάσματος, διαταραχές των εμβόλιμων δίσκων, ανωμαλίες στη μιτοχονδριακή οργάνωση και λειτουργία και ίνωση (Goldfarb LG and Dalakas MC, 2009; Capetanaki Y et al. 2007; Capetanaki Y et al. 2015; Tsikitis M et al. 2018).

Σε μεγάλο βαθμό η κατανόηση των μηχανισμών της λειτουργίας της δεσμίνης τόσο στην υγεία, όσο και στην ασθένεια προέρχεται από μελέτες με μοντέλα ποντικών με έλλειψη της δεσμίνης και από διαγονιδιακά μοντέλα με μεταλλάξεις της δεσμίνης. Το γεγονός ότι τα ποντίκια με έλλειψη δεσμίνης, όπως θα αναφερθούμε και εκτενέστερα παρακάτω, προφανώς απαλλαγμένα από τα συσσωματώματα της δεσμίνης, αναπτύσσουν μυοκαρδιοπάθεια και σκελετική μυοπάθεια (Milner DJ et

al.1996; Milner DJ et al. 1999), υποδηλώνουν έντονα ότι ο υποκείμενος μηχανισμός της παρατηρούμενης παθολογίας είναι ως επί το πλείστον η αποδιοργάνωση του δικτύου της δεσμίνης και οι επιπτώσεις που έχει αυτό στα μόρια και στα οργανίδια με τα οποία αλληλεπιδρά η δεσμίνη.



Εικόνα 2: Μεταλλάξεις στο γονίδιο της δεσμίνης που σχετίζονται με ασθένειες. A) Παρουσιάζονται οι γνωστές μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο της δεσμίνης στον άνθρωπο. Η πλειοψηφία τους εντοπίζεται στην κεντρική περιοχή και συγκεκριμένα στο τμήμα 2B, αλλά ανιχνεύονται επίσης μεταλλάξεις στα τμήματα της κεφαλής και της ουράς (Goldfarb LG and Dalakas MC, 2009; Capetanaki Y et al. 2007; Capetanaki Y et al. 2015; Tsikitis M et al. 2018). B) Διάγραμμα που συνοψίζει τους μηχανισμούς που προκαλούν αποδιοργάνωση του δικτύου της δεσμίνης και τα κυτταρικά προβλήματα που προκύπτουν από την απώλεια της λειτουργίας της δεσμίνης και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με δεσμίνη (Capetanaki Y et al. 2015).

6. Ο μυς με έλλειψη δεσμίνης ως μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας

Παρά το γεγονός ότι έχει γίνει πρόοδος στην κατανόηση των πρωτεϊνών των σαρκομεριδίων, του κυτταροσκελετού και των δεσμοσωμάτων, ως την κύρια αιτία των κληρονομήσιμων μορφών υπερτροφικής, διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας και της αρρυθμογενούς δυσπλασίας δεξιάς κοιλίας αντίστοιχα, δεν έχουν διαλευκανθεί οι

μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι διάφορες μεταλλάξεις οδηγούν στους παρατηρούμενους φαινοτύπους. Επιπρόσθετα, δεν έχουν ταυτοποιηθεί οι μοριακοί και κυτταρικοί στόχοι που επηρεάζονται, έτσι ώστε να μπορούν να εξηγηθούν τα ειδικά γνωρίσματα των φαινοτύπων αυτών, όπως ο εκφυλισμός του μυοκαρδίου, η ίνωση, η ασβεστίωση, ο αιφνίδιος θάνατος κ.α, το οποίο βέβαια θα επέτρεπε μια πιο στοχευμένη θεραπευτική στρατηγική.

Προς την κατεύθυνση αυτή το εργαστήριό μας δημιούργησε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με έλλειψη του μυοειδικού ενδιάμεσου ινιδίου της δεσμίνης (desmin null ή des^{-/-}). Η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της δεσμίνης μέσω γονιδιακής στόχευσης οδηγεί σε διατακτική καρδιομυοπάθεια, εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια (Milner DJ et al. 1996; Milner DJ et al. 1999). Τα des^{-/-} ποντίκια είναι γόνιμα, βιώσιμα και δεν διαφέρουν ανατομικά από τα ετερόζυγα αδέρφια τους, εκτός από ένα πολύ μικρό ποσοστό ποντικών που εμφανίζει ελαφρώς μειωμένο μέγεθος (Milner DJ et al. 1996; Milner DJ et al. 1999). Στη συνέχεια, θ' αναφερθούμε λεπτομερώς στα χαρακτηριστικά του πειραματικού αυτού μοντέλου.

6.1 Η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε καρδιαγγειακές και σκελετικές ανωμαλίες

Το μοντέλο αυτό εμφανίζει προβλήματα και στους τρεις τύπους μυός, με τα πιο σοβαρά προβλήματα να εμφανίζονται στον καρδιακό μυ, όπου παρατηρείται εκτενής θάνατος των μυοκαρδιοκυττάρων και διάταξη των θαλάμων της καρδιάς, καθώς και εναπόθεση ασβεστίου και ινώδους ιστού στις νεκρωτικές περιοχές (Milner DJ et al. 1996). Ειδικότερα, η απουσία της δεσμίνης επιφέρει εκτεταμένο εκφυλισμό και έντονη αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής τόσο του καρδιακού, όσο και του σκελετικού μυός, όπως έχει δειχθεί από ιστολογικές αναλύσεις και μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στα des^{-/-} ποντίκια. Οι δομικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν απώλεια της αγκυροβόλησης των μυϊκών ινών στο σαρκείλημα, διαταραχή της πλευρικής στοίχισης των μυϊκών ινών, της οργάνωσης και του αριθμού των μιτοχονδρίων, ανωμαλίες στους εμβόλιμους δίσκους, καθώς και αλλαγή της θέσης και του σχήματος του πυρήνα (Milner DJ et al. 1996; Capetanaki Y et al. 1997). Ειδικότερα, οι εμβόλιμοι δίσκοι είναι αρκετά συχνά κατεστραμμένοι, τα δεσμοσώματα δεν είναι εύκολα ορατά στο ποντίκι χωρίς δεσμίνη, ενώ οι στενοσυνδέσεις εμφανίζουν αρκετά συχνά μεγάλο διακυτταρικό χάσμα (Panagopoulou P et al. 2008; Papathanasiou S et al. 2015).

Επιπλέον, η δεσμίνη είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική έκταση και συστολή των μυοϊνιδίων, αλλά και για τη διατήρηση του μυϊκού ιστού, καθώς οι σκελετικοί μύες των des-/- ποντικών εμφανίζουν εντονότερη ακαμψία από τους αντίστοιχους άγριου τύπου (Anderson J et al. 2002). Απουσία δεσμίνης, η συνοχή των μυοϊνιδίων είναι μειωμένη, ο όγκος τους ελαφρώς αυξημένος, ενώ η τοπολογία των πυρήνων των μυϊκών ινών επηρεάζεται σημαντικά (Shah SB et al. 2004).

Παρόμοιες πειραματικές προσεγγίσεις αποκάλυψαν διαταραχές και στο λείο μυ που δεν εκφράζει δεσμίνη. Εντονότερες βλάβες παρατηρούνται στην αορτή, όπου παρουσιάζεται υποπλασία και χαλαρή οργάνωση των λείων μυϊκών κυττάρων, απώλεια του πυρηνικού σχήματος, μερικός εκφυλισμός και κενά γύρω από τον πυρήνα των μυϊκών ινών. Στους υπόλοιπους λείους μύες οι ανωμαλίες εμφανίζονται ηπιότερες σε γενικό πλαίσιο, με κοινό χαρακτηριστικό την χαλαρή κυτταρική οργάνωση και την υποπλασία (Milner DJ et al. 1996). Ωστόσο, η μυοκαρδιοπάθεια λόγω της έλλειψης της δεσμίνης δεν οφείλεται σε αγγειακές ανωμαλίες, καθώς η στοχευμένη έκφραση της δεσμίνης, μόνο στα μυοκαρδιοκύτταρα, επαναφέρει το φυσιολογικό φαινότυπο, αποδεικνύοντας ότι η απουσία της από την καρδιά και όχι τους λείους μυς, είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση μυοκαρδιοπάθειας (Weisleder N et al. 2004a).

Στις καρδιές των des-/- ποντικών παρατηρείται διάταση, με μέτρια ή και σοβαρή λέπτυνση του μυοκαρδιακού τοιχώματος. Σε μερικές περιπτώσεις ο εκφυλισμός του μυοκαρδίου μπορεί να φθάσει σε επικίνδυνα επίπεδα που είναι ικανά να οδηγήσουν σε διάρρηξή του (Milner DJ et al. 1999; Capetanaki Y. 2000). Επίσης, οι des-/- καρδιές είναι μεγαλύτερες του φυσιολογικού, ενώ η μεγέθυνση μπορεί να είναι πιο έντονη σε ποντίκια που πεθαίνουν είτε λόγω ξαφνικού θανάτου, είτε λόγω καταπόνησης από έντονη άσκηση (κολύμβηση). Από τον πρώτο μήνα και μετέπειτα οι des-/- μυες εμφανίζουν αύξηση περίπου 20% του λόγου βάρους καρδιάς προς βάρους σώματος, χαρακτηριστικό της καρδιακής υπερτροφίας. Μορφομετρικός χαρακτηρισμός απομονωμένων des-/- μυοκαρδιοκυττάρων, έδειξε 24% αύξηση στον κυτταρικό όγκο, εξαιτίας αύξησης κατά την εγκάρσια διάμετρο, χαρακτηριστικό της ομόκεντρης υπερτροφίας των μυοκαρδιοκυττάρων.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι μετρήσεις Doppler, έδειξαν εξαρτώμενη από την ηλικία μείωση της συστολικής λειτουργίας της καρδιάς των des-/- ποντικών, χαρακτηριστικό της διατατικής μυοκαρδιοπάθειας. Συνολικά, τα ελαττώματα της des-/- καρδιάς οδηγούν σε εκφυλισμό του μυοκαρδιοκυττάρου, παροδική υπερτροφία

με διάταση των θαλάμων και μειωμένη συστολική λειτουργία και τέλος, καρδιακή ανεπάρκεια.

6.2 Η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο: ο ρόλος των μιτοχονδρίων

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε θάνατο των μυοκαρδιοκυττάρων δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Αν όμως λάβουμε υπ' όψιν μας ότι οι ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια εμφανίζονται πριν από οποιαδήποτε άλλη διαταραχή, εύλογα προκύπτει ότι τα οργανίδια αυτά αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο που επηρεάζεται από την απουσία δεσμίνης, οδηγώντας τα μυοκαρδιοκύτταρα σε θάνατο (Milner DJ et al. 2000; Capetanaki Y et al. 2007; Capetanaki Y et al. 2015, Diokmetzidou A et al. 2016a).

Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχονδριακά προβλήματα που παρατηρούνται στα des-/- ποντίκια περιλαμβάνουν διαταραχές στην οργάνωση, την κατανομή, τον αριθμό και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Στο σκελετικό δε μυ αυτά συσσωρεύονται ανώμαλα σε υποσαρκειλημματικές περιοχές. Παράλληλα όμως με την ανώμαλη συσσώρευση, παρατηρείται και έντονος πολλαπλασιασμός των μιτοχονδρίων, ειδικά έπειτα από έργο, κάτι που ενδεχομένως θα μπορούσε να εξηγηθεί εν μέρει λόγω θραύσης των μιτοχονδρίων και αλλαγή στην ισορροπία σύντηξης-διάσπασής τους (fusion-fission) ή ένας συνδυασμός αυτών (Milner DJ et al. 2000; Capetanaki Y, 2002; Capetanaki Y et al. 2007). Η παρουσία αυτοφαγοσωμάτων και αυτοφαγικών κυστιδίων, τα οποία περιέχουν συχνά μιτοχόνδρια, είναι ένα επίσης χαρακτηριστικό της παθολογίας του des-/- μυός. Τα συγκεκριμένα σωμάτια εντοπίζονται και στον εξωκυτταρικό χώρο (Milner DJ et al. 2000).

Η παρουσία της δεσμίνης είναι σημαντική για τη δομή της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (cristae), την αναπνευστική λειτουργία, τη διάνομιξη του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore/mPTP), την ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες και το σωστό δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\psi_m$) (Milner DJ et al. 2000; Capetanaki Y, 2002; Diokmetzidou A et al. 2016a, b). Πράγματι, η πρωτεωμική ανάλυση σε des-/- ποντίκια έδειξε διαφορές στις περισσότερες μεταβολικές οδούς και στα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (Fountoulakis M et al. 2005).

6.3 Προσεγγίσεις διάσωσης των διαταραχών του *des*^{-/-} μυοκαρδίου

Πειράματα διάσωσης με υπερέκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης Bcl-2, βελτιώνει σημαντικά την παθολογία (Weisleder N et al. 2004b). Επιπλέον, η μέτρια υπερέκφραση της MnSOD και/ή καταλάσης στις *des*^{-/-} καρδιές οδήγησε σε μειωμένα ενδοκυτταρικά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species/ROS), βελτιώνοντας τις μιτοχονδριακές και άλλες δομικές ανωμαλίες (Rapti K et al. 2017). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονιστεί ότι μέχρι στιγμής η καλύτερη προστασία έχει επιτευχθεί με υπερέκφραση της α B-κρυσταλλίνης στην *des*^{-/-} καρδιά, όπου όλες οι δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες του *des*^{-/-} μυοκαρδίου επανέρχονται σε επίπεδα σχεδόν άγριου τύπου (Diokmetzidou A et al. 2016a).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι στο *desmin*-null ποντίκι, μαζί με τα μιτοχονδριακά ελαττώματα και το θάνατο μυοκαρδιοκυττάρων, παρατηρείται μια οξεία φάση φλεγμονώδους αντίδρασης, με κορύφωση μετά τη 16^η μέρα. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων, εμπλουτισμένα σε μονοκύτταρα/μακροφάγα και ενεργοποίηση της διαδικασίας της φλεγμονής και αναδόμησης (remodeling) που ρυθμίζονται από υπερέκφραση μεσολαβητών, όπως η osteopontin, galectin-3, osteoactivin, matrix metalloproteinase-12 (Mavroidis M and Capetanaki Y. 2002; Psarras S et al. 2012) και μέλη της οδού του συμπληρώματος αντίστοιχα (Mavroidis M et al. 2015). Κατά συνέπεια, έχει προταθεί ότι τα σήματα κινδύνου που απελευθερώνονται ή ενεργοποιούνται από τα μιτοχονδριακά ελαττώματα και το θάνατο των μυοκαρδιοκυττάρων μπορεί να προκαλέσουν και να διατηρήσουν τη φλεγμονή και την επιβλαβή αναδόμηση (adverse remodeling) (Psarras S et al. 2012; Mavroidis M et al. 2015).

Μέχρι στιγμής, η καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης, μέσω της στόχευσης της οδού του συμπληρώματος (Mavroidis M et al. 2015) ή της αναδόμησης με στόχευση της osteopontin, η οποία οδήγησε επίσης σε έμμεσο περιορισμό της απελευθέρωσης galectin-3 με τη μεσολάβηση μακροφάγων (Psarras S et al. 2012), οδήγησε σε σημαντική μείωση της ίνωσης και της καρδιακής δυσλειτουργίας.

Από την άλλη πλευρά, οι προσεγγίσεις με υπερέκφραση των Bcl-2 και α B-κρυσταλλίνης, ειδικά στα μυοκαρδιοκύτταρα που προστατεύουν από τα μιτοχονδριακά ελαττώματα και τον προκύπτον θάνατο των μυοκαρδιοκυττάρων εξαιτίας της έλλειψης της δεσμίνης, έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικότερες από τις προσεγγίσεις τροποποίησης που περιγράφηκαν παραπάνω για την καταστολή της

φλεγμονής, της ίνωσης και της καρδιακής δυσλειτουργίας (Weisleder N et al. 2004b; Diokmetzidou A et al. 2016a).

Τέλος, παραδόξως η υπερέκφραση του TNF-α έχει δειχθεί ότι βελτιώνει τον φαινότυπο του des^{-/-} ποντικίου, όσον αφορά τη φλεγμονώδη αντίδραση και την αναδόμηση, επάγοντας το σχηματισμό του κυτταρο- και μιτοπροστατευτικού δικτύου της κερατίνης σε μυοκαρδιοκύτταρα για να αντικαταστήσει την απουσία της δεσμίνης (Panagopoulou P et al. 2008; Papathanasiou S et al. 2015).

Κεφάλαιο 2

7. Η δεσμίνη αλληλεπιδρά με την TRIM-like πρωτεΐνη myospryn

7.1 Το N-τελικό άκρο της δεσμίνης αλληλεπιδρά με την περιοχή SPRY της myospryn

7.2 Η myospryn συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη σε σχεδόν όλες τις μεμβράνες και τα μεμβρανώδη οργανίδια

8. Myospryn-δεσμίνη και λυσοσωμική σύνδεση

9. Η myospryn ως μυοειδική-AKAP πρωτεΐνη

9.1 PKA σηματοδότηση

9.2 Η μυοειδική AKAP myospryn

10. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της titin και calpain-3

11. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της calcineurin

12. Minispryn, ένα νέο παράλογο γονίδιο της myospryn

13. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη του υποδοχέα της ρυανοδίνης

14. Η εμπλοκή της myospryn σε ασθένειες

14.1 Η myospryn στη νόσο του καρδιακού μυός

14.2 Η myospryn στη νόσο του σκελετικού μυός

14.3 Η myospryn στη νευρωνική νόσο

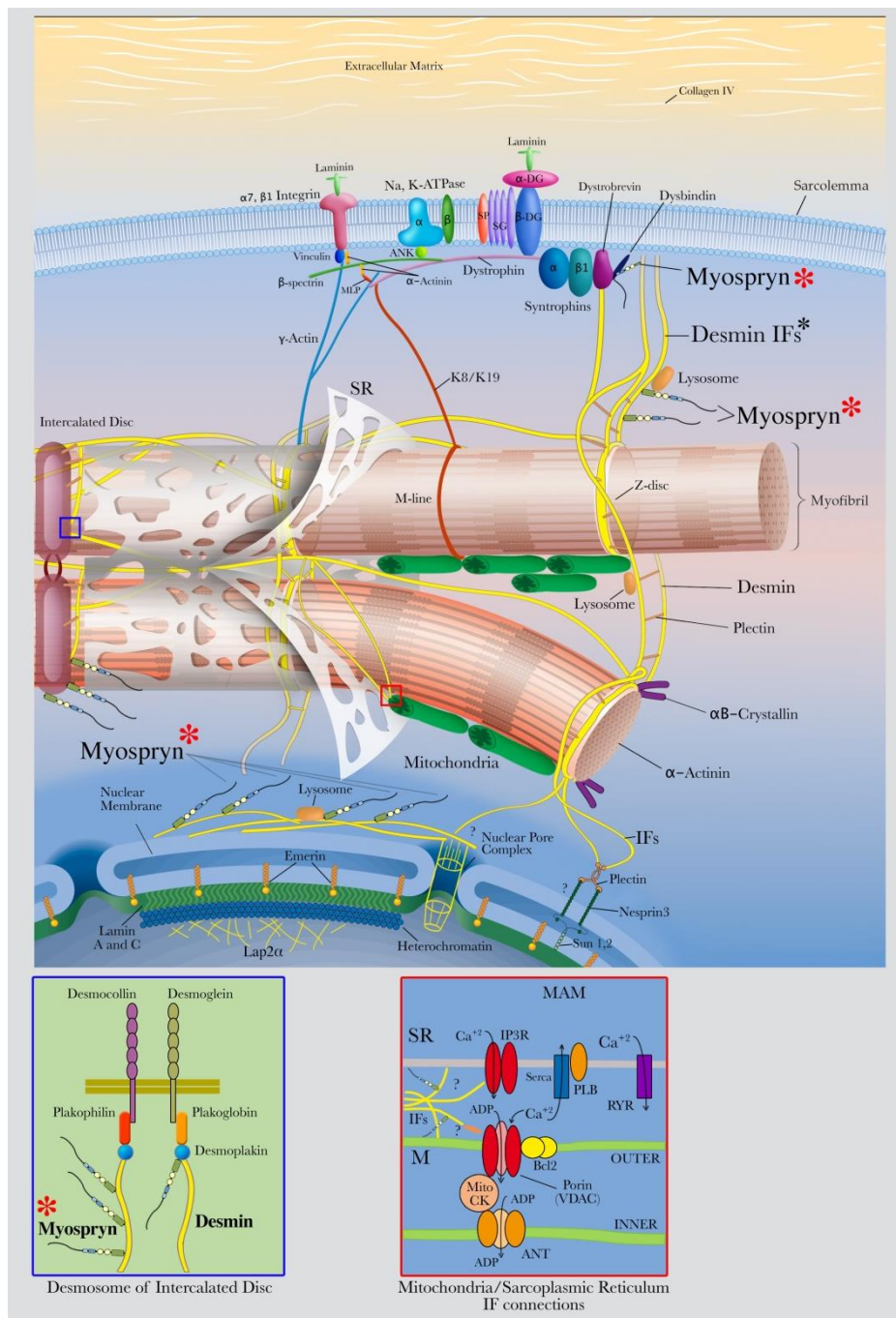
7. Η δεσμίνη αλληλεπιδρά με την TRIM-like πρωτεΐνη myospryn

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η απουσία της δεσμίνης οδηγεί σε μυοκαρδιοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια δεν είναι ακόμη γνωστός. Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί εκτενέστερα η βιολογική δράση του μορίου της δεσμίνης, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, χρησιμοποιήθηκε το διϋβριδικό σύστημα της ζύμης (Yeast Two-Hybrid/Y2H), προκειμένου να μελετηθούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις αυτού του μορίου.

Μεταξύ αυτών, αναγνωρίστηκε μια νέα αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τη myospryn, μία πρωτεΐνη 413-kDa, μέλος της υπερικογένειας των TRIM (Tripartite motif superfamily) πρωτεϊνών (Kouloumenta A et al. 2007). Η myospryn εκφράζεται κυρίως στον καρδιακό και σκελετικό μυ (Benson MA et al. 2004), αλλά και στον εγκέφαλο (Chen X et al. 2011; Hsiung A et al. 2019). Επιπλέον, κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο και εκφράζεται ως ένα ενιαίο μεγάλο μετάγραφο, χωρίς να υπόκειται εναλλακτικό μάτισμα (Tsoupris E and Capetanaki Y, unpublished data, Tsoupris, MSci thesis 2010). Ο γονιδιακός τόπος στον οποίον βρίσκεται το γονίδιο της myospryn στο ποντίκι, το *Mus musculus cardiomyopathy associated 5* (*Cmya5*), εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων NCBI. Το γονίδιο αυτό έχει μέγεθος περίπου 130kb, αποτελείται από 13 εξώνια και το μέγεθος του μεταγράφου που προκύπτει είναι 12.050bp. Το μετάγραφο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 3.739 αμινοξέων. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του γονιδίου αυτού είναι η ύπαρξη ενός ασυνήθιστα μεγάλου 2ου εξωνίου, το οποίο έχει μέγεθος περίπου 9.300bp και βρίσκεται περίπου 45kb καθοδικά του 1ου εξωνίου. Τα υπόλοιπα 11 εξώνια (εκτός δηλαδή από το 1ο και το 2ο εξώνιο) κατανέμονται σε μια περιοχή πάνω από 50kb (Durham JT et al. 2006).

Είναι σπουδαίο να αναφερθεί, ότι η ανεύρεση μορίων με τα οποία η δεσμίνη αλληλεπιδρά μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογική της δράση και να συνδράμει στην κατανόηση της παθολογίας που παρατηρείται σε ποντίκια όπου έχει κατασταλεί η έκφρασή της (όπως προαναφέρθηκε, μοντέλο διατατικής μυοκαρδιοπάθειας που έχει δημιουργηθεί από το εργαστήριο μας) ή σε ασθενείς με μυοκαρδιοπάθειες εξαιτίας μεταλλάξεων στο γονίδιο της δεσμίνης. Γενικότερα, στόχος του εργαστηρίου μας είναι να καταλάβουμε καλύτερα πως λειτουργούν τα ενδιάμεσα ινίδια και οι συνδεόμενες με αυτά πρωτεΐνες ως ένα κρίωμα, το οποίο μπορεί να εναρμονίσει τις διαδικασίες της μηχανοχημικής σηματοδότησης και

διαμετακίνησης πρωτεϊνών και συνεπώς να ρυθμίζει τη λειτουργία σημαντικών μηχανισμών ομοιόστασης και επιβίωσης των κυττάρων των θηλαστικών (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του δικτύου των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης στον καρδιακό μυ και των πιθανών αλληλεπιδράσεών της με διαφορετικά μεμβρανικά διαμερίσματα και οργανίδια. Τα ενδιάμεσα ινίδια δεσμίνης (κίτρινη γραμμή) περικυκλώνουν τους Z-δίσκους, συνδέοντάς τους τόσο μεταξύ τους, όσο και με το σαρκεύλημμα. Επιπλέον, διασυνδέουν τη συσταλτή συσκευή με διάφορα οργανίδια, όπως ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια (M), τα λυσοσώματα και πιθανώς το σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR) και με τα δεσμοσώματα στους εμβόλιμους δίσκους (μεγεθυμένο μπλέ πλαίσιο). Η διατήρηση της εγγύτητας των οργανιδίων, όπως στην περίπτωση των μιτοχονδρίων με το

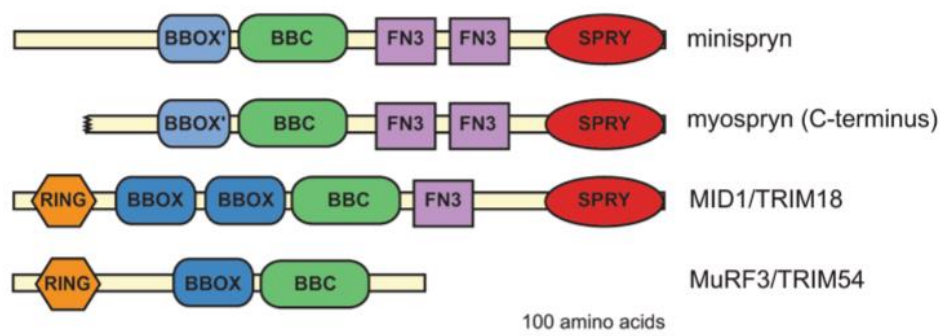
σαρκοπλασματικό δίκτυο μέσω των συνδεόμενων με τα μιτοχόνδρια μεμβρανών (MAM/ mitochondrial associated membranes) (μεγενθυμένο κόκκινο πλαίσιο), από τα ενδιάμεσα ινίδια μπορεί να διευκολύνει την επικοινωνία των οργανιδίων και τις λειτουργίες τους (Capetanaki Y et al. 2007; Tsouprí E and Capetanaki Y, 2013).

7.1 Το N-τελικό άκρο της δεσμίνης αλληλεπιδρά με την περιοχή SPRY της *myospryn*

Οι μελέτες μας αποκάλυψαν ότι η αμινοτελική περιοχή της δεσμίνης (N-(58-103)) δεσμεύεται στο καρβοξυτελικό άκρο μήκους 24 αμινοξέων της SPRY περιοχής (C-(4045-4069)) της *myospryn* (Kouloumenta A et al. 2007) (Εικόνα 8). Να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τη *myospryn* επαληθεύτηκε και με *in vitro* προσεγγίσεις (GST pull down assay, Co-immunoprecipitation) (Kouloumenta A et al. 2007).

Η οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών, όπως θα αναφερθούμε και εκτενέστερα στη συνέχεια, χαρακτηρίζεται από την ικανότητα των μελών της να σχηματίζουν πολύ-πολυμερή και να καθορίζουν συγκεκριμένα διαμερίσματα κυττάρων. Έχουν μια πολύπλοκη δομή, συμπεριλαμβανομένων των ακόλουθων συντηρημένων περιοχών: (α) RING finger, (β) B-box, (γ) B-box coiled coil (BBC), (δ) fibronectin 3 repeat domain (FN3) και ε) SPIa/ryanodine receptor domain (SPRY or B30.2) (Εικόνα 4) (Reymond A et al. 2001).

Ωστόσο, η *myospryn* είναι μια πρωτεΐνη τύπου TRIM-like, καθώς δεν διαθέτει την περιοχή RING finger, η οποία εμπλέκεται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω της οδού της ουμικιτίνης (Εικόνα 4) (Trockenbacher A et al. 2001). Είναι ενδιαφέρον, όπως θα αναφερθούμε και λεπτομερώς στη συνέχεια, ότι όλες οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη *myospryn* προσδέονται στην TRIM-like περιοχή της (Εικόνα 8).



Εικόνα 4: Οργάνωση των TRIM πρωτεϊνών. Η myospryn, η minispryn και δύο μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών TRIM μοιράζονται εκτεταμένη ομοιότητα αλληλουχίας στα C-τελικά άκρα τους. Ενώ οι πρωτεΐνες TRIM είναι E3 λιγάσες συμπικτινής, η απουσία της περιοχής RING σε myospryn και minispryn πιθανώς αποκλείει αυτή τη λειτουργία (Benson MA et al. 2017).

7.2 Η myospryn συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη σε σχεδόν όλες τις μεμβράνες και τα μεμβρανώδη οργανίδια

Οι μελέτες συν-τοπολογίας των δύο μορίων πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικο καρδιακό και σκελετικό ιστό, αλλά και σε απομονωμένα μυοκαρδιοκύτταρα νεογέννητων ποντικών. Στον καρδιακό ιστό η δεσμίνη παρουσιάζει το χαρακτηριστικό γραμμωτό πρότυπο που υποδηλώνει την παρουσία της στους Z-δίσκους, ενώ είναι έντονη και η παρουσία της στους εμβόλιμους δίσκους. Η myospryn με τη σειρά της απαντάται κυρίως στους εμβόλιμους δίσκους, καθώς και στο επίπεδο των κοσταμεριδίων στους Z-δίσκους (στο επίπεδο του σαρκειλήμματος). Σημειώνουμε ότι το κοσταμερίδιο (costamere) αποτελεί ένα πολύπλοκο πρωτεϊνικό δίκτυο που συνδέει το σαρκειλήμμα με τους Z-δίσκους (Peter AK et al. 2011). Η αλληλοεπικάλυψη των δύο πρωτεϊνών είναι έντονη στο επίπεδο των εμβόλιμων δίσκων (Kouloumenta A et al. 2007).

Η συν-τοπολογία της δεσμίνης με τη myospryn στο επίπεδο των κοσταμεριδίων στους Z-δίσκους επιβεβαιώθηκε και στο σκελετικό ιστό. Επιπλέον, χαρακτηριστική είναι και η έντονη αλληλοεπικάλυψη των πρωτεϊνών αυτών στην περιφέρεια του πυρήνα, όπως επιβεβαιώθηκε σε πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων νεογέννητων ποντικών (Kouloumenta A et al. 2007). Ωστόσο, απουσία της δεσμίνης, η myospryn χάνει τον περιπυρηνικό εντοπισμό της. Ειδικότερα, σε πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων νεογέννητων ποντικών η myospryn σχηματίζει ένα δίκτυο στη περιφέρεια του πυρήνα των μυοκαρδιοκυττάρων, μια δομή που μπορεί να συσχετιστεί με κάποια κυτταρικά διαμερίσματα της μηχανής διαλογής του κυττάρου (membrane trafficking/sorting machinery), όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum/ER) ή το σύστημα Golgi. Προκειμένου να πιστοποιηθεί αυτό το πρότυπο εξετάστηκε η myospryn σε σχέση με τους δείκτες της μηχανής διαλογής των παραπάνω κυτταρικών διαμερισμάτων και συγκεκριμένα με τον KDEL υποδοχέα (ενδοπλασματικό δίκτυο) και το TGN38 (trans Golgi 38) (Capitani M and Sallese M, 2009). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η myospryn τοπολογείται κυρίως σε μεμβρανικές δομές του ενδοπλασματικού δικτύου

και πιθανώς στο ενδιάμεσο διαμέρισμα ER/Golgi (ERGIC-ER/Golgi Intermediate Compartment). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση εμπλοκής της myospryn στη διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω του ER και Golgi, καθώς και την εμπλοκή της σε φαινόμενα μεμβρανικής μεταφοράς στο εκκριτικό μονοπάτι (Kouloumenta A et al. 2007).

8. Myospryn-δεσμίνη και λυσοσωμική σύνδεση

Η myospryn βρέθηκε αρχικά να αλληλεπιδρά με την dysbindin, η οποία εμπλέκεται σε διαδικασίες διαμετακίνησης πρωτεϊνών, κυστιδίων και βιοσύνθεσης οργανιδίων και αποτελεί συστατικό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου υπεύθυνου για τη βιογένεση λυσοσωμάτων και λυσοσωμικών σχετιζόμενων οργανιδίων, γνωστό ως Biogenesis of Lysosome Related Organelles Complex 1 (BLOC-1) (Benson MA et al. 2004). Παρόλα αυτά δεν έχει βρεθεί συσχέτιση της myospryn με τα λυσοσώματα.

Προς αυτή την κατεύθυνση μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η myospryn συν-τοπολογείται με δείκτες των λυσοσωμάτων, όπως είναι το ένζυμο Cathepsin D, τόσο παρουσία, όσο και απουσία δεσμίνης. Η δεσμίνη ωστόσο είναι απαραίτητη για τη σωστή τοπολόγηση τόσο της myospryn, όσο και των λυσοσωμάτων. Ειδικότερα, σε μυοκαρδιοκύτταρα από νεογέννητα ποντίκια με έλλειψη δεσμίνης, η myospryn χάνει τον περιπυρηνικό εντοπισμό της και απαντάται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Όσον αφορά τη συμπεριφορά των λυσοσωμάτων, παρατηρείται ανώμαλη διευθέτησή τους, καθώς δεν παρουσιάζουν το στικτό πρότυπο που απλώνεται σε ολόκληρο το κυτταρόπλασμα, αλλά φαίνεται να συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα γύρω από τον πυρήνα. Η παρατηρούμενη ανακατανομή των λυσοσωμάτων στα μυοκαρδιοκύτταρα στο desmin null μυοκάρδιο, υποδηλώνει ότι υπάρχει αποτυχία στον έλεγχο των ενδο-λυσοσωμικών διαμερισμάτων των μυοκαρδιοκυττάρων με έλλειψη δεσμίνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ανακατανομή της myospryn από την περιφέρεια του πυρήνα στη διάχυτη μορφή σε όλο το κυτταρόπλασμα και θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι ο σωστός σχηματισμός του BLOC-1 μπορεί να απαιτεί ορθή αλληλεπίδραση δεσμίνης-myospryn. Επομένως, πιθανώς η δεσμίνη, μέσω της myospryn, να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη βιογένεση ή/και τοπολόγηση των οργανιδίων της λυσοσωμικής συσκευής (Kouloumenta A et al. 2007). Οι παραπάνω μελέτες συνεντοπισμού υποδεικνύουν

πιθανή συσχέτιση των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης με το BLOC-1, το οποίο αποδεικνύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι η δεσμίνη μπορεί να βρεθεί στο ίδιο ανοσοσύμπλοκο με τις υπομονάδες του BLOC-1, dysbindin και pallidin (Kouloumenta A et al. 2007). Όπως θα αναφερθούμε εκτενέστερα και σε επόμενη ενότητα, έχει μεγάλη σημασία ότι, ένα άλλο τύπου III μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων, η GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), έχει περιγραφεί ως πρωτεΐνη συσχετιζόμενη με λυσοσώματα και συγκεκριμένα πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη LAMP-2A (Bandyopadhyay U et al. 2010). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η GFAP διαμορφώνει τη διαμεσολαβούμενη από σύνοδες-πρωτεΐνες αυτοφαγία (chaperone-mediated autophagy/CMA) (Bandyopadhyay U et al. 2010).

Στη συνέχεια, θα αναφερθούμε στη dysbindin, η οποία είναι μια ευρέως εκφρασμένη πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά τόσο με a-, όσο και με b-dystrobrevin, συστατικά του συμπλόκου dystrophin-γλυκοπρωτεΐνης (DGC/dystrophin glycoprotein complex) στους μυς και τον εγκέφαλο, αντίστοιχα (Benson MA et al. 2001). Η dysbindin εμπλέκεται στη διακίνηση πρωτεϊνών και τη βιογένεση των οργανιδίων, καθώς μεταλλάσσεται σε ασθενείς με το σύνδρομο διαταραχής της αιμορραγίας και της χρώσης, Hermansky-Pudlak τύπου 7 και στο sandy (sdy/sdy) ποντίκι, ένα μοντέλο ποντικού της νόσου (Li W et al. 2003). Αυτές οι διαταραχές χαρακτηρίζονται από ελαττώματα στη βιογένεση λυσοσωμικών σχετιζόμενων οργανιδίων, συμπεριλαμβανομένων των μελανοκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Να σημειωθεί ότι η dysbindin αποτελεί μια υπομονάδα του διαλυτού πρωτεϊνικού συμπλόκου BLOC-1, το οποίο και θα αναλύσουμε παρακάτω και δεσμεύεται άμεσα με δύο άλλες υπομονάδες του, την pallidin και τη muted. Έχει προταθεί ότι η myospryn μπορεί να αποτελεί μέρος ενός συμπλόκου τύπου BLOC-1 στους μυς (Benson MA et al. 2004) και ότι μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως ιστοειδικός τελεστής για την καθολικά εκφραζόμενη dysbindin. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν περαιτέρω αυτή την υπόθεση και αποδεικνύουν ότι υπάρχει φυσική σχέση μεταξύ της δεσμίνης και του BLOC-1, επειδή εκτός από τη myospryn, η δεσμίνη μπορεί να ανοσοκατακρημνίζει τις υπομονάδες του BLOC-1, dysbindin και pallidin, πιθανότατα μέσω της myospryn (Kouloumenta A et al. 2007). Σε συνδυασμό με τον ρόλο της ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της dystrobrevin και ως πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη διαμετακίνηση πρωτεϊνών, η dysbindin εμφανίζεται ως ένας σημαντικός παράγοντας επιρρέπειας στη σχιζοφρένεια, όπως θα αναφερθούμε και παρακάτω. Το μοντέλο sdy ποντικού που δεν εκφράζει την πρωτεΐνη dysbindin

παρουσιάζει ανωμαλίες στη νευροεκκρίση και τη βιογένεση κυστιδίων (Chen XW et al. 2008).

Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτά στη διαμετακίνηση πρωτεϊνών και τη βιογένεση και/ή την τοπολόγηση οργανιδίων. Όπως θα αναφερθούμε και εκτενέστερα παρακάτω, είναι ενδιαφέρον ότι άλλα μέλη του κυτταροσκελετού των ενδιάμεσων ινιδίων, όπως η vimentin, η peripherin, και η internexin, έχουν δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη προσαρμογέα AP-3 (adaptor protein-3), η οποία συμμετέχει στη διαλογή των λυσοσωμάτων και των λυσοσωμικών σχετιζόμενων οργανιδίων. Θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ο μη φυσιολογικός εντοπισμός των λυσοσωμάτων που παρατηρείται στα desmin null μυοκαρδιοκύτταρα, είναι πολύ παρόμοιος με εκείνον που παρατηρείται στους ινοβλάστες απουσία vimentin (Styers ML et al. 2004) και μπορεί να αντικατοπτρίζει κάποιο ελάττωμα είτε στην εκβλάστηση και τη σύντηξη κυστιδίων, είτε στην προσέλκυση πρωτεϊνών προσαρμογέων στις θέσεις σχηματισμού κυστιδίων. Από την άλλη πλευρά, τα ενδιάμεσα ινίδια θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως άγκυρα για τα λυσοσώματα ή ως μια γέφυρα ανάμεσα στα κυστίδια και τις κινητήριες πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να τα μετακινήσουν. Λαμβάνοντας υπόψη την αναφορά όπου βρέθηκε το BLOC-1 να είναι παρόν σε κυστίδια που προέρχονται από AP-3 και ότι και τα δύο μπορούν να ρυθμίσουν τη στόχευση των AP-3 πρωτεϊνών φορτίου (Salazar G et al. 2006), θεωρούμε ότι η myospryn μαζί με τη δεσμίνη μπορεί να ρυθμίζουν τη συνύπαρξη BLOC-1/AP-3 στο ίδιο κυστίδιο και κατά συνέπεια τη σωστή κυτταρική μετακίνηση.

9. Η myospryn ως μυοειδική-ΑΚΑΡ πρωτεΐνη

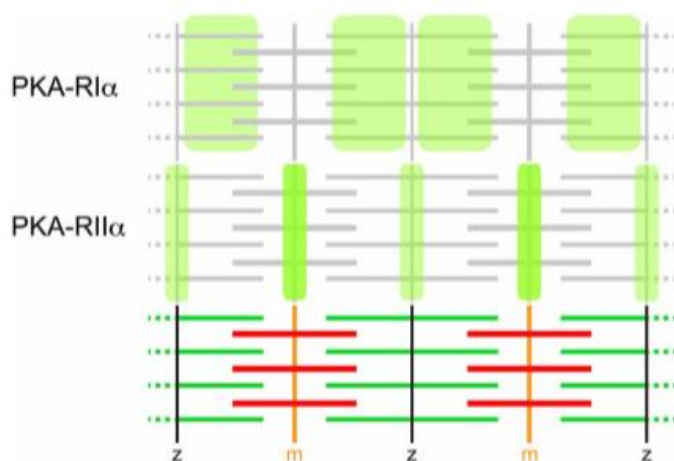
9.1 PKA σηματοδότηση

Το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης Α (PKA/protein kinase A), όπως θα παρουσιαστεί εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα, είναι ένας καθολικός μηχανισμός μεταγωγής σήματος και ιδιαίτερης σημασίας για τη λειτουργία των μυοκαρδιοκυττάρων. Παρά την καθολικότητά του, η ειδικότητα επιτυγχάνεται μέσω της προσέλκυσης της κινάσης σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές με τη βοήθεια πρωτεϊνών κριώματα, γνωστές ως πρωτεΐνες που προσδένουν στην κίνηση

A (AKAPs/A kinase anchoring proteins). Η δέσμευση της PKA από τις AKAPs, καθιστά δυνατή τη φωσφορυλίωση από την PKA ενός στόχου σε ένα συγκεκριμένο διαμέρισμα στο κύτταρο (Ruehr ML et al. 2004).

Είναι ενδιαφέρον ότι η PKA έχει ήδη αναγνωριστεί ως ένα ένζυμο φωσφορυλίωσης των τύπου III ενδιάμεσων ινιδίων και ειδικότερα της δεσμίνης (Gard DL and Lazarides E 1982; Eriksson JE et al. 2004). Όπως δείχνουν οι *in vitro* μελέτες, η myospryn μπορεί επίσης να φωσφορυλιωθεί από την PKA (Reynolds JG et al. 2007), επομένως μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τη myospryn μπορεί να εμπλέκεται σε ένα μηχανισμό ανάδρασης για την τοπική ρύθμιση της δράσης της PKA.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή του σαρκομεριδίου του σκελετικού μύος παρουσιάζει σαφώς προσδιορισμένες και λειτουργικά διακριτές PKA μικρο-περιοχές, οι οποίες οργανώνονται από ειδικές AKAP πρωτεΐνες (Εικόνα 5) (Rudolf R et al. 2013). Προς το παρόν, δεν είναι σαφές ποια AKAP μεσολαβεί στην αγκυροβόληση των υπομονάδων της PKA, PKA-R1α και PKA-R1Iα στις διαφορετικές περιοχές του σαρκομερούς, αλλά προτείνεται ότι η myospryn ασκεί ένα μέρος αυτής της λειτουργίας. Η υπόθεση αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η myospryn (όπως έχουν ήδη αναφερθεί ή θα αναφερθούν στη συνέχεια) διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην ακεραιότητα των μυών και τις μεταβολικές προσαρμογές, υποδηλώνουν ένα μεσολαβητικό ρόλο της myospryn σε αυτές τις διεργασίες (Tsoupru E and Capetanaki Y, 2013).



Εικόνα 5: Πρότυπα διανομής των υπομονάδων R1α και R1Iα της PKA στα μυοκαρδιοκύτταρα.

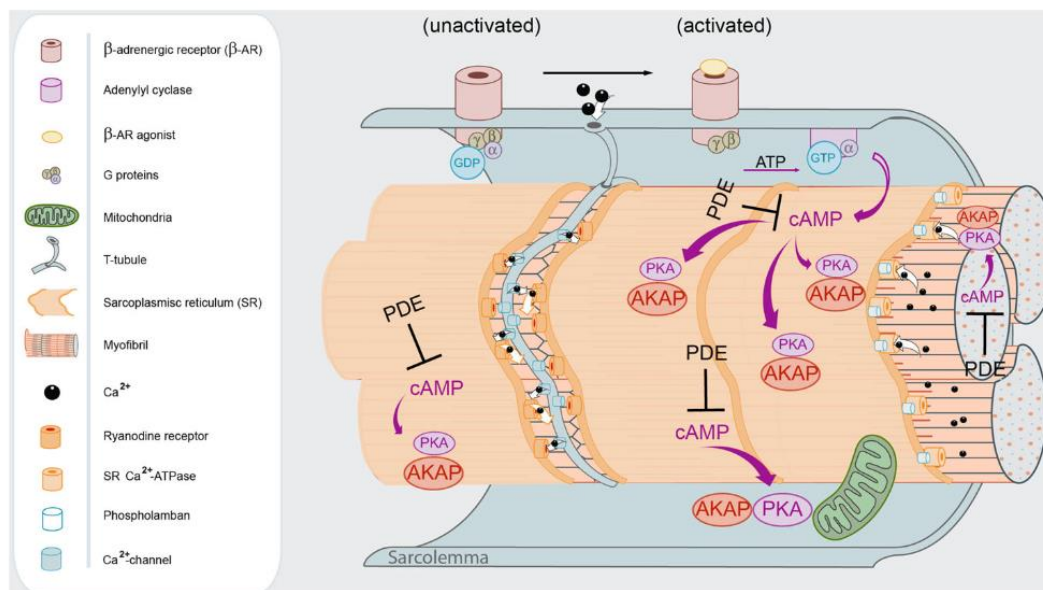
Η υπομονάδα R1α αλληλοεπικαλύπτεται με τα ινίδια της ακτίνης, ενώ η υπομονάδα R1Iα με την M-ζώνη και τους Z-δίσκους. Αυτά τα πρότυπα διανομής είναι τα πιο διαδεδομένα στους μύς του

ποντικίου. Βασίζονται στη δέσμευση από AKAPs και μπορούν να ανατραπούν σε νοσούντες μύες, όπως στη δυστροφία (Rudolf R et al. 2013).

9.2 Η μυοειδική AKAP myospryn

Η myospryn αντιπροσωπεύει μια μυοειδική AKAP και την πρώτη που εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους του καρδιακού μυ (Kouloumenta A et al. 2007) και στα κοσταμερίδια του γραμμωτού μυ (Kouloumenta A et al. 2007; Reynolds JG et al. 2007). Πριν από αυτή την ανακάλυψη, η μόνη γνωστή AKAP μυών ήταν η mAΚAP (Ruehr ML et al. 2004), ωστόσο, υπάρχουν στους μυς και άλλες ευρέως εκφρασμένες AKAPs. Η πιο κοντινή ομόλογη AKAP της myospryn είναι η AKAP12 (Reynolds JG et al. 2007), η οποία είναι επίσης γνωστή ως gravin/AKAP250/SSeCKS (υπόστρωμα κινάσης C που καταστέλλεται από src) (Nauert JB et al. 1997; Lin X et al. 1996).

Όπως θα αναφερθεί και εκτενέστερα στη συνέχεια, ο καρδιακός ιστός έχει 17 διαφορετικές AKAPs (Kritzer MD et al. 2012), αρκετές εκ των οποίων εκφράζονται σε μυοκαρδιοκύτταρα και εντοπίζονται σε όλες τις μεμβράνες και τα μεμβρανόδη οργανίδια, συμπεριλαμβανομένης της πλασματικής μεμβράνης, των εγκολωματικών (caveolar) περιοχών, του σαρκοπλασματικού δικτύου (ΣΔ), των T σωληνίσκων (T-tubules), των μιτοχονδρίων και των πυρήνων (Ruehr ML et al. 2004).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του πιθανού εντοπισμού της AKAP-myospryn στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα (πλασματική μεμβράνη, εγκολωματικές περιοχές, ΣΔ, T-σωληνίσκοι και μιτοχόνδρια). Η AKAP-myospryn ρυθμίζει τη λειτουργία της PKA μέσω προσαρμογής της συγκέντρωσής της σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές (Αναπροσαρμογή από Najafi A et al. 2016).

Είναι πολύ σημαντικό ότι η myospryn διαθέτει το μοναδικό χαρακτηριστικό του εντοπισμού σε όλες σχεδόν τις περιοχές όπου εντοπίζονται οι γνωστές AKAP στην καρδιά (Εικόνα 6). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η myospryn εντοπίζεται και αλληλεπιδρά ειδικά με την τύπου II ρυθμιστική υπομονάδα της PKA, την RIIα, μέσω τριών συντηρημένων περιοχών πρόσδεσης (Εικόνα 8) (Kouloumenta A et al. 2007; Reynolds JG et al. 2007). Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι η AKAP-myospryn εμπλέκεται στην παθογένεση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne (DMD), καθώς η απώλεια της αλληλεπίδρασής της με τη dystrophin οδηγεί σε ανώμαλο εντοπισμό τόσο της myospryn, όσο και της RIIα υπομονάδας και σε επηρεασμένη σηματοδότηση της PKA (Reynolds JG et al. 2008).

10. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της titin και calpain-3

Η myospryn έχει αναγνωρισθεί ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη τόσο της πρωτεΐνης titin της M-ζώνης, όσο και της πρωτεάσης calpain-3 (CAPN3) του σκελετικού μυός (Εικόνες 7, 8), σε μελέτες με το διϋβριδικό σύστημα της ζύμης που πραγματοποιήθηκαν για να αποσαφηνιστούν οι μοριακές οδοί της κνημιαίας μυϊκής δυστροφίας (TMD/tibial muscular dystrophy) και της μυϊκής δυστροφίας άκρου-άκρου τύπου 2J (LGMD2J) και 2A (LGMD2A) (limb-girdle muscular dystrophy type 2J and 2A) (Sarparanta J et al. 2010). Οι μεταλλάξεις στο ακραίο καρβόξυ-τελικό άκρο της titin, η οποία εντοπίζεται στην M-ζώνη του σαρκομεριδίου του γραμμωτού μυός, υποκρύπτουν δύο μυϊκές παθήσεις, τη δυστροφία TMD (Hackman P et al. 2002) και τη δυστροφία LGMD2J (Udd B et al. 2005). Με τη σειρά τους, οι μεταλλάξεις στην πρωτεάση CAPN3, οδήγησαν στη δυστροφία LGMD2A (Richard I et al. 1995) και δευτερογενώς η έλλειψη της CAPN3 στη δυστροφία LGMD2J, υποδηλώνοντας ότι οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί των ασθενειών αυτών συνδέονται. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το αμινο-τελικό άκρο της titin προσδένεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της nebulin (Witt CC et al. 2006), η οποία με τη σειρά της έχει βρεθεί ότι δεσμεύεται μέσω των καρβόξυ-τελικών αμινοξέων 160-170 στην έλικα 1B της δεσμίνης (Εικόνα 7) (Conover G and Gregorio CC, 2011).

Οι μελέτες ταυτόχρονης έκφρασης έδειξαν ότι η myospryn αποτελεί πρωτεολυτικό υπόστρωμα για την CAPN3 και προτείνουν ότι η myospryn μπορεί να προστατεύει την CAPN3 από αυτόλυση (Sarparanta J et al. 2010). Η πιθανή εμπλοκή

της myospryn και του PKA μονοπατιού στη μυϊκή δυστροφία Duchenne έχει ήδη δείξει ότι η myospryn μπορεί να παίζει ρόλο στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό ενός τύπου μυϊκής δυστροφίας (Reynolds JG et al. 2008). Οι νέες αλληλεπιδράσεις της myospryn με την titin της M-ζώνης και την CAPN3, πρωτεΐνες που συνδέονται με τις δυστροφίες TMD, LGMD2J και LGMD2A, μπορεί να υποδηλώνουν ότι η myospryn μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και άλλων τύπων μυϊκής δυστροφίας.

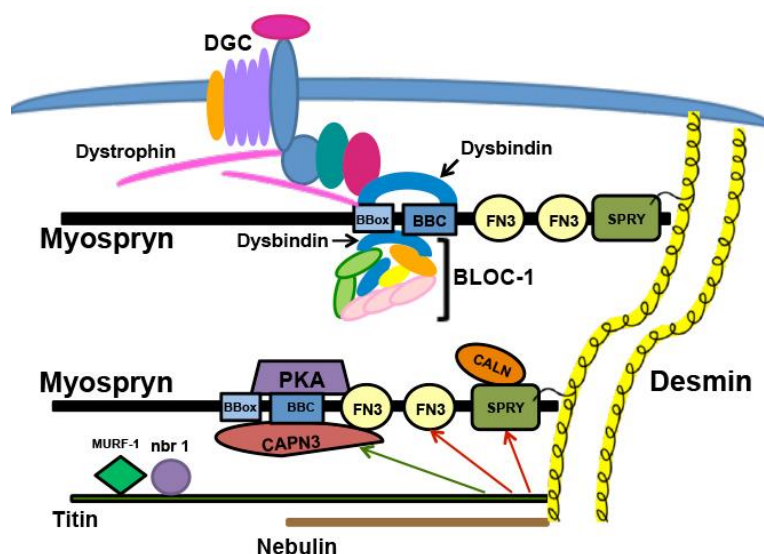
Τέλος, η περιοχή κινάσης της titin (TK/titin kinase domain) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη pbr1, η οποία στοχεύει την πρωτεΐνη p62 που αλληλεπιδρά με την ubiquitin στα σαρκομερή. Η p62 με τη σειρά της αλληλεπιδρά με τη MURF2, μία μυοειδική TRIM RING-B-box E3 λιγάση (Lange S et al. 2005) (Εικόνα 7). Το μονοπάτι TK-pbr1-p62-MURF2 μπορεί να εμπλέκεται στη μηχανική σηματοδότηση στους μυς, καθώς η υπερέκφραση της TK θα μπορούσε να σώσει τη μηχανική καταστολή της έκφρασης των μυϊκών γονιδίων (Lange S et al. 2005). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η myospryn, η οποία σε αντίθεση με τη MURF-2 στερείται την RING περιοχή, εμπλέκεται επίσης στον συντονισμό της σηματοδότησης στον πυρήνα μέσω της calcineurin (Kielbasa OM et al. 2011), όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

11. Η myospryn ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της calcineurin

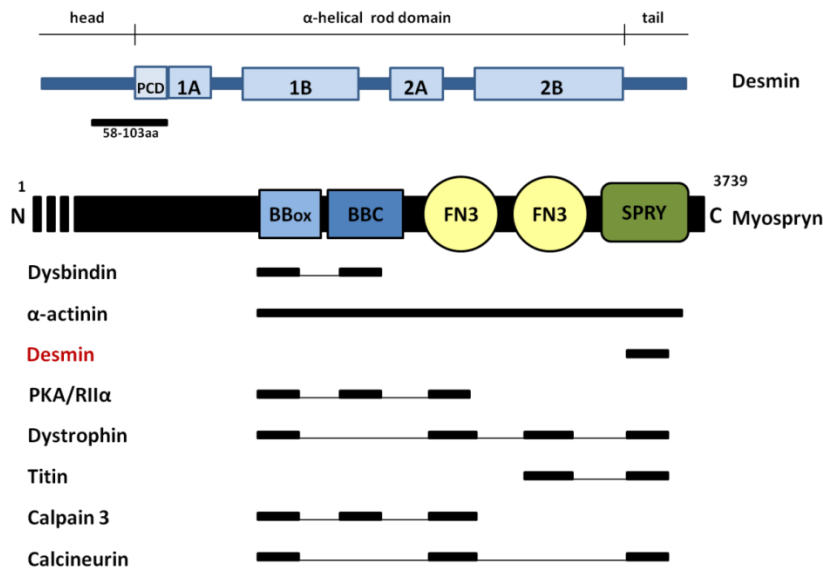
Η myospryn έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με την calcineurin στον σκελετικό μυ (Kielbasa OM et al. 2011) (Εικόνες 7, 8). Η calcineurin, η οποία είναι μια πρωτεϊνική φωσφατάση ρυθμιζόμενη από ασβεστιο και καλμοδουλίνη, εντοπίζεται και αυτή στην περιφερειακή περιοχή των Z-δίσκων, τα κοσταμερίδια. Διαδραματίζει δε σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην διαφοροποίηση των μυών, τον προσδιορισμό του τύπου της μυϊκής ίνας, την υπερτροφία και την αναγέννηση των μυών (Bassel-Duby R and Olson EN, 2003). Λόγω του σημαντικού και ποικίλου ρόλου της στη φυσιολογία του μύος, η calcineurin υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση. Είναι σημαντικό ότι η myospryn τροποποιεί τη σηματοδότηση της calcineurin αναστέλλοντας την εξαρτώμενη από την calcineurin μεταγραφική δραστηριότητα σε C2C12 μυοβλάστες, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το ένζυμο, μέσω 3 περιοχών πρόσδεσης στην περιοχή TRIM (Εικόνα 8). Σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα, βρέθηκε ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τόσο την TRIM-like περιοχή της

myospryn, όσο και τη διαρκώς ενεργή calcineurin, εμφάνισαν σοβαρή εξασθένηση στην ικανότητα της calcineurin να επάγει το φαινότυπο των βραδέων μυϊκών ινών. Επιπλέον, τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την TRIM-like περιοχή της myospryn, εμφάνισαν εξασθενημένη αναγέννηση μυών μετά από μυϊκή βλάβη επαγόμενη από καρδιοτοξίνη, η οποία διασώστηκε εν μέρει παρουσία ενεργοποιημένης calcineurin (Kielbasa OM et al. 2011).

Συνολικά, τα προαναφερθέντα πειράματα υποδεικνύουν έναν κρίσιμο ρόλο για αυτή την πρωτεΐνη ικρίωμα στο συντονισμό σημάτων για να διατηρηθεί η φυσιολογική δομική ακεραιότητα και η ομοιοστάση των μυών. Συγκεκριμένα, η myospryn πιθανώς συντονίζει τη δράση της calcineurin με αυτή των άλλων αλληλεπιδρώντων εταίρων της myospryn, όπως είναι η dystrophin, η PKA και η δεσμίνη, ιδιαίτερα σε απόκριση σε μεταβολές στη μυϊκή δραστηριότητα ή σε βλάβη. Η dystrophin έχει βρεθεί ότι αποφωσφορυλιώνεται από την calcineurin (Walsh MP et al. 1995) και φωσφορυλιώνεται από την PKA (Senter L et al. 1995). Επιπλέον, η υπομονάδα RIIa της PKA, η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με τη myospryn (Kouloumenta A et al. 2007; Reynolds JG et al. 2007), είναι ένα γνωστό υπόστρωμα της calcineurin (Fruman DA et al. 1996). Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το γεγονός ότι η PKA έχει ήδη αναγνωριστεί ως ένα ένζυμο που φωσφορυλιώνει τα τύπου III ενδιάμεσα ινίδια και πιο συγκεκριμένα τη δεσμίνη (Gard DL and Lazarides E, 1982; Eriksson JE et al. 2004) και θα ήταν σημαντικό να προσδιοριστεί εάν η δεσμίνη είναι επίσης ένα υπόστρωμα της calcineurin.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της myospryn τόσο στο επίπεδο των Z-δίσκων, στα κοσταμερίδια, όσο και στα σαρκομερή (Tsoupris E and Capetanaki Y, 2013).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της TRIM-like περιοχής της myospryn και των περιοχών πρόσδεσης των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτήν. a) Υποδεικνύεται η συγκεκριμένη περιοχή του N-τελικού τμήματος της δεσμίνης [58-103 αα, η οποία καλύπτει την περιοχή προσπειράματος (pre-coil/PCD)] που αλληλεπιδρά με την περιοχή SPRY της myospryn. **b)** Αναπαράσταση της TRIM-like περιοχής της myospryn που αποτελείται από τις συντηρημένες περιοχές: B-box, BBC, δύο επαναλήψεις FN3 και SPRY (SPIa/υποδοχέας ρυανοδίνης). Παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη myospryn και προσδένουν στις διάφορες περιοχές της TRIM-like περιοχής (Tsoupri E and Capetanaki Y, 2013).

12. Minispryn, ένα νέο παράλογο γονίδιο της myospryn

Σε μια προσπάθεια εύρεσης άλλων πρωτεϊνών που διαθέτουν τη συντηρημένη B-box περιοχή της myospryn, ερευνήθηκε από μια ερευνητική ομάδα η βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) για την εύρεση παράλογων γονιδίων της myospryn που περιείχαν αυτή την περιοχή. Η αναζήτηση αυτή ταυτοποίησε μια πρωτεΐνη που περιέχει την B-box περιοχή μεγέθους 716 αμινοξέων με προβλεπόμενη μοριακή μάζα 81kDa και μέγεθος μεταγράφου 6.148bp. Με βάση το μέγεθος και ως παράλογο της myospryn, η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε minispryn (Εικόνα 4). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τη minispryn και τη myospryn είναι το Fsd2 (fibronectin type III and SPRY domain containing 2, Gene ID: 244091) και Cmya5 (Gene ID: 76469) αντίστοιχα (Benson MA et al. 2017).

Η minispryn παρουσιάζει 45,5% ομολογία στην πρωτεϊνική της αλληλουχία με το C-τελικό άκρο της myospryn, διατηρώντας τις ίδιες συντηρημένες περιοχές και στην

ίδια σειρά: B-box, BBC, δύο επαναλήψεις FN3 και SPRY περιοχή (Εικόνα 4). Αντίθετα, η *minispryn* στερείται της μεγάλης N-τελικής περιοχής που αποτελεί την πλειονότητα της πρωτεΐνης *myspryn*, συμπεριλαμβανομένης της επαναλαμβανόμενης περιοχής χαμηλής πολυπλοκότητας (Benson MA et al. 2017).

Η σύγκριση της οργάνωσης των *Fsd2* και *Cmya5* γονιδίων, δείχνει ότι η αρχιτεκτονική κάθε γονιδίου είναι παρόμοια, και τα δύο αποτελούνται από 13 εξόνια (Durham JT et al. 2006; Benson MA et al. 2017). Η διαφορά μεγέθους των δύο πρωτεϊνών αποδίδεται στην αλληλουχία που κωδικοποιείται από το εξόνιο 2, το οποίο στο *Cmya5* γονίδιο, όπως προαναφέρθηκε είναι τεράστιο, μεγέθους περίπου 9.300bp, ενώ το *Fsd2* γονίδιο μόνο 582bp. Η ανάλυση αλληλουχίας μεγάλου εύρους γύρω από τους γονιδιακούς τόπους *Cmya5* και *Fsd2*, έδειξε ότι κάθε γονίδιο περιέχεται μέσα σε μια συντηρημένη περιοχή χρωμοσωμικού διπλασιασμού (Benson MA et al. 2017).

Τέλος, στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι το μετάγραφο της *minispryn*, μεγέθους 7 kb εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στην καρδιά, αλλά είναι επίσης ανιχνεύσιμο σε σκελετικούς μυς. Εφόσον οι παράλογες πρωτεΐνες συχνά συμμετέχουν σε παρόμοιες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, μελετήθηκε με συν-ανοσοκατακρήμιση αν η *myspryn* και η *minispryn* σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών *in vivo*. Οι πρωτεΐνες αυτές συν-ανοσοκατακρημνίστηκαν τόσο από τα εκχυλίσματα καρδιάς, όσο και των σκελετικών μυών (Benson MA et al. 2017).

13. Η *myspryn* ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη του υποδοχέα της ρυανοδίνης

Σε μια πρόσφατη αναφορά βρέθηκε ότι η *myspryn* είναι μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος στον καρδιακό μυ που περιλαμβάνει τη *minispryn* και τον καρδιακό υποδοχέα της ρυανοδίνης (Benson MA et al. 2017). Ο καρδιακός αυτός υποδοχέας ρυανοδίνης που κωδικοποιείται από το *RyR2* βρίσκεται στο καρδιακό σαρκοπλασματικό δίκτυο, το οποίο είναι η κύρια πηγή ασβεστίου που απαιτείται για τη σύζευξη διέγερσης-συστολής (excitation-contraction coupling/ECC) του καρδιακού μυός (Tang Y et al. 2012).

Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η *myspryn* και η *minispryn* συν-ανοσοκατακρημνίζονται τόσο από τον καρδιακό, όσο και τον σκελετικό μυ και βρίσκονται σε ένα σύμπλεγμα με τον *RyR2* στον καρδιακό μυ. Επιπλέον, η

myospryn και η minispryn συν-εντοπίζονται με τους υποδοχείς RyRs σε απομονωμένα ενήλικα κοιλιακά μυοκαρδιοκύτταρα, αλλά και στους σκελετικούς μυς (Benson MA et al. 2017). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι μόρια που αλληλεπιδρούν με τη myospryn, όπως η PKA, η RIIα και η calcineurin, έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα RyR2 (Bandyopadhyay A et al. 2000; Marx SO et al. 2000).

Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η myospryn ήταν ικανή να συσσωρεύσει τον υποδοχέα RyR2 και σε ετερόλογα κύτταρα (COS-7). Για την ακρίβεια, συντηρημένες περιοχές στο C-τελικό άκρο της myospryn που δεν υπάρχουν στη minispryn, μεσολαβούν στη συσσώρευση (clustering) του RyR2 (Benson MA et al. 2017). Επομένως, η myospryn αποτελεί το πρώτο παράδειγμα πρωτεΐνης που μπορεί να συσσωρεύσει ενεργά τους υποδοχείς RyRs. Εντούτοις, στο σκελετικό μυ είναι επίσης πιθανό η myospryn να προάγει τη συσσώρευση των RyRs, μεταβάλλοντας τη δομή του σαρκοπλασματικού δικτύου. Είναι επομένως δελεαστικό να υποθέσουμε ότι μία λειτουργία του συμπλόκου της myospryn στον καρδιακό μυ είναι στο σχηματισμό και τη διατήρηση των συστάδων των RyR υποδοχέων. Αν και είναι ξεκάθαρο ότι η συσσώρευση των RyR υποδοχέων είναι απαραίτητη για τη σύζευξη διέγερσης-συστολής στην καρδιά, λίγα είναι γνωστά για τις διεργασίες που οδηγούν στη συσσώρευση των RyR υποδοχέων (Yin CC et al. 2005).

Είναι γνωστό ότι ένα από τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά που αποτελούν τη βάση της καρδιακής ανεπάρκειας είναι η εξασθενημένη εισροή ασβεστίου που μεσολαβείται από τους υποδοχείς RyRs (Blayney LM and Lai FA, 2009). Επιπλέον, η διαταραγμένη αναδόμηση των T-σωληνίσκων στην καρδιακή ανεπάρκεια και την υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια οδηγεί σε ανωμαλίες στη σηματοδότηση του Ca^{2+} που σχετίζεται με ορφανούς υποδοχείς RyRs (Song LS et al. 2006). Είναι συνεπώς σημαντικό να προσδιοριστεί εάν το σύμπλοκο της myospryn εμπλέκεται στην αποσύνδεση (uncoupling) των υποδοχέων RyRs στα διαφορετικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας και μυοκαρδιοπάθειας.

Τέλος, είναι σπουδαίο να αναφερθεί ότι βασιζόμενοι σε προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου μας που έδειξαν ότι η δεσμίνη τοπολογείται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού/σαρκοπλασματικού δικτύου συνδεόμενες με τα μιτοχόνδρια (mitochondrial-associated ER membranes/MAMs) (Vance JE, 1990; Wieckowski MR et al. 2009) όπου αλληλεπιδρά με τη VDAC (Diokmetzidou A et al. 2016a), η σύνδεση της myospryn με τον υποδοχέα RyR2, έδειξαν επιπρόσθετα της VDAC,

έναν έμμεσο τρόπο σύνδεσης της δεσμίνης στο σαρκοπλασματικό δίκτυο των μυοκαρδιοκυττάρων (Benson MA et al. 2017). Στη συνέχεια, θα αναλυθεί εκτενέστερα η σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων.

14. Η εμπλοκή της myosrygn σε ασθένειες

14.1 Η myosrygn στη νόσο του καρδιακού μυός

Η myosrygn είναι το ορθόλογο γονίδιο του ποντικού, ενός ανθρώπινου γονιδίου, του Cmya5, το οποίο αρχικά αναγνωρίστηκε ως ένα νέο γονίδιο άγνωστης λειτουργίας που σχετίζεται με μυοκαρδιοπάθεια. Ένας υποτιθέμενος σύνδεσμος του γονιδίου της myosrygn με τις μυοκαρδιοπάθειες προτάθηκε λόγω της συν-έκφρασής της με γνωστά γονίδια που σχετίζονται με μυοκαρδιοπάθειες (Walker MG, 2001). Αυτή η υπόθεση είναι σε συμφωνία με όλα τα δεδομένα της myosrygn που περιγράφηκαν παραπάνω. Επιπλέον, υποστηρίχθηκε από μια μελέτη που δείχνει τη συσχέτιση ενός πολυμορφισμού της myosrygn (K2906N) με πάχυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας και διαστολική δυσλειτουργία σε ασθενείς με υπέρταση (Nakagami H et al. 2007). Αυτός ο πολυμορφισμός εντοπίζεται κοντά στην εξελικτικά συντηρημένη περιοχή της myosrygn που απαιτείται για τη συσσώρευση του RyR2 υποδοχέα (Benson MA et al. 2017).

Επιπλέον, μεταλλάξεις του γονιδίου της myosrygn και του RyR2 υποδοχέα βρέθηκαν πρόσφατα σε ασθενείς με υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια (Εικόνα 9) (Xu J et al. 2015). Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε Κινέζους ασθενείς με υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας όλων των εξονίων ενός γονιδιώματος (whole exome sequencing/WES). Με τη μέθοδο αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τεσσάρων μεταλλάξεων της myosrygn με την ανάπτυξη υπερτροφικής μυοκαρδιοπάθειας.

Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε μια μετάλλαξη που οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας (loss-of-function/LoF), η p.S2404X (Εικόνα 9, απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα) και τρεις σημειακές παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations) που οδηγούν σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος, οι p.S2813L, p.K1822I και p.D3051E (Εικόνα 9, απεικονίζονται με μαύρο χρώμα) (Xu J et al. 2015). Η μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (LoF), p.S2404X, οδηγεί στην απώλεια τριών πολύ συντηρημένων περιοχών (δύο επαναλήψεις FN3 και η περιοχή SPRY), με

αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου τμήματος του C-τελικού άκρου της myosprgn. Στις συντηρημένες αυτές περιοχές της TRIM περιοχής της myosprgn, υπάρχουν οι θέσεις πρόσδεσης για τη δεσμίνη, titin, α -actinin, dystrophin, PKA, calpain-3 και calcineurin (Εικόνα 8). Η απώλεια των θέσεων πρόσδεσης των αλληλεπιδρώντων μορίων, οδηγεί με τη σειρά του σε διάφορες διαταραχές, οι οποίες χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση. Και οι τρεις σημειακές παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, πιθανώς να διαταράζουν τις αλληλεπιδράσεις τις με άλλες πρωτεΐνες.



Εικόνα 9: Μεταλλάξεις στο γονίδιο της myosprgn και του RyR2 που σχετίζονται με υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια. Σχηματική αναπαράσταση των συντηρημένων περιοχών της myosprgn (B-box, BBC, FN3 και SPRY) και του υποδοχέα RyR2 (MIR, RyR, SPRY και διαμεμβρανική (transmembrane region/ TM). Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας (loss-of-function/LoF), ενώ με μαύρο χρώμα απεικονίζονται οι σημειακές παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations) (Xu J et al. 2015).

Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι και αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έδειξαν εμπλοκή της myosprgn στην καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία. Ειδικότερα, σε μελέτες αποσιώπησης του μεταγράφου της myosprgn στο μοντέλο του zebrafish, παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στην ανάπτυξη και τη λειτουργία της καρδιάς. Συγκεκριμένα, τα παρατηρούμενα ελαττώματα περιλαμβάναν 30% εμβρυϊκή θνησιμότητα, ήπιες δομικές ανωμαλίες, περικαρδιακό οίδημα και κοιλιακή υποπλασία. Αυτά τα προκαταρκτικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο εταίρος δέσμευσης της δεσμίνης, η myosprgn, παίζει κεντρικό ρόλο στην ορθή ανάπτυξη και

λειτουργία της καρδιάς (Kouloumenta A and Capetanaki Y, unpublished data, Kouloumenta, PhD thesis 2008).

Τέλος, σε μια άλλη μελέτη, η *myospryn* βρέθηκε να μειορρυθμίζεται σε διαγονιδιακά ποντίκια με καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A), ενός μεταγραφικού παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση μυοειδικών γονιδίων (Durham JT et al. 2006). Τα ποντίκια αυτά εμφάνιζαν καρδιακή ανεπάρκεια κατά την περιγεννητική περίοδο και οι καρδιές τους εμφάνιζαν διάφορες ανωμαλίες (μη σωστή διάταξη των μυοϊνιδίων, ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια και προβλήματα στην αγωγιμότητα) (Durham JT et al. 2006). Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποδίδουν στη *myospryn* έναν δυνητικά ρυθμιστικό ρόλο στο μονοπάτι που απαιτείται για τη συγκρότηση και ακεραιότητα του κυτταροσκελετού στο γραμμωτό μύ.

14.2 Η *myospryn* στη νόσο του σκελετικού μύος

Η εμπλοκή της *myospryn* στη νόσο των σκελετικών μυών υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι το μετάγραφο της *myospryn* μειώνεται στη μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD) (Tkatchenko AV et al. 2001; Ghahramani Seno MM et al. 2010). Σε συμφωνία με αυτό, το *mdx* μοντέλο ποντικού της ανθρώπινης δυστροφίας Duchenne, με έλλειψη της *dystrophin*, παρέχει λειτουργικές ενδείξεις που καταδεικνύουν τη σημασία της *myospryn* στη σηματοδότηση της PKA και εμπλέκει τη *myospryn* στην παθογένεση της δυστροφίας Duchenne. Ειδικότερα, στο μυ των *mdx* ποντικών, η έκφραση της *myospryn* είναι σημαντικά μειωμένη. Επιπλέον, η *myospryn* βρέθηκε να χάνει τον ορθό εντοπισμό της και αυτό πιθανόν να οφείλεται στη διαταραγμένη αλληλεπίδρασή της με τη *dystrophin* (Tkatchenko AV et al. 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι η *myospryn* αποτελεί την μοναδική AKAP που μειορρυθμίζεται στο *mdx* μυ (Reynolds JG et al. 2008). Εξαιτίας της ύπαρξης μικρότερης διαθέσιμης πρωτεΐνης αγκυροβόλησης (*myospryn*) στα κοσταμερίδια, βρέθηκε ότι ο εντοπισμός της υπομονάδας RIIa της PKA είναι ανώμαλος και η δραστηριότητα της PKA είναι μειωμένη στο *mdx* μυ (Reynolds JG et al. 2008). Έτσι, η ικανότητα της *myospryn* να αγκυροβολεί την PKA στα κοσταμερίδια μπορεί να έχει βαθιές ρυθμιστικές επιπτώσεις, δεδομένου ότι η δυστροφίνη έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται από την PKA (Michalak M et al. 1996).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ποσότητες της *dysbindin* και των άλλων υπομονάδων του BLOC-1 είναι αυξημένες στο *mdx* μυ (Benson MA et al. 2001).

Αυτή η αύξηση στην έκφραση του BLOC-1, μπορεί να υποδηλώνει αντιστάθμιση για την έλλειψη της myospryn, ίσως ανεξάρτητα από την αβέβαιη αλληλεπίδραση dystrobrevin-dysbindin. Επιπλέον, η έκφραση των mAKAP, RyR και SERCA2A είναι μειωμένη σε αυτά τα ποντίκια, με αποτέλεσμα τη διαταραγμένη ομοιόσταση του Ca^{2+} και την καρδιακή υπερτροφία. Η παρατεταμένη καρδιακή υπερτροφία μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια, στην οποία παρατηρείται μειωμένη έκφραση των β -αδρενεργικών υποδοχέων, μειωμένη φωσφορυλίωση της RII υπομονάδας και ως αποτέλεσμα μπορεί να υπάρξει μετατόπιση στον εντοπισμό της RII, λόγω των διαφορετικών συγγενειών της AKAP για φωσφορυλιωμένη και μη φωσφορυλιωμένη RII (Zakhary DR et al. 2000).

Εκτός από τη μυϊκή δυστροφία Duchenne, όπως ήδη αναφέρθηκε αναλυτικά ανωτέρω, η myospryn, συνδέεται με τις μυϊκές δυστροφίες TMD, LGMD2J και LGMD2A μέσω των αλληλεπιδράσεών της με την titin της M-ζώνης και την CAPN3 (Sarparanta J et al. 2010). Συνολικά, προτείνετε ένας ρόλος της myospryn στην παθογένεση των μυϊκών δυστροφιών.

14.3 Η myospryn στη νευρωνική νόσο

Μια πρόσφατη αναφορά για τη myospryn δείχνει ότι αυτή εκφράζεται στον εγκέφαλο αρουραίων και ειδικότερα στις περιοχές: ραβδωτό σώμα (striatum), ρομβοειδή εγκέφαλο (hindbrain), υπόκαμπο (hippocampus), παρεγκεφαλίδα (cerebellum) και φλοιό (cortex) (Hsiung A et al. 2019). Ωστόσο, μια παλαιότερη αναφορά για τη myospryn έδειχνε ότι εκφράζεται σε μέτριο βαθμό στον εγκέφαλο (Chen X et al. 2011).

Σε συμφωνία με την έκφραση στον εγκέφαλο, μελέτες γονιδιακής συσχέτισης (genome-wide associations/GWA) ταυτοποίησαν τη myospryn ως γονίδιο κινδύνου για τη σχιζοφρένεια (Chen X et al. 2011; Li M et al. 2011; Zhang R et al. 2013). Ειδικότερα, βρέθηκαν τέσσερις απλοί πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων (single nucleotide polymorphisms/SNPs), ο rs10043986 και ο rs4704591 (Chen X et al. 2011), καθώς και ο rs7714250 και ο rs13158477 (Zhang R et al. 2013), οι οποίοι σχετίζονται στατιστικά σημαντικά και ανεξάρτητα με τη σχιζοφρένεια. Ειδικότερα, ο πολυμορφισμός rs10043986 στον γονιδιακό τόπο της myospryn οδηγεί στην αλλαγή του εξαιρετικά συντηρημένου αμινοξέος 4063 από προλίνη (Pro) σε λευκίνη (Leu) (Hsiung A et al. 2019), με το αλληλόμορφο της λευκίνης να έχει προστατευτικό ρόλο (Chen X et al. 2011). Να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι το εργαστήριό μας έδειξε ότι η

δέσμευση της myospryn στη δεσμίνη λαμβάνει χώρα στην περιοχή αυτή, και πιο συγκεκριμένα στα αμινοξέα 4045-4069 (Kouloumenta A et al. 2007). Η αλλαγή επομένως του συγκεκριμένου αμινοξέος οδήγησε σε πιο ισχυρή (διπλάσια) δέσμευση της myospryn στη δεσμίνη in vitro (Hsiung A et al. 2019). Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι το προστατευτικό αλληλόμορφο της myospryn, πιθανώς να παρέχει δομική υποστήριξη και αποτελεσματική αναδιάταξη του δικτύου του κυτταροσκελετού.

Μια επιπλέον συσχέτιση της myospryn με τη σχιζοφρένεια ενισχύεται λόγω της αλληλεπίδρασής της με τη dysbindin (Benson MA et al. 2004), η οποία έχει ταυτοποιηθεί ως γονίδιο κινδύνου για τη σχιζοφρένεια (Straub RE et al. 2002). Όπως προαναφέρθηκε, η dysbindin αποτελεί υπομονάδα του BLOC-1, το οποίο σύμπλοκο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διακίνηση των ενδοσωμάτων και εμπλέκεται στη συναπτική μετάδοση και τη νευροανάπτυξη, και συγκεκριμένα στη ρύθμιση του υποδοχέα της ντοπαμίνης D2 (D2DR), στη βιογένεση και τη σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων και στην ανάπτυξη των νευριτών (Ryder PV and Faundez V, 2009; Ghiani CA and Dell'angelica EC, 2011; Mullin AP et al. 2011). Οι προαναφερθείσες διαδικασίες του BLOC-1 πιθανώς να διαταράσσονται στους σχιζοφρενείς ασθενείς όπου παρατηρείται μειωμένη έκφραση της dysbindin (Weickert CS et al. 2004; Wang H et al. 2017).

Επιπλέον, η dysbindin αλληλεπιδρά με τη snapin, μια SNARE-συσχετιζόμενη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη νευροδιαβίβαση (Starcevic M and Dell'Angelica EC, 2004). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μοντέλο *sdγ* ποντικού που δεν εκφράζει την πρωτεΐνη dysbindin έχει ανωμαλίες στη νευροέκκριση και τη μορφολογία των κυστιδίων στα ενδοκρινικά κύτταρα και στις συνάψεις, υποδηλώνοντας ότι η dysbindin, μαζί με τη myospryn, λειτουργούν για να ρυθμίζουν την εξωκυττάρωση και τη βιογένεση των κυστιδίων, έναν πιθανό μηχανισμό στην παθογένεση της σχιζοφρένειας στο συναπτικό επίπεδο (Chen XW et al. 2008).

Τέλος, η myospryn έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του cAMP σηματοδοτικού μονοπατιού, οι οποίες έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζουν μεταβλητά επίπεδα σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Tardito D et al. 2000; Molteni R et al. 2009). Ειδικότερα, όπως έχουμε προαναφέρει η myospryn αλληλεπιδρά με την RIIa υπομονάδα της PKA (Kouloumenta A et al. 2007; Reynolds JG et al. 2007), η οποία έχει βρεθεί ότι μειορυθμίζεται σε σχιζοφρενείς ασθενείς (Tardito D et al. 2000). Στους ασθενείς αυτούς βρέθηκε ότι μειορυθμίζεται τόσο η RIIa, όσο και η RIa

υπομονάδα της PKA, αλλά όχι η καταλυτική της υπομονάδα (Tardito D et al. 2000). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με σχιζοφρένεια έχουν τροποποιήσει τα επίπεδα PKA, υποστηρίζοντας έτσι ότι οι δυσλειτουργίες στα συστατικά της cAMP σηματοδότησης μπορεί να συνεισφέρουν στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας.

Συνολικά, τα προαναφερθέντα δεδομένα αποδίδουν ένα ρόλο για τη myosryn στη μυοκαρδιοπάθεια, τη μυϊκή δυστροφία και τις νευρωνικές νόσους.

Κεφάλαιο 3

15. Η οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών

16. Μεμβρανική μεταφορά

16.1 Ενδοκυττάρωση

16.2 Συμβατικό εκκριτικό μονοπάτι

17. Πρωτεΐνες Rab

18. Μη συμβατικό μονοπάτι έκκρισης πρωτεϊνών (UPS/ unconventional protein secretion)

19. Νέοι ρόλοι των ενδιάμεσων ινιδίων: εμπλοκή στη διαμετακίνηση κυστιδίων

19.1 Ενδοκυττάρωση και ενδιάμεσα ινίδια

19.2 Εξωκυττάρωση και ενδιάμεσα ινίδια

20. BLOC-1 σύμπλοκο

20.1 Το BLOC-1 και οι μηχανισμοί μεταφοράς συναπτικών κυστιδίων

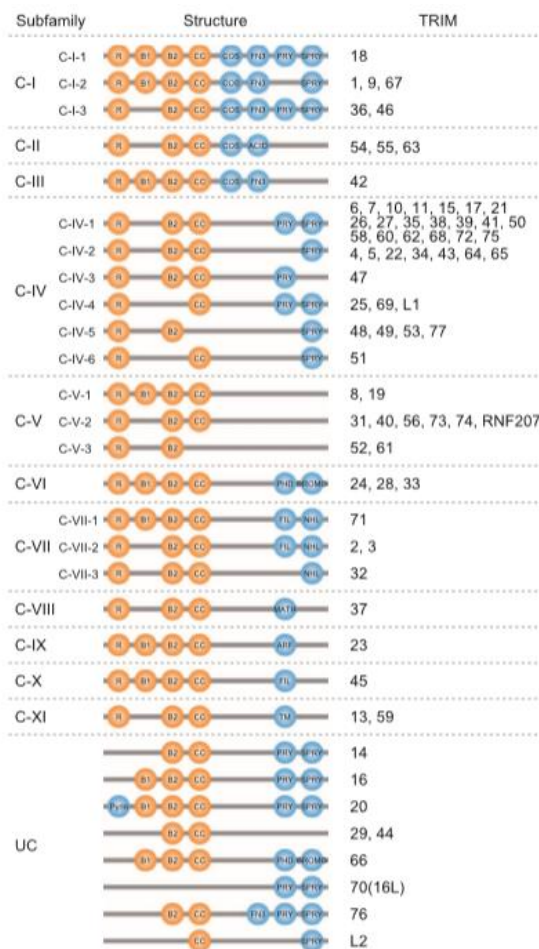
20.2 Το BLOC-1 και οι κυτταροσκελετικοί μηχανισμοί

20.3 Το BLOC-1, η σύγκλιση και η σύντηξη μεμβρανών

15. Η οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών

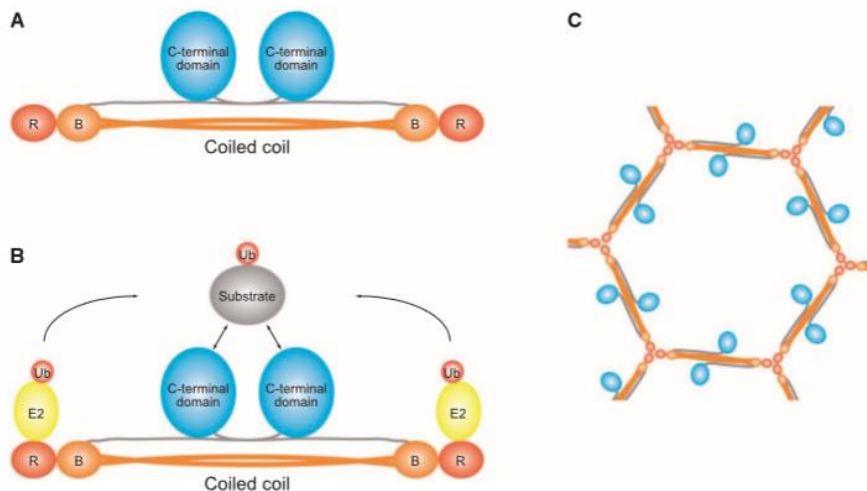
Η tripartite motif (TRIM) πρωτεϊνική οικογένεια χαρακτηρίζεται από την παρουσία του τριμερούς (tripartite) μοτίβου, το οποίο αποτελείται από τις ακόλουθες συντηρημένες περιοχές: α) RING finger περιοχή στο N-τελικό άκρο, β) μία ή δύο περιοχές B-box, γ) μια περιοχή B-box coiled-coil (BBC), δ) μια περιοχή επαναλήψεων φιβρονεκτίνης τύπου III (Fibronectin 3 repeat domain/FN3) και ε) την περιοχή του υποδοχέα της ρυανοδίνης (SP1a/ryanodine receptor domain-SPRY), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10 (Reymond A et al. 2001; Watanabe M and Hatakeyama S, 2017).

Η περιοχή RING προσδίδει δραστικότητα E3 λιγάσης της ουμπικιτίνης (E3 ubiquitine ligase), αν και αρκετές πρωτεΐνες TRIM δεν έχουν την περιοχή RING, όπως προαναφέραμε, μεταξύ των οποίων και η myospryn (TRIM76 στην Εικόνα 10). Οι ενζυματικές δραστηριότητες αυτών των πρωτεϊνών είναι πιθανό να ρυθμίζονται από εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες (Reymond A et al. 2001; Watanabe M and Hatakeyama S, 2017).



Εικόνα 10: Ταξινόμηση των TRIM πρωτεϊνών στον άνθρωπο. Τα μέλη της οικογένειας TRIM ταξινομούνται σε 11 υποοικογένειες (C-I έως C-XI). Πολλές από τις πρωτεΐνες TRIM διαθέτουν (με πορτοκαλί χρώμα) μια c-τελική περιοχή RING (R), ένα ή δύο κουτιά/B-box (B) και μια περιοχή coiled coil (CC). Κάποιες άλλες πρωτεΐνες διαθέτουν (με μπλε χρώμα) τις ακόλουθες περιοχές: ACID, acid-rich περιοχή; ARF, ADPribosylation factor family περιοχή; BROMO, bromo περιοχή; COS, cos-box; FIL, filamin-type Ig περιοχή; FN3, fibronectin type III επαναλήψεις; MATH, meprin and TRAF περιοχές ομολογίας; NHL, NCL1, HT2A and LIN41 περιοχές; PHD, PHD περιοχές; PRY, PRY περιοχή; Pyrin, Pyrin περιοχή; SPRY, SPRY περιοχή; TM, (transmembrane region), διαμεμβρανική περιοχή (Watanabe M and Hatakeyama S, 2017).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οι πρωτεΐνες TRIM σχηματίζουν ένα ομοδιμερές με αντιπαράλληλο τρόπο μέσω της περιοχής B-box coiled coil (CC), υποδηλώνοντας ότι οι δύο καταλυτικές περιοχές RING που διαχωρίζονται από τη μακρά περιοχή CC δουλεύουν μαζί για να ασκήσουν τη δράση λιγάση της ουμπικιτίνης στα διάφορα υποστρώματα (Εικόνες 11 A και B) (Koliopoulos MG et al. 2016). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο σχηματισμός δομών υψηλότερης τάξης προωθείται από περιοχές RING και B-box σε μερικές πρωτεΐνες TRIM (Εικόνα 11 C) (Goldstone DC et al. 2014). Οι πρωτεΐνες TRIM σχηματίζουν επίσης ετεροδιμερή, αν και ο ετεροδιμερισμός τους δεν είναι ετερόκλητος και γενικά περιορίζεται σε στενά συγγενείς πρωτεΐνες TRIM (Napolitano LM and Meroni G, 2012; Sanchez JG et al. 2014). Αυτές οι δομές διμερισμού ή υψηλότερης τάξης μπορούν να τροποποιήσουν την ειδικότητα στην αναγνώριση υποστρώματος.



Εικόνα 11: Μοντέλα διμερισμού και δομών υψηλότερης τάξης των πρωτεϊνών TRIM. (A) Ένα σχηματικό μοντέλο ομοδιμερούς πρωτεΐνης TRIM. Μία πρωτεΐνη TRIM σχηματίζει ένα ομοδιμερές με αντιπαράλληλο τρόπο μέσω της CC περιοχής της. **(B)** Οι δύο καταλυτικοί τομείς RING που διαχωρίζονται από το μακρύ πεδίο CC λειτουργούν μαζί για να ασκήσουν τη δράση λιγάση της ουμπικιτίνης στα διάφορα υποστρώματα. **(C)** Ένα παράδειγμα μοντέλο δομών υψηλότερης τάξης των πρωτεϊνών TRIM. Η TRIM5a σχηματίζει μια δομή υψηλότερης τάξης για την αναγνώριση των εξαμερών του καψιδίου του HIV-1 ιού, μέσω της C-τελικής περιοχής PRY-SPRY (Watanabe M and Hatakeyama S, 2017).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας TRIM συνδέονται με μια ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kano S et al. 2008; Watanabe M et al. 2009), της επιδιόρθωσης του DNA (Masuda Y et al. 2015), της πολυδυναμίας των κυττάρων (Sato T et al. 2012), της μεταγωγής σήματος

(Okumura F et al. 2010) και της μεταγραφής (Kikuchi M et al. 2009). Ειδικότερα, η περιοχή SPRY, μέσω της οποίας αλληλεπιδρά η myospryn με τη δεσμίνη, εκτός από την οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών έχει βρεθεί σε περίπου 11 πρωτεϊνικές οικογένειες, όπως οι υποδοχείς επιφάνειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (BTNns) και οι αρνητικοί ρυθμιστές του μονοπατιού JAK/STAT (SOCS-box, SSB1-4). Οι πρωτεΐνες αυτές καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της μεταβίβασης σήματος των κυτταροκινών (SOCS), του μεταβολισμού του RNA (DDX1, hnRNPs), της ενδοκυττάριας απελευθέρωσης του Ca^{+2} (υποδοχείς RyR), της πυρηνικής εισόδου και εξόδου, της ανοσίας έναντι ρετροϊών (TRIM5a), καθώς επίσης και διαφόρων ρυθμιστικών και αναπτυξιακών διαδικασιών (HERC1, Ash2L) (Rhodes DA et al. 2005). Κάποιες από τις προαναφερθείσες διαδικασίες είναι εξαιρετικής σημασίας για τη λειτουργία και την ακεραιότητα του μυός και είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της δεσμίνης και της myospryn πιθανώς να διευκολύνει κάποιες από αυτές.

Τέλος, οι μεταβολές στις πρωτεΐνες TRIM πιστεύεται ότι εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που περιλαμβάνουν νευροψυχιατρικές διαταραχές, αναπτυξιακές ασθένειες, καρδιαγγειακές παθήσεις, χρωμοσωμικές ανωμαλίες και μολυσματικές ασθένειες (Πίνακας 8). Πολλές δε μελέτες επισημαίνουν την εμπλοκή των πρωτεϊνών TRIM στον καρκίνο και στις φλεγμονώδεις και έμφυτες ανοσολογικές αντιδράσεις (Ozato K et al. 2008; Hatakeyama S, 2011; Watanabe M and Hatakeyama S, 2017).

Πίνακας 8: Μεταβολές των γονιδίων των TRIM πρωτεϊνών σε διάφορες ασθένειες. Η TRIM76/myospryn εμπλέκεται στη σχιζοφρένεια και σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Watanabe M and Hatakeyama S, 2017).

	Disease	Gene	Alteration	
Neuropsychiatric disorders	MS	TRIM5	SNP rs3802981 (synonymous)	
			SNP rs1498553 (synonymous)	
			SNP rs3802980 (synonymous)	
			SNP rs7114084 (synonymous)	
			SNP rs2133256 (synonymous)	
			SNP rs7117107 (synonymous)	
			SNP rs4992801 (synonymous)	
			TRIM10	SNP rs1557608 (synonymous)
			SNP rs2022065 (synonymous)	
			SNP rs9261535 (synonymous)	
			TRIM15	SNP rs929156 (S324N)
			SNP rs2844786 (synonymous)	
			TRIM20	SNP rs61752717 (M694V)
			SNP rs3743930 (E148Q)	
	SNP rs28940579 (V726A)			
	TRIM26	SNP rs4711211 (synonymous)		
	TRIM39	SNP rs261949 (synonymous)		
	SNP rs928822 (synonymous)			
	TRIM40	SNP rs757262 (T212M)		
	SNP rs757259 (E244K)			
	Schizophrenia	TRIM3	Upregulation	
		TRIM19	SNP (T75M)	
		TRIM26	SNP rs2021722 (synonymous)	
		TRIM76	SNP rs3828611 (H3358Q)	
SNP rs10043986 (P4063L)				
TRIM20		SNP rs61752717 (M694V)		
AD	ADHD	TRIM31	SNP rs2023472 (synonymous)	
		TRIM32	Copy number variation	
Others		TRIM33	SNP rs6537825 (I840T)	
		TRIM1	SNP rs551253128 (N343S)	
		SNP rs587777605 (R347Q)		
		TRIM2	SNP rs587777063 (E227V)	
SNP rs587777838 (K567Rfs7X)				
TRIM47	SNP rs1055129 (synonymous)			
SNP rs3744017 (synonymous)				
TRIM65	SNP rs3744028 (synonymous)			
SNP rs3760128 (L509P)				
Developmental diseases	Opitz syndrome	TRIM18	Various non-synonymous mutations	
	AT	TRIM29	Complementation of cells from patients	
	LGMD2H	TRIM32	SNP rs121434447 (R394H)	
			SNP rs111033570 (D487N)	
			SNP rs762110851 (D588del)	
	BBS	TRIM32	SNP rs111033571 (P130S)	
Mulibrey nanism	TRIM37	Various non-synonymous mutations		
WBS	TRIM50	Location in deleted chromosomal region (7q11.23)		
Cardiovascular and metabolic diseases	Obesity	TRIM3	Lower CpG methylation	
	Paget's disease	TRIM19	SNP rs5742915 (F645L)	
	AMI	TRIM20	SNP rs61752717 (M694V)	
	Muscular atrophy	TRIM63	Upregulation in various atrophy conditions	
	Cardiomyopathies	TRIM63	SNP rs140523053 (A48V)	
			SNP rs377334933 (I130M)	
			SNP rs148395034 (Q247X)	
LVH	TRIM76	SNP rs2278239 (K2906N)		

16. Μεμβρανική μεταφορά

Μία από τις κύριες διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για τη σωστή τοπολόγηση των μορίων μέσα στο κύτταρο, ονομάζεται μεμβρανική μεταφορά (membrane trafficking) ή διαμετακίνηση κυστιδίων (vesicular transport).

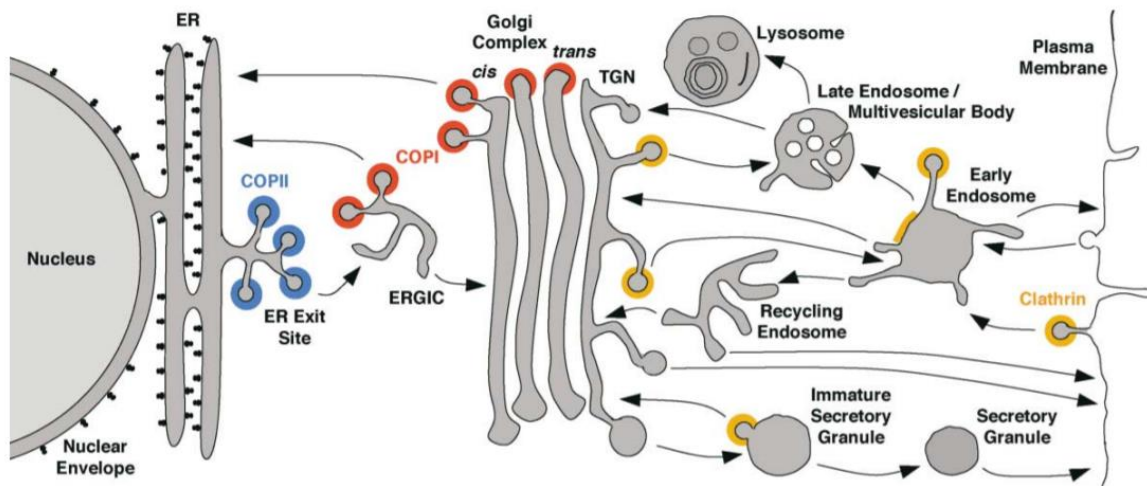
16.1 Ενδοκυττάρωση

Η ενδοκυττάρωση είναι μια ενεργή διαδικασία που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για να εγκολπώνουν και να εσωτερικεύουν σε κυστίδια, μόρια και

μακρομόρια από το εξωκυττάριο περιβάλλον, σε αντίθεση με την εξωκύτταρωση που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή από τα κύτταρα αυτών των μορίων, χρησιμοποιώντας εκκριτικά κυστίδια. Στην ενδοκύτταρωση, μόρια από το εξωκυττάριο περιβάλλον εσωτερικεύονται από ένα τμήμα της πλασματικής μεμβράνης που θα σχηματίσει ένα κυστίδιο. Αυτό το κυστίδιο θα συγχωνευθεί με πρώιμα ενδοσώματα (early endosomes), τα οποία είναι σχηματισμοί με σωληνοειδείς επεκτάσεις που εντοπίζονται στην περιφέρεια του κυττάρου. Στη συνέχεια, τα φορτία προωθούνται στα όψιμα ενδοσώματα (late endosomes) προκειμένου να μεταφερθούν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση ή να ανακυκλωθούν ξανά πίσω στην πλασματική μεμβράνη απευθείας ή μέσω περι-πυρηνικών ανακυκλούμενων ενδοσωμάτων (perinuclear recycling endosomes). Η ενδοκυτταρική οδός χαρακτηρίζεται από την προοδευτική οξίνιση των ενδοσωμικών οργανιδίων, το σχηματισμό πολυκυστιδικών σωματιδίων (multivesicular bodies) και όψιμων ενδοσωμάτων, τη συσσώρευση των λυσοσωμικών υδρολασών από το δίκτυο trans-Golgi και, τέλος, την αποικοδόμηση των φορτίων. Αντ' αυτού, στο εκκριτικό μονοπάτι η συσκευή Golgi πακετάρει τα μακρομόρια σε κυστίδια που κινούνται προς την πλασματική μεμβράνη και συγχωνεύονται με αυτήν για την εξαγωγή του περιεχομένου τους έξω από το κύτταρο (Εικόνα 12) (Olkkonen VM and Ikonen E, 2006; Jahn R, 2004; Brooks DA, 2009).

Αυτή η απομάκρυνση της μεμβράνης από την κυτταρική επιφάνεια εξισορροπείται από τις οδούς ανακύκλωσης ενδοσωμάτων που επιστρέφουν πολλές από τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια πίσω στην πλασματική μεμβράνη. Η ισορροπία μεταξύ της ενδοκυτταρικής πρόσληψης και της ανακύκλωσης ελέγχει τη σύνθεση της πλασματικής μεμβράνης και συμβάλλει σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, της κυτταρικής προσκόλλησης και του σχηματισμού συνδέσμων, της κυτταρικής μετανάστευσης, της κυτταρικής πολικότητας και της μεταγωγής σήματος.

Ένας πολύπλοκος μοριακός μηχανισμός ελέγχει τα διάφορα στάδια της ενδοκυτταρικής διαμετακίνησης κυστιδίων, όπως ο σχηματισμός του κυστιδίου, η επιλογή του φορτίου, η κίνηση του κυστιδίου και η πρόσδεση, η προσάρτηση και η σύντηξη στο διαμέρισμα δέκτη. Οι πρωτεΐνες Rab, οι μικρές GTPases που ανήκουν στην υπεροικογένεια ras, είναι βασικά μόρια αυτού του μηχανισμού και θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 12: Μονοπάτια ενδοκυτταρικής μεταφοράς. Το σχήμα απεικονίζει τα διαμερίσματα των εκκριτικών, λυσοσωμικών/κυστιδικών και ενδοκυτταρικών μονοπατιών. Τα διαδοχικά βήματα μεταφοράς υποδεικνύονται με βέλη. Το κάθε χρώμα υποδεικνύει τις γνωστές ή πιθανές τοποθεσίες των COPII (Coat protein II) (μπλε), COPI (Coat protein I) (κόκκινο) και clathrin (πορτοκαλί). Το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης μέσω της clathrin είναι ετερογενές και περιέχει διαφορετικές πρωτεΐνες προσαρμογείς και βοηθητικές σε διαφορετικές μεμβράνες. Μόνο η λειτουργία του COPII στην έξοδο από το ER και της ενδοκυττάρωσης της πλασματικής μεμβράνης μέσω της clathrin είναι γνωστές με βεβαιότητα. Λιγότερο κατανοητές είναι οι ακριβείς λειτουργίες των COPI στο ERGIC και το Golgi σύμπλεγμα και της clathrin στο TGN, τα πρώιμα ενδοσώματα και τα ανώριμα εκκριτικά κοκκία. Η διαδρομή μεταφοράς μέσω του συμπλέγματος Golgi εξακολουθεί να διερευνάται, αλλά γενικά πιστεύεται ότι περιλαμβάνει έναν συνδυασμό κυστιδικής μεταφοράς με τη μεσολάβηση του COPI και ωρίμανσης με σιστερνισμό (Bonifacino JS and Glick BS, 2004).

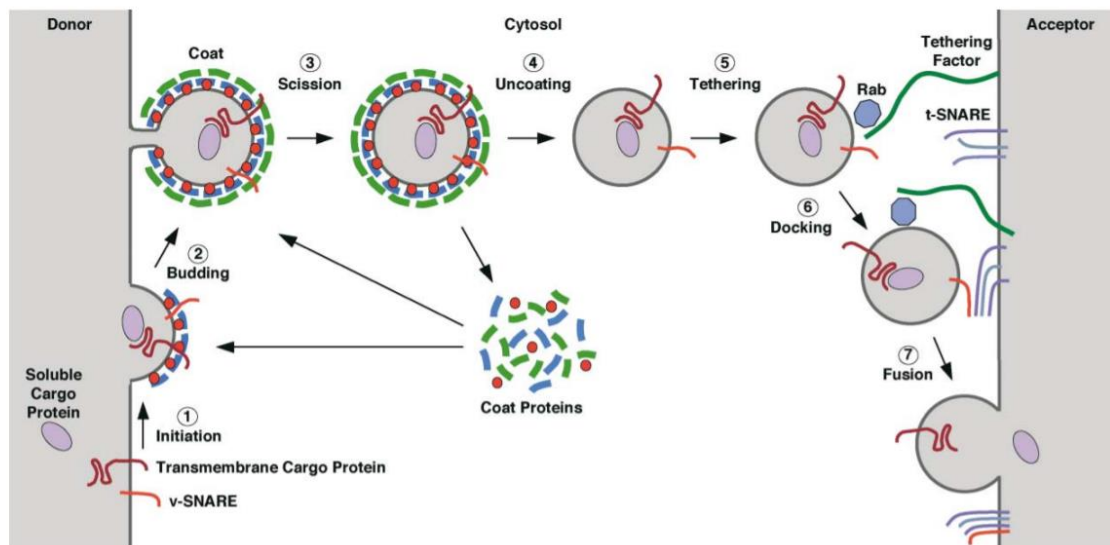
16.2 Συμβατικό εκκριτικό μονοπάτι

Μέσω της διαδικασίας της εξωκυττάρωσης, το εκκριτικό μονοπάτι μεταφέρει νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια, είτε στην πλασματική μεμβράνη, είτε στον εξωκυτταρικό χώρο. Ειδικότερα, μεμβρανικές δομές-φορείς, οι οποίες μπορεί να είναι μικρά κυστίδια ή και μεγαλύτερες σωληνοειδείς δομές, αποκόβονται από ένα κυτταρικό διαμέρισμα-δότη (budding) και συντήκονται (fussion) με ένα άλλο κυτταρικό διαμέρισμα-δέκτη, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο, είτε το μεμβρανικό, είτε το διαλυτό περιεχόμενό τους στο οργανίδιο στόχο (Εικόνα 13) (Oikkonen VM and Ikonen E, 2006).

Οι περισσότερες μεμβρανικές και εκκριτικές πρωτεΐνες, καθώς και πολλά λιπίδια, συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το περιβάλλον του οποίου είναι κατάλληλα προσαρμοσμένο για τη διευκόλυνση της σωστής αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων

πρωτεϊνών, καθώς και των αρχικών σταδίων της N-γλυκοζυλίωσής τους. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για μεταφορά εκτός του ER μετακινούνται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου και υφίστανται περαιτέρω μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Ακολούθως, οι πρωτεΐνες εξέρχονται προς διαφορετικούς προορισμούς: την πλασματική μεμβράνη, ρυθμιζόμενα εκκριτικά κοκκία ή κυστίδια ή οργανίδια της ενδοκυτταρικής οδού (Bard F and Malhotra V, 2006; McNiven MA and Thompson HM, 2006).

Αυτή η κατευθυνόμενη πορεία αντισταθμίζεται από την μεταφορά προς την αντίθετη κατεύθυνση, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των οργανιδίων και την επαναχρησιμοποίηση των συστατικών της μηχανής μεταφοράς (Sannerud R et al. 2003). Οι εξερχόμενες και οι εισερχόμενες οδοί κυκλοφορίας επικοινωνούν μέσω της αμφίδρομης μεταφοράς μεταξύ του συμπλέγματος Golgi και των ενδοσωμάτων (Bonifacino and Rojas, 2006).



Εικόνα 13: Στάδια κυστιδικής αποκόλλησης και σύντηξης. (1) Έναρξη της συναρμολόγησης του επιχρίσματος. Τα συστατικά της εγγύς μεμβράνης επίστρωσης (μπλε) προσελκύνονται στο διαμέρισμα δότη μέσω πρόσδεσης σε μια GTPase (κόκκινη) συνδεδεμένη με μεμβράνη και/ή σε ένα συγκεκριμένο φωσφοϊνοσιτίδιο. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που θα μεταφέρουν το φορτίο και οι SNAREs αρχίζουν να συγκεντρώνονται στο σημείο συναρμολόγησης του επιχρίσματος.

(2) **Εκβλάστηση.** Τα συστατικά της απομακρυσμένης-μεμβράνης επιχρίσματος (πράσινο) προστίθενται και πολυμερίζονται σε δομή τύπου πλέγματος. Το φορτίο συμπυκνώνεται και αυξάνεται η καμπυλότητα της μεμβράνης. (3) **Διάσπαση.** Ο λαιμός μεταξύ του κυστιδίου και του διαμερίσματος του δότη έχει αποκοπεί, είτε με άμεση δράση του επιχρίσματος, είτε με βοηθητικές πρωτεΐνες. (4) **Απομάκρυνση του επιχρίσματος.** Το κυστίδιο χάνει το επίχρισμά του λόγω διαφόρων συμβάντων,

συμπεριλαμβανομένης της απενεργοποίησης της μικρής GTPase, της υδρόλυσης του φωσφοϊνοσιτιδίου και της δράσης ενζύμων που αφαιρούν το επίχρισμα. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες του επιχρίσματος στη συνέχεια ανακυκλώνονται για επιπλέον γύρους κυστιδικής εκβλάστησης. **(5) Σύγκλιση.** Το "γυμνό" κυστίδιο μετακινείται στο διαμέρισμα δέκτη, ενδεχομένως καθοδηγούμενο από τον κυτταροσκελετό, και δεσμεύεται στο διαμέρισμα δέκτη μέσω του συνδυασμού ενός GTP δεσμευμένου με Rab και ενός παράγοντα πρόσδεσης. **(6) Σύντηξη.** Οι v- και οι t-SNAREs συναρμολογούνται σε μια δέσμη τεσσάρων ελίκων. **(7)** Αυτό το "σύμπλεγμα trans-SNARE" προωθεί τη σύντηξη της διπλοστοιβάδας λιπιδίων του κυστιδίου και του δέκτη. Το φορτίο μεταφέρεται στο διαμέρισμα δέκτη και οι SNAREs ανακυκλώνονται (Bonifacino JS and Glick BS, 2004).

17. Πρωτεΐνες Rab

Ένας πολύπλοκος μοριακός μηχανισμός ελέγχει τα διάφορα στάδια της ενδοκυτταρικής διαμετακίνησης κυστιδίων, όπως ο σχηματισμός του κυστιδίου, η επιλογή του φορτίου, η κίνηση του κυστιδίου και η πρόσδεση, η προσάρτηση και η σύντηξη στο διαμέρισμα δέκτη. Οι πρωτεΐνες Rab, οι μικρές GTPases που ανήκουν στην υπεροικογένεια ras, είναι βασικά μόρια αυτού του μηχανισμού. Εντοπίζονται σε συγκεκριμένα διαμερίσματα στην ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική οδό και ρυθμίζουν διάφορα βήματα της ενδοκυτταρικής διαμετακίνησης κυστιδίων, από το σχηματισμό του κυστιδίου έως τη σύντηξή του με το διαμέρισμα στόχο (Bhain T and Roy JK, 2014). Κάθε πρωτεΐνη Rab ρυθμίζει τη μεταφορά μεταξύ καθορισμένων διαμερισμάτων. Για παράδειγμα, η Rab5 ρυθμίζει τα πρώτα στάδια ενδοκυττάρωσης από την πλασματική μεμβράνη στα πρώιμα ενδοσώματα και είναι υπεύθυνη για την βιογένεση και ωρίμανση των πρώιμων ενδοσωμάτων, ελέγχοντας την επιλογή φορτίου, ρυθμίζοντας την κινητικότητα και τη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων και προσελκύνοντας μόρια που είναι απαραίτητα για την ενδοκυττάρωση (Gorvel JP et al. 1991; Bucci C et al. 1992; Nielsen E et al. 1999; Zeigerer A et al. 2012; Kiral FR et al. 2018). Από την άλλη πλευρά, οι Rab4, Rab11 και Rab25 ρυθμίζουν την ανακύκλωση από τα ενδοσώματα στην πλασματική μεμβράνη (McCaffrey MW et al. 2001; Takahashi S et al. 2012; Kessler D et al. 2012; Grant BD and Donaldson JG, 2009; Kiral FR et al. 2018).

18. Μη συμβατικό μονοπάτι έκκρισης πρωτεϊνών (UPS/ unconventional protein secretion)

Όπως προαναφέρθηκε, οι περισσότερες εκκριτικές πρωτεΐνες ταξιδεύουν μέσω μιας καλά τεκμηριωμένης συμβατικής οδού έκκρισης που περιλαμβάνει το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και το σύμπλεγμα Golgi από όπου έπειτα μεταφέρονται στο δίκτυο trans-Golgi (TNG) και τελικώς στην πλασματική μεμβράνη. Αυτή η διαδικασία ξεκινάει με την αναγνώριση ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου (επίσης γνωστού ως αλληλουχία οδηγός-leader sequence) στο N-τελικό άκρο ή στη διαμεμβρανική περιοχή των πρωτεϊνών-φορτία, ακολουθούμενη από διαδοχική εκβλάστηση και σύντηξη των κυστιδικών φορέων (Bonifacino JS and Glick BS, 2004).

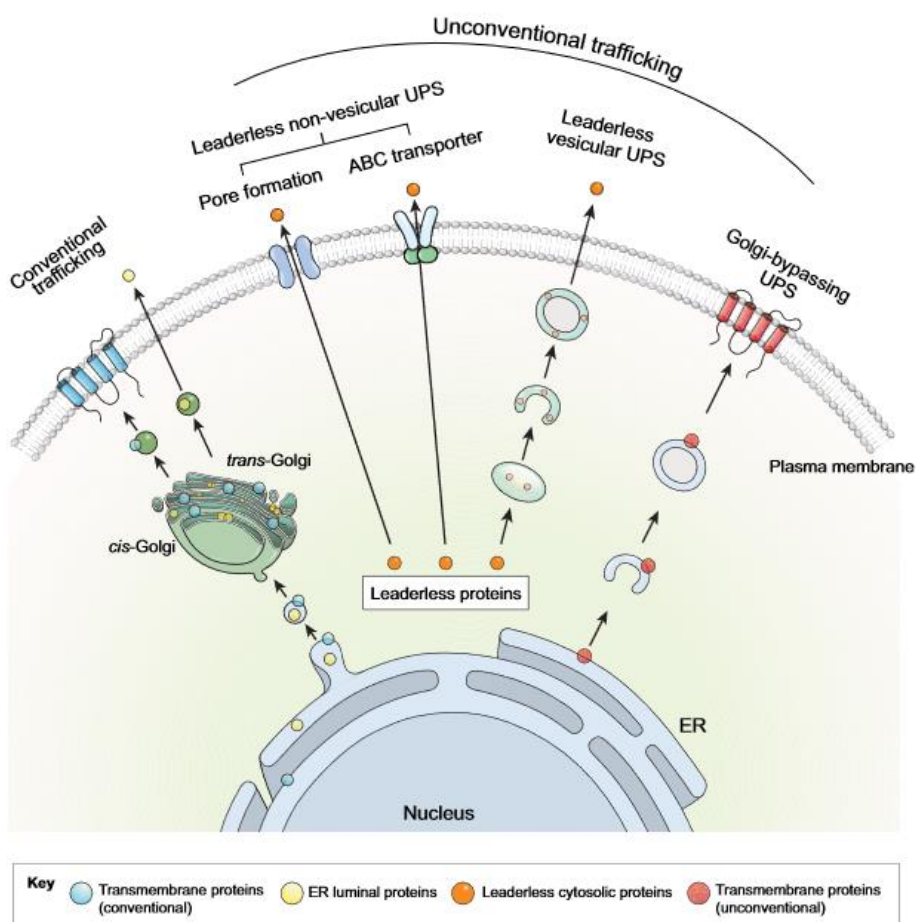
Παρόλα αυτά, τελευταία δεδομένα αναδεικνύουν ότι ένας αυξανόμενος αριθμός πρωτεϊνών φθάνει στην πλασματική μεμβράνη ή στον εξωκυτταρικό χώρο χρησιμοποιώντας εναλλακτικές εκκριτικές οδούς που δεν εμπλέκουν τη μεταφορά ER-Golgi. Αυτές οι εναλλακτικές οδοί περιλαμβάνουν την εξωκυτταρική έκκριση κυταροπλασματικών πρωτεϊνών που δεν περιέχουν σηματοδοτικό πεπτίδιο και τη διακίνηση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών παρακάμπτοντας το Golgi (Golgi-bypass). Αυτές οι οδοί συλλογικά αναφέρονται ως μη συμβατική έκκριση πρωτεΐνης (UPS/ unconventional protein secretion) (Malhotra V, 2013; Rabouille C, 2017).

Αναλυτικότερα, δύο κατηγορίες πρωτεϊνών εκκρίνονται μέσω της μη συμβατικής οδού. Η πρώτη περιλαμβάνει κυταροπλασματικές πρωτεΐνες, χωρίς πεπτίδιο οδηγό που διασχίζουν την πλασματική μεμβράνη και είναι δραστικές στην εξωκυττάρια ουσία, παρόλο που δεν έχουν σηματοδοτικό πεπτίδιο ή διαμεμβρανική περιοχή. Να σημειωθεί ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να περιέχουν άλλα σήματα που κατευθύνουν την έκκριση τους. Οι πρωτεΐνες χωρίς πεπτίδιο οδηγό εκκρίνονται μέσω τριών μονοπατιών που διαμεσολαβούνται από διαφορετικούς μηχανισμούς:

- α) **Τύπου I** μονοπάτι ή μετατόπιση μέσω της πλασματικής μεμβράνης με τη μεσολάβηση πόρων,
- β) **Τύπου II** μονοπάτι ή έκκριση που βασίζεται στον ABC μεταφορέα, το οποίο είναι αφιερωμένο στην έκκριση ακυλιωμένων πεπτιδίων και πεπτιδίων ζευγαρώματος ζύμης, και
- γ) **Τύπου III** μονοπάτι ή έκκριση βασιζόμενη στα αυτοφαγосώματα/ενδοσώματα.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες με πεπτίδιο οδηγό και/ή διαμεμβρανική περιοχή που εισέρχονται στο ER, αλλά παρακάμπτουν τη συσκευή Golgi στο δρόμο τους προς την πλασματική μεμβράνη. Αυτό είναι το μονοπάτι **τύπου IV ή Golgi-bypass** (Εικόνα 14) (Malhotra V, 2013; Rabouille C, 2017).

Η κατανόηση των οδών της UPS δεν είναι σημαντική μόνο για την αποσαφήνιση των μηχανισμών των οδών ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας, αλλά έχει και σημαντικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, επειδή πολλές από τις πρωτεΐνες που εκκρίνουν ασυνήθιστα τα κύτταρα των θηλαστικών και οι μικροοργανισμοί συνδέονται με ανθρώπινες ασθένειες, όπως για παράδειγμα κοινές φλεγμονώδεις νόσοι, αλλά και η θανατηφόρος γενετική ασθένεια της κυστικής ίνωσης. Με λίγες εξαιρέσεις, τα περισσότερα μονοπάτια UPS επάγονται από διάφορες κυτταρικές πιέσεις, όπως η στέρηση θρεπτικών συστατικών, το μηχανικό στρες, η φλεγμονή και το ER στρες. Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι πιθανώς το στρες να εμποδίζει τη λειτουργία του κλασσικού εκκριτικού μονοπατιού, με αποτέλεσμα να δημιουργείται η ανάγκη για πιο αποτελεσματικά εναλλακτικά μονοπάτια (Malhotra V, 2013; Rabouille C, 2017; Kim J et al. 2018).



Εικόνα 14: Τα μονοπάτια της έκκρισης πρωτεϊνών. Η συμβατική οδός έκκρισης περιλαμβάνει τη μεταφορά φορτίου από το ER στο Golgi (μπλε και κίτρινοι κύκλοι). Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιούν εναλλακτικά εκκριτικά μονοπάτια, γνωστά ως μη συμβατική έκκριση πρωτεΐνης (UPS) που δεν περιλαμβάνουν τη μεταφορά φορτίου από το ER στο Golgi. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες χωρίς αλληλουχία οδηγό (πορτοκαλί κύκλοι) μπορούν να εκκρίνονται από τα κύτταρα μέσω μη-κυστιδικών μονοπατιών, όπως για παράδειγμα μέσω πόρων στη μεμβράνη και/ή μέσω του μεταφορέα ABC. Για παράδειγμα το UPS μονοπάτι του FGF2 περιλαμβάνει το σχηματισμό πόρων στη μεμβράνη. Άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες χωρίς αλληλουχία οδηγό συμπεριλαμβανομένων των IL-18, IL-33, α-συνουκλεΐνης και αμυλοειδούς-β, μπορούν να εκκρίνονται μέσω κυστιδίων που σχετίζονται με αυτοφαγία, όπως λυσοσώματα και όψιμα ενδοσώματα. Επιπλέον, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (κόκκινοι κύκλοι) μπορούν να φθάσουν στην πλασματική μεμβράνη παρακάμπτοντας το Golgi (Golgi-bypassing UPS). Τέτοια παραδείγματα είναι η αPS1 ιντεγκρίνη, η Mpl και το ΔP508-CFTR, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν στην πλασματική μεμβράνη με το UPS μονοπάτι που εξαρτάται από GRASP (Golgi Reassembly Stacking Protein) (Kim J et al. 2018).

19. Νέοι ρόλοι των ενδιάμεσων ινιδίων: εμπλοκή στη διαμετακίνηση κυστιδίων

Παραδόξως, έχει ανακαλυφθεί ένας ρόλος των ενδιάμεσων ινιδίων στην διαμετακίνηση κυστιδίων και έχουν βρεθεί αρκετές συνδέσεις μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων και του μηχανισμού της κυστιδικής μεταφοράς μεμβρανών (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Κατάλογος των συνδέσεων μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων και του μηχανισμού της κυστιδικής μεταφοράς μεμβρανών (Margiotta A and Bucci C, 2015).

IF	Interaction	Function in Vesicular Trafficking
Keratin 8		Formation of autophagosomes (Blankson H et al. 1995)
		Syntaxin 3 targeting (Ameen NA et al. 2001)
Vimentin	Rab7a regulates vimentin phosphorylation state and assembly (Cogli L et al. 2013)	
		Endocytosis of Jagged-1 (Wilhelmsson U et al. 2012)
		Inhibition of endocytic vesicles fusion in mitosis (Ikawa K et al. 2014)
		Rab21-regulated β1-integrin trafficking to the cleavage furrow (Ikawa K et al. 2014)
	AP-3 (Styers ML et al. 2004)	Positioning of late endosomal-lysosomal compartments, luminal ionic composition of endocytic organelles and content of autophagosomes (Styers ML et al. 2004)
	Rab9 (Walter M et al. 2009)	
	Rab5 (Kurzchalia TV et al. 1992)	
	Directional mobility of vesicles (Potokar M et al. 2007)	
	Activity-dependent mobility of endosomes/lysosomes (Potokar M et al. 2010;	

		Vardjan N et al. 2012)
		Integrin recycling (Ivaska J et al. 2005)
		Reservoir for SNAP23 (Faigle W et al. 2000)
	Rab4A (Mruk DD et al. 2007)	
		Intracellular transport of glycolipids (Gillard BK et al. 1998)
GFAP		Directional mobility of vesicles (Potokar M et al. 2007)
		Endocytosis of Jagged-1 (Wilhelmsson U et al. 2012)
		Activity-dependent mobility of endosomes/lysosomes (Potokar M et al. 2010; Vardjan N et al. 2012)
Peripherin	Rab7a regulates peripherin assembly (Cogli L et al. 2013)	
	AP-3 (Styers ML et al. 2004)	
	SIP30 affects peripherin assembly (Gentil BJ et al. 2014)	Lysosomal transport (Perrot R et al. 2009) Subcellular distribution of SIP30 and SNAP25 (Gentil BJ et al. 2014)
Desmin		Lysosomal distribution (Kouloumenta A et al. 2007)
	Rab5 (Kurzchalia TV et al. 1992)	
NF-L		Lysosomal transport (Perrot R et al. 2009)
α-Internexin	AP-3 (Styers ML et al. 2004)	
Drosophila lamin	Rab5 regulates lamin disassembly (Capalbo L et al. 2011)	

Στη συνέχεια, θα αναλύσουμε την εμπλοκή των ενδιάμεσων ινιδίων τόσο στη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, όσο και της εξωκυττάρωσης.

19.1 Ενδοκυττάρωση και ενδιάμεσα ινίδια

Αρκετές μελέτες καταδεικνύουν ότι τα ενδιάμεσα ινίδια και η διαμετακίνηση κυστιδίων είναι στενά συνδεδεμένες και ότι τα ενδιάμεσα ινίδια διαδραματίζουν κάποιο ρόλο σε διάφορα στάδια ενδοκυττάρωσης. Αρχικά, μερικές αναφορές δείχνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων και των Rab πρωτεϊνών, στη διαλογή και στην ανακύκλωση των πρώιμων ενδοσωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ενδιάμεσα ινίδια ενδέχεται να έχουν κάποιο ρόλο στα πρώτα στάδια της ενδοκυττάρωσης (Kurzchalia TV et al. 1992; Ivaska J et al. 2005; Mruk DD et al. 2007). Για παράδειγμα, η Rab4 που εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα και στα ανακυκλούμενα κυστίδια, έχει δείχτει ότι αλληλεπιδρά με τη vimentin στα κύτταρα Sertoli, στο σπερματικό σωληνάριο και στους όρχεις (McCaffrey MW et al. 2001; Mruk DD et al. 2007). Επιπλέον, έχουν βρεθεί μια σειρά κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη Rab5 και μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών υπήρχε η vimentin και η δεσμίνη (Kurzchalia TV et al. 1992).

Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ο ρόλος της vimentin στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής μεταφοράς σε διαφορετικά επίπεδα. Πρώτα από όλα, η vimentin συνεργάζεται με PKCε-θετικά κυστίδια που μεσολαβούν στη μεταφορά της β 1-

ιντεγκρίνης και η φωσφορυλίωση της vimentin, με τη μεσολάβηση της PKCε, καθορίζει τη διάσταση του συμπλόκου PKCε-vimentin από το κυτίδιο, υποδηλώνοντας έτσι ότι η vimentin έχει ένα ρόλο στη διακίνηση της β1-ιντεγκρίνης (Ivaska J et al. 2005).

Αρκετές αναφορές καταδεικνύουν επίσης μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων και της μεταφοράς των όψιμων ενδοσωμάτων και οι περισσότερες από αυτές επικεντρώνονται στη vimentin. Έχει δειχθεί ότι η vimentin αλληλεπιδρά τόσο με τη Rab7a, όσο και με τη Rab9 (Cogli L et al. 2013; Walter M et al. 2009). Η Rab7a ρυθμίζει τη μεταφορά από τα όψιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα και είναι σημαντική για τη βιογένεση των λυσοσωμάτων (Bucci C et al. 2000; Jager S et al. 2004). Η βιογένεση των λυσοσωμάτων ρυθμίζεται επίσης από τη Rab9, η οποία έχει ρόλο όχι μόνο στη μεταφορά από το δίκτυο trans-Golgi στα όψιμα ενδοσώματα (Riederer MA et al. 1994), αλλά και στον καθορισμό της μορφολογίας και της τοπολογίας των όψιμων ενδοσωμάτων (Ganley IG et al. 2004). Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι η Rab7a ρυθμίζει τη συναρμολόγηση και την οργάνωση των ινιδίων της vimentin τροποποιώντας τη φωσφορυλίωσή της (Cogli L et al. 2013).

Μια άλλη σχετική αλληλεπίδραση που αποδεικνύει τη σημασία της vimentin στη ενδοκυτταρική διακίνηση είναι αυτή μεταξύ της vimentin και του συμπλόκου AP-3, η οποία είναι σημαντική στη διαλογή των πρωτεϊνών στο ενδοσωμικό/λυσοσωμικό σύστημα και προσελκύεται από το κυτταρόπλασμα στις μεμβράνες με έναν ARF1-GTP-εξαρτώμενο τρόπο (Styers ML et al. 2004). Η έλλειψη της vimentin μεταβάλλει την υποκυτταρική κατανομή του AP-3 και των λυσοσωμάτων, αλλά επίσης και τα επίπεδα των λυσοσωμικών πρωτεϊνών LAMP-1 και LAMP-2, υποδηλώνοντας ότι τα ενδιάμεσα ινίδια μπορεί να ρυθμίζουν τη διακίνηση λυσοσωμικών φορτίων, πιθανώς μαζί με το AP-3 (Styers ML et al. 2004). Η vimentin πιστεύεται ότι ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της AP-3, την εξαρτώμενη από την AP-3 μεταφορά σε ενδοκυτταρικά οργανίδια, καθώς και την τοπολογία των λυσοσωμάτων (Styers ML et al. 2004). Επιπλέον, η vimentin έχει συνδεθεί με τη μεταφορά μελανοσωμάτων στο *Xenopus laevis* (Chang L et al. 2009).

Θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ο μη φυσιολογικός περι-πυρηνικός εντοπισμός των λυσοσωμάτων που παρατηρείται σε απομονωμένα μυοκαρδιοκύτταρα από des-/- ποντίκια, είναι πολύ παρόμοιος με εκείνον που παρατηρείται απουσία vimentin σε ινοβλάστες (Styers ML et al. 2004). Η παρατηρούμενη εσφαλμένη τοπολογία μπορεί να αντικατοπτρίζει ανωμαλία στο σχηματισμό κυστιδίων, είτε εξαιτίας ανωμαλίας

στην εκβλάστηση κυστιδίων και στη σύντηξη, είτε στην προσέλκυση του προσαρμογέα πρωτεϊνών στις θέσεις σχηματισμού κυστιδίων. Από την άλλη πλευρά, τα ενδιάμεσα ινίδια θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως άγκυρα για τα λυσοσώματα ή ως μια γέφυρα ανάμεσα στα κυστίδια και τις κινητήριες πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να τα μετακινήσουν. Λαμβάνοντας υπόψη την αναφορά όπου βρέθηκε ότι το BLOC-1 είναι παρόν σε κυστίδια που προέρχονται από AP-3 και ότι και τα δύο μπορούν να ρυθμίσουν τη στόχευση των AP-3 πρωτεϊνών φορτία (Salazar G et al. 2006), θεωρούμε ότι η myospryn μαζί με τη δεσμίνη, μπορεί να ρυθμίζουν τη συνύπαρξη BLOC-1/AP-3 στο ίδιο κυστίδιο και κατά συνέπεια τη σωστή κυτταρική μετακίνηση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όπως αναφέρθηκε και εκτενώς παραπάνω η δεσμίνη αλληλεπιδρά με τη myospryn, η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την υπομονάδα του BLOC-1, dysbindin και έτσι πιθανώς, η δεσμίνη μέσω της myospryn να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη βιογένεση ή/και τοπολόγηση των οργανιδίων της λυσοσωμικής συσκευής (Kouloumenta A et al. 2007).

Έχει μεγάλη σημασία ότι, ένα άλλο τύπου III μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων, η GFAP, έχει περιγραφεί ως πρωτεΐνη συσχετιζόμενη με λυσοσώματα και συγκεκριμένα πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη LAMP-2A (Bandyopadhyay U et al. 2010). Εκτός από τη vimentin, άλλες δύο πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, η περιφερίνη και η α -internexin αλληλεπιδρούν επίσης με το σύμπλοκο AP-3 (Styers ML et al. 2004).

Τέλος, εκτός από τη ρύθμιση των λυσοσωμικών φορτίων και του περιεχομένου του αυλού των όψιμων ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων, τα ενδιάμεσα ινίδια έχουν ρόλο στην κατανομή και την κινητικότητα των όψιμων κυστιδίων. Για παράδειγμα, η vimentin, μαζί με τη GFAP, ρυθμίζουν την κινητικότητα των ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων και την ενδοκυττάρωση στα αστροκύτταρα (Wilhelmsson U et al. 2012; Potokar M et al. 2010; Vardjan N et al. 2012). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η GFAP διαμορφώνει την αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών (CMA) (Bandyopadhyay U et al. 2010).

Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα ενδιάμεσα ινίδια αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες κλειδιά που εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρώιμης και όψιμης ενδοκυτταρικής οδού.

19.2 Εξωκυττάρωση και ενδιάμεσα ινίδια

Λίγες είναι οι διαθέσιμες ενδείξεις για την εμπλοκή των ενδιάμεσων ινιδίων στην εξωκυττάρωση. Η επικοινωνία μεταξύ των αστροκυττάρων και των νευρώνων προκαλείται από εξωκυτταρικά κυστιδία, των οποίων η κινητικότητα και η σύντηξη με την πλασματική μεμβράνη απαιτεί διαφορετικά στοιχεία του κυτταροσκελετού (Potokar M et al. 2007). Πράγματι, οι μικροσωληνίσκοι, αλλά και τα μικροϊνίδια είναι απαραίτητα για την κατευθυνόμενη κινητικότητα αυτών των κυστιδίων προς την πλασματική μεμβράνη (Potokar M et al. 2007). Παρόλα αυτά και τα ενδιάμεσα ινίδια φαίνεται να έχουν βασικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, καθώς ο αποπολυμερισμός των ενδιάμεσων ινιδίων προκαλεί ισχυρή παρεμπόδιση στη διακίνηση αυτών των κυστιδίων και μειώνει το κλάσμα των κυστιδίων που κινούνται προς την πλασματική μεμβράνη (Potokar M et al. 2007).

Τα ενδιάμεσα ινίδια και ειδικότερα οι κυτοκερατίνες έχουν εμπλακεί στην οργάνωση της κορυφαίας περιοχής της πλασματικής μεμβράνης σε μονόστιβα πολωμένα επιθήλια. Η έλλειψη των ινιδίων της κυτοκερατίνης, παρεμποδίζει τη διανομή στην κορυφαία περιοχή της πλασματικής μεμβράνης ενός αριθμού πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων η syntaxin 3, η οποία αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του μηχανισμού SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) της διαμετακίνησης κυστιδίων (Ameen NA et al. 2001). Η syntaxin 3 εμπλέκεται στη σύντηξη εξωκυτταρικών κυστιδίων με την κορυφαία περιοχή της πλασματικής μεμβράνης σε εντεροκύτταρα και σε περίπτωση απουσίας της κυτοκερατίνης 8 παρατηρείται μη σωστή στόχευση, επιβεβαιώνοντας έτσι τον ρόλο των ενδιάμεσων ινιδίων στη ρύθμιση της εξωκυττάρωσης (Ameen NA et al. 2001).

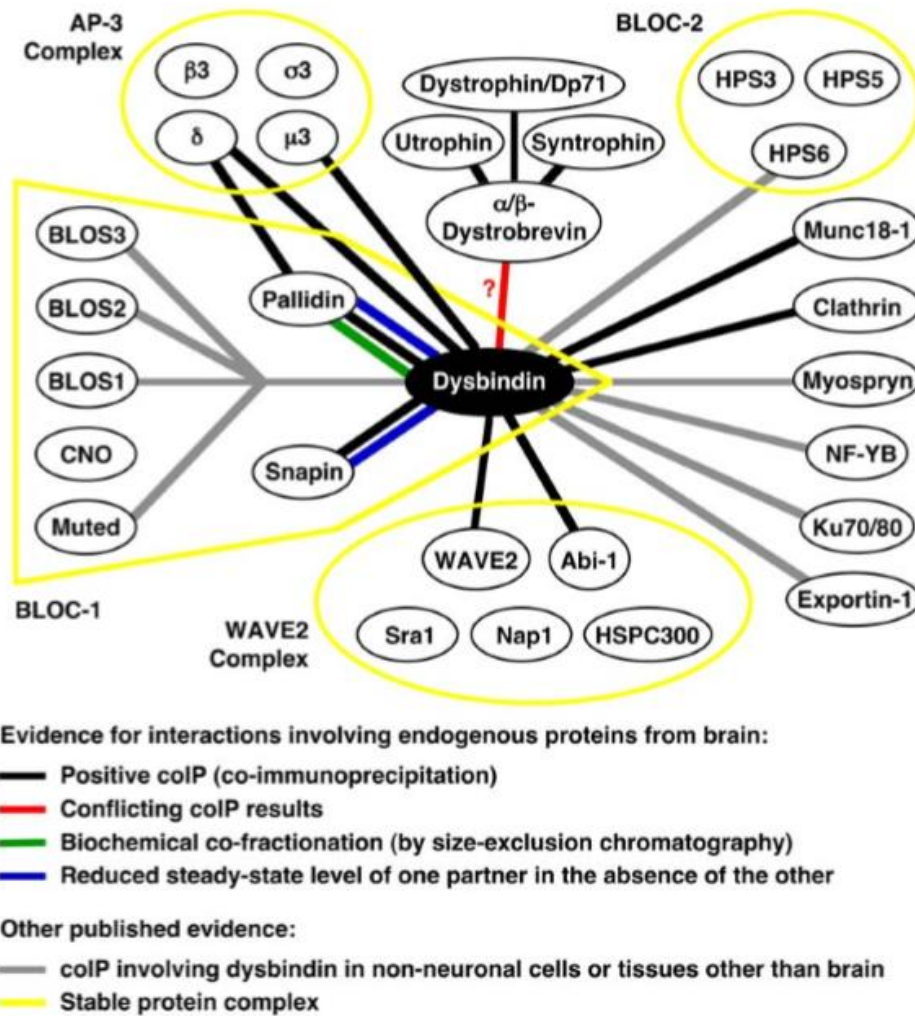
Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η περιφερίνη αλληλεπιδρά με την SIP30, μια νευρωνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εξωκυττάρωση εξαρτώμενη από SNARE (Gentil BJ et al. 2014). Αυτή η αλληλεπίδραση μεταβάλλει την υποκυτταρική διανομή των SIP30 και SNAP25, ενώ η SIP30 είναι σε θέση να επηρεάσει τη συγκρότηση της περιφερίνης. Έτσι, η περιφερίνη, μέσω της στενής λειτουργικής σχέσης με το SIP30, ελέγχει την εξωκυτταρική οδό στα νευρικά κύτταρα (Gentil BJ et al. 2014).

Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι η vimentin αλληλεπιδρά με τη SNAP23, μια ισομορφή της SNAP25 με καθολική έκφραση που εμπλέκεται στην εξωκυττάρωση των επιθηλιακών κυττάρων. Στο κυτταρόπλασμα η SNAP23 αλληλεπιδρά με τη

vimentin και συνεπώς, τα ινίδια της vimentin θεωρούνται δεξαμενή για τη SNAP23 που όταν χρειάζεται, συσσωρεύεται για να σχηματίσει σύμπλοκα SNARE στην πλασματική μεμβράνη. Επομένως, η vimentin μέσω της απομόνωσης της SNAP23 είναι σε θέση να ρυθμίζει την έκκριση (Faigle W et al. 2000).

20. BLOC-1 σύμπλοκο

Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο υπεύθυνο για τη βιογένεση λυσοσωμάτων και λυσοσωμικών σχετιζόμενων οργανιδίων (BLOC-1) απαρτίζεται από σύμπλοκα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που απαιτούνται για την εξειδικευμένη κυκλοφορία μεμβρανικών πρωτεϊνών κατά μήκος της ενδοκυτταρικής οδού. Πιο συγκεκριμένα, το BLOC-1 απαιτείται για τη διαλογή μεμβρανικών πρωτεϊνών των πρόιμων/ανακυκλούμενων ενδοσωμάτων. Το BLOC-1 σχηματίζεται από οκτώ υπομονάδες BLOC1S1 έως 6, dysbindin και snapin (Ghiani CA and Dell'angelica EC, 2011) (Εικόνα 15). Μια επιπλέον υπομονάδα, που αναφέρεται ως μη υποχρεωτική υπομονάδα του BLOC-1, η KXD1, έχει προταθεί ότι είναι μέρος του συμπλόκου BLOC-1. Η KXD1 είναι μια πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία που αλληλεπιδρά in vitro με τέσσερις από τις υπομονάδες BLOC1S1, BLOC1S2, BLOC1S4 και dysbindin του BLOC-1 (Yang Q et al. 2012).



Εικόνα 15: Σύνοψη δημοσιευμένων στοιχείων που υποστηρίζουν την ύπαρξη φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ενδογενώς εκφρασμένης dysbindin και πολλαπλών αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις της dysbindin σε άλλους ιστούς εκτός από τον εγκέφαλο ή από μη νευρωνικούς κυτταρικούς τύπους, σημειώνονται με γκρι (Ghiani CA and Dell’Angelica EC, 2011)

20.1 Το BLOC-1 και οι μηχανισμοί μεταφοράς συναπτικών κυστιδίων

Οι υπομονάδες του BLOC-1 συμπλόκου απαιτούνται για τη σωστή στόχευση των φορτίων της μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών των συναπτικών κυστιδίων και των μετα-συναπτικών υποδοχέων (Mullin AP et al. 2011). Το BLOC-1 δεσμεύει μερικές από αυτές τις μεμβρανικές πρωτεΐνες και βοηθά στη διαλογή τους σε κυστίδια προερχόμενα από ενδοσώματα, συνδεδεμένα σε εξειδικευμένες κυτταρικές περιοχές και εκκριτικά οργανίδια. Αυτή η λειτουργία του BLOC-1 στη διαλογή μπορεί να επιτευχθεί είτε μόνο από το BLOC-1, είτε σε συνδυασμό με το

σύμπλοκο προσαρμογέα AP-3 (Di Pietro SM et al. 2006; Mullin AP et al. 2011; Gokhale A et al. 2012).

Μερικά παραδείγματα μεμβρανικών πρωτεϊνών που είτε αλληλεπιδρούν με υπομονάδες του BLOC-1, είτε η υποκυτταρική τους θέση και/ή έκφρασή τους μεταβάλλεται από μεταλλάξεις υπομονάδων του BLOC-1 είναι ποικίλες SNAREs πρωτεΐνες (VAMP7, SNAP25, syntaxin 1A και syntaxin 13) και η φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη 4 κινάση τύπου 2 άλφα (PI4K2A) (Di Pietro SM et al. 2006; Salazar G et al. 2006; Dickman DK et al. 2012; Ryder PV et al. 2013; Dennis MK et al. 2016). Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η VAMP7 και η PI4K2A είναι παρούσες σε συναπτικά κυστίδια και μεταλλάξεις σε υπομονάδες του BLOC-1 παρεμποδίζουν τη μεταφορά των VAMP7 και PI4K2A στα συναπτικά κυστίδια (Newell-Litwa K et al. 2009; Newell-Litwa K et al. 2010; Morgan JR et al. 2013).

Επιπλέον, έχει βρεθεί αλληλεπίδραση της Rab5 GTPase με την pallidin/BLOC1S6 για να ανακυκλώνει ταχέως τα συναπτικά κυστίδια μέσω των πρώιμων ενδοσωμάτων κατά τη διάρκεια αυξημένης συναπτικής δραστηριότητας (Chen X et al. 2017). Έτσι, το BLOC1 μπορεί να συνεργάζεται με τη Rab5 για να επιτρέψει την ταχεία μεταφορά μεμβράνης και τη διαλογή των συναπτικών κυστιδίων για την ταχεία αναπλήρωση της δεξαμενής κυστιδίων σε συνθήκες υψηλής δραστηριότητας. Τέλος, η υπομονάδα του BLOC-1 snarin συμμετέχει στην παλίνδρομη μεταφορά φορτίου από τους άξονες στα κυτταρικά σώματα (Zhou B et al. 2012; Di Giovanni J and Sheng ZH, 2015).

20.2 Το BLOC-1 και οι κυτταροσκελετικοί μηχανισμοί

Οι υπομονάδες του συμπλόκου BLOC-1 αλληλεπιδρούν ή συνεντοπίζονται με συστατικά του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων. Πιο συγκεκριμένα, η pallidin/BLOC1S6 περιγράφηκε για πρώτη φορά ως πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με πολυμερισμένη ακτίνη *in vitro* (Falcon-Perez JM et al. 2002). Ακολούθως, βρέθηκε ότι η dysbindin/BLOC1S8 και άλλες υπομονάδες του συμπλόκου BLOC-1 αλληλεπιδρούν με τους ενεργοποιητές του συμπλόκου Arp2/3 (WAVE2, Abi1, annexin A2), το ίδιο το σύμπλοκο Arp2/3 και το σύμπλοκο WASH (Ryder PV et al. 2013; Abazyan B et al. 2014; Jia JM et al. 2014; Delevoye C et al. 2016; Gokhale A et al. 2016). Το BLOC-1, οι ενεργοποιητές του Arp2/3, το ίδιο το σύμπλοκο Arp2/3 και ο πολυμερισμός ακτίνης, δρουν σε συγκεκριμένες περιοχές

των ενδοσωμάτων για τον καθορισμό του σχηματισμού κυστιδίων/σωληναρίων που απαιτούνται για τη διαλογή πρωτεϊνών μεμβράνης (Ryder PV et al. 2013; Delevoeye C et al. 2016; Gokhale A et al. 2016). Ο τοπικός πολυμερισμός της ακτίνης εξαρτώμενος από το Arp2/3 είναι απαραίτητος για πολλαπλά στάδια σχηματισμού κυστιδίων. Η εγκόλπωση της μεμβράνης, η διάσπαση και η απελευθέρωση ενός κυστιδίου από τη μεμβράνη του δότη, όλα απαιτούν τον εξαρτώμενο από το Arp2/3 πολυμερισμό της ακτίνης (Merrifield CJ et al. 2005; Yasar D et al. 2005; Collins A et al. 2011).

Η αποσιώπηση ή η μειορύθμιση κάποιου από τους ενεργοποιητές του Arp2/3 καταλήγει σε διαταραγμένη διακίνηση ή μορφολογία ενός υποκυτταρικού διαμερίσματος. Ειδικότερα, η μειορύθμιση των ενεργοποιητών του Arp2/3 WASH ή annexin A2 διαταράσσει τη στόχευση μεμβρανικών πρωτεϊνών που προορίζονται για τα όψιμα ενδοσώματα (VAMP7 και PI4K2A) ή τα φορτία που στοχεύουν σε μελανοσώματα (VAMP7, TYRP1), αποδεικνύοντας ότι τα γεγονότα σχηματισμού κυστιδίων/σωληναρίων απαιτούν την τοπική δραστηριότητα του συμπλέγματος Arp2/3 (Ryder PV et al. 2013; Delevoeye C et al. 2016; Dennis MK et al. 2016).

20.3 To BLOC-1, η σύγκλιση και η σύντηξη μεμβρανών

Η σύντηξη μεμβρανών προχωρά μέσω βημάτων που εμπλέκουν μια σειρά από Rab GTPases, παράγοντες σύγκλισης, πρωτεΐνες SM (Sec1/Munc18) και SNAREs. Το BLOC-1 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες Rab, SM, SNAREs και NSF (ATPase N-ethylmaleimide-sensitive factor) και αυτές οι πολυμερείς δομές σύγκλισης συμμετέχουν σε μέτα-Golgi συμβάντα σύντηξης (Hikita T et al. 2009; Lu L et al. 2009; Ghiani CA et al. 2015).

Η dysbindin αλληλεπιδρά με την AP-3, την clathrin και τη Munc18-1, οι οποίες μεσολαβούν στην ενδοκυτταρική διακίνηση λιπιδίων μεμβράνης και πρωτεϊνών. Επιπλέον, η Munc18-1 ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη μεμβρανική σύντηξη (Hikita T et al. 2009). Η υπομονάδα pallidin/BLOC1S6 του BLOC-1 δεσμεύει τη SNARE πρωτεΐνη syntaxin 13 των πρώιμων ενδοσωμάτων, ενώ η SNAPIN δεσμεύει τη SNARE πρωτεΐνη syntaxin 8 των ώριμων ενδοσωμάτων (Lu L et al. 2009; Ghiani CA et al. 2010). Η SNARE πρωτεΐνη VAMP7 δεσμεύει το σύμπλεγμα BLOC-1, ωστόσο η υπομονάδα που είναι υπεύθυνη για αυτή την αλληλεπίδραση δεν έχει ταυτοποιηθεί (Ryder PV et al. 2013). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η διακοπή των αλληλεπιδράσεων SNARE-BLOC-1 εκδηλώνεται ως

μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού των SNAREs και/ή της μείωσης του κυτταρικού περιεχομένου των SNAREs στα νευρωνικά κύτταρα και στα μελανοκύτταρα (Salazar G et al. 2006; Ryder PV et al. 2013).

Συνολικά, υπάρχουν σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως η διαλογή και η στόχευση πρωτεϊνών μεμβράνης σε εξειδικευμένες κυτταρικές περιοχές και ο έλεγχος του πολυμερισμού ακτίνης που απαιτούν το σύμπλοκο BLOC-1 και τα μόρια που αλληλεπιδρούν με αυτό.

Κεφάλαιο 4

- 21. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G (G-protein-coupled receptors/GPCRs)**
- 22. Το αδρενεργικό ή συμπαθητικό νευρικό σύστημα (adrenergic nervous system/ANS)**
- 23. Αδρενεργικοί υποδοχείς στην καρδιά**
- 24. Αδρενεργικοί υποδοχείς στην καρδιακή ανεπάρκεια**
- 25. Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης δεσμίνης-AKAP/myospryn στη ρύθμιση της PKA**
- 26. Λειτουργίες των AKAPs στην καρδιά**

21. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G (G-protein-coupled receptors/GPCRs)

Οι GPCRs είναι η μεγαλύτερη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών που μεσολαβούν στις περισσότερες κυτταρικές αποκρίσεις στις ορμόνες και τους νευροδιαβιβαστές και επιπλέον, είναι υπεύθυνοι για την όραση, την οσμή και τη γεύση. Ως οικογένεια πρωτεϊνών, οι GPCRs μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας συντηρημένης δομής που συνίσταται από επτά διαμεμβρανικές έλικες. Οι GPCRs αποτελούν τη μεγαλύτερη υπεροικογένεια υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Επιπλέον, προσδέματα των GPCRs (κυρίως αγωνιστές και ανταγωνιστές) αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη οικογένεια φαρμακολογικών παραγόντων, καθώς αποτελούν σχεδόν το 30% των διαθέσιμων φαρμακευτικών ουσιών (Εικόνα 16) (Drake MT et al. 2006; Rosenbaum DM et al. 2009).

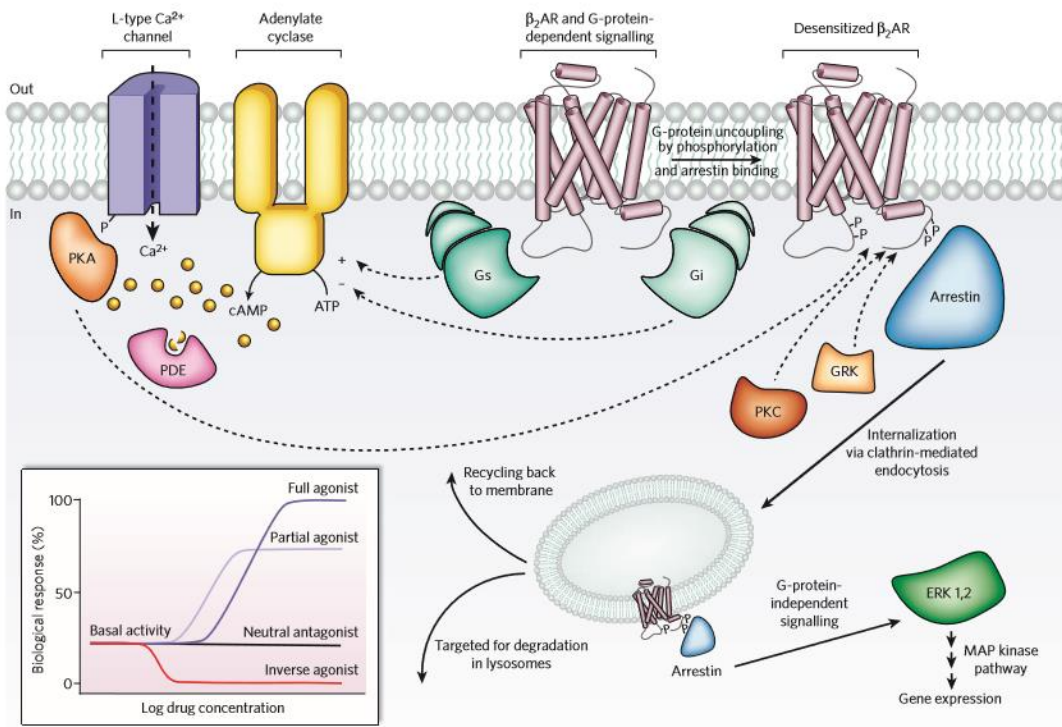
Τόσο οι ορμόνες, όσο και οι νευροδιαβιβαστές ασκούν τις δράσεις τους στο καρδιαγγειακό σύστημα μέσω των GPCRs. Παραδείγματα GPCRs με καλά αποδιδόμενους ρόλους στο καρδιαγγειακό σύστημα περιλαμβάνουν τους β 1- και β 2-αδρενεργικούς υποδοχείς, τους α 1- και α 2-αδρενεργικούς υποδοχείς, τους M2- και M3-μυοκαρμικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης, τους υποδοχείς της αγγειοτενσίνης II, τους υποδοχείς ενδοθηλίνης, τον υποδοχέα αδενোসίνης, τον υποδοχέα θρομβίνης και τον υποδοχέα αγγειοπιεσίνης (Drake MT et al. 2006; Rosenbaum DM et al. 2009).

Όταν ένα μόριο-προσδέτης συνδέεται με τον GPCR προκαλεί μία αλλαγή στην διαμόρφωση αυτού, η οποία επιτρέπει στον υποδοχέα να ενεργήσει ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanidine exchange factor/GEF). Ο GPCR μπορεί στη συνέχεια να ενεργοποιήσει μια ενωμένη με αυτόν πρωτεΐνη G, με την ανταλλαγή του GDP που είναι συνδεδεμένο στην G πρωτεΐνη για GTP. Η υπομονάδα της G πρωτεΐνης, μαζί με το δεσμευμένο GTP, μπορεί έπειτα να απομακρυνθεί από τις β - και γ -υπομονάδες και να επηρεάσει περαιτέρω ενδοκυτταρικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες ή να στοχοποιήσει λειτουργικές πρωτεΐνες, γεγονός που εξαρτάται άμεσα από τον υπότυπο της α -υπομονάδας (Gas, Gai/o, Gaq/11, Ga12/13). Ο ελεύθερος GPCR είναι σε θέση να συνδεθεί ξανά με μια άλλη ετεροτριμερή G πρωτεΐνη και να σχηματίσει ένα νέο σύμπλεγμα που είναι έτοιμο να

ξεκινήσει ένα νέο γύρο μεταγωγής σήματος (Εικόνα 16) (Wettschureck N and Offermanns S, 2005).

Οι G-πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται με GPCR ενεργοποιούν κλασσικά μόρια τελεστές, συμπεριλαμβανομένης της αδενυλικής κυκλάσης, της φωσφολιπάσης C και των ιοντικών καναλιών. Με τη σειρά τους, η ενεργότητα των τελεστών ρυθμίζει την παραγωγή δευτερογενών μηνυματοδοτικών μορίων (second messengers) που ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια και ρυθμίζουν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Παραδείγματα δευτερογενών μηνυματοδοτικών μορίων αποτελούν η δημιουργία της 3'-5'-κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (3'-5'-cyclic adenosine monophosphate/cyclic AMP/cAMP), μετά από την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης από GPCRs και η δημιουργία της διακυλογλυκερόλης (DAG) και της διαλυτής 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3), μετά από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C από GPCRs (Newton AC et al. 2016)

Ωστόσο, έρευνα κατά την τελευταία δεκαετία έχει αποδείξει ότι οι πρωτεΐνες G εξυπηρετούν μη-κανονικούς ρόλους στο κύτταρο, όπου ρυθμίζουν νέους τελεστές, ενεργοποιούνται ανεξάρτητα από έναν GPCR, και/ή λειτουργούν σε υποκυτταρικές θέσεις εκτός της πλασματικής μεμβράνης. Παραδείγματα μη κανονικής σηματοδότησης της πρωτεΐνης G αφορούν τις άμεσες αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών G με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες προσκόλλησης κυττάρων, το ρόλο τους στην κυτταρική διαίρεση και το ρόλο της G πρωτεϊνικής σηματοδότησης σε διάφορα οργανίδια (μιτοχόνδρια, Golgi, ER, ενδοσώματα και πυρήνας) (Hewavitharana T and Wedegaertner PB, 2012).



Εικόνα 16: Μεταγωγή σήματος σε υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G. Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζονται από τον β₂-αδρενεργικό υποδοχέα (β₂-AR). Ο β₂-AR μπορεί να ενεργοποιήσει δύο πρωτεΐνες G, G_s και G_i (μέρος των G_s και G_i ετεροτριμερών, αντίστοιχα), οι οποίες ρυθμίζουν διαφορετικά την αδενυλική κυκλάση. Η αδενυλική κυκλάση παράγει κυκλικό AMP (cAMP), το οποίο ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), μια κινάση που ρυθμίζει τη δραστηριότητα αρκετών κυτταρικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένου του L-τύπου καναλιού Ca²⁺ και του β₂-AR. Τα επίπεδα του δευτερογενούς μηνυματοδοτικού μορίου cAMP μειορρυθμίζονται από ειδικές πρωτεΐνες φωσφοδιεστεράσες (PDEs). Η ενεργοποίηση του β₂-AR οδηγεί επίσης σε φωσφορυλίωση από μια κινάση συζευγμένη με GPCRs (G-protein-coupled receptor kinase/GRK) και επακόλουθη σύζευξη με arrestin. Η arrestin είναι μία σηματοδοτική και ρυθμιστική πρωτεΐνη που προάγει την ενεργοποίηση κινασών που ρυθμίζονται από εξωκυττάριο σήμα (extracellular signal-regulated kinases/ERK), αποτρέπει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών G και προάγει την εσωτερίκευση του υποδοχέα μέσω κοιλότητων με επικάλυψη clathrin. Το ένθετο δείχνει την ταξινόμηση της αποτελεσματικότητας του συνδέτη για GPCRs. Πολλοί GPCRs εμφανίζουν βασική, ανεξάρτητη από αγωνιστή δραστηριότητα. Οι ανάστροφοι αγωνιστές αναστέλλουν αυτή τη δραστηριότητα και οι ουδέτεροι ανταγωνιστές δεν έχουν καμία επίδραση. Οι αγωνιστές και οι μερικοί αγωνιστές, διεγείρουν βιολογικές αποκρίσεις πάνω από τη βασική δραστηριότητα. Η αποτελεσματικότητα δεν σχετίζεται άμεσα με τη συγγένεια. Για παράδειγμα, ένας μερικός συναγωνιστής μπορεί να έχει υψηλότερη συγγένεια για έναν GPCR, από ότι ένας πλήρης αγωνιστής (Rosenbaum DM et al. 2009).

22. Το αδρενεργικό ή συμπαθητικό νευρικό σύστημα (adrenergic nervous system/ANS)

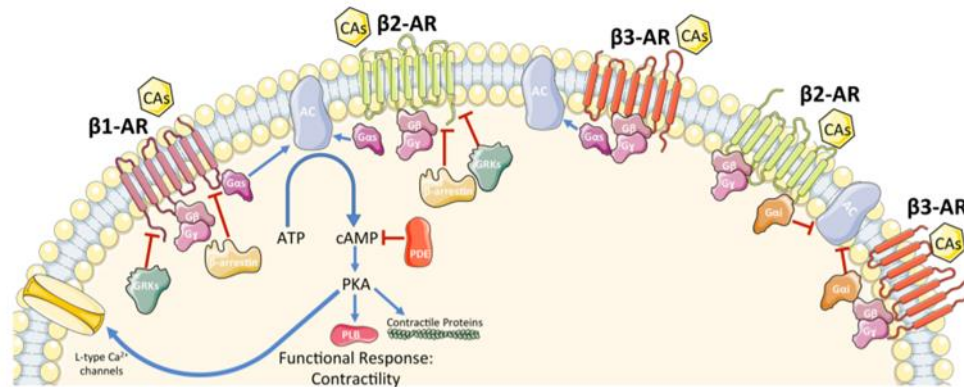
Το αδρενεργικό ή συμπαθητικό νευρικό σύστημα (adrenergic nervous system/ANS) ασκεί μια πληθώρα καρδιαγγειακών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης του καρδιακού ρυθμού, της αύξησης της καρδιακής συσταλτικότητας, της επιταχυνόμενης καρδιακής χαλάρωσης και της μείωσης της φλεβικής χωρητικότητας. Όλες αυτές οι επιδράσεις στοχεύουν στην αύξηση της καρδιακής απόδοσης για προετοιμασία του σώματος για να επιτρέψει την αποκαλούμενη αντίδραση “fight or flight”. Η ενεργοποίηση του αδρενεργικού νευρικού συστήματος στο καρδιαγγειακό σύστημα μεταφράζεται σε απελευθέρωση των δύο κατεχολαμινών, νορεπινεφρίνη (ή νοραδρεναλίνη) και επινεφρίνη (ή αδρεναλίνη) (Madamanchi A, 2007; Lymperopoulos A et al. 2013; De Lucia C et al. 2018).

Η νορεπινεφρίνη και επινεφρίνη μεσολαβούν τις δράσεις τους σε κύτταρα και ιστούς με δέσμευση σε επιλεκτικούς υποδοχείς επιφάνειας κυττάρων, τους αδρενεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι ανήκουν στους GPCRs. Οι υποδοχείς για αμφότερες τις κατεχολαμίνες του αδρενεργικού νευρικού συστήματος χωρίζονται σε 3 τύπους και 10 συνολικά διαφορετικούς υποτύπους, ως εξής: 3 υποτύποι α 1-AR (α 1A, α 1B, α 1D), 3 υποτύποι α 2-AR (α 2A, α 2B, α 2C) και 4 υποτύποι β -AR (β 1, β 2, β 3, β 4). Όλοι οι αδρενεργικοί υποδοχείς σηματοδοτούν κυρίως μέσω ετεροτριμερικών πρωτεϊνών G (Madamanchi A, 2007; Lymperopoulos A et al. 2013; De Lucia C et al. 2018).

23. Αδρενεργικοί υποδοχείς στην καρδιά

Η ανθρώπινη καρδιά περιέχει 3 υποτύπους β -AR (β 1, β 2, β 3). Ο β 1-AR, είναι ο κυρίαρχος υπότυπος στο κανονικό, υγιές μυοκάρδιο και αντιπροσωπεύει το 75%-80% της συνολικής πυκνότητας β -AR (Εικόνα 17). Ο β 2-AR εκφράζεται στους πνεύμονες, στα νεφρά και στα αιμοφόρα αγγεία, καθώς επίσης και στην καρδιά όπου αντιπροσωπεύει το 20-25% της συνολικής πυκνότητας β -AR. Ο β 3-AR υπότυπος εκφράζεται κυρίως στον λιπώδη ιστό, και ελάχιστα στην καρδιά. Τέλος, λίγα δεδομένα υπάρχουν για το β 4-AR, ο οποίος θεωρείται ότι έχει χαμηλή συγγένεια με το β 1-AR, αλλά δεν έχει χαρακτηριστεί γενετικά και φαρμακολογικά. Ο κύριος

ρόλος των β -ARs στην καρδιά είναι η ρύθμιση του καρδιακού ρυθμού και της συσταλτικότητας σε απάντηση στη νορεπινεφρίνη και την επινεφρίνη (Port DJ and Bristow MR, 2001; Xiang Y and Kobilka BK, 2003; Madamanchi A, 2007; El-Armouche A and Eschenhagen Th, 2009; Lymperopoulos A et al. 2013; De Lucia C et al. 2018).



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης β -AR στα μυοκαρδιοκύτταρα. CAs, κατεχολαμίνες (catecholamines); β -AR, β -αδρενεργικός υποδοχέας, υπομονάδες G-πρωτεΐνης: Ga (Gas ή GaI), G β , G γ ; GRK2, κινάση 2 συζευγμένη με πρωτεΐνη G; AC, αδενυλική κυκλάση; ATP, τριφωσφορική αδενοσίνη; cAMP, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη; PDE, φωσφοδιεστεράση; PKA, πρωτεϊνική κινάση A. Με μπλε βέλος απεικονίζεται ένας διεγερτικός μηχανισμός, ενώ με κόκκινη γραμμή με μπάρα ένας ανασταλτικός μηχανισμός (De Lucia C et al. 2018)

Όταν διεγείρεται ο β 1-AR στα μυοκαρδιοκύτταρα δεσμεύεται πρωτίστως με την πρωτεΐνη διέγερσης G (Gs). Η υπομονάδα Ga της πρωτεΐνης Gs (Gas) ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (AC), η οποία παράγει το δεύτερο μηνυματοδοτικό μόριο την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP). Τα αυξημένα επίπεδα cAMP ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) εξαρτώμενη από cAMP. Η ενεργοποιημένη PKA στη συνέχεια φωσφορυλιώνει διάφορα σημαντικά υποστρώματα, όπως τον υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR), την cAMP-responsive element binding protein (CREB), την τροπονίνη I, το L-τύπου Ca²⁺ κανάλι, την phospholamban κ.α. Υπό κανονικές συνθήκες, η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PKA αυξάνει τη συσταλτικότητα του καρδιακού μυ (Εικόνα 17) (Madamanchi A, 2007; Lymperopoulos A et al. 2013; De Lucia C et al. 2018).

Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι ο β 2-AR μεσολαβεί στις επιδράσεις των κατεχολαμινών στην καρδιά, αλλά με διαφορετικό τρόπο από τον β 1-AR. Συγκεκριμένα, οι β 2-ARs προσδένουν εκτός από τη διεγερτική υπομονάδα (Gs) των

G-πρωτεϊνών και στην ανασταλτική υπομονάδα (Gi) τους (Communal C et al. 1999; Dorn II GW et al. 1999; Liggett SB et al. 2000; Chesley A et al. 2000; Zhu WZ et al. 2001). Η σύνδεση αυτή πιθανώς να έχει καρδιοπροστατευτική δράση, καθώς περιορίζει το εύρος της δύναμης σύσπασης και παράλληλα συνδέει τον υποδοχέα με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (MAP kinases) (Xiao RP et al. 1999; Lefkowitz RJ et al. 2000; El-Armouche A and Eschenhagen Th, 2009; De Lucia C et al. 2018). Μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια, με εκλεκτική διέγερση β2-AR και υπερέκφραση β2-AR με τη μεσολάβηση αδενοϊού, έδειξαν την προστατευτική δράση της σηματοδότησης του β2-AR στο μυοκάρδιο, συμπεριλαμβανομένης της βελτιωμένης καρδιακής λειτουργίας και της μειωμένης απόπτωσης. Αντίθετα, η υπερδιέγερση ή υπερέκφραση του β1-AR έχει επιβλαβείς επιδράσεις στην καρδιά (Communal C et al. 1999; Dorn II GW et al. 1999; Liggett SB et al. 2000; Chesley A et al. 2000; Zhu WZ et al. 2001). Συνολικά, η ενεργοποίηση β1-AR ενισχύει την απόπτωση των μυοκαρδιοκυττάρων, ενώ η ενεργοποίηση β2-AR ασκεί αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα στην καρδιά. Αυτή η ουσιώδης διαφορά μεταξύ των δύο υποτύπων υποδοχέων αποδίδεται στο σήμα των β2-AR μέσω των πρωτεϊνών Gi. Η ικανότητα των β-ARs να προσδέουν διαφορετικές πρωτεΐνες G επιτρέπει στους δέκτες να ενεργοποιούν πολλαπλές οδούς σηματοδότησης και να εκκινούν ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις.

24. Αδρενεργικοί υποδοχείς στην καρδιακή ανεπάρκεια

Στην υγιή ανθρώπινη καρδιά, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω ο λόγος β1-AR προς β2-AR είναι περίπου 4:1, με ελάχιστη έκφραση των β3-AR. Έχει επιβεβαιωθεί πρόσφατα ότι οι β1-ARs είναι παρόντες σε όλα τα μυοκαρδιοκύτταρα (Myagmar BE et al. 2017). Στην ίδια μελέτη διαπίστωσαν ότι οι β2-ARs και οι β3-ARs απουσιάζουν συχνά από τα μυοκύτταρα (ανιχνεύονται σε μόνο ≈5% των μυοκυττάρων), αλλά είναι άφθονα κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, οι β1-ARs εκφράζονται σε χαμηλό επίπεδο σε μη μυοκύτταρα (Madamanchi A, 2007; Lymperopoulos A et al. 2013; De Lucia C et al. 2018).

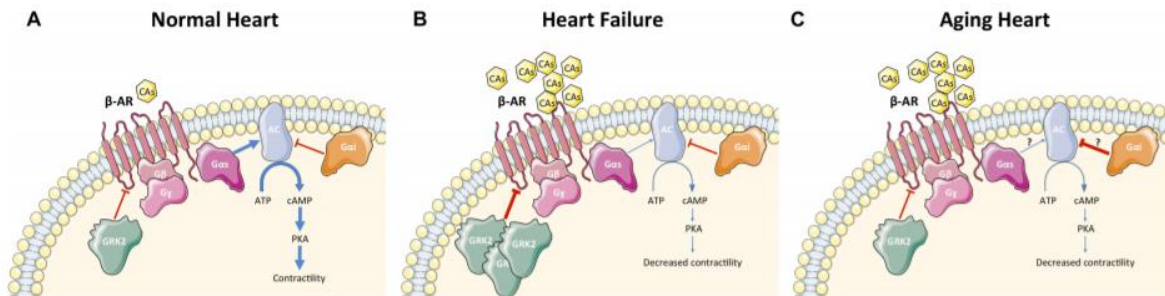
Στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια στους ανθρώπους παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων κατεχολαμινών, τα οποία οδηγούν σε σημαντική διατάραξη της β-αδρενεργικής σηματοδότησης και λειτουργίας, με το αδρενεργικό

απόθεμα της καρδιάς να μειώνεται, οδηγώντας σε καταστρεπτικές επιπτώσεις στην καρδιά (Εικόνα 18). Η καρδιακή δυσλειτουργία των αδρενεργικών υποδοχέων στην καρδιακή ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται στο μοριακό επίπεδο από επιλεκτική μείωση της πυκνότητας του $\beta 1$ -AR στην πλασματική μεμβράνη (μειορύθμιση) και από αποσύνδεση (uncoupling) των υπόλοιπων υποδοχέων $\beta 1$ -AR και $\beta 2$ -AR της πλασματικής μεμβράνης από G πρωτεΐνες, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε λειτουργική απευαισθητοποίηση των υποδοχέων (functional desensitization) (Madamanchi A, 2007; Lymperopoulos A et al. 2013; De Lucia C et al. 2018).

Πιο συγκεκριμένα, στην καρδιακή ανεπάρκεια ο $\beta 1$ -AR μειορυθμίζεται επιλεκτικά (δηλ. μειώνεται ο αριθμός του λειτουργικού υποδοχέα), μεταβάλλοντας έτσι την προαναφερθείσα στοιχειομετρία $\beta 1$ -AR: $\beta 2$ -AR από $\approx 75\%:20\%$ στην κανονική, υγιή καρδιά, σε 50:50 στην καρδιά με καρδιακή ανεπάρκεια (Port DJ and Bristow MR, 2001; Xiang Y and Kobilka BK, 2003; Madamanchi A, 2007; El-Armouche A and Eschenhagen Th, 2009; Lymperopoulos A et al. 2013; De Lucia C et al. 2018). Εντούτοις, ο $\beta 2$ -AR είναι μη λειτουργικός και δεν σηματοδοτεί σωστά στην καρδιά με καρδιακή ανεπάρκεια. Τα αναδυόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η σηματοδότηση του $\beta 2$ -AR στην καρδιά με καρδιακή ανεπάρκεια είναι αρκετά διαφορετική από αυτή της κανονικής καρδιάς. Είναι δηλαδή πιο διάχυτη και μη κατακερματισμένη και μοιάζει με το προαποπτωτικό διάχυτο μοτίβο της cAMP σηματοδότησης του $\beta 1$ -AR (Nikolaev VO et al. 2010). Επομένως, αυτή η στοιχειομετρική μετατόπιση υπέρ του υποτιθέμεθα καλού $\beta 2$ -AR στην καρδιακή ανεπάρκεια φαίνεται ότι δεν μπορεί να βοηθήσει την καρδιά να βελτιώσει τη δομή και τη λειτουργία της.

Επιπλέον, στην καρδιά με καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρείται απότομη αύξηση (έως 200%) των επιπέδων της ανασταλτικής υπομονάδας Gai (Freedman NJ et al. 2004) και σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα των πανταχού παρόντων κινασών, GRK2 και GRK5 (Εικόνα 18). Ειδικότερα, τα επίπεδα και η δραστηριότητα των GRK2 και GRK5, είναι αυξημένα τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ζωικά μοντέλα της καρδιακής ανεπάρκειας (Rengo G et al. 2011; Rengo G et al. 2012; Lymperopoulos A et al. 2012). Στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια η υπερβολική ποσότητα των κυκλοφορούντων κατεχολαμινών προσδένουν στους β -ARs, προκαλώντας την αύξηση της έκφρασης της GRK2 εντός των μυοκαρδιοκυττάρων, οδηγώντας έτσι σε μείωση της πυκνότητας των β -ARs και της απόκρισης, με αποτέλεσμα την εξάντληση των καρδιακών ινοτροπικών αποθεμάτων. Αυτή η

αύξηση των επιπέδων έκφρασης της GRK2 χρησιμεύει ενδεχομένως ως ένας ομοιοστατικός προστατευτικός μηχανισμός με στόχο την υπεράσπιση της καρδιάς από την υπερβολική κατεχολαμινεργική τοξικότητα (Rengo G et al. 2011; Rengo G et al. 2012; Lymperopoulos A et al. 2012). Όλες αυτές οι προσαρμογές αντανακλούν τη διαταραγμένη σηματοδότηση των β -ARs, πιθανώς λόγω των αυξημένων επιπέδων των κατεχολαμινών.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης β -AR στα μυοκαρδιοκύτταρα υπό φυσιολογική κατάσταση (A), κατά τη διάρκεια της καρδιακής ανεπάρκειας (B) και κατά τη διάρκεια της καρδιακής γήρανσης (C). (A): Υπό φυσιολογικές συνθήκες η κινάση GRK2 φωσφορυλιώνει τους β -ARs στα μυοκαρδιοκύτταρα και ρυθμίζει τη συσταλτικότητα μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού αδενυλικής κυκλάσης-PKA. (B): Στην καρδιακή ανεπάρκεια αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων κατεχολαμινών οδηγούν σε υπερδιέγερση των β -ARs και σε αύξηση των επιπέδων τους στα μυοκαρδιοκύτταρα, με αποτέλεσμα την απευαισθητοποίηση και μειорύθμιση των β -ARs, οδηγώντας τελικά σε μείωση της συσταλτικότητας της καρδιάς. (C): Η γήρανση χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων κατεχολαμινών που οδηγούν στην απευαισθητοποίηση και μειорύθμιση των β -ARs στα μυοκαρδιοκύτταρα (η GRK2 παραμένει αμετάβλητη και ο μηχανισμός της β -AR δυσλειτουργίας είναι ακόμη άγνωστος) και σε μειωμένη συσταλτικότητα. Η δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης μειώνεται οδηγώντας σε μειωμένα επίπεδα cAMP. CAs, κατεχολαμίνες (catecholamines); β -AR, β -αδρενεργικός υποδοχέας, υπομονάδες G-πρωτεΐνης: G α (G α s ή G α I), G β , G γ ; GRK2, κινάση 2 συζευγμένη με πρωτεΐνη G; AC, αδενυλική κυκλάση; ATP, τριφωσφορική αδενοσίνη; cAMP, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη; PDE, φωσφοδιεστεράση; PKA, πρωτεϊνική κινάση A. Με μπλε βέλος απεικονίζεται ένας διεγερτικός μηχανισμός, ενώ με κόκκινη γραμμή με μπάρα ένας ανασταλτικός μηχανισμός. Το παχύτερο βέλος σημαίνει ρύθμιση προς τα πάνω, ενώ το λεπτότερο βέλος σημαίνει μείωση της ρύθμισης (De Lucia C et al. 2018).

25. Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης δεσμίνης-AKAP/myospryn στη ρύθμιση της PKA

Οι β 2-ARs εντοπίζονται στα μυοκαρδιοκύτταρα σε ειδικές εγκολπωματικές περιοχές (caveolar regions) (Rybin VO et al. 2000; Xiang Y et al. 2002), σε αντίθεση με τα άλλα κύτταρα όπου συνδέονται κυρίως με clathrin. Απ' την άλλη πλευρά η δεσμίνη έχει βρεθεί να συνεντοπίζεται και να αλληλεπιδρά με την caveolin-3, την κυρίαρχη πρωτεΐνη του caveolae στον καρδιακό, λείο και σκελετικό μυ (Mermelstein CS et al. 2007). Πολύ σημαντικό είναι ότι η δεσμίνη και η caveolin-3 συνεντοπίζονται και αλληλεπιδρούν με το συνδεόμενο με τη dystrophin σύμπλοκο του κοσταμεριδίου. Πιθανότατα, σε αυτή την αλληλεπίδραση να λαμβάνει μέρος και η myospryn μέσω της δεσμίνης και του συμπλόκου dysbindin/dystrobrevin (Song KS et al. 1996).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το εργαστήριό μας έχει δείξει ότι η TRIM-like πρωτεΐνη myospryn αλληλεπιδρά με τη δεσμίνη (Kouloumenta A et al. 2007) Επιπλέον, η myospryn είναι μια AKAP πρωτεΐνη που προσδένει στην PKA (Kouloumenta A et al. 2007; Reynolds JG et al. 2007). Οι AKAPs παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της PKA, μέσω προσαρμογής της συγκέντρωσής της σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές, όπως το caveolae, προσδένοντας τους διάφορους απαιτούμενους ρυθμιστές της PKA. Στους ρυθμιστές αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι ρυθμιστές της αδενυλικής κυκλάσης και οι φωσφοδιεστεράσες (PDEs), καθώς και διαφορετικές φωσφατάσες στο ίδιο σύμπλοκο (Ruehr ML et al. 2004). Είναι πολύ σημαντικό ότι οι AKAPs, όπως η AKAP79 και η AKAP12 (gravin), λειτουργούν ως ικρίωματα του β 2-AR ως προς αυτά τα σύμπλοκα κινασών-φωσφατάσων, παρέχοντας έτσι ένα κινητό ικρίωμα κατά τη διάρκεια της απευαισθητοποίησης των υποδοχέων (Fan G et al. 2001; Baldwin TA and Dessauer CW, 2018).

Για τους παραπάνω λόγους, είναι πολύ δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η δεσμίνη μπορεί να διευκολύνει και την AKAP λειτουργία της myospryn και πιθανώς να παίζει ρόλο στη διαμετακίνηση και την ανακύκλωση του β 2-AR. Για αυτό το λόγο, περιμένουμε ότι η διατάραξη του κυτταροσκελετού της δεσμίνης θα μπορούσε να συνδέεται με την απευαισθητοποίηση στη β -αδρενεργική διέγερση. Γενικότερα, είναι πολύ σημαντικό να μελετήσουμε τη σπουδαιότητα της αλληλεπίδρασης της δεσμίνης με την AKAP-myospryn στη ρύθμιση του PKA μονοπατιού, καθώς η σημασία της

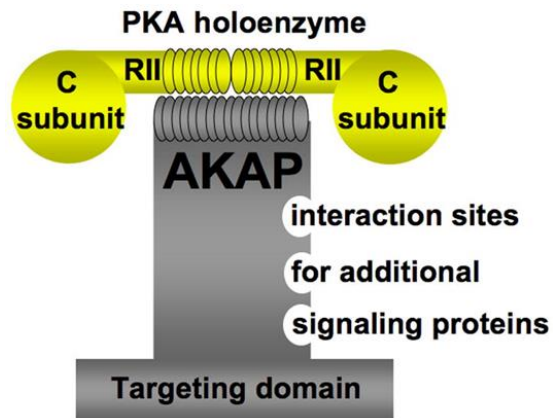
PKA στη λειτουργία του μυοκαρδιοκυττάρου και η καθολική σημασία του μονοπατιού της, είναι ευρέως αναγνωρισμένη.

26. Λειτουργίες των AKAPs στην καρδιά

Μέχρι σήμερα, ίσως η μεγαλύτερη απόδειξη για τους φυσιολογικούς ρόλους ενός αριθμού διαφορετικών AKAPs, έγκειται στη μελέτη της καρδιακής λειτουργίας (Εικόνα 20 και Πίνακας 10). Συγκεκριμένα, στον καρδιακό ιστό εκφράζονται 17 διαφορετικές AKAPs (Kritzer MD et al. 2012). Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, οι AKAPs αποτελούν πρωτεΐνες κριώματα, γνωστές ως πρωτεΐνες που προσδέουν στην PKA και διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της PKA, μέσω προσαρμογής της συγκέντρωσής της σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές. Η PKA φωσφορυλιώνει πολυάριθμα υποστρώματα που μπορεί να επηρεάσουν τη συσταλτικότητα των μυοκαρδιοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του L-τύπου Ca^{2+} καναλιού, του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR), της phospholamban και της troponin I (Olson E, 2004).

Η πλειοψηφία των γνωστών AKAPs προσδέουν ειδικά στην RII ρυθμιστική υπομονάδα της PKA. Υπάρχουν βέβαια και AKAPs που προσδέουν τόσο στην RII ρυθμιστική υπομονάδα της PKA, όσο και στην RI. Η υπομονάδα RIa είναι πιθανό να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην καρδιακή φυσιολογία, επειδή είναι η κυρίαρχη ισομορφή που σχετίζεται με το σαρκείλημα στα μυοκαρδιοκύτταρα (Εικόνα 19) (Robinson ML et al. 1996).

Οι AKAPs διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση της φωσφορυλίωσης πολυάριθμων, εξαρτώμενων από την PKA, υποστρωμάτων που ρυθμίζουν την καρδιακή λειτουργία. Έτσι, η αλλοίωση της έκφρασης των AKAP φαίνεται πιθανό να έχει δραστικές συνέπειες. Συγκεκριμένα, η mAKAP (Dodge-Kafka et al. 2005), η *yoitiao* (Kurokawa J et al. 2004), η AKAP18 (Lygren B et al. 2007), η AKAP-Lbc (Appert-Collin A et al. 2006) και η *myospryn* (Kouloumenta A et al. 2007; Reynolds JG et al. 2007) έχουν όλες αναφερθεί ότι έχουν φυσιολογικές λειτουργίες στην καρδιά. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η διπλά ειδική AKAP2 (D-AKAP2) (η οποία στοχεύει τόσο στην RII ρυθμιστική υπομονάδα της PKA, όσο και στην RI) παίζει σημαντικό ρόλο στην καρδιά (Tingley WG et al. 2007).



Εικόνα 19: Οι Ιδιότητες των ΑΚΑΡs. Οι ΑΚΑΡs συνδέονται με την ρυθμιστική υπομονάδα της ΡΚΑ. Οι ΑΚΑΡs συνδέονται επίσης με πρόσθετες πρωτεΐνες σηματοδότησης (για παράδειγμα άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, πρωτεϊνικές φωσφατάσες, φωσφοδιεστεράσες, αδενυλικές κυκλάσες και μικρές πρωτεΐνες G). Οι ΑΚΑΡs λειτουργούν στο να στοχεύουν τα σύμπλοκα σηματοδότησης σε διακριτές θέσεις μέσα στο κύτταρο (Carnegie GK et al. 2009).

Στη συνέχεια, θα αναλύσουμε τις λειτουργίες διαφόρων ΑΚΑΡs που εκφράζονται στην καρδιά (Εικόνα 20, Πίνακας 10).

Myospryn

Βλέπε αντίστοιχη ενότητα παραπάνω για λεπτομέρειες (9.2 Η μυοειδική ΑΚΑΡ myospryn Σελ. 47) (Εικόνα 20, Πίνακας 10).

mAKAP

Η mAKAP (Εικόνα 20, Πίνακας 10) αποτελεί τη μυϊκή ειδική πρωτεΐνη πρόσδεσης της ΡΚΑ. Εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στον καρδιακό ιστό και εντοπίζεται στην περιπυρηνική μεμβράνη και στο σαρκοπλασματικό δίκτυο όπου βρίσκεται κοντά σε μια ποικιλία υποστρωμάτων όπως τα L-τύπου Ca^{2+} κανάλια και ο υποδοχέας της ρυανοδίνης (Kapiloff MS et al. 2001). Λειτουργώντας ως ικρίωμα για μια σειρά μορίων όπως η ΡΚΑ, η PDE4D3, η Erac1 και η ERK5, η mAKAP μπορεί να συναρμολογήσει ένα πολύ δομημένο δίκτυο, στο οποίο τα σήματα μπορούν να ρυθμιστούν και να επικεντρωθούν σε κοντινά υποστρώματα (Dodge KL et al. 2001).

Είναι γνωστό ότι η φωσφορύλιωση του υποδοχέα RyR από την ΡΚΑ, έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του υποδοχέα και την αύξηση της καρδιακής λειτουργίας και της συσταλτικότητας και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο διαμεσολαβούμενο από την mAKAP εντοπισμό της ΡΚΑ στο RyR (Marx SO et al. 2001). Η αυστηρή ρύθμιση της καρδιακής συσταλτικότητας είναι κρίσιμη για την αποτελεσματική λειτουργία της καρδιάς. Η mAKAP παίζει ρόλο σε αυτό, δημιουργώντας ένα ικρίωμα για τις φωσφοδιεστεράσες, οι οποίες είναι ικανές να υδρολύουν ταχέως το εντοπισμένο cAMP και να αποκαταστήσουν την ΡΚΑ σε ανενεργή κατάσταση.

Εκτός από το ρόλο της στην καρδιακή συστολή, η mAKAP εμπλέκεται επίσης στην καρδιακή υπερτροφία. Δύο μόρια του συμπλέγματος της mAKAP που εμπλέκονται στην υπερτροφική απόκριση είναι η κινάση ERK5 (Dodge-Kafka KL et al. 2005) και η φωσφατάση PP2B (calcineurin) (Pare GC et al. 2005). Η ενεργοποίηση της ERK5 έχει σαν αποτέλεσμα την καρδιακή υπερτροφία, αν και η ERK5 αποφωσφορυλιώνεται εύκολα και απενεργοποιείται από την PP2B, δείχνοντας για άλλη μια φορά έναν άλλο μηχανισμό ανάδρασης, όπου η mAKAP ρυθμίζει αυστηρά την καρδιακή λειτουργία.

AKAP15/18

Η AKAP15/18 (Εικόνα 20, Πίνακας 10) εκφράζεται στην καρδιά και εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη (οι μικρότερες ισομορφές α και β), εξαιτίας μιας αμινοτελικής περιοχής πρόσδεσης σε λιπίδια (Fraser ID et al. 1998). Η μεγαλύτερη ισομορφή του γονιδίου AKAP15/18, η AKAP15/18δ, η οποία εμφανίζει κυτταροπλασματικό εντοπισμό, βρέθηκε να στοχεύει την PKA στη phospholamban. Η phospholamban είναι ένας κρίσιμος ρυθμιστής της Ca^{2+} -ATPase (SERCA) του σαρκοπλασματικού δικτύου (Lygren B et al. 2007). Η αλληλεπίδραση της AKAP15/18δ με τη phospholamban είναι απαραίτητη για τη μεσολαβούμενη από την PKA φωσφορυλίωση της phospholamban στη Ser16, οδηγώντας στις επίδρασεις της αδρενεργικής διέγερσης στην επαναπρόσληψη ασβεστίου. Η μειωμένη έκφραση/δραστικότητα της SERCA και η υπο-φωσφορυλίωση της phospholamban εμπλέκονται στην καρδιακή ανεπάρκεια, επομένως, η AKAP15/18δ διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της καρδιακής λειτουργίας. Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η AKAP15/18 μπορεί να χρησιμεύσει ως ικρίωμα του β2-αδρενεργικού υποδοχέα (Sacchetto R et al. 2001) και του L-τύπου Ca^{2+} καναλιού (Gray PC et al. 1997).

AKAP79 (ή AKAP150, ή AKAP5)

Εκτός από την AKAP15/18, η AKAP79 (ή AKAP150, ή AKAP5) (Εικόνα 20, Πίνακας 10) παίζει επίσης ρόλο στη ρύθμιση του Ca^{2+} , μέσω της στόχευσης της PKCa στο L-τύπου Ca^{2+} κανάλι σε αρτηριακά μυοκύτταρα. Μελέτες σε knockout ποντίκια για την AKAP79, έδειξαν ότι έχουν χαμηλότερο ενδοκυτταρικό ασβέστιο αρτηριακού τοιχώματος και μειωμένο μυογενικό τόνο. Επιπλέον, τα ποντίκια ήταν υποτασικά και δεν ανέπτυξαν την επαγόμενη από αγγειοτενσίνη II υπέρταση (Navedo MF et al. 2008). Τέλος, έχει δείχτει ότι αποσιώπηση της AKAP5 προκαλεί

καρδιακή διαστολή και δυσλειτουργία, μέσω ενισχυμένης δραστηριότητα κινάσης καλμοδουλίνης II/calcineurin και αλλοιωμένης ανακύκλωσης των καρδιακών β1-ARs (Li X et al. 2014).

AKAP-Lbc

Η AKAP-Lbc (Εικόνα 20, Πίνακας 10) χρησιμεύει ως ικρίωμα για τις PKA, PKC, PKD (Carnegie GK et al. 2004). Επίσης, περιέχει την περιοχή DH (Dbl-ομολογία) - PH (pleckstrin-ομολογία) που δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) για τη χαμηλού μοριακού βάρους GTPase Rho (Diviani D and Scott JD, 2001), η οποία είναι γνωστός μεσολαβητής της καρδιακής υπερτροφίας. Εκτός από την εμπλοκή της στην υπερτροφία, μέσω της περιοχής Dbl, η AKAP-Lbc χρησιμεύει επίσης για την ενεργοποίηση της PKD, μέσω της προσέκλυσης του ενεργοποιητή της, της PKC (Carnegie GK et al. 2004). Η PKD προωθεί την πυρηνική εξαγωγή ορισμένων κλάσης II αποακετυλασών των ιστονών (HDAC's), οδηγώντας έτσι στη MEF2-εξαρτώμενη μεταγραφή υπερτροφικών γονιδίων (Vega RB et al. 2004). Επομένως, η AKAP-Lbc διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο συντονισμό πολλαπλών οδών που εμπλέκονται στη διαδικασία της καρδιακής υπερτροφίας.

Synemin

Η synemin (Εικόνα 20, Πίνακας 10) είναι μάλλον η μοναδική AKAP, καθώς αποτελεί την πρώτη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων που έχει βρεθεί να δεσμεύει την RII υπομονάδα της PKA και να τοπολογεί την PKA σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές. Η synemin εντοπίζεται στην καρδιά στους Z-δίσκους, μαζί με την RII υπομονάδα της PKA και τη δεσμίνη. Με την τοπολόγηση της PKA πλησίον των ενδιάμεσων ινιδίων, η synemin μπορεί να ενισχύσει τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της PKA στους Z-δίσκους, όπως είναι η δεσμίνη, η vimentin, η τουμπουλίνη και η αβ-κρυσταλλίνη. Αυτή η πρωτεΐνη αγκυροβόλησης μπορεί επίσης να χρησιμεύσει στην τοπολόγηση της PKA κοντά σε μυοϊνίδια για πιθανή φωσφορυλίωση υποστρωμάτων, όπως η τροπονίνη I ή η πρωτεΐνη σύνδεσης της μυοσίνης C. Ο εντοπισμός της synemin στις γραμμές Z και την πλασματική μεμβράνη, την καθιστούσαν ιδανική για συμμετοχή στην καρδιακή αναδόμηση (remodelling), ως επακόλουθο της καρδιακής υπερτροφίας ή ακόμη και στις μυοκαρδιοπάθειες, καθώς παρατηρείται μεταβολή της φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων PKA σε αυτές τις συνθήκες (Russell MA et al. 2006). Πρόσφατα

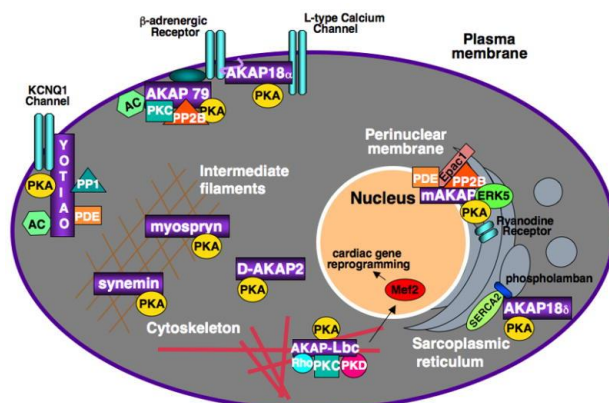
δημιουργήθηκε και το synemin knock out μοντέλου ποντικού. Η απουσία της synemin προκαλεί μερικά χαρακτηριστικά μικτής μυοκαρδιοπάθειας, υπερτροφικής και διατακτικής που σχετίζεται με σημαντικές αλλαγές στην καρδιακή λειτουργία. Αν και οι πρωτεΐνες της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων παρέμειναν αμετάβλητες στις ενήλικες synemin-null καρδιές, έχει διαπιστωθεί ότι τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλιωμένων PKA RII, 70s6K και ERK1/2, τα οποία είναι κρίσιμα για τη λειτουργία των μυοκαρδιοκυττάρων, αλλάζουν σε μικρό, αλλά σημαντικό βαθμό (Garcia-Pelagio KP et al. 2018).

Yotiao

Η Yotiao (Εικόνα 20, Πίνακας 10) χρησιμεύει ως ένα ικρίωμα στην καρδιά για τον εντοπισμό των PP1, PDE4D3 και RII στην υπομονάδα I_{KS} του καναλιού hKCNQ1, με τη βοήθεια ενός καρβόξυ-τελικού μοτίβου φερμουάρ λευκίνης του καναλιού hKCNQ1 (Marx SO et al. 2002). Μεταλλάξεις σε αυτό το μοτίβο έχουν βρεθεί σε άτομα με σύνδρομο του μακριού διαστήματος QT (Long QT syndrome), όπου η μειωμένη εξαρτώμενη από το cAMP φωσφορυλίωση του καναλιού I_{KS}, οδηγεί σε παρατεταμένο δυναμικό δράσης (Chen L et al. 2007).

AKAP1

Η μιτοχονδριακή AKAP1 έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και την παραγωγή οξυγόνου στην καρδιά. Επιπλέον, έχει δείχτει ότι αποσιώπηση της AKAP1 οδηγεί σε μιτοχονδριακές αλλοιώσεις, αυξημένη μιτοφαγία και αυξημένο μέγεθος εμφράγματος, καθώς και παθολογική αναδόμηση της αριστερής κοιλίας (left ventricle/LV) σε ένα μετα-ισχαιμικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας (Schiattarella GG et al. 2006).



Εικόνα 20: Οι AKAPs στην καρδιά. Οι AKAPs διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας. Οι AKAP18, AKAP79 και yotiao διαδραματίζουν ρόλο στη ρύθμιση καναλιών, ενώ η myospryn και η synemin στοχεύσουν την PKA στα ενδιάμεσα ινίδια. Η mAKAP και η AKAP-Lbc παίζουν ρόλο στη διαδικασία της καρδιακής υπερτροφίας (Carnegie GK et al. 2009).

Πίνακας 10: Οι ΑΚΑΡs που εκφράζονται στην καρδιά (Kritzer MD et al. 2012)

AKAPs Expressed in the Heart.

Gene Name	Protein Names and Isoforms	Binding Partners	Localization
<i>AKAP1</i>	D-AKAP1, s-AKAP84, AKAP121, AKAP149	PKA I and II, Protein tyrosine phosphatase PTPD1, Src, PKC α , L ϵ , PDE7A, RSK1, PPI, PP2A, CaN, RNA, AMY-1	Mitochondrion, Endoplasmic Reticulum, Nuclear Envelope
<i>AKAP5</i>	AKAP79, AKAP75, AKAP150	PKAII, PKC, CaN, KCNQ2, Ca v 1, β -AR, AC, SAP-97	Plasmalemma and T-tubules
<i>AKAP6</i>	mAKAP β	PKAII, AC5, PDE4D3, PP2A, B56 δ , RyR2, CaNA β , NFATc, HIF-1 α , VHL, Siah2, Epac1, Rap1, ERK5, MEK5, RSK3, PDK1, NCX1, Nesprin-1 α , myopodin	Nuclear Envelope
<i>AKAP7</i>	AKAP15, AKAP18 (α , β , γ , δ)	PKAII, Ca v 1, Na Channel, phospholamban, Inhibitor-1, PPI	Plasmalemma and sarcoplasmic reticulum
<i>AKAP8</i>	AKAP95	PKAII, PDE7A, MCM2, p68 RNA helicase, HDAC3, AMY-1, Cyclin D/E	Nucleus
<i>AKAP9</i>	Yotiao, AKAP450, AKAP350, CG-NAP, Hyperion	PKAII, AC, PPI, PP2A, PDE4D3, KCNQ1, IP $_3$ R, PKC ϵ , PKN, Casein kinase 1, chloride intracellular channel (CLIC)	Plasmalemma, Centrosomes, Golgi
<i>AKAP10</i>	D-AKAP2	PKA I and II, Rab11, Rab4, PDZK1	Outer Mitochondrial Membrane
<i>AKAP11</i>	AKAP220	PKAII, PPI, GSK3 β	Peroxisomes
<i>AKAP12</i>	Gravin, SSeCKS	PKAII, PDE4D, PKC, Src, CaN, β_2 AR, Calmodulin, Cyclin D	Actin cytoskeleton, Plasma membrane
<i>AKAP13</i>	AKAP-Lbc, Hg31, BRX-1	PKAII, G α_{12} -Rho, PKN α , MLTK, MKK3, p38 α , KSRI, Raf, MEK1/2, ERK1/2, 14-3-3, PKC η , PKD	Cytoskeleton
<i>ARFGEF2</i>	BIG2	PKA I and II, formin binding protein 3, PDE3A, TNFR1	Cytoplasm, Internal Membranes including Golgi
<i>EZR</i>	Ezrin	PKA I and II, CFTR, EBP50/NHERF, NHE3, calmodulin, Rho kinase, Actin, α_1 AR, E-cadherin, β -catenin, EGFR, Fas-R, PKC α , S100, FAK, SAP-97, Moesin, Radixin	Cytoskeleton
<i>MAP2</i>	MAP2B	PKAII, tubulin, Ca $_v$ 1	microtubules
<i>CMYA5</i>	Myospryn	PKAII, Dysbindin, Titin, Calpain-3	Sarcomere
<i>SPHKAP</i>	SKIP	PKA I, sphingosine kinase type 1,	Cytosolic
<i>SYNM</i>	Synemin	PKAII, desmin, vimentin, dystrobrevin, desmuslin, zyxin, talin, vinculin,	Intercalated discs, sarcolemma, Z-lines, intermediate filaments
<i>TNNI2</i>	Troponin T	Troponin I, Troponin C, Actin	Sarcomere Thin Filaments

AC, AC; AMY-1, associate of myc-1; AR, adrenergic receptor; CaN, calcineurin (PP2B); CaV1, L-type Ca $^{2+}$ channel; NCX1, sodium-calcium exchanger; PKC, protein kinase C; PPI, protein phosphatase 1; PP2A, protein phosphatase 2A; Siah2, seven in absentia homolog; RyR2, ryanodine receptor; VHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor

Κεφάλαιο 5

- 27. Υπό συνθήκη αδρανοποίηση γονιδίων**
- 28. Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος για την αδρανοποίηση του γονιδίου της myospryn**
- 29. Τα συστήματα Tet-Off και Tet-On**
 - 29.1 Το Tet-off σύστημα*
- 30. Αποσιωποητής της μεταγραφής (transcriptional terminator)**
- 31. Ταυτόχρονη έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών - 2A ιϊκά πεπτίδια**

27. Υπό συνθήκη αδρανοποίηση γονιδίων

Στη μετα-γονιδιωματική εποχή που διανύουμε αποτελεί τεράστια πρόκληση η διαλεύκανση του ρόλου χιλιάδων γονιδίων. Μια από τις βασικές προσεγγίσεις για τη μελέτη της λειτουργίας και της ρύθμισης των διαφόρων γονιδίων κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες αποτελεί η αδρανοποίηση των γονιδίων στα κύτταρα και σε ζωικά μοντέλα με τη χρήση της τυχαίας μεταλλαξογένεσης (χημικής ή παρεμβαλλόμενης) ή της γονιδιακής στόχευσης. Ένα κοινό πρόβλημα των προαναφερθέντων μεθόδων αποτελεί το γεγονός ότι το εκάστοτε υπό μελέτη γονίδιο μεταλλάσσεται μη αντιστρεπτά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ζώου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα ακόλουθα: α) σε πολλές περιπτώσεις η μετάλλαξη οδηγεί σε εμβρυϊκή ή νεογνική θνησιμότητα, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η μελέτη της λειτουργίας του γονιδίου στη μετέπειτα ζωή και β) σε περιπτώσεις που οι μεταλλάξεις είναι βιώσιμες, η ερμηνεία του παρατηρούμενου φαινότυπου είναι συχνά περίπλοκη. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει αδυναμία στο διαχωρισμό του άμεσου αποτελέσματος λόγω της έλλειψης του γονιδίου τη δεδομένη στιγμή που πραγματοποιείται η παρατήρηση, από τα αποτελέσματα εξαιτίας αναπτυξιακών ανωμαλιών λόγω της έλλειψης του γονιδίου σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο και γ) σε κάποιες άλλες περιπτώσεις η έλλειψη ενός γονιδίου προκαλεί αντισταθμιστικές προσαρμογές στη δράση άλλων γονιδίων, εμποδίζοντας τη διαλεύκανση της λειτουργίας του υπό μελέτη γονιδίου (Zeng H et al. 2008).

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων έχουν αναπτυχθεί συστήματα για την υπό συνθήκη αδρανοποίηση των γονιδίων στόχων, όπως το τοποειδικό Cre-lox σύστημα και το Tetracycline-Responsive Gene Targeting σύστημα (Tet) όπου η στόχευση γονιδίων εξαρτάται από την απόκριση στην τετρακυκλίνη. Τα δύο αυτά συστήματα μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων με τρόπο που ελέγχεται ιστοειδικά και χρονικά (Zeng H et al. 2008).

Όσον αφορά το σύστημα του τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre-lox, η CRE ρεκομπινάση, υπό τον έλεγχο ενός κατάλληλου υποκινητή χρησιμοποιείται για να ενεργοποιήσει, αδρανοποιήσει ή μεταβάλει ένα γονίδιο κατά τη διάρκεια ενός συγκεκριμένου αναπτυξιακού σταδίου στον αναπτυσσόμενο οργανισμό. Και σε αυτή όμως την περίπτωση οι γενετικές αλλαγές είναι μη αναστρέψιμες (Kistner A et al. 1996).

Επομένως, εύλογα προκύπτει ότι θα αποτελούσε σπουδαίο πλεονέκτημα ένα σύστημα “γενετικός διακόπτης”, το οποίο θα το ρυθμίζαμε κατά βούληση και θα επέτρεπε τον έλεγχο της λειτουργίας μεμονωμένων γονιδίων ποσοτικά και αντιστρεπτά με τρόπο που ελέγχετε χρονικά και τοποειδικά. Το Tetracycline-Responsive Gene Targeting σύστημα (Tet) για τη στόχευση γονιδίων εξαρτώμενη από την απόκριση στην τετρακυκλίνη συγκεντρώνει πολλά από αυτά τα πλεονεκτήματα (Gossen M and Bujard H, 1992; Furth P et al. 1994; Kistner A et al. 1996).

28. Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος για την αδρανοποίηση του γονιδίου της *myospryn*

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας προκειμένου να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης της *myospryn* είχε χρησιμοποιηθεί το πειραματικό μοντέλο του *Danio rerio* (zebrafish) σε πειράματα έκφρασης του μεταγράφου της *myospryn* -in situ hybridization- με τη χρήση antisense ιχνηθετών. Σημειώνουμε ότι ως ιχνηθέτης είχε χρησιμοποιηθεί ένα τμήμα από το δεύτερο εξώνιο του γονιδίου της *myospryn* και η υβριδοποίηση είχε πραγματοποιηθεί σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια του zebrafish. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το μετάγραφο της *myospryn* εκφράζεται από την αρχή της ανάπτυξης του εμβρύου, πρόκειται δηλαδή για ένα μετάγραφο που υπάρχει στο ωοκύτταρο (maternal deposition) και μάλιστα φαίνεται να είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του εμβρύου (Kouloumenta and Capetanaki, unpublished data, Kouloumenta, PhD thesis 2008).

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του γονιδίου της *myospryn* in vivo, είχε χρησιμοποιηθεί το πειραματικό μοντέλο του zebrafish και η τεχνολογία των antisense morpholinos. Πρόκειται για 25 νουκλεοτίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται έναντι θέσεων έναρξης της μεταγραφής ATG και επομένως μπλοκάρουν τη μετάφραση του μητρικού και ζυγωματικού RNA. Επίσης, δύναται να χρησιμοποιηθούν και έναντι θέσεων ματίσματος (splicing sites), παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη μετάφραση του ζυγωματικού RNA. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν antisense morpholinos που μπλόκαραν το μάτισμα μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου εξωνίου, με αποτέλεσμα να μην παράγεται λειτουργικό προϊόν του γονιδίου της

myospryn και επομένως να έχουμε καταστολή της έκφρασής της (knockdown of myospryn).

Σημειώνουμε ότι τα πειράματα αυτά που πραγματοποιήθηκαν σε έμβρυα zebrafish με τη χρήση της τεχνολογίας των antisense morpholinos είχαν σαν αποτέλεσμα το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας των εμβρύων. Τα έμβρυα δε που επέζησαν εμφάνιζαν σοβαρές ανατομικές, δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες στο καρδιακό σύστημα. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει την αναγκαιότητα της myospryn στη δημιουργία πλήρως λειτουργικού καρδιακού συστήματος. Από την άλλη πλευρά, το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας εγείρει το ερώτημα του κατά πόσο ο παρατηρούμενος φαινότυπος στα ενιόμενα με τα antisense morpholinos έμβρυα zebrafish αποτελεί απόρροια της καταστολής της έκφρασης της myospryn ή είναι ένα επιφανόμενο από την καθυστέρηση στην ανάπτυξη του εμβρύου εξαιτίας της καταστολής της έκφρασης ενός γονιδίου που είναι απαραίτητο από τα πρώτα στάδια της ζωής του zebrafish (Kouloumenta and Capetanaki, unpublished data, Kouloumenta, PhD thesis 2008).

Για να αποφευχθεί παρόμοιο πρόβλημα στα ποντίκια επιλέχθηκε η δημιουργία ενός επαγόμενου και αναστρέψιμου γενετικού μοντέλου για την αδρανοποίηση του γονιδίου της myospryn, το Tetracycline-Responsive Gene Targeting, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το σύστημα της υπό συνθήκης αδρανοποίησης του γονιδίου της myospryn (conditional knock out) παρουσιάζει το πλεονέκτημα της κατά βούλησης ενεργοποίησης/αδρανοποίησης του γονιδίου στόχου σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης, μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες για εμβρυϊκή θνησιμότητα και αναπτυξιακά προβλήματα. Έτσι λοιπόν, η myospryn θα εκφράζεται κανονικά στην εμβρυϊκή ζωή, ενώ θα είναι δυνατή η αδρανοποίησή της σε μετεμβρυϊκό στάδιο και η μελέτη των διαφόρων επιπτώσεων εξαιτίας της έλλειψής της.

29. Τα συστήματα Tet-Off και Tet-On

Τα συστήματα Tet-Off και Tet-On είναι δυαδικά συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης, στα οποία η έκφραση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει εξαρτάται από την ενεργότητα ενός επαγόμενου μεταγραφικού ενεργοποιητή (inducible transcriptional activator). Και στα δυο αυτά συστήματα, η έκφραση του μεταγραφικού ενεργοποιητή ρυθμίζεται με αντιστρεπτό και δοσοεξαρτώμενο τρόπο από την έκθεση του

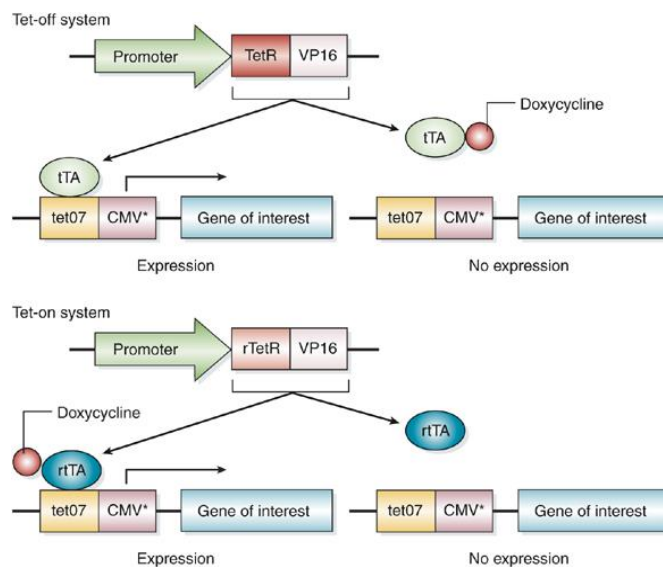
διαγονιδιακού ζώου στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (tetracycline/Tc) ή σε χημικό ανάλογο αυτού, όπως είναι η δοξικυκλίνη (doxycycline/Dox).

Το σύστημα Tet-Off βασίζεται σ' έναν ελεγχόμενο από την τετρακυκλίνη ενεργοποιητή tTA (tetracycline-controlled transactivator), ο οποίος αποτελείται από την πρωτεΐνη καταστολέα πρόσδεσης στο DNA TetR (Tet Repressor DNA binding protein) συνδεδεμένη στην περιοχή ισχυρής ενεργοποίησης της μεταγραφής VP16 του ιού Herpes simplex virus (HSV) και ελέγχει την έκφραση του γονιδίου-στόχου που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του ευαίσθητου στην τετρακυκλίνη στοιχείου TRE (tetracycline-responsive promoter element). Το στοιχείο TRE αποτελείται από την αλληλουχία του χειριστή tetO (Tet Operator) συντηγμένη με έναν υποκινητή, συνήθως τον CMV (human cytomegalovirus). Απουσία τετρακυκλίνης, ο ενεργοποιητής tTA συνδέεται στο στοιχείο TRE και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου. Παρουσία τετρακυκλίνης, η σύνδεση tTA-TRE εμποδίζεται, με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (Εικόνα 21) (Gossen M and Bujard H, 1992; Furth P et al. 1994; Kistner A et al. 1996).

Σε γενικές γραμμές το σύστημα αυτό εμφανίζει υψηλό επίπεδο επαγωγής της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου όταν βρίσκεται στην κατάσταση 'On' και αυστηρό έλεγχο όταν βρίσκεται στην 'Off' κατάσταση, έπειτα από χορήγηση χαμηλής δόσης τετρακυκλίνης/δοξικυκλίνης. Παρόλα αυτά, όταν μελετώνται διεργασίες ανεξάρτητες της ανάπτυξης ή διεργασίες που ξεκινούν σε ενήλικο στάδιο και το γονίδιο-στόχος θα πρέπει να παραμένει σιωπηλό κατά τα εμβρυϊκά ή νεογνικά στάδια, απαιτείται χορήγηση τετρακυκλίνης/δοξικυκλίνης για μεγάλο χρονικό διάστημα, γεγονός που μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις, ειδικά κατά την εμβρυογένεση. Από την άλλη πλευρά, η επαγωγή του γονιδίου μπορεί να πάρει κάποιες μέρες, κάτι βέβαια που εξαρτάται από την κάθαρση της τετρακυκλίνης/δοξικυκλίνης από το σύστημα (Zhu Z et al. 2002). Για να αντισταθμιστούν οι αδυναμίες αυτού του συστήματος αναπτύχθηκε από την ίδια ομάδα (Gossen M. και τους συνεργάτες τους) το δεύτερο επαγόμενο σύστημα, το Tet-On.

Το σύστημα Tet-On βασίζεται στον επαγωγέα rtTA που ελέγχεται από την τετρακυκλίνη/δοξικυκλίνη με τρόπο αντίστροφο. Όπως και ο tTA, ο rtTA είναι μία χημική πρωτεΐνη που αποτελείται από την πρωτεΐνη καταστολέα TetR και την περιοχή ενεργοποίησης VP16. Η αλλαγή όμως τεσσάρων αμινοξέων στην περιοχή σύνδεσης του DNA (DNA binding domain) διαφοροποιεί τον TetR με τέτοιο τρόπο,

ώστε να αναγνωρίζει την αλληλουχία του χειριστή tetO μόνο παρουσία τετρακυκλίνης/δοξικυκλίνης. Επομένως, στο σύστημα Tet-On, η μεταγραφή του γονιδίου-στόχου ενεργοποιείται μόνο παρουσία τετρακυκλίνης/δοξικυκλίνης (Gossen M and Bujard H, 1992; Furth P et al. 1994; Kistner A et al. 1996). Σε γενικές γραμμές, η επαγωγή του γονιδίου λόγω χορήγησης τετρακυκλίνης/δοξικυκλίνης είναι γρήγορη και σε ορισμένα συστήματα μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε λίγες ώρες. Αυτό φυσικά αποτελεί ένα πλεονέκτημα έναντι του Tet-Off συστήματος για τη μελέτη οξέων επιδράσεων των υπό μελέτη γονιδίων (Zhu Z et al. 2002).



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των συστημάτων Tet-Off και Tet-On.

29.1 Το Tet-off σύστημα

Το Tet-off σύστημα είναι αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Όπως προαναφέρθηκε παρουσία τετρακυκλίνης/δοξικυκλίνης καταστέλλεται η μεταγραφή του γονιδίου καθοδικά του υποκινητή.

Το σύστημα αυτό αποτελεί μια διπλή προσέγγιση που περιλαμβάνει τη δημιουργία και τη διασταύρωση δύο σειρών ποντικών: α) της knock out σειράς όπου έχουμε έκφραση του tTA υπό το έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του γονιδίου στόχου, στην προκειμένη περίπτωση της *myospryn* και β) της TIGRE (tightly regulated) σειράς όπου έχουμε αυστηρά ρυθμιζόμενη έκφραση του γονιδίου της *myospryn* υπό τον έλεγχο του Tet στοιχείου απόκρισης (TRE). Το σύστημα αυτό παρουσιάζει το πλεονέκτημα της αδρανοποίησης/ενεργοποίησης κατά βούληση του γονιδίου στόχου απλά προσθέτοντας ή αφαιρώντας την τετρακυκλίνη/δοξικυκλίνη,

οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της ζωής του ζώου, ελαττώνοντας έτσι τις πιθανότητες για εμβρυϊκή θνησιμότητα και αναπτυξιακά προβλήματα (Zeng H et al. 2008).

30. Αποσιωποητής της μεταγραφής (transcriptional terminator)

Ο τερματισμός της μεταγραφής αποτελεί μια σπουδαία διαδικασία καθώς προάγει την έκφραση γονιδίων, ενώ παράλληλα διευκολύνει την ανακύκλωση της RNA πολυμεράσης, διατηρώντας κατ' αυτόν τον τρόπο διαθέσιμο το απόθεμά της (Dye MJ and Proudfoot NJ, 2001). Επιπλέον, ο τερματισμός εμποδίζει την επιρροή σε καθοδικούς υποκινητές -φαινόμενο γνωστό ως promoter occlusion ή transcriptional interference- όπως για παράδειγμα στην περίπτωση δυο γονιδίων που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση (closely spaced genes) (Ashfield R et al. 1991; Dye MJ and Proudfoot NJ, 2001). Τέλος, ο τερματισμός της μεταγραφής πιθανώς να προάγει την ενεργειακή ισορροπία του κυττάρου μειώνοντας την υπέρμετρη μεταγραφή μεγάλων περιοχών με μη κωδικές αλληλουχίες (Dye MJ and Proudfoot NJ, 2001).

Για να λάβει χώρα η λήξη της μεταγραφής απαιτείται τόσο η απελευθέρωση του μεταγράφου από την RNA πολυμεράση, όσο και ο διαχωρισμός της πολυμεράσης από το DNA εκμαγείο. Οι παραπάνω διαδικασίες έχουν περιγραφεί για γονίδια που μεταγράφονται από την E.coli πολυμεράση (προκαρυωτικοί οργανισμοί) και τις πολυμεράσες I και III (ευκαρυωτικοί οργανισμοί). Αντιθέτως, ο μηχανισμός αυτός δεν έχει μελετηθεί εκτενώς για γονίδια που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (Dye MJ and Proudfoot NJ, 2001). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο τερματισμός της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II λαμβάνει χώρα καθοδικά της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου (αναλύεται εκτενώς παρακάτω) και πιθανώς να μην είναι σημαντικός για τη γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση. Επιπλέον, οι μελέτες με την RNA πολυμεράση II είναι τεχνικά δύσκολες και απαιτητικές καθώς περιλαμβάνουν το χειρισμό αναπτυσσόμενων μεταγράφων (nascent transcripts) (West S et al. 2008b).

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι αποδεκτό για μια ποικιλία μεταγραφικών μονάδων ότι η RNA πολυμεράση II δεν τερματίζει τη μεταγραφή στο 3' άκρο των mRNAs. Πιο συγκεκριμένα, η RNA πολυμεράση II μεταγράφει καθοδικά από το 3' άκρο του μεταγράφου, το οποίο προκύπτει αργότερα έπειτα από

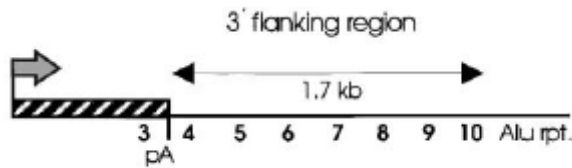
κόψιμο του πρωτογενούς μεταγράφου με ενδονουκλεάση (Logan J et al. 1987). Έτσι λοιπόν, στους οργανισμούς αυτούς το 3' άκρο των mRNAs μορίων δεν αντιστοιχεί στη θέση όπου η RNA πολυμεράση II διαχωρίζεται από το DNA εκμαγείο (όπως στην περίπτωση των περισσότερων RNA μορίων των προκαρυωτικών οργανισμών). Το 3' άκρο του mRNA προκύπτει από διάφορες επεξεργασίες που κόβουν ειδικά το μετάγραφο και του προσθέτουν μια poly-A ουρά για τη σταθεροποίησή του (Enriquez-Harris P et al. 1991).

Σημειώνουμε ότι τα μετάγραφα όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, με εξαίρεση τα γονίδια των ιστονών, περιέχουν μια poly-A αλληλουχία (poly-A signal) στο 3' άκρο τους. Καθοδικά της αλληλουχίας AAUAAA ακολουθεί μια περιοχή πλούσια σε GU ή μια περιοχή μη πλούσια σε GU, όπου σε κάποια παραδείγματα γονιδίων που θ' αναφερθούν παρακάτω έχει βρεθεί ότι περιέχει αλληλουχίες τερματισμού (Gromak N et al. 2006). Το κόψιμο του πρωτογενούς μεταγράφου στην poly-A αλληλουχία ή στις αλληλουχίες τερματισμού, -όπως θα δούμε παρακάτω από τα δύο μοντέλα τερματισμού της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II που παραθέτουμε-, έχει σαν αποτέλεσμα να προκύψουν δύο προϊόντα με τελείως διαφορετική μοίρα. Το 5' ανοδικό προϊόν προορίζεται να γίνει mRNA και σταθεροποιείται από την προσθήκη της ουράς poly-A. Η ουρά αυτή το προστατεύει από πέψη από ενδοκυτταρικές, προάγει την έξοδο του στο κυτταρόπλασμα και επάγει τη μετάφρασή του. Το 3' καθοδικό προϊόν, το οποίο εκτείνεται μέχρι τη θέση του τερματισμού της μεταγραφής και μπορεί να καλύπτει ένα εύρος χιλιάδων βάσεων καθοδικά του σημείου όπου έχει γίνει το κόψιμο, μετά από αυτό αποσταθεροποιείται, έτσι ώστε να απομακρυνθεί από το μετάγραφο (Dye MJ et al. 2001; West S et al. 2008a).

Τα συμπεράσματα από τις διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον τερματισμό της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II υποστηρίζουν ότι πρόκειται για μια τυχαία διαδικασία που συμβαίνει 100-4000bp καθοδικά της poly-A αλληλουχίας και εξαρτάται: α) από την ύπαρξη μιας λειτουργικής poly-A αλληλουχίας και β) από μια περιοχή που βρίσκεται καθοδικά της poly-A αλληλουχίας αυτής και περιέχει αλληλουχίες τερματισμού που προωθούν τη λήξη της μεταγραφής (Logan J et al. 1987; Dye MJ et al. 2001; Gromak N et al. 2006; West S et al. 2008a).

Μια από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες αλληλουχίες τερματισμού της RNA πολυμεράσης II είναι αυτή που βρίσκεται στην 3' πλευρική περιοχή (3' flanking

region) του γονιδίου της σφαιρίνης της β-γλοβίνης στον άνθρωπο. Αυτές οι αλληλουχίες τερματισμού εκτείνονται σε μια περιοχή 1.7 kb καθοδικά των poly-A αλληλουχιών και είναι απαραίτητες για τον τερματισμό της μεταγραφής. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι από μόνες τους οι αλληλουχίες από το 0.9-1.6kb (οι περιοχές 8-10 στην παρακάτω Εικόνα 22) είναι ικανές να επάγουν τη λήξη της μεταγραφής (Dye MJ et al. 2001).

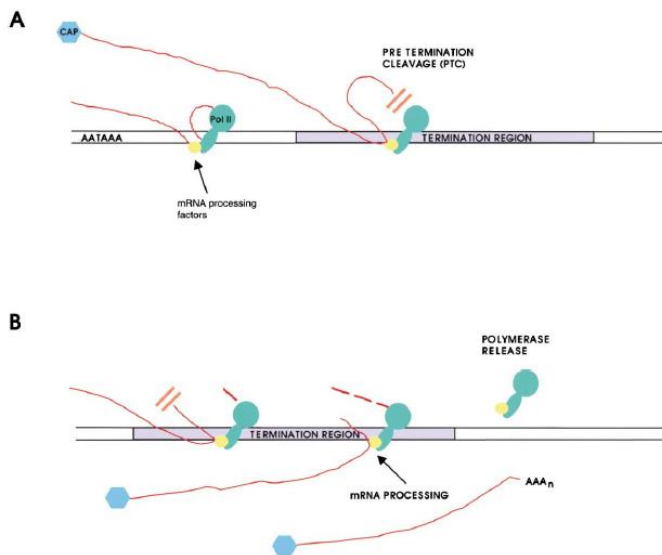


Εικόνα 22: Η 3' πλευρική περιοχή του γονιδίου της β-γλοβίνης στον άνθρωπο (Dye MJ et al. 2001).

Οι αλληλουχίες αυτές διαθέτουν ενεργότητα αποκοπής του μεταγράφου (pretermination cleavage activity-PTC) και απελευθέρωσής του από την RNA πολυμεράση II. Ένα άλλο χαρακτηριστικό αυτών των αλληλουχιών τερματισμού και ειδικότερα των περιοχών 8-10 αποτελεί το γεγονός ότι είναι πλούσιες σε AT, το οποίο πιθανώς να είναι σημαντικό για την ιδιότητα της ‘pretermination cleavage activity-PTC’. Ο όρος PTC αναφέρεται ώστε να διαχωριστεί αυτή η καινούρια ιδιότητα των αλληλουχιών αυτών που προάγουν αποκοπή του μεταγράφου, από το κόψιμο του μεταγράφου στην poly-A αλληλουχία (Dye MJ et al. 2001).

Από τα δεδομένα από τις διάφορες μελέτες για τις αλληλουχίες τερματισμού του γονιδίου της β-γλοβίνης προτείνεται ένα μοντέλο δύο σταδίων που προβλέπει τον τερματισμό της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II (Εικόνα 23):

- **Στάδιο I: Αποκοπή του μεταγράφου (pretermination cleavage)**
Οι αλληλουχίες τερματισμού που διαθέτουν ικανότητα PTC και βρίσκονται καθοδικά της poly-A αλληλουχίας προωθούν την αποκοπή του μεταγράφου και την απελευθέρωσή του από την πολυμεράση.
- **Στάδιο II: Απελευθέρωση της πολυμεράσης**
Αφού η RNA πολυμεράση μεταγράψει μια λειτουργική poly-A αλληλουχία καθώς και τις αλληλουχίες τερματισμού, αυτή απελευθερώνεται από το DNA εκμαγείο καθοδικά των αλληλουχιών τερματισμού.



Εικόνα 23: Ένα μοντέλο δύο σταδίων για τον τερματισμό της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II στο γονίδιο της β-γλοβίνης (Dye MJ et al. 2001).

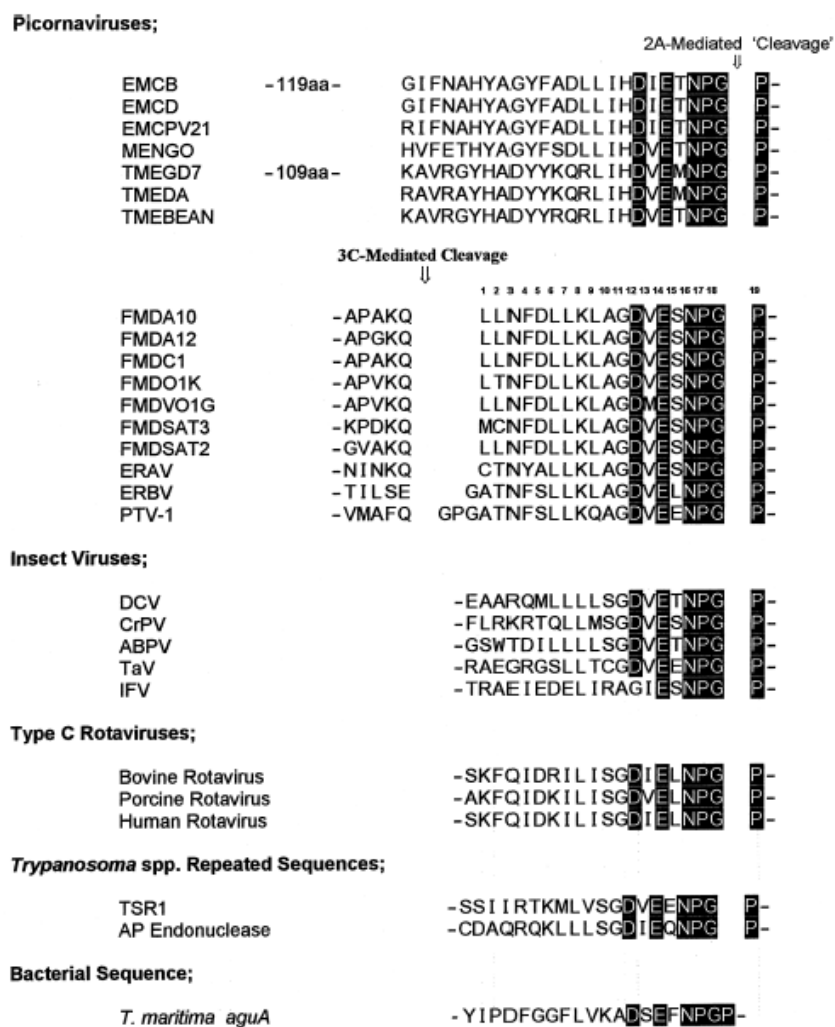
Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης οι αλληλουχίες τερματισμού (αποσιωποητής της μεταγραφής) που χρησιμοποιήθηκαν για να εξασφαλιστεί η πλήρης αδρανοποίηση του γονιδίου της *myosrpn*, είναι το τμήμα 0.9-1.6kb της 3' πλευρικής περιοχής του γονιδίου της σφαιρίνης της β-γλοβίνης του ανθρώπου (ευγενική χορηγία του NJ Proudfoot). Περισσότερες λεπτομέρειες παρατίθενται στην αντίστοιχη ενότητα ‘Υλικά και Μέθοδοι’ και στο Παράρτημα.

31. Ταυτόχρονη έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών-2A ιϊκά πεπτιδία

Σε πληθώρα περιπτώσεων στα πλαίσια της βιοϊατρικής έρευνας και της βιοτεχνολογίας είναι επιθυμητή και αναγκαία η δημιουργία ενός μοντέλου που επιτρέπει την επαρκή, ποσοτική και ταυτόχρονη έκφραση πολλών ετερόλογων πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες προσεγγίσεις, όπως τα στοιχεία IRES (Internal Ribosome Entry Site), οι υποκινητές διπλής κατεύθυνσης ή οι διπλοί υποκινητές ή η ταυτόχρονη επιμόλυνση με πολλαπλούς ιϊκούς φορείς (Tang W et al. 2009). Παρόλα αυτά οι στρατηγικές αυτές εμφανίζουν κάποια βασικά μειονεκτήματα και το κυριότερο όλων είναι ότι οι πρωτεΐνες δεν εκφράζονται στα ίδια επίπεδα (Trichas G et al. 2008; Tang W et al. 2009).

Μια εναλλακτική και πολλά υποσχόμενη στρατηγική σε σύγκριση με τις προσεγγίσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελεί η χρήση των ιϊκών 2A πεπτιδίων. Όπως τα στοιχεία IRES, έτσι και τα ιϊκά αυτά πεπτιδία ταυτοποιήθηκαν στους picornaviruses, αλλά σε μια διαφορετική υποκατηγορία, τους Aphthoviruses, ένα τυπικό παράδειγμα των οποίων αποτελεί ο ιός Foot-and-mouth disease virus

(FMDV). Πεπτίδια 2A και 2A-like έχουν βρεθεί και σε άλλα μέλη της οικογένειας Picornaviridae, όπως ο ιός Equine rhinitis A (ERAV), καθώς και σε μη σχετιζόμενους ιούς, όπως ο ιός Porcine teschovirus-1 (PTV-1) και ο ιός των εντόμων *Thosea asigna virus* (TaV). Σε αυτούς τους ιούς διάφορες πολλαπλές πρωτεΐνες που διαχωρίζονται από τα πεπτίδια αυτά κωδικοποιούνται σε ίσες ποσότητες από ένα μόνο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 24) συγκεντρώνονται τα διάφορα 2A και 2A like πεπτίδια που απαντώνται φυσικά σε ιούς, αλλά και όχι μόνο (de Felipe P et al. 2006; Donnelly MLL et al. 2001; Trichas G et al. 2008; Tang W et al. 2009).



Εικόνα 24: 2A και 2A-like πεπτίδια που απαντώνται φυσικά (Donnelly MLL et al. 2001).

Τα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνουν οι 2A και 2A-like αλληλουχίες σε σύγκριση με τις προηγούμενες προσεγγίσεις είναι ότι: α) πρόκειται για σχετικά μικρά πεπτίδια (συνήθως περίπου 20 αμινοξέα, ανάλογα τον ιό από τον οποίον

προέρχονται), γεγονός σπουδαίο σε περιπτώσεις συστημάτων φορέων όπου έχουμε αυστηρό περιορισμό μεγέθους, β) με τη χρήση της προσέγγισης αυτής είναι δυνατή η χρήση ενός μόνο υποκινητή, ο οποίος μπορεί να είναι κυτταροειδικός και γ) οι διάφορες πολλαπλές πρωτεΐνες που διαχωρίζονται από τα πεπτίδια αυτά κωδικοποιούνται σε ίσες ποσότητες από ένα μόνο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και με τη χρήση κατάλληλων φθορίζοντων γονιδίων αναφοράς είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που εκφράζονται ταυτόχρονα σ' ένα τέτοιο σύστημα (Tang W et al. 2009).

Οι μικρές αυτές αλληλουχίες περιέχουν το συναινετικό μοτίβο Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro. Αρχικά, θεωρούσαν ότι τα πεπτίδια αυτά προκαλούν την αυτοκαταλυτική πρωτεόλυση των μεγάλων πολυπρωτεϊνών και για το λόγο αυτό καλούνταν 'self-cleaving peptides'. Ωστόσο, το μοντέλο που έχει προταθεί για τη δράση των πεπτιδίων αυτών είναι ότι αυτά δρουν παράλληλα με τη μετάφραση, εμποδίζοντας το σχηματισμό ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της γλυκίνης (Gly) και της τελευταίας προλίνης (Pro), με την υδρόλυση του εστερικού δεσμού μεταξύ του πρωτογενούς πεπτιδίου και του tRNA που έχει σαν αποτέλεσμα από τη μια πλευρά την απελευθέρωση του πεπτιδίου αυτού και από την άλλη πλευρά την υπερπήδηση του ριβοσώματος (ribosome skipping) στο επόμενο κωδικόνιο για την επανέναρξη της μετάφρασης. Έπειτα από την υδρόλυση του δεσμού αυτού, το μικρό 2A πεπτίδιο παραμένει συντηγμένο στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που βρίσκεται ανοδικά, ενώ η προλίνη προστίθεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που βρίσκεται καθοδικά. Συνολικά, ο μηχανισμός δράσης των 2A και 2A-like πεπτιδίων είναι μέσω της υπερπήδησης του ριβοσώματος (ribosome skipping) και τα πεπτίδια αυτά χαρακτηρίζονται πλέον ως CHYSELS (cis-acting hydrolase elements) (de Felipe P et al. 2006; Donnelly MLL et al. 2001; Trichas G et al. 2008; Tang W et al. 2009).

Τέλος, η προλίνη που προστίθεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που βρίσκεται καθοδικά προσδίδει μεταβολική σταθερότητα στην πρωτεΐνη αυτή. Η αλληλουχία του 2A που βρίσκεται ανοδικά από το σημείο όπου γίνεται το κόψιμο φαίνεται να επηρεάζει, αλλά να μην είναι κρίσιμη για τη διαδικασία αυτή. Στο 2A πεπτίδιο του ιού TaV που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημά μας προστέθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα (-APGS) στην καρβοξυτελική περιοχή του (Tang W et al. 2009). Με την προσθήκη της συνδετικής αλληλουχίας των τεσσάρων αμινοξέων προτείνεται ότι δημιουργείται ένα πιο σταθερό περιβάλλον για την

επαναλαμβανόμενη επεξεργασία στο σημείο που πραγματοποιείται το κόψιμο (Tang W et al. 2009).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι το κόψιμο που διαμεσολαβείται από τις αλληλουχίες 2A έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως τα κύτταρα των θηλαστικών, των εντόμων, των ζυμών, των μυκήτων και των φυτών, αλλά όχι στα βακτήρια (de Felipe P et al. 2006; Donnelly MLL et al. 2001). Παρά την πληθώρα των 2A και 2A like αλληλουχιών (Εικόνα 24), τέσσερις διαφορετικές αλληλουχίες έχουν χρησιμοποιηθεί in vivo για την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών σε ίσα επίπεδα από ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 11) παρουσιάζονται οι αλληλουχίες αυτές (de Felipe P et al. 2006).

Πίνακας 11: 2A και 2A-like αλληλουχίες που έχουν χρησιμοποιηθεί in vivo στη βιοτεχνολογία. Με έντονα γράμματα απεικονίζεται το συντηρημένο μοτίβο (de Felipe P et al. 2006).

Virus	Virus family	Host	2A or 2A-like sequence
Foot-and-mouth disease (FMDV)	<i>Picomaviridae</i>	Mammals	-P V KQLLN F DL L KL A GD V ES N P G P-
Equine rhinitis A virus (ERAV)	<i>Picomaviridae</i>	Mammals	----Q C T N Y A LL K L A GD V ES N P G P-
Porcine teschovirus-1 (PTV1)	<i>Picomaviridae</i>	Mammals	-----A T N F S L L K Q A GD V ES N P G P-
Thosea asigna virus (TaV)	<i>Tetraviridae</i>	Insects	-----E G R G S L L T C G D V ES N P G P-

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το 2A πεπτίδιο του ιού των εντόμων *Thosea asigna virus* (TaV). Περισσότερες λεπτομέρειες παρατίθενται, στην αντίστοιχη ενότητα ‘‘Υλικά και Μέθοδοι’’ και στο Παράρτημα.

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου της myosrygn στην καρδιά και της βιολογικής σημασίας της αλληλεπίδρασής της με τη δεσμίνη. Για την περεταίρω διαλεύκανση της δομικής και/ή ρυθμιστική λειτουργίας του ικρίωματος myosrygn-δεσμίνης χρησιμοποιήσαμε τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* στρατηγικές.

Όσον αφορά τις *in vitro* προσεγγίσεις μελετήσαμε τη σημασία της αλληλεπίδρασης της δεσμίνης με την AKAP-myosrygn στη ρύθμιση του PKA μονοπατιού, το οποίο αποτελεί έναν καθολικό μηχανισμό μεταγωγής σήματος και είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τη λειτουργία των μυοκαρδιοκυττάρων. Ειδικότερα, χρησιμοποιήσαμε πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από *des^{+/+}* και *des^{-/-}* ποντίκια, πριν και έπειτα από επώαση με Isoproterenol (μη ειδικός ολικός β-αδρενεργικός αγωνιστής) και μελετήσαμε εάν ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης παίζει ρόλο στη β-αδρενεργική σηματοδότηση.

Παράλληλα, με *in vivo* προσεγγίσεις απενεργοποιήσαμε το γονίδιο της myosrygn χρησιμοποιώντας ένα επαγόμενο tet-off σύστημα διπλού χτυπήματος (two-hit conditional tet-off system). Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο σύστημα καθώς υποθέταμε ότι η απουσία της myosrygn προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα, βασιζόμενοι σε παλαιότερα δεδομένα του εργαστηρίου μας. Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία δημιουργήσαμε και χαρακτηρίσαμε ποντίκια με έλλειψη της myosrygn και μελετήσαμε τις συνέπειες της απουσίας της myosrygn στο μυοκάρδιο και στους σκελετικούς μυς.

Γενικότερα, στόχος του εργαστηρίου μας είναι να καταλάβουμε καλύτερα πως λειτουργούν τα ενδιάμεσα ινίδια και οι συνδεόμενες με αυτά πρωτεΐνες ως ένα ικρίωμα, το οποίο μπορεί να εναρμονίσει τις διαδικασίες της μηχανοχημικής σηματοδότησης και διαμετακίνησης πρωτεϊνών και συνεπώς να ρυθμίζει τη λειτουργία σημαντικών μηχανισμών ομοιόστασης και επιβίωσης των κυττάρων των θηλαστικών

B. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Μοριακή κλωνοποίηση

1.1 Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι βακτηριακά ένζυμα, τα οποία αναγνωρίζουν και πέπτουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, οι οποίες καλούνται θέσεις αναγνώρισης-πέψης. Οι περισσότερες ενδονουκλεάσες περιορισμού αναγνωρίζουν και πέπτουν το DNA μέσα σε μια αλληλουχία τεσσάρων ή έξι νουκλεοτιδίων και ανάλογα με τον τρόπο πέψης δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα. Ως 1 μονάδα (unit) περιοριστικού ενζύμου, ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1 μg υποστρώματος DNA, σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μL, μετά από επώαση για 1 ώρα. Στην αντίδραση πέψης του DNA προστίθεται το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο το ένζυμο περιορισμού παρουσιάζει τη βέλτιστη δραστηριότητα και αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), ανάλογα το ένζυμο. Η ενδονουκλεάση περιορισμού προστίθεται τελευταία και ο όγκος του ενζυμικού μίγματος δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης, προκειμένου να αποφευχθεί το φαινόμενο της μη ειδικής πέψης (star activity) που μπορεί να παρατηρηθεί λόγω υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης (> 5%) στο μίγμα της αντίδρασης (τα ένζυμα διατηρούνται σε διάλυμα 50% γλυκερόλης προκειμένου να μην παγώνουν στους -20°C). Ο τελικός όγκος του μίγματος είναι 20 μL και η αντίδραση πραγματοποιείται για δύο ώρες στους 37°C. Σε περίπτωση πέψης του DNA με δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού, η προσθήκη των ενζύμων γίνεται ταυτόχρονα, όταν αυτά είναι συμβατά στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και εμφανίζουν σ' αυτό τη βέλτιστη δραστηριότητά τους, ή διαδοχικά όταν δεν έχουν συμβατά ρυθμιστικά διαλύματα. Τέλος, υπάρχει και η δυνατότητα πραγματοποίησης μερικής πέψης του δείγματος σε περίπτωση που η αλληλουχία της επιθυμητής περιοριστικής ενδονουκλεάσης υπάρχει σε αυτό παραπάνω από μια φορές. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι διεξαγωγής μερικής πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση, εκ των οποίων οι δύο πιο γνωστοί είναι: α) οι διαφορετικές χρονικές στιγμές τερματισμού της αντίδρασης με την προσθήκη ίδιας ποσότητας ενζύμου και β) η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων του ενζύμου, αλλά τερματισμό των πέψεων την ίδια χρονική στιγμή.

1.2 Γέμισμα (fill in) των άκρων τμήματος DNA με το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I

Το μεγαλύτερο από τα δύο πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν όταν η βακτηριακή DNA πολυμεράση I πέπτεται από την πρωτεάση subtilisin ονομάζεται Klenow. Το κλάσμα Klenow διατηρεί την ενεργότητα 5'→3' πολυμεράσης και 3'→5' εξωνουκλεάσης, αλλά χάνει την ενεργότητα της 5'→3' εξωνουκλεάσης. Για το λόγο αυτό το κλάσμα Klenow χρησιμοποιείται ευρέως για το γέμισμα των 3' υπολειπόμενων άκρων του DNA, προκειμένου να δημιουργηθούν «τυφλά» άκρα, ώστε να διευκολυνθεί η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε έναν πλασμιδιακό φορέα, όταν τα άκρα των δύο αυτών τμημάτων δεν είναι συμβατά μεταξύ τους. Στην αντίδραση γεμίματος των άκρων του DNA προστίθεται το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο δρα το κλάσμα Klenow (1x NEBuffer), μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε τελική συγκέντρωση 33 μM το καθένα και τέλος 1 unit Klenow πολυμεράσης για κάθε μg DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι τα 10μL, τα οποία και συμπληρώνονται με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease free). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 15 λεπτά στους 25°C. Προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση προστίθενται EDTA (0.5M, pH 8.0), σε τελική συγκέντρωση 10 mM και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στους 75°C.

1.3 Αποφωσφορυλίωση των 5' άκρων του DNA με Antarctic φωσφατάση (Antarctic phosphatase)

Αποφωσφορυλίωση του DNA καλείται η διαδικασία απομάκρυνσης των φωσφορικών ομάδων από τα 5' άκρα του μορίου και καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις αλκαλικές φωσφατάσες. Η αποφωσφορυλίωση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην κλωνοποίηση τμημάτων DNA, καθώς τμήματα DNA από τα οποία έχουν απομακρυνθεί οι φωσφορικές ομάδες και από τα δύο 5' άκρα τους, δεν μπορούν να επανενωθούν μετά από κατεργασία με DNA λιγάση. Με τον τρόπο αυτό, πλασμιδιακοί φορείς, οι οποίοι έχουν υποστεί πέψη με κάποια ενδονουκλεάση περιορισμού, δεν επανενώνονται λόγω της δράσης της λιγάσης, αυξάνοντας έτσι την απόδοση της αντίδρασης λιγάσης, αφού ελαττώνεται το ποσοστό των «επιμολύνσεων» από αυτό-κυκλοποιημένους πλασμιδιακούς φορείς. Η αλκαλική φωσφατάση, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση ήταν η antarctic

phosphatase (New England Biolabs). Ένα σημαντικό βήμα στη διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης είναι να υπολογιστούν οι ενζυμικές μονάδες (units) της antarctic phosphatase που θα προστεθούν στην αντίδραση, καθώς εάν προστεθεί πολύ περισσότερο ένζυμο ή αν υπάρχει στο ένζυμο επιμόλυνση με εξωνουκλεάση, μπορεί να καταστραφούν τα άκρα του DNA. Ειδικότερα, για την αποφωσφορυλίωση 1 pmol 5' προεξεχόντων άκρων απαιτούνται 5 units antarctic phosphatase. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης μπορεί να λάβει χώρα αμέσως μετά το πέρας μιας αντίδρασης πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού, καθώς η antarctic phosphatase είναι δραστική σε οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα πέψης και επομένως, μπορεί να προστεθεί απευθείας σε αυτό. Αφού προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα antarctic phosphatase και ρυθμιστικό διάλυμα Antarctic Phosphatase Reaction Buffer (10X), ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε υδατόλουτρο στους 37°C. Προκειμένου να απενεργοποιηθεί πλήρως η δράση της antarctic phosphatase και να σταματήσει η αντίδραση, ακολουθεί θερμική κατεργασία για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 65°C. Τέλος, ακολουθεί επεξεργασία του DNA με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης, σύμφωνα με την επόμενη παράγραφο 1.4.

1.4 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης

Προκειμένου να αποκτήσουμε μεγαλύτερης καθαρότητας πλασμιδιακό DNA, το δείγμα μπορεί να εκχυλιστεί με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει καλύτερη απομάκρυνση των πρωτεϊνικών προσμίξεων από το δείγμα. Στη συνέχεια ακολουθεί νέα εκχύλιση με διάλυμα χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της φαινόλης. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Στο δείγμα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και ακολουθεί έντονη ανάδευση.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο (υδατική φάση) μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο για περαιτέρω επεξεργασία.

- Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί έντονη ανάδευση.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου CH₃COONa (3M Sodium acetate pH 5.2 ή pH 6) και 2,5x του όγκου κρύας 100% αιθανόλης (EtOH) και ακολουθεί ήπια ανάδευση για την κατακρήμνιση του DNA.
- Το μίγμα αφήνεται στους -80°C ολονύκτια (ή για 30 λεπτά).
- Την επομένη το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται με 0,5 mL κρύου διαλύματος 70% αιθανόλης (EtOH) και έπειτα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για λίγα λεπτά.
- Τέλος, επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE ή ddH₂O.

1.5 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Στη συνέχεια, πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Bio-Rad) με σκοπό τον καθαρισμό του δείγματος από άλατα και ένζυμα (gel extraction) με τη χρήση του kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1.6 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε βακτηριακούς φορείς - Αντίδραση λιγάσης (ligation)

Ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA που μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε οποιοδήποτε αυτόνομο γενετικό σύστημα ονομάζεται κλωνοποίηση. Αρχικά, πραγματοποιείται πέψη του DNA, απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος και επιτελούμε τη σύνδεσή του με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης, ο οποίος έχει υποστεί πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, δημιουργώντας του κατά αυτόν τον τρόπο συμβατά άκρα.

Τα πλασμίδια - φορείς είναι μικρά, κυκλικά, δίκλιωνα μόρια DNA και αποτελούν αυτόνομα εξωχρωμοσωμικά στοιχεία, δηλαδή δεν αποτελούν μέρος του βακτηριακού χρωμοσώματος. Φέρουν τα εξής τρία χαρακτηριστικά: μία θέση έναρξης της

αντιγραφής (ORI), ένα γονίδιο μάρτυρα επιλογής (ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό) και θέσεις πέψης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που απαντώνται μόνο μία φορά στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS ή polylinker). Το υπό κλωνοποίηση τμήμα του DNA προέρχεται είτε από την πέψη κάποιου μεγαλύτερου αρχικού με ενδονουκλεάσες περιορισμού, είτε από την ενίσχυση μιας ακολουθίας με τη μέθοδο της PCR. Το τμήμα αυτό μπορεί να έχει κολλώδη ή τυφλά άκρα, ανάλογα με την ενδονουκλεάση περιορισμού ή τη θερμο-ανθεκτική DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Η Taq DNA πολυμεράση δημιουργεί συμπληρωματικά άκρα (με μια προεξέχουσα βάση A) σε κάθε 3' άκρο. Η κλωνοποίηση στηρίζεται στη σύνδεση των συμπληρωματικών άκρων του φορέα και του τμήματος του DNA και στη συνέχεια, στην ομοιοπολική σύνδεση τους, μέσω φωσφοδιεστερικού δεσμού που καταλύεται από το ένζυμο T4 DNA λιγάση.

Στην αντίδραση σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιούμε τις κατάλληλες ποσότητες φορέα και ενθέματος, έτσι ώστε να έχουμε τον επιθυμητό λόγο των μεγεθών τους. Η αναλογία του μορίου DNA και του πλασμιδιακού φορέα πρέπει να είναι 3:1.

Πειραματική πορεία

- Αναμιγνύονται η κατάλληλη ποσότητα γραμμικού πλασμιδιακού DNA (linearized vector), με την αντίστοιχη ποσότητα DNA από το κομμάτι που πρόκειται να κλωνοποιηθεί (insert DNA) (με αναλογία συνήθως 1:3).
- Διεξάγεται η αντίδραση της σύνδεσης σε τελικό όγκο 10 μl προσθέτοντας ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης μαζί με το ένζυμο T4 DNA λιγάσης (New England Biolabs).
- Αξίζει να σημειωθεί ότι διεξάγονται δύο παρόμοιες αντιδράσεις που λειτουργούν ως μάρτυρες της αντίδρασης. Στην πρώτη δεν προστίθεται το προς κλωνοποίηση DNA και στη δεύτερη δεν προστίθεται λιγάση. Με την πρώτη ελέγχεται το κατά πόσο έχει γίνει επανασύνδεση των άκρων του πλασμιδιακού φορέα και με τη δεύτερη εάν υπάρχει άκοπο πλασμίδιο.
- Η αντίδραση επωάζεται ολονύκτια στους 16°C.
- Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να πιστοποιηθεί εάν πραγματοποιήθηκε η αντίδραση, χρησιμοποιώντας το 1/10 του όγκου της αντίδρασης.
- Η υπόλοιπη αντίδραση χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους.

Στη συνέχεια, ακολουθεί ο πίνακας με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της κασέτας και των περιοχών ομολογίας της *myospryn* στον TOPO XL φορέα για την κατασκευή του φορέα στόχευσης της knock out σειράς.

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1	3ARM FRW	5'-gctctagagc ctgcttgagtac -3'
2	3ARM REV	5'-gccgctcgagcggc ctatggtgaac -3'
3	CST FRW	5'-gccgctcgagcggc GGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGT CGAGGAGAATCCTGGCCAGCA CCG GGA TCC ATGTCTAGATTAGATAAAAG -3'
4	CST REV	5'-atttgcggcggcttta ACAGCTATGACC -3'
5	5ARM FRW	5'-atttgcggcggcttta AGCTCCAAGTGT -3'
6	5ARM REV	5'-cgcggatccg CTCATCCTGCAC -3'

Τέλος, ακολουθεί ο πίνακας με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του cDNA της *myospryn* στον pGlnZ φορέα για την κατασκευή του φορέα στόχευσης της Tigre σειράς.

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	TGRMY 1 FRW (binds at 219 nucleotide of <i>myospryn</i> 's cDNA)	5'-TCCCCGCGGGGA at ggagagcggc gaca-3'
2.	TGRMY 1 REV (binds at 4289 nucleotide of <i>myospryn</i> 's cDNA)	5'-tggcttaagcacacaggttgactcgggtg-3'
3.	TGRMY 2 FRW (binds at 4278 nucleotide of <i>myospryn</i> 's cDNA)	5'-gtgcttaagccagagcaggagcccaca-3'
4.	TGRMY 2 REV (binds at 11438 nucleotide of <i>myospryn</i> 's cDNA)	5'-ATTTGCGGCCGCTTTA tcacttgtgcctgaca-3'
5.	TGRMY 3 FRW (binds at 9097 nucleotide of <i>myospryn</i> 's cDNA)	5'-ggagaaagcctgaaactagttttgggag-3'
6.	TGRMY 3 REV (binds at 9119 nucleotide of <i>myospryn</i> 's cDNA)	5'-aaaactagtttcaggctttctccggatctc-3'

Σημείωση: TCCCCGCGGGGA = SacII θέση περιορισμού + επιπρόσθετη βοηθητική αλληλουχία

ATTTGCGGCCGCTTTA = NotI θέση περιορισμού + επιπρόσθετη βοηθητική αλληλουχία

1.7 Δημιουργία δεκτικών στελεχών E. coli

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA, είναι το One Shot® TOP10 (Invitrogen). Ως υλικό για την υγρή καλλιέργειά τους χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο μέσο καλλιέργειας Luria-Bertani Broth (LB). Για την καλλιέργειά τους σε τρυβλία Petri χρησιμοποιήθηκε LB Bacto-agar. Το Bacto-agar διαλύεται κατά την υγρή αποστείρωση. Πριν κρυώσει και πολυμεριστεί, στους 45-55°C, προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με το πλασμίδιο και το βακτηριακό στέλεχος που καλλιεργείται. Το υγρό θρεπτικό υλικό καθώς και τα τρυβλία μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται στους 37°C σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας. Για τις υγρές καλλιέργειες είναι απαραίτητη η συνεχής ανάδευση, καθώς και ο καλός αερισμός. Προκειμένου να διατηρηθούν για μεγαλύτερες περιόδους τα βακτήρια φυλάσσονται στους -80°C, στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, παρουσία 30-50% γλυκερόλης (glycerol stocks).

Υλικά - Διαλύματα

1. LB (Luria-Bertani Broth): Bacto tryptone 10 gr, Yeast Extract 5 gr, Sodium Chloride (NaCl) 10 gr, dH₂O μέχρι 1 lt. Ρύθμιση του pH στο 7 και στη συνέχεια αποστείρωση.
2. LB agar: Ομοίως με LB και επιπλέον προσθήκη Bacto agar 15 gr.
3. Γλυκερόλη (glycerol)

Για τη δημιουργία δεκτικών στελεχών ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Πειραματική πορεία

- Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας σε 100ml LB.
- Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση στις 225rpm μέχρι η οπτική απορρόφηση OD_{600nm} να γίνει ~0,4 (εκθετική φάση).
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Συλλέγουμε τα βακτήρια με φυγοκέντρηση στις 2.500rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 12ml φρέσκου και παγωμένου 0,1M CaCl₂.
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση στις 2.500rpm για 5 λεπτά στους 4°C.

- Επαναδιαλύουμε σε 4ml CaCl₂ 0,1M και προσθέτουμε γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 15%.
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Αποθήκευση στους -80°C.

1.8 Μετασηματισμός δεκτικών στελεχών E.coli

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

Πειραματική πορεία

- Αφού αποψύξουμε ένα σωλήνα erpendorf με χημειοδεκτικά βακτήρια E.coli στον πάγο, προσθέτουμε το πλασμίδιο της επιλογής μας και αναμιγνύουμε ήπια.
- Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Στη συνέχεια, μεταφέρουμε το σωλήνα erpendorf για 30 δευτερόλεπτα στους 42°C (θερμικό σοκ).
- Έπειτα, επωάζουμε για 2 λεπτά στον πάγο.
- Προσθέτουμε LB ή SOC θρεπτικό μέσο.
- Έπεται επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση στις 225rpm.
- Τέλος, επιστρέφουμε τα βακτήρια σε τρυβλίο με ανθεκτικότητα σε κατάλληλο αντιβιοτικό.

1.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι. Στην παρούσα εργασία για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η πορεία που αναλύεται παρακάτω. Το DNA που απομονώνεται με τη μέθοδο αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κάθε είδους εφαρμογή.

Πειραματική πορεία

- Εμβολιασμός μοναδικών αποικιών σε 2 ml θρεπτικό μέσο LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες υπό ανάδευση.
- Την επομένη, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 1 min.

- Το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας απομακρύνεται και τα κύτταρα επανααιρούνται σε 300 μl διαλύματος P1 (από το QIAGEN plasmid midi kit).
- Προστίθενται 300 μl διαλύματος P2 (QIAGEN).
- Προστίθενται 300 μl διαλύματος P3 (QIAGEN).
- Προστίθενται 500 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο (1:1)
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 20 min.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο erpendorf και προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλης και τοποθετείται στον πάγο για 5 min.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 20 min στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 0.5 ml 70% αιθανόλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 5 min στους 4°C.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και ακολουθεί επώαση για 5 min στους 37°C.
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος του DNA με 30μl ddH₂O.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία (Midi prep) και μεγάλη κλίμακα (Maxi prep) πραγματοποιείται με τη χρήση του αντίστοιχου kit (Plasmid purification midi ή maxi kit) της QIAGEN σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή.

1.10 Πιστοποίηση της κλωνοποιημένης αλληλουχίας (sequencing)

Προκειμένου να πιστοποιηθεί η ορθότητα της κλωνοποιημένης αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του DNA. Με τη χρήση εφαρμογών βιοπληροφορικής, η αλληλουχία μεταφράζεται και πραγματοποιείται ευθυγράμμιση και αντιστοίχιση (alignment) με καταχωρημένες αλληλουχίες του δικτυακού τόπου.

2. Ομόλογος ανασυνδυασμός με BAC κλώνο σε E.coli

2.1 Προσθήκη των περιοχών ομολογίας με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού σε βακτήρια

Η προσθήκη των περιοχών ομολογίας της *myospryn* (μήκους 5 kb περίπου) στο φορέα στόχευσης (targeting vector *myospryn-tTA*) θα πραγματοποιηθεί με την τεχνολογία του ομόλογου ανασυνδυασμού τεχνητών βακτηριακών χρωμοσωμάτων (BACs) σε βακτήρια *E.coli*. Ο φορέας που φέρει τις περιοχές ομολογίας της *myospryn* θα μπορέσει να ενσωματωθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό στην επιθυμητή περιοχή στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Πριν από αυτό, θα πρέπει να προστεθούν περιοχές ομολογίας της *myospryn* μήκους 50 βάσεων εκατέρωθεν της κασέτας ‘*tTA-PGK-neo-pA-term*’.

Υλικά - Διαλύματα

1. KOD Hot Start DNA polymerase (Novagen, Cat. No. 71086)
2. Αντιβιοτικά: i) χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol) 15 µg/ml
ii) τετρακυκλίνη (tetracycline) 3 µg/ml
iii) καναμυκίνη (kanamycin) 15 µg/ml
3. L-arabinose (Sigma A-3256)
4. LB θρεπτικό μέσο
5. LB-άγαρ στερεό θρεπτικό μέσο
6. Κυβέτες ηλεκτροδιάτρησης (1 mm, BTX)
7. Quick & Easy BAC Modification Kit by Red/ET Recombination (GENE BRIDGES, Cat. No. K001)

2.2 Προσθήκη περιοχών ομολογίας μήκους 50 βάσεων στην κασέτα ‘tTA-PGK-neo-pA-term’

Αρχικά, η κασέτα ‘*tTA-PGK-neo-pA-term*’ ενισχύεται με PCR, με χημεικούς primers που φέρουν αλληλουχίες ομολογίας της *myospryn* μήκους 50 βάσεων, ειδικές για την περιοχή στόχευσης στον BAC κλώνο bMQ-427A5 (129SV) και ειδικές για την περιοχή στόχευσης στον BAC κλώνο RP 23-237P18 (C57/B16).

Στον πίνακα που ακολουθεί παραθέτουμε τους χημικούς primers για τους δύο BAC κλώνους που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR.

Κλώνος		Όνομα χημικών εκκινητών	Αλληλουχία 5' - 3'
RP23-237P18 (C57/Bl6)	1.	FRW TARV	5'-GAA CAC CGG GCG AGG CGT GGG CAG CTC CGA CTC CGG CCA GGA CAG GCG CGA TGT CTA GAT TAG ATA AAA GTA AAG TGA TT-3'
	2.	REV TARV	5'-CTG GCT TAA GCA CAC AGG TTG ACT CGG GTG AAA CTG AGG GCT GAG AGG TGA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG-3'
bMQ-427A5 (129SV)	1.	FRW 2ATARV	5'-GGA GAG GGC AGA GGA AGT CTG CTA ACA TGC GGT GAC GTC GAG GAG AAT CCT GGC CCA GCA CCG GGA TCC ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA GTG-3'
	2.	FRW MYO2A	5'-TAA TTT TAT TTA TTA CTA TAA TAT ATA ATT ACT GGT ATT GTT CAC CAT AGG GAG AGG GCA GAG GAA GTC TGC-3'
	3.	REV TARV	5'-CTG GCT TAA GCA CAC AGG TTG ACT CGG GTG AAA CTG AGG GCT GAG AGG TGA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG-3'

Η αντίδραση της PCR με τους χημικούς εκκινητές πραγματοποιείται ως εξής:

DNA	x μl
10x Buffer	5 μl
MgSO ₄ (25 mM)	3 μl
dNTPs (2 mM each)	5 μl
Primer FRW (10μM)	1,5 μl
Primer REV (10μM)	1,5 μl
KOD Hot Start DNA polymerase (1U/μl)	1 μl
ddH ₂ O	x μl
Total vol	50 μl

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μl. Το πρόγραμμα της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε έχει τα ακόλουθα βήματα:

1. 95°C για 2 min
2. 95°C για 40 sec
3. 60°C για 25 sec
4. 72°C για 4 min
5. go to step 2 for 30 cycles
6. 72°C για 10 min
7. 4°C για 10 min

Το προϊόν της αντίδρασης της PCR αναλύεται με ηλεκτροφόρηση, ανιχνεύεται και απομονώνεται από πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, με το ειδικό gel extraction kit της QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες του αντίστοιχου εγχειριδίου.

Αυτό το τμήμα DNA που περιέχει την κασέτα '(2A)-tTA-PGK-neo-pA-term' σημασμένο εκατέρωθεν με τις κατάλληλες περιοχές ομολογίας της myospryn, χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση επιδεκτικών κυττάρων E.coli του στελέχους DH10b που περιέχουν τον BAC κλώνο bMQ-427A5 και κυττάρων που περιέχουν τον κλώνο RP 23-237P18.

Σημείωση: παρατίθεται το ζεύγος primers που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της PCR με μήτρα τον φορέα βΔ5-7 (CoTC) για να προκύψουν, ως προϊόν της PCR οι αλληλουχίες τερματισμού.

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	FRW CoTC 3	5'- AGTGTTACCATCAACCACCTAA -3'
2.	REV CoTC 4	5'- CTGTCTGTTCCATGAGAGTGA -3'

2.3 Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση των βακτηρίων που φέρουν τον BAC κλώνο με το πλασμίδιο του Red/ET ανασυνδυασμού pSC101- BAD-gbaA

- Τα βακτήρια που φέρουν τον BAC κλώνο καλλιεργούνται σε υγρό LB με χλωραμφαινικόλη 15 μg/ml για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση.
- Την επομένη, 300 μl υγρής καλλιέργειας εμβολιάζονται σε 14 ml LB με χλωραμφαινικόλη και επωάζονται για 1 ώρα και 30 λεπτά περίπου, έως OD₆₀₀=0,5.
- Ακολουθεί προετοιμασία των κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση: Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 2 ml κρύου ddH₂O με γρήγορη ανάδευση στο vortex. Προστίθεται κρύο ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 50 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως προηγουμένως. Μετά τη δεύτερη πλύση, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 30 μl ddH₂O. Τα κύτταρα τώρα είναι επιδεκτικά σε μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση.
- Σε 30μl δεκτικών κυττάρων προστίθεται 1 μg του πλασμιδίου pSC101- BAD-gbaA (1μl). Τα κύτταρα αναδεύονται ήπια και μεταφέρονται σε παγωμένες κυβέτες ηλεκτροδιάτρησης (1 mm, BTX). Η ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται

σε συσκευή BTX 630 σε τάση 1.65KV, αντίσταση 200Ω και χωρητικότητα 25μF.

- Μετά την ηλεκτροδιάτρηση προστίθενται στην κυβέτα 700 μL θρεπτικού μέσου LB χωρίς αντιβιοτικά και το εναιώρημα μεταφέρεται σε σωληνάριο falcon και επωάζεται στους 30°C για 70 min υπό ανάδευση. 20 μl από το εναιώρημα χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο LB-άγαρ, ώστε ν' αναπτυχθούν οι μετασχηματισμένες αποικίες. Το θρεπτικό μέσο περιέχει 3 μg/ml τετρακυκλίνη (επιλογή πλασμιδίου) και 15 μg/ml χλωραμφαινικόλη (επιλογή BAC κλώνου). Τα τρυβλία επωάζονται για 16 ώρες στους 30°C.

2.4 Ομόλογος ανασυνδυασμός των BAC κλώνων με την κασέτα '(2A)-tTA-PGK-neo-pA-term'

- Μια αποικία από τα βακτήρια που φέρουν τον BAC κλώνο και έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pSC101- BAD-gbaA καλλιεργείται σε 2 ml θρεπτικού μέσου LB που περιέχει 3 μg/ml τετρακυκλίνη και 15 μg/ml χλωραμφαινικόλη στους 30°C για 16 ώρες.
- Την επομένη, 350 μl υγρής καλλιέργειας εμβολιάζονται σε 14 ml θρεπτικού μέσου LB με τα ίδια αντιβιοτικά έως OD₆₀₀=0,3-0,4.
- Στην καλλιέργεια προστίθεται 0.5 ml L-αραβινόζης (L-arabinose) 10% και η επώαση συνεχίζεται στους 37°C για 1 ώρα.
- Τα κύτταρα προετοιμάζονται για ηλεκτροδιάτρηση, όπως προηγουμένως.
- 30 μl δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιούνται για ηλεκτροδιάτρηση με το τμήμα DNA που περιέχει την κασέτα '(2A)-tTA-PGK-neo-pA-term', σημασμένο εκατέρωθεν με τις κατάλληλες περιοχές ομολογίας, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
- Μετά την ηλεκτροδιάτρηση προστίθενται στην κυβέτα 700 μL θρεπτικού μέσου LB χωρίς αντιβιοτικά και το εναιώρημα επωάζεται στους 37°C για 70 min, υπό ανάδευση. Από το εναιώρημα αυτό 20 μl χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο LB-άγαρ, ώστε να αναπτυχθούν οι μετασχηματισμένες αποικίες. Το θρεπτικό μέσο περιέχει 15 μg/ml καναμυκίνη (επιλογή κασέτας) και 15 μg/ml χλωραμφαινικόλη (επιλογή BAC κλώνου). Τα τρυβλία επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C.

2.5 Απομόνωση DNA από BACs

Οι BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) είναι πολύ μεγάλοι και σχετικά μη σταθεροί φορείς. Είναι πάρα πολύ εύκολο να καταστραφούν και για αυτό το λόγο ολόκληρη η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση DNA από BACs είναι η ακόλουθη:

- Εμβολιασμός μοναδικών αποικιών σε 2 ml θρεπτικό μέσο LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες υπό ανάδευση.
- Την επομένη, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 12.000rpm για 2 min.
- Το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 300 μl διαλύματος P1 (από το QIAGEN DNA Midi-preparation kit).
- Προστίθενται 300 μl διαλύματος P2 (QIAGEN) και το δείγμα αναδεύεται (4-6 φορές). Ακολουθεί επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προστίθενται 300 μl διαλύματος P3 (QIAGEN) και το δείγμα αναδεύεται πάρα πολύ προσεχτικά. Ακολουθεί επώαση για 5-10 min στον πάγο.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10 min στους 4°C.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο erpendorf και προστίθενται 750 μl ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάδευση για κατακρήμνιση του DNA και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 15 min στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 1 ml 70% αιθανόλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 5 min.
- Απομακρύνουμε την αιθανόλη με επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος του DNA με 30 μl ddH₂O ή 30 μl διαλύματος TE.

2.6 Έλεγχος με PCR των ανασυνδυασμένων BAC κλώνων

Η επιλογή των BAC κλώνων -τόσο του bMQ-427A5, όσο και του RP 23-237P18- που προσέλαβαν με ομόλογο ανασυνδυασμό την κασέτα '2A-tTA-PGK-neo-pA-term' και 'tTA-PGK-neo-pA-term' αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε με PCR με το ίδιο ζεύγος primers. Το ζεύγος των primers που χρησιμοποιήθηκε είναι το FRW REC και REV REC. Ειδικότερα, ο FRW primer αντιστοιχεί στην περιοχή του 2^ο εξωνίου της myosrygn (στους BAC κλώνους) και ο REV αντιστοιχεί στην περιοχή του neo. Το αναμενόμενο προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος 3.555 bp.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθεται το ζεύγος των primers που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR.

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	FRW REC	5'-CCTGTTTCATCTCATGTCTGAGG-3'
2.	REV REC	5'-CAGAGCACGTCTACCTGTCTCG-3'

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται ως εξής:

Template (DNA από BAC)	x μl
10x Buffer	5 μl
MgSO ₄ (25 mM)	3 μl
dNTPs (2 mM each)	5 μl
Primer FRW (10μM)	1,5 μl
Primer REV (10μM)	1,5 μl
KOD Hot Start DNA polymerase (1U/μl)	1 μl
ddH ₂ O	x μl
Total vol	50 μl

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μl. Το πρόγραμμα της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε έχει τα ακόλουθα βήματα:

1. 95°C για 2 min
2. 95°C για 30 sec
3. 60°C για 25 sec
4. 72°C για 3.5 min
5. go to step 2 for 30 cycles
6. 72°C για 10 min
7. 4°C για 10 min

3. Ομόλογος ανασυνδυασμός σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells/ESCs)

3.1 Εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts/MEFs)

Οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού χρησιμοποιούνται ως τροφοδοτικά κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με σκοπό αυτά να παραμένουν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Συνοπτικά, ξεπαγώνουμε τους εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού, εγκαθιδρύουμε την καλλιέργειά τους και στη συνέχεια, επωάζουμε με μιτομυκίνη C (mitomycin C) για 3 h, με σκοπό να καταστείλουμε τον πολλαπλασιασμό τους. Τέλος, οι τροφοδοτικοί πλέον ινοβλάστες μεταφέρονται σε πιάτα που έχουν προηγουμένως επωαστεί με gelatin 0,1x, καθώς αυτά είναι κατάλληλα για την καλλιέργεια των εμβρυϊκών κυττάρων.

Διαλύματα

1. Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας MEFs: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco), 10% FBS (Gibco) και 1% penicillin/streptomycin (Gibco)
2. PBS 1x (Gibco)
3. Trypsin (Gibco)
4. Mitomycin C (10 µg/mL)
5. Gelatin 0.1% (w/v) (Sigma)

3.2 Καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (inner cell mass/ICM) της βλαστοκύστης. Έχουν την ιδιότητα να διατηρούν την πλειοδυναμία τους και να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα, παραμένοντας αδιαφοροποίητα όταν καλλιεργούνται πάνω σε τροφοδοτικό στρώμα κυττάρων (εμβρυϊκοί ινοβλάστες/ embryonic fibroblasts). Όπως είναι ευρέως γνωστό τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων τόσο in vitro, όσο και in vivo.

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν 129/SV W4 ESCs ποντικού σταδίου 13 (passage 13), το οποίο θεωρείται ασφαλές στάδιο, για τα έχουν τα κύτταρα αυτά φυσιολογικό καρυότυπο.

Θρεπτικά μέσα-Διαλύματα

1. Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ESCs: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco), 15% FBS (Hyclone), 1% L-glutamine (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 1% nucleosides (Embryomax Millipore), 1% non essentials amino acids (Gibco), 0,2% leukemia inhibitory factor (LIF) (Gibco) και 0,1mM 2-mercaptoethanol (Gibco)
2. Phosphate buffered saline (PBS) 1x (Gibco)
3. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) 1x (Gibco)
4. Trypsin (Gibco)
5. Gelatin 0.1% (w/v) (Sigma)

Πειραματική πορεία

- Ξεπάγωμα ESCs κυττάρων και επίστρωσή τους σε πιάτα καλλιέργειας μεγέθους 6 cm με τροφοδοτικά κύτταρα MEFs.
- Αλλαγή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας των ESCs κυττάρων έπειτα από 24 h.
- Έπειτα από 48 h καλλιέργειας των ESCs κυττάρων πραγματοποιείται η δεύτερη αλλαγή θρεπτικού μέσου και παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν φτάσει σε κορεσμό.
- Πραγματοποιείται αραίωση των κυττάρων με χρήση τρυψίνης και επίστρωσή τους σε πιάτα καλλιέργειας μεγέθους 10 cm με τροφοδοτικά κύτταρα MEFs (passage of ESCs).
- Αλλαγή του θρεπτικού μέσου στα ESCs κύτταρα έπειτα από 24 h.

3.3 Ηλεκτρομετασχηματισμός και επιλογή ES κυττάρων

Πειραματική πορεία

- Αλλαγή του θρεπτικού μέσου στα ESCs κύτταρα 3 h πριν τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης.
- Ο φορέας στόχευσης που θα χρησιμοποιηθεί για τον ομόλογο ανασυνδυασμό στο γονιδιακό τόπο της *myospryn*, έχει γίνει γραμμικός και στη συνέχεια κατακρημνίστηκε με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Χρησιμοποιήθηκαν 30 μg φορέα (συγκέντρωση φορέα 1 μg/μl), τα οποία επαναδιαλύθηκαν σε 770 μl DPBS 1x.

- Τα κύτταρα υφίστανται κατεργασία με τρυψίνη για να αποκολληθούν, φυγοκεντρώνονται στις 1.650rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνται στα 800 μl DPBS 1x που περιέχουν το φορέα στόχευσης.
- Μεταφέρουμε το εναιώρημα ESCs κυττάρων και του φορέα στόχευσης σε παγωμένη κυψελίδα (0,4 cm electrode gap microcuvettes BIORAD).
- Ο ηλεκτρομετασχηματισμός πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή της εταιρίας BIORAD (BIORAD Gene Pulser) στις εξής συνθήκες: 400Volt και 25μF.
- Ακολούθως, μετά την διαβίβαση του ηλεκτρικού παλμού, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα 50 ml falcon σωλήνα, ο οποίος περιέχει 30 ml θρεπτικού μέσου για ES και επιστρώνονται σε 3x10 cm πιάτα που φέρουν τροφοδοτικά MEFs κύτταρα.
- Αλλαγή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας των ESCs κυττάρων έπειτα από μεσολάβηση 24 h από τον ηλεκτρομετασχηματισμό των κυττάρων και στη συνέχεια, καθημερινά ή και δύο φορές την ημέρα αν το κρίνουμε απαραίτητο.
- Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται και η επιλογή υπέρ της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό geneticin G418. Η συγκέντρωση του G418 στο θρεπτικό μέσο κυμαίνεται μεταξύ 150-250 μg/ml για την αποτελεσματική εξάλειψη κλώνων, οι οποίοι δεν φέρουν το γονίδιο neoR.
- Την 4^η ημέρα επιλογής με G418 ξεκινάνε να πεθαίνουν τα κύτταρα και ειδικότερα, την 5^η ημέρα επιλογής παρατηρείται μαζικός θάνατος.
- Συνεχίζουμε την επιλογή με G418 και την 8^η ημέρα επιλογής παρατηρούμε ωραίες αποικίες ανθεκτικές στο G418.
- Την 8^η ημέρα επιλέγουμε μεμονωμένες αποικίες κάτω από στερεοσκόπιο, οι οποίες μεταφέρονται σε πιάτο καλλιέργειας με 96 πηγάδια.
- Την 10^η ημέρα επιλέγουμε μεμονωμένες αποικίες κάτω από στερεοσκόπιο, οι οποίες μεταφέρονται σε πιάτο καλλιέργειας με 96 πηγάδια.
- Ανανεώνουμε το θρεπτικό μέσο καθημερινά και όταν οι καλλιέργειες φτάσουν σε βαθμό κορεσμού (έπειτα από 4-5 ημέρες), τα κύτταρα τρυψινοποιούνται και το 65% κάθε πηγαδιού παγώνεται σε θρεπτικό μέσο για ES εμπλουτισμένο με 80% FBS ορό (Hyclone) και 20% DMSO, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιείται για την απομόνωση γενωμικού DNA.

Θρεπτικά μέσα-Διαλύματα

1. Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ESCs: βλέπε παραπάνω
2. Fetal bovine serum (Hyclone)
3. PBS 1x (Gibco)
4. DPBS 1x (Gibco)
5. Trypsin (Gibco)
6. Gelatin 0.1% (w/v) (Sigma)
7. Αντιβιοτικό geneticin G418 (200mg/ml)
8. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από ES κύτταρα

Πειραματική πορεία

- Απομακρύνουμε το θρεπτικό μέσο των ES κυττάρων και ξεπλένουμε 3 φορές με 1x PBS.
- Προσθέτουμε 50 μ l πρωτεΐνάσης K σε διάλυμα πέψης (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8 και 1% SDS) στα ES κύτταρα, τυλίγουμε με μεμβράνη το πιάτο καλλιέργειας 96 πηγαδιών και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 55 °C.
- Την επόμενη μέρα προσθέτουμε 100 μ l NaCl/EtOH σταγόνα-σταγόνα.
- Επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναποδογυρίζουμε ήπια το πιάτο πάνω σε χειροπετσέτα.
- Ξεπλένουμε 3 φορές με 150 μ l 70% αιθανόλης και κάθε φορά απομακρύνουμε την αιθανόλη αναποδογυρίζοντας ήπια το πιάτο πάνω σε χειροπετσέτα.
- Ακολουθεί επώαση στους 56°C για 6 min και επαναδιαλύουμε το DNA σε 60 μ l 0,1x TE.
- Τοποθετούμε το πιάτο για ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 4°C.

3.5 Ενέσεις ES κυττάρων σε βλαστοκύστες και δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών

Τα γενετικά τροποποιημένα ES κύτταρα 129/SV καλλιεργούνται σε βαθμό κορεσμού 70-80%, υφίστανται κατεργασία με τρυψίνη για 10 min στους 37°C, επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο ES κυττάρων και επιστρώνονται σε νέο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας με σκοπό την απομάκρυνση των τροφοδοτικών κυττάρων. Συλλέγουμε τα κύτταρα πολύ προσεκτικά και τα επαναδιαλύουμε σε θρεπτικό μέσο για ενέσεις (injection medium). Βλαστοκύστες που βρίσκονται κατά την 3.5 ημέρα ανάπτυξης συλλέγονται από C57Bl/6 θηλυκά ποντίκια και διατηρούνται σε ειδικό θρεπτικό μέσο για βλαστοκύστες (blastocyst medium). 10-15 ES κύτταρα ενύονται σε κάθε μία βλαστοκύστη και 10-12 βλαστοκύστες μεταφέρονται στη μήτρα κάθε ανάδοχης μητέρας. Χιμαιρικά αρσενικά ποντίκια που προκύπτουν με αυτόν τον τρόπο διασταυρώνονται με 129/SV θηλυκά ποντίκια και η επιτυχής διαβίβαση στη γαμετική σειρά της γενετικής τροποποίησης διαπιστώνεται από το χρώμα τριχώματος των απογόνων. Οι ενέσεις των ES πραγματοποιήθηκαν από την Ζωή Κανάκη.

4. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών (founders)

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών πραγματοποιήθηκε μικροένεση στους πυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων του στελέχους C57/BL6, με διάλυμα που περιείχε απομονωμένο DNA, σύμφωνα με τις συνήθειες μεθόδους και όπως αναφέρεται από τον Gordon JW και συνεργάτες (Gordon JW et al. 1980). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

Πειραματική πορεία

- Σε θηλυκά ποντίκια ενέθηκαν ορμόνες για την επαγωγή της ωορρηξίας [Pregnant Mare's Serum (PMS), τρεις μέρες πριν τη γοναδοτρόπο ορμόνη human Chorionic Gonadotropin (hCG)].
- Ακολούθησε διασταύρωση με αρσενικά και 24 h αργότερα απομονώθηκαν οι ωοθήκες.
- Τα ωάρια απομονώθηκαν με τη χρήση του ενζύμου υαλουροδινάση και διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θρεπτικό μέσο M2 (Sigma), μέχρι τη μικροένεση.

- Σε γονιμοποιημένα ωάρια μικροενέθηκε το απογονωμένο διαγονιδιακό DNA και στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε ανάδοχες μητέρες του στελέχους CD1.
- Για τη δημιουργία των ανάδοχων μητέρων, ακολουθήθηκε η ορμονική προετοιμασία που προαναφέρθηκε, με τη διαφορά ότι τα θηλυκά ποντίκια διασταυρώθηκαν με ευνουχισμένα αρσενικά.
- Από τους απογόνους των ανάδοχων μητέρων αποκτήσαμε ιδρυτές (founders), οι οποίοι μετέδιδαν το γονίδιο στους απογόνους τους με Μεντελιανή κληρονομικότητα.

Η πιστοποίηση των διαγονιδιακών ιδρυτών, πραγματοποιήθηκε ύστερα από απομόνωση γονιδιωματικού DNA και ανάλυση κατά Southern, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Οι διαγονιδιακοί ιδρυτές διασταυρώθηκαν με 129SV ποντίκια, προκειμένου με την πάροδο του χρόνου και τις συνεχόμενες διασταυρώσεις, να αποκτήσουν καθαρό γενετικό υπόβαθρο 129SV.

Οι διαδικασίες συντήρησης και φροντίδας των πειραματόζων ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες του οίκου πειραματόζων, ο οποίος ακολουθεί τις προδιαγραφές και συστάσεις των οργανισμών Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) και Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC).

5. Τεχνικές Μοριακής Ανάλυσης

5.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με στόχο την ανάλυσή του με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ταυτοποίηση του γενοτύπου των διαγονιδιακών ποντικών.

Πειραματική πορεία

Για την απομόνωση γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε τμήμα της ουράς του ζώου (1-1,5 cm). Για την διάσπαση του ιστού, οι ουρές επωάζονται για 12-18 ώρες στους 55°C σε 0,5 ml διαλύματος πρωτεΐνάσης K (Sigma-Aldrich) ανά ουρά (200 µg πρωτεΐνάσης K/ ml διαλύματος πέψης 50 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM EDTA pH 8

και 0,5% SDS). Στη συνέχεια, ακολουθεί εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης (pH 7,5), ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 min σε 12.000g. Φυλάσσεται η υδατινή φάση, στην οποία επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με φαινόλη. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 min σε 12.000g. Η υδατινή φάση υποβάλλεται σε δεύτερο καθαρισμό με χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη με τον ίδιο τρόπο. Στην υδατινή φάση που συλλέγεται γίνεται κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M CH₃COONa (3M Sodium acetate) (pH 5,2) και διπλάσιου όγκου κρύας αιθανόλης (EtOH) 100%. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και στη φάση αυτή το DNA γίνεται ορατό με μορφή ινιδίων. Το δείγμα φυγοκεντρείται στους 4°C, για 20 min σε 12.000g. Μετά από αυτό το βήμα, το DNA έχει κατακρημνιστεί, οπότε αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 0,3 ml κρύας αιθανόλης (EtOH) 70%. Το δείγμα φυγοκεντρείται στους 4°C, για 10 min σε 12.000g και το ίζημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου, για να εξατμιστεί όλη η ποσότητα της αιθανόλης. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100 μl ddH₂O και φυλάσσεται στους 4°C. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

Συγκέντρωση DNA = O.A 260nm x 50 x συντελεστής αραίωσης

Η συγκέντρωση δίνεται σε ng/μl. Ο συντελεστής 50 εξάγεται από την παρατήρηση ότι ένα διάλυμα DNA, συγκέντρωσης 50 ng/μl, έχει απορρόφηση 1 στα 260nm.

5.2 Ανάλυση DNA

Για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση DNA μορίων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Μόρια DNA, μεγέθους 200 bp - 50 kb, μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όταν το πήκτωμα βρίσκεται σε ηλεκτρικό πεδίο, το DNA, το οποίο σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο, κινείται προς την άνοδο με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογάριθμου (log₁₀) του μοριακού βάρους του. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA σε πηκτώμα αγαρόζης εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα.

Υλικά - Διαλύματα

1. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x TAE): 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA.
2. Διάλυμα δείγματος 6x: 0.25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0.25% (w/v) κυανού του ξυλολίου (xylene cyanol), 15% φικόλλη σε H₂O
3. Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide)

Πειραματική πορεία

Σε 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης διαλύεται με θέρμανση στους 100°C η αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης. Στη συνέχεια, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml και το διάλυμα στερεοποιείται σε υποδοχέα-μήτρα. Στα δείγματα του DNA προστίθεται διάλυμα δειγμάτων και αναλύονται σε οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση 45-70V.

5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται συνήθως για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, η οποία βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Στην αντίδραση χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών (primers), ως εναρκτήρια μόρια για μια σειρά από συνθετικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από μια DNA πολυμεράση. Στην παρούσα μελέτη, ανάλογα την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση (Invitrogen, Cat. No.11615-010), η Taq πολυμεράση (Qiagen, Cat. No. 201203) και η KOD Hot Start DNA polymerase (Novagen, Cat. No.71086). Η κάθε εναρκτήρια αλληλουχία είναι συμπληρωματική με μια διαφορετική αλυσίδα της μήτρας DNA. Αρχικά, πραγματοποιείται ενεργοποίηση του ενζύμου και στη συνέχεια, αποδιατάσσεται το DNA με θέρμανση. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται στη θερμοκρασία επανασύνδεσης, η οποία επιτρέπει την υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες. Τέλος, πραγματοποιείται επιμήκυνση των αναδιαταγμένων εκκινητών από την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος της αποδιάταξης, επανασύνδεσης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους. Το προϊόν της αντίδρασης στο τέλος η κύκλων είναι δυνατόν να περιέχει θεωρητικά 2ⁿ μόρια

DNA, τα οποία είναι αντίγραφα της αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του γενοτύπου των *myosprgn* knock out και TIGRE διαγονιδιακών ποντικών. Ο έλεγχος γίνεται με απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα προς εξέταση ποντίκια, με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Κατόπιν, πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι εκκινητές για να πιστοποιήσουν την έλλειψη της *myosprgn* και την παρουσία του tetO-*myosprgn* διαγονιδίου.

Οι εκκινητές για κάθε διαγονίδιο που ελέγχθηκε σχεδιάστηκαν και δοκιμάστηκαν για την πιστότητά τους. Οι συνθήκες αντίδρασης σχεδιάστηκαν ειδικά για κάθε γενότυπο και η μεθοδολογία βελτιστοποιήθηκε για τις συνθήκες κάθε αντίδρασης ξεχωριστά. Παρατίθενται τα ζεύγη primers που σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγραμμάτος PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (v. 0.4.0) και χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR.

Οι εκκινητές για να πιστοποιήσουν την έλλειψη της *myosprgn*:

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	SCR 3ARM FRW 2	5'-cgagaccaggccaataagag-3'
2.	SCR CST REV 4	5'-ACCTTCGATTCCGACCTCAT-3'
3.	SCR EX2 OM REV 4	5'-GGAGGCGTATTTGATGCAGT-3'

Να σημειωθεί ότι από την αντίδραση με εκκινητές το ζεύγος SCR 3ARM FRW 2 και SCR EX2 OM REV 4, προκύπτει προϊόν PCR μεγέθους 910 bp (wt), ενώ από το ζεύγος SCR 3ARM FRW 2 και SCR CST REV 4 προκύπτει προϊόν PCR μεγέθους 589 bp (targeted).

Οι εκκινητές για να πιστοποιήσουν την παρουσία του tetO-*myosprgn* διαγονιδίου:

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	pGlnZ 3035 FRW	5'-GACAGCACAACAACCAGCAC-3'
2.	Myosp 10749 FRW	5'-tgcagacagcactctcctga-3'
3.	M5 REV	5'-AAGCCTTCCTGTTGCACATC-3'
4.	pGlnZ 6973 REV	5'-TGAAAGTCGAGCTCGGTACC-3'

Να σημειωθεί ότι από την αντίδραση με εκκινητές το ζεύγος pGlnZ 3035 FRW και Myosp 10749 FRW, προκύπτει προϊόν PCR μεγέθους 1.129bp, ενώ από το ζεύγος M5 REV και pGlnZ 6973 REV προκύπτει προϊόν PCR μεγέθους 1.409bp.

Η αντίδραση της PCR για την πιστοποίηση της έλλειψη της myospryn είναι η ακόλουθη:

DNA	1 μ l
5x Buffer	5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3,5 μ l
dNTPs (25mM)	0,4 μ l
Primer FRW (10 μ M)	2 μ l
Primer REV (10 μ M)	1,5 μ l
Primer REV (10 μ M)	1,5 μ l
Q buffer	10 μ l
Taq (home made)	0,4 μ l
ddH ₂ O	24,7 μ l
Total vol	50 μ l

Το πρόγραμμα της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των ποντικών με έλλειψη της myospryn έχει τα ακόλουθα βήματα:

1. 94°C για 5 min
2. 94°C για 1 min
3. 58,5°C για 40 sec
4. 72°C για 1 min
5. go to step 2 for 30 cycles
6. 72°C για 10 min
7. 4°C για 10 min

Η αντίδραση της PCR για την πιστοποίηση της παρουσίας του tetO-myospryn διαγονιδίου είναι η ακόλουθη:

DNA	1 μ l
5x Buffer	5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3,5 μ l
dNTPs (25mM)	0,4 μ l
Primer FRW (10mM)	1,5 μ l
Primer REV (10mM)	1,5 μ l
Q buffer	10 μ l
Taq (home made)	0,4 μ l
ddH ₂ O	26,7 μ l
Total vol	50 μ l

Το πρόγραμμα της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των tetO-mysprgn διαγονιδιακών ποντικών έχει τα ακόλουθα βήματα:

1. 94°C για 5 min
2. 94°C για 1 min
3. 58°C για 40 sec
4. 72°C για 1 min
5. go to step 2 for 30 cycles
6. 72°C για 10 min
7. 4°C για 10 min

5.4 Ανάλυση κατά Southern

Προκειμένου να πιστοποιηθούν τα ποντίκια με έλλειψη της mysprgn, καθώς και οι θετικοί για το διαγονίδιο ιδρυτές, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern. Ως ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε τμήμα της αλληλουχίας του 1^{ου} εσωνίου της mysprgn, μεγέθους 502 bp. Ο υβριδισμός αυτής της ζώνης με γονιδιωματικό DNA, το οποίο έχει κοπεί με το ένζυμο περιορισμού BglIII, αποδίδει μια ζώνη 5,1 kb από τη mysprgn αγρίου τύπου και μια μεγαλύτερη ζώνη 9,1 kb, από το αλληλόμορφο με τη διακεκομμένη mysprgn. Για την ανάλυση, πραγματοποιήθηκε πέψη περίπου 10 µg γονιδιωματικού DNA με το ένζυμο BglIII (New England Biolabs, Cat. No. R0144S). Προστίθενται 20 μονάδες ενζύμου (ή 2 µl) περιορισμού BglIII (10.000units/ml) στα δείγματα και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 37°C σε διάλυμα που περιέχει σπερμιδίνη σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Τα προϊόντα της πέψης διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% στα 80 volts για περίπου 5 h. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα επωάζεται με διάλυμα αποδιάταξης HCl για 20 min. Ακολούθως, το πήκτωμα ξεπλένεται με dH₂O και επωάζεται με το διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH για 20 min. Ακολουθεί μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Hybond-N+, Amersham: RNP303B) με τη βοήθεια της τριχοειδούς διάχυσης. Η μεμβράνη που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά, αρχικά διαβρέχεται με dH₂O και στη συνέχεια, επωάζεται για μερικά λεπτά στο διάλυμα εξουδετέρωσης. Το πήκτωμα ετοιμάζεται για τη διαδικασία της μεταφοράς και έτσι αυτό τοποθετείται ανάποδα σε μια επίπεδη επιφάνεια. Πάνω από το πήκτωμα τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και πάνω από αυτή 3 κομμάτια χαρτί whatman. Έπειτα, τοποθετούνται απορροφητικά

χαρτιά ύψους περίπου 10 cm και στη συνέχεια, ένα μεγάλο βιβλίο, ώστε να διασφαλίζεται η επαφή πηκτώματος-μεμβράνης. Η μεταφορά πραγματοποιείται για τουλάχιστον 16-18 ώρες. Το DNA προσδένεται σταθερά στη μεμβράνη ύστερα από διπλή έκθεση σε υπεριώδες φως στα 1200 J (UV Crosslinker) και επώαση στους 80°C για 15 min. Η μεμβράνη φυλάσσεται σε RT μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Διαλύματα

1. Διάλυμα αποδιάταξης HCl 0,25M
2. Διάλυμα εξουδετέρωσης NaOH 0,4M

5.5 Σήμανση DNA με τη χρήση τυχαίων εναρκτήριων αλληλουχιών (random priming)

Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξανουκλεοτίδια ως εναρκτήριες αλληλουχίες και ραδιοσημασμένο ATP, με αποτέλεσμα να προκύπτει από την αντίδραση πολυμερισμού ραδιοσημασμένο DNA με ενεργότητα $4 \times 10^7 - 4 \times 10^8$ cpm/μg. Για τη σήμανση του ιχνηθέτη με ραδιενεργό $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Prime-a-gene Labeling system της εταιρείας Promega (U 1100).

Το DNA (25 ng) αποδιατάσσεται στους 100°C για 10 min και στη συνέχεια, φυλάσσεται στον πάγο. Στο αποδιατεταγμένο DNA προστίθενται διαδοχικά: 10μl ρυθμιστικού διαλύματος σήμανσης 5x, 2 μl μείγματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων, 1 μl αλβουμίνη από ορό βοός, 2 μl $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ και 1 μl της DNA πολυμεράσης I (θραύσμα Klenow). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται στα 20 μl με ddH₂O. Το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 1 h. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στον πάγο και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 1 μl διαλύματος EDTA 0,5 M pH 8.0. Ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης καθарίστηκε από το μη σημασμένο με τη χρήση στηλών χρωματογραφίας Sephadex G-50 (Roche, Cat. No. #11 273 973 001).

Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα σήμανσης 5x
2. Μείγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP)
3. Αλβουμίνη από ορό βοός
4. $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ 3000 Ci/mMol
5. DNA πολυμεράση I (θραύσμα Klenow)

Τα παραπάνω υλικά περιέχονται στο σύστημα σήμανσης, Prime-a-gene Labeling system της εταιρείας Promega (Cat. No. #U1100).

Το α -³²P-dCTP προέρχεται από την εταιρεία Amersham.

6. Διάλυμα υβριδοποίησης: 5x SSC, 10% PEG 8000, 5% Poly Sodium 4-Styrene-Sulfonate, 0,2% Hexadecylpyridinium Chloride Monohydrate
7. Σπέρμα σολωμού (10 mg/ml) (Salmon sperm/ssDNA)
8. Διάλυμα 2x SSC
9. Διάλυμα 1^{ης} πλύσης 2X SSC + 0,1% SDS
10. Διάλυμα 2^{ης} πλύσης 0,2X SSC + 0,1% SDS

Ταυτόχρονα με τη διαδικασία της ραδιενεργής σήμανσης πραγματοποιείται και η διαδικασία της προ-υβριδοποίησης. Πριν τη διαδικασία της προ-υβριδοποίησης, η μεμβράνη ξεπλένεται με 2x SCC και στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση με το διάλυμα υβριδοποίησης και ssDNA χωρίς την προσθήκη του ραδιενεργού ιχνηθέτη στους 65°C για 1-2 h. Στη συνέχεια, προστέθηκε ο ραδιενεργός ιχνηθέτης και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 65°C. Την επόμενη μέρα ακολουθεί πλύση των μεμβρανών, αρχικά, με το διάλυμα 1^{ης} πλύσης 2X SSC + 0,1% SDS στους 65°C για 20-30 min και στη συνέχεια, με το διάλυμα 2^{ης} πλύσης 0,2X SSC + 0,1% SDS στους 65°C για 20-30 min. Οι σημασμένες μεμβράνες μετά το πέρας των πλύσεων αφήνονται να στεγνώσουν για λίγο και τοποθετούνται σε διαφανή μεμβράνη Saran Wrap. Η ανίχνευση του σήματος έγινε με έκθεση σε X-ray φιλμ (αυτοραδιογραφία) στους -80°C για διάστημα από λίγες ώρες-λίγες μέρες, με τη βοήθεια ειδικών ενισχυτικών (intensifying screens).

Ακολουθεί πίνακας με το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του ιχνηθέτη (Southern probe) εκτός των περιοχών ομολογίας της *myosp^{ry}* για την γονοτύπηση των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών. Ο ιχνηθέτης έχει μέγεθος 502 bp.

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	INTR1SCR 1 FRW	5'-gtagaatggtcccagcaaacac-3'
2.	INTR1SCR 1 REV	5'-ttcgaatctgtgagcctgtg-3'

Ακολουθεί πίνακας με το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του ιχνηθέτη (Tigre probe A) για την γονοτύπηση των Tigre διαγονιδιακών ποντικών. Ο ιχνηθέτης έχει μέγεθος 1.129 bp.

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	pGlnZ 3035 FRW	5'-GACAGCACAACAACCAGCAC-3'
2.	Mycop 10749 FRW	5'-tgcagacagcactctcctga-3'

5.6 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε με το σύστημα TRIZOL (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες που περιγράφονται στο αντίστοιχο εγχειρίδιο.

Πειραματική πορεία

- Οι καρδιές απομονώθηκαν από ζώα διαφόρων ηλικιών, τεμαχίστηκαν σε αποστειρωμένο και παγωμένο 1x PBS και μεταφέρθηκαν σε ομογενοποιητή.
- Ακολουθεί ομογενοποίηση του ιστού με διάλυμα TRIZOL (Invitrogen, Cat. No. #11596-026). Προσθέτουμε 500 μl διαλύματος TRIZOL ανά καρδιά.
- Ακολούθησε η ομογενοποίηση του ιστού με μηχανικό πολυτρονικό ομογενοποιητή.
- Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 10 min στους 4°C.
- Στο υπερκείμενο προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης και γλυκογόνου και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 14.000rpm για 10 min στους 4°C.
- Το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και αναδιαλύθηκε σε ddH₂O.
- Ακολούθησε κατεργασία με DNAση I (Roche, Cat. No. #03539121103) για 20 min στους 37°C, διπλή έκπλυση με χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη στους -20°C.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000rpm για 20 min στους 4°C και το RNA επαναδιαλύθηκε σε ddH₂O, χωρίς την παρουσία RNAσών.

5.7 Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Invitrogen Moloney Murine Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Cat. No. 28025, Invitrogen) και πραγματοποιήθηκε η αντίδραση σύμφωνα με τις οδηγίες που περιγράφονται στο αντίστοιχο εγχειρίδιο.

Πειραματική πορεία

- Σ' ένα σωληνάριο τύπου eppendorf αναμιγνύονται τα ακόλουθα:

Random primers		50-250 ng
RNA		1 ng-5 µg total RNA 1-500 ng mRNA
dNTPs mix	10 mM each	1 µl
ddH ₂ O		μέχρι 12 µl

- Η αντίδραση θερμαίνεται στους 65°C για 5 min και διατηρείται στον πάγο.

Ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντρηση και προστίθενται τα ακόλουθα:

5x First-Strand Buffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNAse out Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/ µl)	1 µl

- Το διάλυμα αναδεύεται ήπια και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 min. Τέλος, προστίθενται:

M-MLV RT (200 units)	1 µl
----------------------	------

- Επώαση στους 25°C για 10 min.
- Επώαση στους 37°C για 50 min.
- Απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 70°C για 15 min.
- Διατήρηση στους - 20°C.

Η συγκέντρωση του cDNA που παράχθηκε μετρήθηκε με το σύστημα Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. 10606433), σύμφωνα με τις οδηγίες που περιγράφονται στο αντίστοιχο εγχειρίδιο. Εν συντομία, 1 µl cDNA αραιώνεται σε 200 µl του διαλύματος Qubit dsDNA HS και προστίθενται 1 µl χρωστικής Qubit dsDNA HS Reagent. Η μέτρηση της συγκέντρωσης γίνεται με το QubitTM fluorometer (Invitrogen). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα ανάλυσης “Nanodrop” (Thermo Fisher Scientific Inc).

5.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR, Q-PCR/quantitative PCR)

Η Real Time PCR είναι μια *in vitro* μέθοδος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων αλληλουχιών RNA που επιτρέπει την εκτίμηση της ποσότητας συγκεκριμένου RNA στο δείγμα που εξετάζεται. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρησιμοποίηση μιας φθορίζουσας χρωστικής (SYBR Green) που δεσμεύεται ειδικά στο δίκλωνο DNA και συνδυάζει ταυτόχρονα τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση της αλληλουχίας-στόχου του RNA, επιτρέποντας την παρακολούθηση του προϊόντος της PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι μετρήσεις της έντασης του φθορισμού πραγματοποιούνται στο τέλος κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού της PCR για να παρακολουθείται η αυξανόμενη ποσότητα του πολλαπλασιαζόμενου DNA.

Η ειδικότητα της Real Time PCR πιστοποιείται από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης του προϊόντος της PCR. Αφού η αντίδραση ολοκληρωθεί, η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά και στο σημείο που το προϊόν της αντίδρασης αποδιαταχθεί (T_m), ο φθορισμός παύει να ανιχνεύεται. Η συνάρτηση του φθορισμού με τη θερμοκρασία, απεικονίζει τη καμπύλη αποδιάταξης του προϊόντος. Επειδή το T_m είναι ειδικό για κάθε αλληλουχία και εξαρτάται τόσο από το μέγεθός της, όσο και από τη σύστασή της, οποιοσδήποτε φθορισμός κάποιου μη ειδικού προϊόντος της αντίδρασης PCR θα ανιχνευτεί στην καμπύλη αποδιάταξης σε άλλη θερμοκρασία.

Η σχεδίαση των εκκινήτων των προς μελέτη γονιδίων έγινε χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες του mRNA από το National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) και το λογισμικό PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (v. 0.4.0). Οι εκκινήτες σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε το προϊόν της PCR να είναι αποτέλεσμα σύνδεσης δύο εξωνίων και να έχει μέγεθος μεταξύ 90 και 120 βάσεων, για να επαλείφεται ο πολλαπλασιασμός του μη επιθυμητού DNA, καθιστώντας την αντίδραση πιο αποτελεσματική.

Η ποσοτικοποίηση του mRNA των γονιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη SYBR Green I χρωστική στο Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG Invitrogen (Cat. No. 11733), σύμφωνα με τις οδηγίες του αντίστοιχου εγχειριδίου. Επιπλέον, μια καμπύλη αναφοράς της β-ακτίνης πραγματοποιήθηκε για κάθε πείραμα προκειμένου να ομαλοποιηθούν τα αποτελέσματα. Η κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε 3 επαναλήψεις στον θερμοκυκλοποιητή Roche LightCycler 480 (Roche) σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες:

- Κύκλος 1: (1x) βήμα 1: 50°C για 2 λεπτά
- Κύκλος 2: (1x) βήμα 1: 95°C για 10 λεπτά
- Κύκλος 3 (40x) βήμα 1: 95°C για 15 δευτερόλεπτα,
βήμα 2: 60°C για 1 λεπτό.

Οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων, είναι οι εξής:

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	Myosp 10749 FRW	5'-TGCAGACAGCACTCTCCTGA-3'
2.	Myosp 10889 REV	5'-CTGTTCACTCGTCCCAGAGG-3'
3.	Des-RT-PCR2 FRW	5'-GTGAAGATGGCCTTGGATGT-3'
4.	Des-RT-PCR2 REV	5'-TGGACTTCAGAACCCCTTTG-3'
5.	RTACTF	5'-TGGCTCCTAGCACCATGA-3'
6.	RTACTR	5'-CCACCGATCCACA CAGAG-3'

Οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση έκφρασης των β1 και β2 αδρενεργικών υποδοχέων καθώς και της myosrygn, είναι οι εξής:

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	FRW B1a	5'-TGGCTTACTGGCTTGTCTTG-3'
2.	REV B1a	5'-TTTCCACTCGGGTCCTTG-3'
3.	FRW B1b	5'-atctggtcatgggattgctg-3'
4.	REV B1b	5'-aagtcagagctcgcagaag-3'
5.	FRW B2a	5'-GGACAACCTCATCCCTAA-3'
6.	REV B2a	5'-AGAGTAGCCGTTCCATA-3'
7.	FRW B2b	5'-acttctggtgagttctgg-3'
8.	REV B2b	5'-agcaacatagcgatccactg-3'
9.	M5FRW	5'-TGCAGTCAGACGGAGAACAC-3'
10.	RTP 1 REV	5'-tcgtctgcacccatccta-3'

Τέλος, οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση έκφρασης των PGC1a και PGC1b γονιδίων, είναι οι εξής:

	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5' - 3'
1.	PGC1a FRW	5'-CCCTGCCATTGTTAAGACC-3'
2.	PGC1a REV	5'-TGCTGCTGTTCTGTTTTC-3'

3.	PGC1b FRW	5'-TCCTGTAAAAGCCCGGAGTAT-3'
4.	PGC1b REV	5'-GCTCTGGTAGGGGCAGTGA-3'

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με χρήση των λογισμικών των θερμοκυκλοποιητών και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο της συγκριτικής διαφοράς κύκλων (comparative CT) για τη σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, όπως έχει περιγραφεί (Pfaffl MW, 2001).

6. Ανοσοαποτύπωση

6.1 Απομόνωση πρωτεϊνών

Προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία των προς μελέτη πρωτεϊνών σε ολικά ακατέργαστα εκχυλίσματα από καρδιακό ιστό από ποντίκια wt, myosp^{-/-} και des^{-/-}, οι ιστοί αρχικά ομογενοποιήθηκαν με τον τρόπο που αναλύεται στη συνέχεια.

Υλικά - Διαλύματα

1. Διάλυμα ομογενοποίησης-RIPA buffer: 0,5% DOC, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1% SDS
2. Διάλυμα αναστολέων πρωτεϊνών (proteinase inhibitor, Sigma, Cat. No. P8340)

Πειραματική πορεία

- Μετά από τη θυσία, οι ιστοί τοποθετούνται σε σωληνάρια τύπου eppendorf και βυθίζονται σε υγρό άζωτο για να πραγματοποιηθεί άμεση ψύξη. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στους -80°C όπου και φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα.
- Ο ιστός μεταφέρεται από τους -80°C σε ιγδίο όπου και λειοτριβείται με τη χρήση υγρού αζώτου.
- Οι ιστοί που έχουν υποστεί λειοτριβήση μεταφέρονται σε ομογενοποιητή glass-TEFLON στον πάγο και ομογενοποιούνται με 500 μl διαλύματος ομογενοποίησης.
- Η ομογενοποίηση συνεχίζεται με τη χρήση υπερήχων (3x10 sec και στο ενδιάμεσο 3x1 min στον πάγο) στις κατάλληλες συνθήκες (cycle 1, amplitude 40) και διατηρώντας το δείγμα αυστηρά στον πάγο.

- Το ομογενοποίημα των ιστών φυγοκεντρείται στους 4°C για 10 min στις 6.500rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται στους 4°C για 10 min στις 12.3000rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf και ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών στο υπερκείμενο με τη μέθοδο Bradford.

6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Με τη μέθοδο Bradford προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα/εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις διάφορες απομονώσεις. Βασική αρχή της μεθόδου αυτής αποτελεί η δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue στα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470 nm στα 595 nm. Σημειώνεται ότι το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μια περίπου ώρα και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Με τη βοήθεια διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών σε ένα εκχύλισμα.

Υλικά - Διαλύματα

1. Αντιδραστήριο Bradford (Sigma, Cat. No. B6916)
2. Πρότυπο διάλυμα BSA

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης μέτρησης συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Προετοιμάζουμε μια σειρά πρωτεϊνικών δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	1	2	3	4	5
Δ/μα Bradford	0.75 ml	0.75 ml	0.75 ml	0.75 ml	0.75 ml	0.75 ml
BSA (10mg/ml)	-	0.5 μ l 0.2 mg/ml	1.25 μ l 0.5 mg/ml	2.5 μ l 1 mg/ml	3.7 μ l 1.5 mg/ml	5 μ l 2 mg/ml

Σε σωληνάκια τύπου erpendorf προστίθεται 0.75 ml αντιδραστήριο Bradford και στη συνέχεια, μια ποσότητα δείγματος προς μέτρηση ή το πρότυπο διάλυμα BSA. Οι σωλήνες αναδεύονται έντονα και μετά από 5-10 min παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου μετράται η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο (η χρωστική μετατρέπεται σε μπλε καθώς δεσμεύει πρωτεΐνη), σε μήκος κύματος 595 nm. Ο μάρτυρας/τυφλό της μέτρησης περιλαμβάνει το αντιδραστήριο Bradford με την προσθήκη μόνο του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των πρωτεϊνών και νερού ίσου όγκου με τον όγκο του δείγματος που μετράται.

6.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

Το ακρυλαμίδιο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων από 3% ως 30%. Το πήκτωμα σχηματίζεται με βινυλ-πολυμερισμό μονομερούς ακρυλαμιδίου που οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Σε αυτές ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια NN-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (bis), τα οποία λόγω της δομής τους μπορούν να ενσωματωθούν σε δύο διαφορετικές αλυσίδες και έτσι να δημιουργηθεί ένα πλέγμα.

Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου γίνεται με μια βάση, τη NNN'N'-τετρα-μεθυλοδιαμίνη (TEMED), για τη δράση της οποίας είναι απαραίτητη η παρουσία υπερθειικών ιόντων ($S_2O_3^{2-}$). Τα υπερθειικά ιόντα ενεργοποιούν το TEMED, προκαλώντας το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, οι οποίες με τη σειρά τους καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.

Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου καθορίζει το μέσο μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς, ενώ η αναλογία του ακρυλαμιδίου προς το μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο καθορίζει την έκταση του σχηματισμού γεφυρών (cross-links). Έτσι, και τα δύο είναι σημαντικά για τον καθορισμό των φυσικών ιδιοτήτων του πηκτώματος, όπως είναι η πυκνότητα, η ελαστικότητα, η μηχανική αντοχή και το μέγεθος των πόρων.

Σημειώνουμε ότι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου δεν είναι πάντα η ίδια σε όλα τα πηκτώματα, αλλά καθορίζεται κάθε φορά από το μέγεθος των πολυπεπτιδίων, τα οποία θέλουμε να διαχωρίσουμε. Για πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου (π.χ. 7-8%), ενώ για το διαχωρισμό πολυπεπτιδίων μικρότερου μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται πηκτώματα μεγαλύτερης συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου (π.χ. 10-12%).

6.4 Ηλεκτροφόρηση με αποδιατακτικούς παράγοντες (SDS PAGE)

Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το ιοντικό απορρυπαντικό θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) και η διθειοθρεϊτόλη (DTT). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4 gr SDS/gr πρωτεΐνης), προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο, το οποίο είναι ανάλογο του μεγέθους τους. Η επιπλέον χρήση αναγωγικών, όπως το DDT ή η β-μερκαπτοαιθανόλη έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, τόσο αυτών που υπάρχουν μέσα στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα, όσο και αυτών που συνδέουν διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες πολυμερών πρωτεϊνών. Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στους 95°C για 10 min. Τελικά, τα πολυπεπτίδια, τα οποία αναλύονται στην SDS-PAGE έχουν αποκτήσει καθαρό αρνητικό φορτίο και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι συνάρτηση του μοριακού βάρους τους.

Υλικά - Διαλύματα

1. 30% Acrylamide/Bis solution, 29:1, Electrophoresis Purity Reagent 500 ml (Biorad Cat. No. 161-0156)
2. Page Ruler Prestained Protein Ladder, (Fermentas Life Science, Cat. No. 5M0679)
3. TEMED (Promega Molecular Biology Grade, Cat. No. V3161)

4. Διάλυμα DTT 1M: 3.09 gr σε 20 ml ddH₂O (Αποστείρωση με διήθηση, αποθήκευση στους -20°C)
5. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5x (Running buffer for SDS PAGE): 15.1 gr Tris base, 94 gr Γλυκίνη, 50 ml SDS 10%, ddH₂O μέχρι 1lt

6.5 Παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού (separation gel)

Παρασκευάζουμε το διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού με βάση τις ποσότητες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα ανάλογα με την % περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο και τον όγκο που χρειαζόμαστε για την κάθε συσκευή ηλεκτροφόρησης (στη συγκεκριμένη περίπτωση 10 ml). Στην προκειμένη περίπτωση, για την μελέτη της myosrygn που είναι μια πρωτεΐνη με μέγεθος 413 kDa, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα διαχωρισμού 7% και της δεσμίνης που είναι μια πρωτεΐνη με μέγεθος 58 kDa, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα διαχωρισμού 12,5%.

	Συστατικά δ/τος	Όγκοι (ml) συστατικών για τελικό όγκο δ/τος		
		10 ml	20 ml	25 ml
10%	d H ₂ O	4	7.9	9.9
	30% ακρυλαμίδιο	3.3	6.7	8.3
	1.5 M Tris - HCl pH 8.8	2.5	5	6.3
	10% SDS	0.1	0.2	0.25
	10% υπερθειικό αμμώνιο (ammomium persulfate)	0.1	0.2	0.25
	TEMED	0.004	0.008	0.01
12%	d H ₂ O	3.3	6.6	8.2
	30% ακρυλαμίδιο	4	8	10
	1.5 M Tris - HCl pH 8.8	2.5	5	6.3
	10% SDS	0.1	0.2	0.25
	10% υπερθειικό αμμώνιο (ammomium persulfate)	0.1	0.2	0.25
	TEMED	0.004	0.008	0.01

Σε όλες τις περιπτώσεις πειραμάτων ανάλυσης πρωτεϊνών SDS PAGE, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ηλεκτροφόρησης BioRad-Mini Protein 3 (Work Set Cat. No. 116EPS3). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία γίνεται ο πολυμερισμός του πηκτώματος διαχωρισμού αποτελείται από τζάμια διαστάσεων 10cm x 8cm x 1.5mm. Στην επιφάνεια του πηκτώματος προστίθεται μικρή ποσότητα H₂O ώστε να μην έρχεται το πήκτωμα σε επαφή με το ατμοσφαιρικό O₂, διότι αναστέλλεται ο πολυμερισμός, καθώς και για να εξασφαλιστεί πως η επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού, μετά τον πολυμερισμό, θα είναι επίπεδη. Ο πολυμερισμός του πηκτώματος διαχωρισμού ολοκληρώνεται σε περίπου 20 min. Αμέσως μετά, ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος επιστοιβαξης (stacking gel) και η τοποθέτηση του πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού.

6.6 Παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβαξης (stacking gel)

Παρασκευάζουμε το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβαξης με βάση τις ποσότητες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα ανάλογα με τον όγκο που χρειαζόμαστε.

	Συστατικά δ/τος	Όγκοι (ml) συστατικών για τελικό όγκο δ/τος		
		4 ml	6 ml	8 ml
5%	d H ₂ O	2.7	4.1	5.5
	30% ακρυλαμίδιο	0.67	1	1.3
	1.5 M Tris – HCl pH 6.8	0.5	0.75	1
	10% SDS	0.04	0.06	0.08
	10% υπερθειικό αμμώνιο (ammomium persulfate)	0.04	0.06	0.08
	TEMED	0.004	0.006	0.008

Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφού αφαιρέσουμε το H₂O. Στην επιφάνεια του πηκτώματος τοποθετείται ειδική πλαστική οδοντωτή μήτρα (χτενάκι), ώστε να σχηματιστούν τα φρεάτια τοποθέτησης των δειγμάτων. Για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος επιστοιβαξης απαιτούνται 20-30 min.

6.7 Προετοιμασία δειγμάτων

Οι πρωτεΐνες αποδιατάχθηκαν με την προσθήκη του αναγωγικού DTT στο διάλυμα protein loading dye (6x) και με βρασμό των δειγμάτων στους 95°C για 10 min. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min σε 14.000g. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια δειγμάτων και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης αρχικά 15 mA και στη συνέχεια 35-40 mA, όταν έχουν πλέον περάσει τα δείγματα στο πήκτωμα διαχωρισμού και μέχρις ότου το μέτωπο της χρωστικής να φτάσει στο κάτω μέρος του πηκτώματος.

6.8 Μεταφορά σε μεμβράνη

Πειραματική πορεία

- Προετοιμασία μεμβράνης: κόβουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose membrane, ThermoFisher Scientific) ή την PVDF (polyvinylidene fluoride, Westram Whatman) μεμβράνη στις διαστάσεις του πηκτώματος. Ενεργοποιούμε την κάθε μεμβράνη σύμφωνα με τις οδηγίες του αντίστοιχου εγχειριδίου.
- Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πολυπεπτιδίων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Σημαδεύουμε το πήκτωμα προκειμένου να γνωρίζουμε τη σειρά τοποθέτησης των δειγμάτων.
- Τοποθετούμε στη συσκευή μεταφοράς τα παρακάτω με τη σειρά που αναφέρονται: (ξεκινώντας από τον αρνητικό πόλο) δικτυωτό πλέγμα-σφουγγάρι-χαρτί whatman-πήκτωμα-μεμβράνη-χαρτί whatman-σφουγγάρι-δικτυωτό πλέγμα (θετικός πόλος).
- Η μεταφορά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης και γίνεται σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Συνολικά για τη συσκευή που χρησιμοποιήθηκε, εφαρμόσαμε περίπου 180-200 mA/h.
- Πραγματοποιούμε ένα ξέπλυμα με PBS-Tween-20 0,1%.
- Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε 3% BSA διαλυμένο σε PBS-Tween-20 0,1% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.

6.9 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόζεται προκειμένου να γίνει εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης/αντιγόνου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παρασκευαστεί για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται στις μεμβράνες δεσμεύονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, διατηρώντας τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που πρόκειται να ανιχνευτεί και στη συνέχεια, με 2ο αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής του 1^{ου} αντισώματος. Στο 2^ο αντίσωμα έχει συνδεθεί ομοιοπολικά ένζυμο (υπεροξειδάση), με τη δράση του οποίου με χημειοφωταύγεια παίρνουμε σήμα στο σημείο που βρίσκεται η πρωτεΐνη που μελετάμε.

Πειραματική Πορεία

- Η μεμβράνη έχει επωαστεί σε 3% BSA διαλυμένο σε PBS-Tween-20 0,1% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.
- Ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με PBS-Tween-20 0,1%.
- Η μεμβράνη επωάζεται O/N στους 4°C σε διάλυμα 3% BSA PBS-Tween-20 0,1% που περιέχει το αντίσωμα (πρωτογενές αντίσωμα) έναντι του αντιγόνου που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Το στάδιο αυτό είναι το πιο σημαντικό για την επιτυχία της μεθόδου και για το λόγο αυτό απαιτείται σωστή τιτλοδότηση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν, ώστε να μειωθεί η δέσμευσή τους σε μη ειδικές θέσεις.
- Την επομένη, ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με PBS-Tween-20 0,1%.
- Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται στο σκοτάδι σε διάλυμα 3% BSA PBS-Tween-20 0,1% που περιέχει το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύεται στην Fc περιοχή του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του αντιγόνου. Το δευτερογενές αντίσωμα, όπως προαναφέραμε είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση.
- Ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με PBS-Tween-20 0,1%.
- Προκειμένου να καταστεί ορατό το σύμπλοκο αντιγόνου-πρωτογενούς αντισώματος-δευτερογενούς αντισώματος, η μεμβράνη επωάζεται με ένα κατάλληλο υπόστρωμα της υπεροξειδάσης, το οποίο παράγει φως (σύστημα

χημειοφωταύγειας) στα σημεία που εντοπίζεται το σύμπλοκο και το οποίο ανιχνεύεται με έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα χημειοφωταύγειας της εταιρείας Amersham (ECL kit, Amersham) σύμφωνα με τις οδηγίες του αντίστοιχου εγχειριδίου.

Υλικά - Διαλύματα

1. Μεμβράνη PVDF Biorad - Immune Blot™ PVDF membrane for protein Blotting διαμέτρου 0,2 μm (26 cm x 3.3 m), Cat. No. 162-0177
2. Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ThermoFisher Scientific
3. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5X, Running Buffer): 15,1 gr Tris base, 94 gr Γλυκίνη, 5 g SDS, ddH₂O μέχρι 1 lt
4. Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer): 7 μέρη dH₂O : 2 μέρη μεθανόλης : 1 μέρος Western Buffer (10x)
5. Western Buffer (10x): Tris base 58 gr, Γλυκίνη 29 gr, SDS 3.7 gr, ddH₂O μέχρι 1lt
6. Διάλυμα PBS 10x: 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM K₂HPO₄, dH₂O μέχρι 1lt. Ρύθμιση του pH στο 7.4 με HCl. Το διάλυμα PBS χρησιμοποιείται 1x.
7. Διάλυμα PBS-Tween-20 0.1%: Σε 1lt PBS 1x προσθέτουμε 1 ml Tween-20
8. Πρωτογενή αντισώματα: anti-myospryn (rabbit polyclonal) με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:2.000, anti-Desmin (Y-20, Santa Cruz Biotechnology Inc, Cat. No. sc-7559) με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:500, anti-b-tubulin (Sigma-Aldrich, Cat. No. T3526) με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:1000 και anti-GAPDH (mouse monoclonal, Applied Biosystems Cat. No. AM4300) με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:4.000
9. Τα αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα ήταν συζευγμένα με HRP (Sigma).

7. Ιστολογική Μελέτη

7.1 Έγκλειση ιστών σε παραφίνη και τμήση σε μικροτόμο

Η μέθοδος αυτή μονιμοποιεί τον προς εξέταση ιστό διατηρώντας σε μεγάλο βαθμό την δομή του και επιτρέποντας την περαιτέρω ανάλυση λεπτών τομών (έως 4-5 μm) με την βοήθεια μικροτόμου παραφίνης. Αρχικά, μονιμοποιούνται οι ιστοί και στη συνέχεια, εγκλείονται στην παραφίνη σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια:

Πειραματική πορεία

- Απομονώθηκαν καρδιές από ποντίκια διαφόρων ηλικιών σύμφωνα με τις προβλεπόμενες διαδικασίες. Η καρδιά εκπλένεται με PBS 1x στους 4°C.
- Μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 10% (Sigma, HT-50-1-128) για 12-16 ώρες ανάλογα με το πάχος του ιστού.
- Μετά τη μονιμοποίηση, ακολουθεί έκπλυση του ιστού με PBS 1x, ώστε να απομακρυνθούν ενεργά υπολείμματα του μέσου μονιμοποίησης.
- Ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση του ιστού, με μια σειρά από διαδοχικές επώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH) και στη συνέχεια ξυλόλης, ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση της παραφίνης. Πιο συγκεκριμένα, η πορεία των επώσεων είναι η ακόλουθη:
 1. EtOH 70% (x2 φορές), RT, 30 λεπτά
 2. EtOH 85% (x2 φορές), RT, 30 λεπτά
 3. EtOH 95% (x2 φορές), RT, 30 λεπτά
 4. EtOH 100% (x2 φορές), RT, 30 λεπτά
- Ο αφυδατωμένος ιστός επωάζεται στη συνέχεια 2 φορές σε 100% ξυλόλη, σε απαγωγό, για 20 λεπτά σε RT.
- Ακολουθεί επώση σε διάλυμα ξυλόλης/παραφίνης (1:1), στους 65°C για 45 λεπτά.
- Οι ιστοί ενσωματώθηκαν σε παραφίνη με αυτοματοποιημένη επεξεργασία σε ιστοκινέτα (Leica) και παρήχθησαν τομές σε μικροτόμο (Leica).
- Οι εγκλεισμένοι ιστοί φυλάσσονται στους 4°C.

7.2 Τομές σε μικροτόμο παραφίνης

Οι τομές που θα κοπούν εναποτίθονται επάνω σε θετικά φορτισμένες με πολυλυσίνη αντικειμενοφόρους πλάκες.

Πειραματική πορεία

- Αρχικά θερμαίνεται δοχείο που περιέχει αποστειρωμένο H₂O, η θερμοκρασία του οποίου ρυθμίζεται στους 40-45°C. Η τελική θερμοκρασία προσαρμόζεται κάθε φορά ώστε οι τομές παραφίνης να απλώνονται μέσα στο H₂O, αλλά να μην ξεκολλάνε από την περιβάλλουσα παραφίνη.
- Κόβονται 3-10 συνεχόμενες τομές πάχους 5 μm υπό τύπο κορδέλας.
- Με τη βοήθεια ενός πινέλου μεταφέρονται προσεκτικά στο δοχείο με το H₂O, απλώνονται και στη συνέχεια, τοποθετούνται με τη βοήθεια ενός πινέλου στην αντικειμενοφόρο.
- Το υπόλοιπο δείγμα φυλάσσεται στους 4°C μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθεί, ενώ οι τομές παραμένουν μέχρι να στεγνώσουν και στη συνέχεια φυλάσσονται σε RT.

7.3 Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των ιστών

Οι τομές, οι οποίες θα πραγματοποιηθεί κάποιου είδους χρώση, αρχικά υφίστανται τη διαδικασία της αποπαραφινοποίησης, όπως περιγράφεται παρακάτω, προκειμένου να ενυδατωθούν και να μπορέσει η υδατοδιαλυτή χρωστική να βάψει τον ιστό.

Πειραματική πορεία

- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές του ιστού προθερμαίνονται στους 60°C για 5 λεπτά προκειμένου να λιώσει η παραφίνη.
- Ακολουθεί αποπαραφινοποίηση των ιστών μέσα σε γυάλινο δοχείο με ξυλόλη για 10 λεπτά, 2 φορές.
- Έπειτα, οι ιστοί ενυδατώνονται σταδιακά με εμβάπτιση σε μια σειρά από διαδοχικά ελλυτούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση του υδατικού διαλύματος μέσα στους ιστούς.
- Πιο συγκεκριμένα η πορεία των επώασεων είναι η ακόλουθη:
 1. EtOH 100% (x2 φορές), RT, 5 λεπτά

2. EtOH 95% (x2 φορές), RT, 2 λεπτά
3. EtOH 80% (x2 φορές), RT, 2 λεπτά
4. EtOH 50% (x2 φορές), RT, 2 λεπτά
5. Μεταφορά σε dH₂O

7.4 Χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη

Όλες οι χρώσεις προβλέπουν ως πρώτο στάδιο την αποπαραφινποίηση των ιστών, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Η αιματοξυλίνη βάφει τους πυρήνες ιώδεις, ενώ η εωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα ροζ. Συνήθως η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της διήθησης φλεγμονωδών κυττάρων.

Πειραματική πορεία

- Επώαση σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1 λεπτό σε RT.
- Πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με dH₂O.
- Επώαση σε διάλυμα εωσίνης για 1 λεπτό σε RT.
- Πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με dH₂O.
- Ακολουθεί αφυδάτωση με εμβαπτίσεις σε διαδοχικά αύξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης ως εξής: 70% EtOH για 20 sec, 80% EtOH για 30 sec, 95% EtOH για 30 sec, 100% EtOH για 2x1min και τέλος ξυλόλη.
- Στεγανοποίηση των τομών και διατήρηση με Depex (Serva), το οποίο διατηρεί την μορφολογία του ιστού και τη ζωνρότητα των χρωμάτων για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

7.5 Χρώση Τριχρωμίας Masson

Για την εκτίμηση της ίνωσης, τομές παραφίνης χρωματίστηκαν με τριχρωμία Masson. Η συγκεκριμένη χρώση βάφει μπλε το κολλαγόνο, ροζ το κυτταρόπλασμα και τους πυρήνες σκούρους.

Πειραματική πορεία

- Οι αποπαραφινωποιημένες τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης Harris για 1 min σε RT.
- Ακολούθησε επώαση σε διάλυμα ερυθρό του Mallory [0,5% όξινης φουξίνης (Sigma) σε 0,5% οξικό οξύ] για 1 min και στη συνέχεια επώαση σε διάλυμα 1% φωρφομολυβδικού οξέος για 2 min σε RT.
- Ακολούθησε επώαση σε διάλυμα κυανό του μεθυλίου (methyl blue) για 1 min σε RT και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυση με νερό βρύσης εις τριπλούν.
- Ακολούθησε αντίστροφη πορεία αφυδάτωσης με εμβαπτίσεις σε αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλες και ξυλόλη.
- Στεγανοποίηση των τομών και διατήρηση με Depex (Serva).

7.6 Μικροσκοπία

Οι ιστολογικές χρώσεις των τομών που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκαν σε φωτονικό στερεοσκόπιο της εταιρείας Zeiss, μοντέλο AxioPhot (Zeiss-AxioPhot optical photomicroscope), ενώ η λήψη των εικόνων, έγινε με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας της εταιρείας Leica, μοντέλο DC-300.

8. Ανοσοϊστοχημεία/ ανοσοφθορισμός

Η μέθοδος αυτή δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης και εντόπισης της θέσης μιας πρωτεΐνης στους ιστούς και στα κύτταρα που την εκφράζουν. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης παραπάνω της μιας πρωτεΐνης που εκφράζονται στον ίδιο ιστό ή κύτταρο.

8.1 Έγκλειση ιστών σε O.C.T και παρασκευή τομών σε κρυοστάτη

Η μονιμοποίηση των ιστών σε φορμαλίνη και η έγκλειση σε παραφίνη είναι μια διαδικασία που μπορεί να αλλοιώσει τις αντιγονικές ιδιότητες κάποιων πρωτεϊνών. Επομένως, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί μια εναλλακτική μέθοδος έγκλεισης

των ιστών σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα O.C.T (Optimal Cutting Temperature compound, VWR compounds).

Πειραματική πορεία

- Ειδικότερα, οι ιστοί αφαιρούνται προσεκτικά και εκπλένονται με PBS 1x στους 4°C, μετά τοποθετούνται σε ειδικές θήκες-μήτρες με τον κατάλληλο προσανατολισμό.
- Έχει προηγηθεί πλήρωση των θηκών με το κρυοπροστατευτικό διάλυμα O.C.T (VWR compounds) και τοποθέτησή τους σε μεταλλική επιφάνεια.
- Στη συνέχεια, ο ιστός ψύχεται σταδιακά, αλλά σε μικρό χρονικό διάστημα με υγρό άζωτο. Οι παγωμένοι, μη μονιμοποιημένοι ιστοί μπορούν έτσι να αποθηκευτούν στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Να σημειωθεί ότι ο ιστός με το O.C.T είναι σκληρό και συμπαγές υλικό, με αποτέλεσμα να κόβεται εύκολα και με μεγάλη ακρίβεια όταν τοποθετηθεί στην ειδική υποδοχή του κρυοστάτη και σε θάλαμο που έχει σταθερή θερμοκρασία -20°C.

- Κόβονται 3-10 συνεχόμενες τομές πάχους 8-10 μm.
- Οι τομές μεταφέρονται προσεκτικά σε ειδικές θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες πολυλυσίνης.
- Το υπόλοιπο υλικό φυλάσσεται στους -80°C μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθεί.
- Οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν καλά και μπορούν να διατηρηθούν στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα, αν και προτιμάται η άμεση χρήση τους.

8.2 Επώαση των τομών με πρώτα αντισώματα

Πειραματική πορεία

- Οι τομές ξεπλένονται με 1x PBS για 1 min και στη συνέχεια με 1x PBS για 10 min.
- Ακολουθεί μονιμοποίηση σε παγωμένο διάλυμα μεθανόλης/ακετόνης (70%/30%) για 15 min στους -20°C.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις με διάλυμα 1x PBS, για 5 λεπτά σε RT, για απομάκρυνση των υπολειμμάτων του μονιμοποιητικού διαλύματος.

- Ακολούθησε κατεργασία των τομών με διάλυμα απορρυπαντικού 0,2% Triton-X-100 σε 1x PBS για 10 min, για την αύξηση της διαπερατότητας των τομών σε αντισώματα.
- Ακολουθούν 2 πλύσεις με διάλυμα 1x PBS, για 5 λεπτά σε RT.
- Κατόπιν οι τομές επώαστηκαν με διάλυμα αποκλεισμού, 5% BSA σε 1x PBS, για 1h σε RT.
- Ακολουθούν 2 πλύσεις με διάλυμα PBS-Tween-20 0,05%, για 5 λεπτά σε RT.
- Κατόπιν οι τομές επώαστηκαν με το διάλυμα αντισώματος (το πρωτογενές αντίσωμα στην επιθυμητή αραίωση σε διάλυμα 5% BSA σε PBS-Tween-20 0,05% για 16-18 h στους 4°C.
- Το αδέσμευτο αντίσωμα απομακρύνθηκε με τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα 1x PBS-Tween-20 0,05% και εφαρμόστηκε το δευτερογενές αντίσωμα σε διάλυμα 5% BSA σε PBS-Tween-20 0,05% για 1 h σε RT.
- Ο ιστός ξεπλένεται με PBS-Tween-20 0,05% εις τριπλούν για 5 min.
- Ακολουθεί επώαση με Hoechst 33342 (1:5000 από 10 mg/ml stock) σε 5% BSA PBS-Tween-20 0,05% για τη χρώση των πυρήνων για 2 min σε RT, σε σκοτεινό χώρο.
- Οι τομές που έχουν επωαστεί με αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες επικαλύπτονται με ειδικό υλικό, fluorescent mounting medium (Dako), το οποίο διατηρεί την ένταση του φθορισμού σε υψηλά επίπεδα και για μεγάλο χρονικό διάστημα, υπό την προϋπόθεση οι τομές να διατηρούνται στο σκοτάδι και στους 4°C.
- Αφήνουμε τις τομές να στεγνώσουν στο σκοτάδι για 10 min περίπου και μετά παρατηρούμε τη χρώση σε μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα φίλτρα.

Λίστα αντισωμάτων

Μία λίστα των περισσότερων πρώτων αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες μας ακολουθεί παρακάτω:

- anti-Desmin (Y-20, Santa Cruz, sc-7559, 1:50),
- anti- α -Actinin (Sigma-Aldrich, A2543, 1:500),
- anti-desmoplakin (Progen, 651109, 1:30),
- anti-Connexin-43 (Sigma-Aldrich, C6219, 1:200)

- anti-vinculin (Sigma-Aldrich, V9131, 1:800), diluted in 5% BSA PBS-Tween 0,05%.
- anti-ryanodine receptor 2 (anti-RyR2) (Sigma-Aldrich, HPA020028, 1:400)

Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες μας είναι τα Alexafluor-488 and -594 (Molecular Probes, Life Technologies Corporation, 1:1000).

8.3 Μικροσκοπία

Η παρατήρηση καθώς και η ανάλυση των μονών, αλλά και διπλών χρώσεων ανοσοφθορισμού, πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης της εταιρείας Leica, μοντέλο TCS SP5 (Leica TCS SP Confocal Laser Scanning Microscope). Το μικροσκόπιο είναι εξοπλισμένο με ειδικό πρόγραμμα τρισδιάστατης ανάλυσης εικόνας, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ηλεκτρονική συρραφή μιας σειράς συνεχόμενων συνεστιακών εικόνων που λαμβάνονται στην περιοχή του ιστού που μας ενδιαφέρει. Συγκεκριμένα, γίνεται πρώτα επιλογή της περιοχής του ιστού που θα ληφθεί η φωτογραφία και κατόπιν η επιλεχθείσα περιοχή χωρίζεται ηλεκτρονικά σε τομές πάχους 0,1 ή 0,2 μm ανάλογα με τον ιστό, οι ακτίνες λέιζερ έπειτα σαρώνουν τον ιστό στο ύψος των παραπάνω τομών και τέλος, με τη βοήθεια του ειδικού λογισμικού γίνεται οπτική ανασυγκρότηση της περιοχής του ιστού. Για να αποφευχθεί η επικάλυψη της εικόνας του φθορισμού που προέρχεται από διαφορετικά μήκη κύματος, στην περίπτωση του διπλού ανοσοφθορισμού, οι εικόνες για την κάθε χρώση προέκυψαν από την σάρωση κάθε φθορίζουσας ουσίας χωριστά, ενώ ο οπτικός συνδυασμός των χρώσεων γίνεται ηλεκτρονικά. Το λογισμικό Leica LAS-AF παρείχε επιπλέον τη δυνατότητα λήψης εικόνων με ταυτόχρονη απεικόνιση της τρίτης διάστασης των τομών, απεικόνιση δηλαδή κατά τον κατακόρυφο άξονα z (orthogonal slicing).

9. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

9.1 Μονιμοποίηση του ιστού και έγκληση σε μίγμα εποξικών ρητινών Epon/Araldite

Πριν την απομόνωση και την επεξεργασία του καρδιακού ιστού, τα ποντίκια ενέθηκαν με ηπαρίνη (5 Units/gr), για την αποφυγή της πήξης του αίματος και αφέθηκαν σε ηρεμία για 30 min. Για τη μορφολογική μελέτη, ακολούθησε η έκχυση στην αριστερή κοιλία 10 ml διαλύματος μονιμοποίησης 2,5% γλουταραλδεϋδης (Fluka, Cat. No. 49628) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού (PB) 0,1 M (pH 7.4) και επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Στη συνέχεια, το μυοκάρδιο τμήθηκε σε τεμάχια 1-2 mm, τα οποία επώαστηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης για 12-16 h στους 4°C. Ακολούθησε συμπληρωματική μονιμοποίηση του ιστού σε 1% υδατικό διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου (OsO₄) για 1 h στους 4°C.

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη, μικρά τμήματα του ιστού (1,5-2mm³) μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% φορμαλδεϋδης-1% γλουταραλδεϋδης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού (PB) 0,1 M (pH 7.4) για 2 h στους 4°C.

Στη συνέχεια, τα τμήματα πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα τρεις φορές στους 4°C για 10 min. Ακολούθησε και δεύτερη μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα 1% OsO₄ σε 0,1 M PB (pH 7.4) για 1 h στους 4°C και διπλή πλύση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα στους 4°C για 10 min. Ακολούθως, αφυδατώθηκαν σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (30%, 50%, 70%, 90%, για 5 min και 3x 100% για 10 min). Τέλος, οι ιστοί επώαστηκαν διαδοχικά σε ανάδευση σε 100% διάλυμα οξειδίου του προπυλενίου (Electron Microscopy Sciences) εις τριπλούν για 5 min, 15 min σε μίγμα οξειδίου του προπυλενίου-εποξικών ρητινών Epon/Araldite (1:2), 30 min σε μίγμα οξειδίου του προπυλενίου-εποξικών ρητινών Epon/Araldite (1:1), 1 h σε μίγμα οξειδίου του προπυλενίου-εποξικών ρητινών Epon/Araldite (1:3) και εις τριπλούν σε καθαρό μίγμα εποξικών ρητινών Epon/Araldite για 5 min. Για τον πολυμερισμό της ρητίνης τα ιστοτεμάχια τοποθετούνται σε εκμαγεία και επωάζονται σε κλίβανο στους 60°C για 24 h. Για τις ημίλεπτες τομές μεγέθους 65-70 nm χρησιμοποιήθηκε ο εξειδικευμένος μικροτόμος LeicaEM-UC7 ultramicrotome, (Leica). Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για τις φωτογραφίες είναι το Philips 420 στα 40 kV και η κάμερα Megaview G2 CCD camera (Olympus SIS).

10. Ηχοκαρδιογραφία και Ανάλυση Doppler

Πραγματοποιήθηκε M-mode ηχοκαρδιογραφία, από εξειδικευμένο προσωπικό της μονάδας Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Ηχοκαρδιογραφικές παράμετροι

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν για την ανάλυση των λειτουργικών ιδιοτήτων του μυοκαρδίου είναι οι εξής: τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας (LV end-diastolic diameter, LVEDD), τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας (LV end-systolic diameter, LVESD), πάχος του οπισθίου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη συστολή (LV posterior wall thickness at systole, PWTs) και κατά τη διαστολή (LV posterior wall thickness at diastole, PWTd). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του λόγου της ακτίνας της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας προς το τελοδιαστολικό πάχος του οπισθίου τοιχώματος (LV radius/PWTd, r/h) και του ποσοστού της κλασματικής βράχυνσης της αριστερής κοιλίας (LV fractional shortening, FS%).

Πειραματική πορεία

Εξετάστηκαν ποντίκια ηλικίας 3-, 6- και 12-μηνών, αρσενικά και θηλυκά, με τον αντίστοιχο αριθμό των ατόμων για κάθε ένα γονότυπο, όπως παρουσιάζονται στους Συμπληρωματικούς Πίνακες 1-4. Τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία συμπεριλήφθησαν ποντίκια στη μελέτη, ήταν ο σωστός γενότυπος και να μην παρουσιάζουν οποιονδήποτε τύπο μόνιμων αρρυθμιών. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν από εξειδικευμένο υπερηχογραφιστή που δεν γνώριζε τους γενοτύπους των πειραματικών μοντέλων.

Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 100 mg/kg κεταμίνης. Η υπερηχοκαρδιογραφική ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υπερήχων (Vivid 7, General Electric Healthcare) με ένα 13-MHz γραμμικό μετατροπέα. Η δυσδιάστατη στοχευόμενη απεικόνιση M-mode λαμβανόταν από την προβολή του μικρού άξονα στο επίπεδο της μεγαλύτερης διάστασης της LV. Οι εικόνες της ηχοκαρδιογραφίας αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Echopac PC SW 3.1.3 (General Electric Healthcare).

Η τελοδιαστολική διάμετρος προσδιορίστηκε κατά τη μέγιστη διαστολική απόσταση, και η τελοσυστολική διάμετρος ελήφθη κατά την κορύφωση της οπίσθιας κίνησης του τοιχώματος. Μετρήθηκαν τρεις καρδιακοί χτύποι κατά μέσο όρο για κάθε μέτρηση. Οι υπολογισμοί για το λόγο της ακτίνας της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας προς το τελοδιαστολικό πάχος του οπισθίου τοιχώματος (r/h) και του ποσοστού της κλασματικής βράχυνσης της αριστερής κοιλίας (FS%) έγιναν ως εξής: $r/h = LV \text{ radius}/PWTd$ και $FS (\%) = [(EDD - ESD)/EDD] \times 100$.

11. Πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από νεογέννητα ποντίκια

Με τη διαδικασία αυτή απομονώνονται μυοκαρδιοκύτταρα, προκειμένου να μελετηθεί *in vitro* οι επιπτώσεις που έχουν οι διάφοροι παράγοντες στο συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και όχι στο μυοκάρδιο γενικά. Για την απομόνωση απαιτούνται καρδιές που προέρχονται από νεογέννητα ποντίκια έως 3^{ov} ημερών, στις οποίες τα μυοκαρδιοκύτταρα δεν θεωρούνται πλήρως διαφοροποιημένα και διατηρούν ακόμη την ικανότητα προσκόλλησης σε υπόστρωμα, δημιουργώντας συστάδες κυττάρων που πάλλονται ταυτόχρονα. Επίσης, απαιτείται αρκετός αριθμός καρδιών (ιδανικά 8-10 καρδιές), προκειμένου να επιτευχθεί μια ικανοποιητική συγκέντρωση καρδιακών μυϊκών κυττάρων.

Θρεπτικά μέσα-Διαλύματα

1. Trypsin (Gibco, Cat. No. 840-72501L)
2. HBSS [Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS (Gibco), Cat. No.14175-053]
3. Αναστολέα της τρυψίνης (Gibco, Cat. No.17075-029)
4. Κολλαγενάση τύπου II (CLS-2, Worthington)
5. Leibovitz's L-15 (Gibco, Cat. No. 31415)
6. Ham's F10 (BiochromAG, Cat. No. GF 0715)
7. FBS/ Fetal Bovine Serum (Gibco, Cat. No. 12485-025)
8. HS/ Horse Serum (Gibco, Cat. No. 16170-078)
9. Διάλυμα penicillin/streptomycin (Gibco, Cat. No. 15070-063)
10. Κολλαγόνο A (Biochrom AG, Cat. No. L7220)
11. AraC/ cytosine β-D-arabinofuranoside (Sigma, Cat. No. C1768)

Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωσή τους περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

Πειραματική πορεία

- Αφαιρούμε με προσοχή τις καρδιές από περίπου 10 νεογέννητα ποντίκια 0-3^{ov} ημερών και μεταφέρονται άμεσα σε παγωμένο HBSS [Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS (Gibco)].
- Με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου απομακρύνονται οι κόλποι, καθώς η μορφολογία των μυοκαρδιοκυττάρων αυτού του τμήματος προσομοιάζει τα επιθηλιακά κύτταρα.
- Οι καρδιές τεμαχίζονται με χρήση νυστεριού σε στεγνή επιφάνεια (τρυβλίο) που ακουμπά πάνω σε πάγο. Τα τεμαχισμένα τμήματα των κοιλιών υποβάλλονται σε πέψη με τρυψίνη [100 μg/ml σε 10 ml HBSS (Gibco)] για 16-18 h στους 4°C.
- Η πέψη με τρυψίνη διακόπτεται με προσθήκη αναστολέα της τρυψίνης [200 μg/ml σε HBSS (Gibco)] και επώαση στους 37°C για 10 min.
- Ακολουθεί πέψη με κολλαγενάση σε θρεπτικό διάλυμα [500 μg/ml collagenase type II (CLS-2, Worthington) σε 10 ml Leibovitz's L-15 (Gibco)] και ο ιστός επωάζεται για 20-25 min στους 37°C, με περιοδικές ήπιες αναδύσεις.
- Ο ιστός υποβάλλεται σε 10 ήπιες αναρροφήσεις και εκροφήσεις για την πλήρη ρήξη των κυτταρικών συνδέσεων και τη δημιουργία απομονωμένων κυττάρων.
- Το εναιώρημα των κυττάρων αφήνεται σε ηρεμία για 10 min και στη συνέχεια το υπερκείμενο φιλτράρεται για την κατακράτηση υπολειμμάτων ιστού σε φίλτρα με οπές 70-μm (BD).
- Τα φιλτραρισμένα κύτταρα αφήνονται σε ηρεμία για 20 min και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 5 min στα 50-100xg.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό που αποτελείται από [Ham's F10 (BiochromAG) εμπλουτισμένο με 5% FBS(Gibco), 10% Horse Serum (Gibco) και 1% penicillin/streptomycin (Gibco)].
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε 10 cm πιάτα κυτταροκαλλιεργειών και επωάζονται σε 5% CO₂, στους 37°C για περίπου 1-3 h, χρονικό διάστημα επαρκές ώστε να ολοκληρωθεί η προσκόλληση των ινοβλαστών και να επιτευχθεί με αυτό τον τρόπο εμπλουτισμός της πρωτογενούς καλλιέργειας σε μυοκαρδιοκύτταρα, καθώς απομακρύνονται άλλα είδη κυττάρων.

- Ακολουθεί συλλογή του υπερκειμένου αιωρήματος κυττάρων που περιέχει τα μυοκαρδιοκύτταρα που δεν έχουν προσκολληθεί και επίστρωσή τους, σε πυκνότητα 2×10^5 κύτταρα/cm² σε κυψελίδες (Chamber permanox slide) που έχουν προ-επωαστεί με κολλαγόνο-A (Biochrom AG) για 2-3 min και έχουν στεγνώσει κάτω από UV για 30 min. Να σημειωθεί ότι το θρεπτικό υλικό [Ham's F10 (BiochromAG) εμπλουτισμένο με 5% FBS (Gibco), 10% Horse Serum (Gibco) και 1% penicillin/streptomycin (Gibco)] περιέχει επιπλέον τον αναστολέα cytosine β-D-arabinofuranoside 10 μM (AraC, Sigma), για την αποφυγή πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών.
- Μετά από την πάροδο 24 h τα μυοκαρδιοκύτταρα, θα έχουν προσκολληθεί στις κυψελίδες και ιδανικά θα συσπώνται. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται καθημερινά για 4-5 ημέρες.
- Μετά την πάροδο 4-5 ημερών στην καλλιέργεια τα μυοκαρδιοκύτταρα, είτε επωάζονται με τους κατάλληλους αγωνιστές και ανταγωνιστές των β-αδρενεργικών υποδοχέων και πραγματοποιείται μέτρηση του ρυθμού σύσπασης των μυοκαρδιοκυττάρων με γυμνό μάτι, κάτω από ανάστροφο μικροσκόπιο, πριν και έπειτα από επώαση με αυτούς, είτε πραγματοποιούμε τα διάφορα πειράματα που θα αναλυθούν παρακάτω (κυτταρομετρία ροής, μέτρηση cAMP, πειράματα ανοσοφθορισμού κτλ).

12. Το σύστημα Langendorff

Ο Oscar Langendorff εισήγαγε την πρώτη μέθοδο απομόνωσης μιας καρδιάς με συσταλτική δραστηριότητα το 1895. Το σύστημα Langendorff είναι μια τεχνική διατήρησης της λειτουργίας της καρδιάς *ex vivo*. Η καρδιά αφαιρείται από το σώμα του ζώου, τοποθετείται στη συσκευή Langendorff και τροφοδοτείται αντίστροφα, μέσω της αορτής, με ένα διάλυμα εμπλουτισμένο με οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και ηλεκτρολύτες. Έτσι, είναι δυνατή η συνέχιση της λειτουργίας της για αρκετές ώρες. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την ανακάλυψη των μηχανισμών της φυσιολογίας της καρδιάς. Σήμερα, η αξία του μοντέλου παραμένει μεγάλη, καθώς αποτελεί την κυριότερη μέθοδο για τη μελέτη τόσο του μοριακού μηχανισμού της ισχαιμίας, όσο και της επίδρασης νέων φαρμάκων. Εδώ και πάνω από έναν αιώνα, η μέτρηση της πίεσης της αριστερής κοιλίας παραμένει ο κύριος

τρόπος εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας στο σύστημα Langendorff. Συγκεκριμένα, ένα μπαλόνι γεμάτο νερό εισέρχεται στην αριστερή κοιλία και μεταδίδει την πίεση που του ασκείται σε κατάλληλο μέσο καταγραφής (πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο ή αισθητήρα οπτικής ίνας). Η καταγραφή της μεταβολής της πίεσης επιτρέπει την αξιολόγηση της καρδιακής λειτουργίας.

12.1 Εμποτισμός της καρδιάς στη συσκευή Langendorff

Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 100 mg/kg κεταμίνης. Επίσης, χορηγείται ηπαρίνη (300IU/kg) μέσω της μηριαίας φλέβας και η καρδιά αφαιρείται από το σώμα του ζώου. Η καρδιά τοποθετείται σε παγωμένο διάλυμα εμποτισμού για την διακοπή των συσπάσεων της καρδιάς και τον περιορισμό των συνεπειών της ισχαιμίας. Μετά την απομάκρυνση των γύρω ιστών, η καρδιά προσαρμόζεται μέσω της αορτής σε ειδικά διαμορφωμένη κάνουλα της συσκευής εμποτισμού, όπου και στερεώνεται με τη χρήση ράμματος. Ο χρόνος που μεσολαβεί από την αφαίρεση της καρδιάς μέχρι την τοποθέτησή της στη συσκευή δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 1-2 min. Ειδικότερα, πραγματοποιείται διασωλήνωση της αορτής και παροχή των στεφανιαίων αρτηριών με οξυγονωμένο διάλυμα εμποτισμού. Το διάλυμα αυτό διοχετεύεται αντίθετα προς την in vivo ροή του αίματος με σταθερή ροή που εξασφαλίζεται είτε με αντλία (constant flow preparation), είτε με σταθερή υδροστατική πίεση (constant pressure preparation) (60-100 mmHg). Ο όγκος του διαλύματος που ρέει στα στεφανιαία αγγεία παροχετεύεται στον στεφανιαίο κόλπο και τελικά εξέρχεται από την καρδιά μέσω της πνευμονικής αρτηρίας. Το φυσιολογικό διάλυμα εμποτισμού Krebs-Henseleit (KHB) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικών με σύσταση: 25 mM NaHCO₃, 118,5 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄ και 10 mM γλυκόζη pH 7,4. Στην προκειμένη περίπτωση μελετήθηκε η αντιπροσωπευτική επίδραση του β-αδρενεργικού αγωνιστή Iso στον καρδιακό παλμό και στη σύσπαση σε perfused καρδιές από des-/- και des+/+ ποντίκια ηλικίας 3 και 6 μηνών. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Δρ. Χρήστο Τζίμα, στο εργαστήριο της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Δέσποινας Σανούδου στο ΙΒΕΑΑ.

13. Κυτταρομετρία Ροής (Flow cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική, η οποία χρησιμεύει στην καταμέτρηση, την ταυτοποίηση, αλλά και το διαχωρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων που είναι αιωρημένα σε υγρό εν ροή και βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στην αυτοματοποίηση της ανάλυσης και του διαχωρισμού κυττάρων σημασμένων με φθορίζοντα αντισώματα. Επιτρέπει την ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση των φυσικών ή και των χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία ρέουν μέσα από ένα οπτικό ή και ηλεκτρονικό σύστημα ανίχνευσης.

Μια δέσμη laser καθορισμένου μήκους κύματος κατευθύνεται σε ένα υδροδυναμικά εστιασμένο ρεύμα κυττάρων που είναι σε εναιώρημα. Μία σειρά από ανιχνευτές βρίσκονται στο σημείο όπου το εναιώρημα διέρχεται μέσα από την ακτίνα του laser: ένας ανιχνευτής στην ίδια ευθεία με την πηγή του φωτός (Forward Scatter/FSC) και αρκετοί ανιχνευτές κάθετοι σε αυτήν (Side Scatter/SSC), καθώς επίσης και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο διαμέτρου 0,2 έως 150 μm που διέρχεται διαμέσου της δέσμης του laser, σκεδάζει το φως με κάποιο τρόπο, ενώ ταυτόχρονα τα φθορίζοντα χημικά μόρια, τα οποία υπάρχουν στα διερχόμενα σωματίδια ή είναι προσκολλημένα σε αυτά, μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως σε υψηλότερο μήκος κύματος από αυτό της φωτεινής πηγής. Ο συνδυασμός του σκεδαζόμενου φωτός και του φθορισμού καταγράφεται από τους ανιχνευτές (ένας για κάθε μια κορυφή εκπομπής φθορισμού) και αναλύεται. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών για τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των διερχόμενων σωματιδίων. Η FSC σκέδαση συσχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου, ενώ η SSC εξαρτάται από την πολυπλοκότητα που απαντάται στο εσωτερικό του διερχόμενου σωματιδίου (πχ. το σχήμα του πυρήνα, τον αριθμό και το είδος των κυτταροπλασματικών κοκκίων ή την αδρότητα της πλασματικής μεμβράνης). Οι σύγχρονοι κυτταρομετρητές ροής είναι ικανοί να αναλύσουν αρκετές χιλιάδες σωματίδια κάθε δευτερόλεπτο, σε πραγματικό χρόνο και ενεργά να απομονώσουν και να διαχωρίσουν πληθυσμούς σωματιδίων με όμοιες ιδιότητες.

Στην προκειμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε μέτρηση με κυτταρομετρία ροής (FACs ανάλυση) της σχετικής ποσότητας του β2-AR στην πλασματική μεμβράνη των des^{-/-} και des^{+/+} μυοκαρδιοκυττάρων, πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη για 20 min και 3 ώρες.

Πειραματική πορεία

- Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες des-/- και des+/+ μυοκαρδιοκυττάρων, τα οποία ήταν σε καλλιέργεια για 4-5 ημέρες. Την ημέρα του πειράματος τα μυοκαρδιοκύτταρα επώαστηκαν με ισοπροτερενόλη για 20 min και 3 ώρες, αντίστοιχα.
- Ξεπλένουμε τα μυοκαρδιοκύτταρα 2 φορές με PBS 1x.
- Επωάζουμε τα μυοκαρδιοκύτταρα με 0,5 mM EDTA σε PBS 1x στους 37°C για 10 min για να διευκολύνουμε την απομάκρυνσή τους από το υπόστρωμα.
- Συλλέγουμε το εναιώρημα κυττάρων και προσθέτουμε 10% FCS (fetal calf serum).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 800g για 20-30 min στους 4°C.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο μυοκαρδιοκυττάρων (Ham's F10 με 5% FBS, 10% Horse Serum και 1% penicillin/streptomycin) εμπλουτισμένο με 10% αποκλειστή του Fc υποδοχέα (Fc receptor blocker). Διατηρούμε για 10 min στον πάγο.
- Επωάζουμε με το 1^ο αντίσωμα για 40 min στους 4°C.
- Στη συνέχεια, προσθέτουμε θρεπτικό μέσο μυοκαρδιοκυττάρων εμπλουτισμένο με 10% FCS και φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 2,5 rpm για 30 min στους 4°C.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο μυοκαρδιοκυττάρων που έχουμε προσθέσει το 2^ο αντίσωμα και επωάζουμε για 30 min στους 4°C.
- Στη συνέχεια, προσθέτουμε θρεπτικό μέσο μυοκαρδιοκυττάρων εμπλουτισμένο με 10% FCS και φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 2,5 rpm για 30min στους 4°C.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε PBS 1x με 1% FCS και 2 mM EDTA.
- Στο σημείο αυτό τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες κατάλληλους για την κυτταρομετρία ροής (FACs tubes) και πραγματοποιήθηκε η ανάλυσή τους. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κυτταρομέτρου FC-500 (Beckman Coulter).

Λίστα αντισωμάτων

Πρώτα αντισώματα

- Beta 2 adrenergic receptor rabbit polyclonal με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:50 (Abcam, Cat. No. ab36956)
- Rabbit IgG-Chip Grade με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:50 (Abcam, Cat. No. ab37415)
- CD90/Thy-1 mouse monoclonal (FITC) με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:100 (Abcam, Cat. No. ab62009)

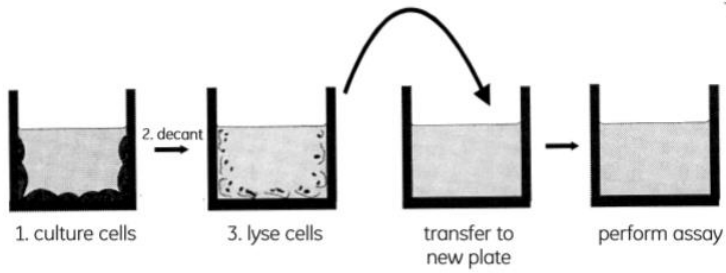
Δεύτερα αντισώματα

- Donkey anti rabbit 488 με χρησιμοποιούμενη αραίωση 1:200

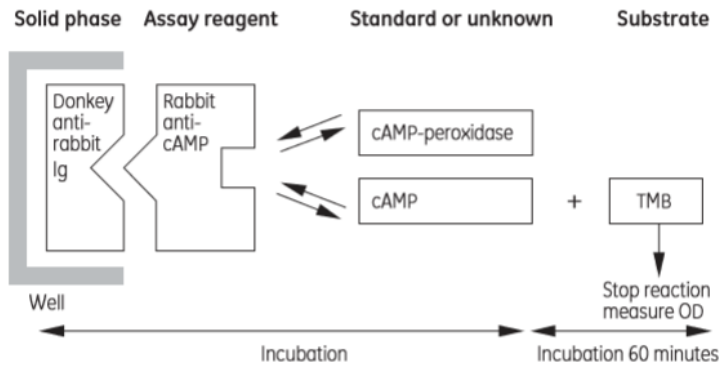
14. Μέτρηση κυκλικού AMP (cAMP)

Σκοπός μας ήταν η μέτρηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου c-AMP, σε πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη, σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε το kit cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System (Amersham, GE healthcare) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνοπτικά, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: το αντιδραστήριο λύσης 1 υδρολύει τις κυτταρικές μεμβράνες για να απελευθερώσει το ενδοκυτταρικό cAMP. Το αντιδραστήριο λύσης 2 διαχωρίζει το βασικό συστατικό στο αντιδραστήριο λύσης 1 και εξασφαλίζει ότι το cAMP είναι ελεύθερο για επακόλουθη ανάλυση. Το αντιδραστήριο λύσης 1 προστίθεται απλά σε καλλιεργημένα κύτταρα, ακολουθούμενο από επώαση 5-10 λεπτών πριν από τη δοκιμασία (Εικόνα 25). Η δοκιμασία βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ μη επισημανθέντος cAMP και μίας σταθερής ποσότητας cAMP σημασμένης με υπεροξειδάση, για έναν περιορισμένο αριθμό θέσεων πρόσδεσης επί ενός ειδικού αντισώματος cAMP (Εικόνα 26).



Εικόνα 25: Πρωτόκολλο λύσης κυττάρων



Εικόνα 26: Αρχή της ενζυμοανοσοδοκιμασίας (Enzymeimmunoassay/EIA)

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελέτη του ρόλου της δεσμίνης και της AKAP-myospryn στη β-αδρενεργική σηματοδότηση με *in vitro* και *ex vivo* προσεγγίσεις

Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, είναι πολύ δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η δεσμίνη μπορεί να διευκολύνει και την AKAP λειτουργία της myospryn και πιθανώς να παίζει ρόλο στη διαμετακίνηση και την ανακύκλωση του β2 αδρενεργικού υποδοχέα. Για αυτό το λόγο, περιμένουμε ότι η διατάραξη του κυτταροσκελετού της δεσμίνης θα μπορούσε να συνδέεται με την απευαισθητοποίηση στη β-αδρενεργική διέγερση (receptor desensitization). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ρύθμιση και η σημασία του PKA μονοπατιού στη λειτουργία του μυοκαρδιοκυττάρου, καθώς και η καθολική σημασία του μονοπατιού της, είναι ευρέως αναγνωρισμένη.

Προς την κατεύθυνση αυτή και με *in vitro* προσεγγίσεις, χρησιμοποιήσαμε πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων (0-3 ημερών) (NCCM/neonatal cardiomyocytes) από ποντίκια des+/+ και des-/- πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη (Iso/ Isoproterenol, μη ειδικός ολικός β-αδρενεργικός αγωνιστής) για να μελετήσουμε εάν ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης παίζει ρόλο στη β-αδρενεργική σηματοδότηση.

1. Μελέτη της έκφρασης των β1 και β2 αδρενεργικών υποδοχέων

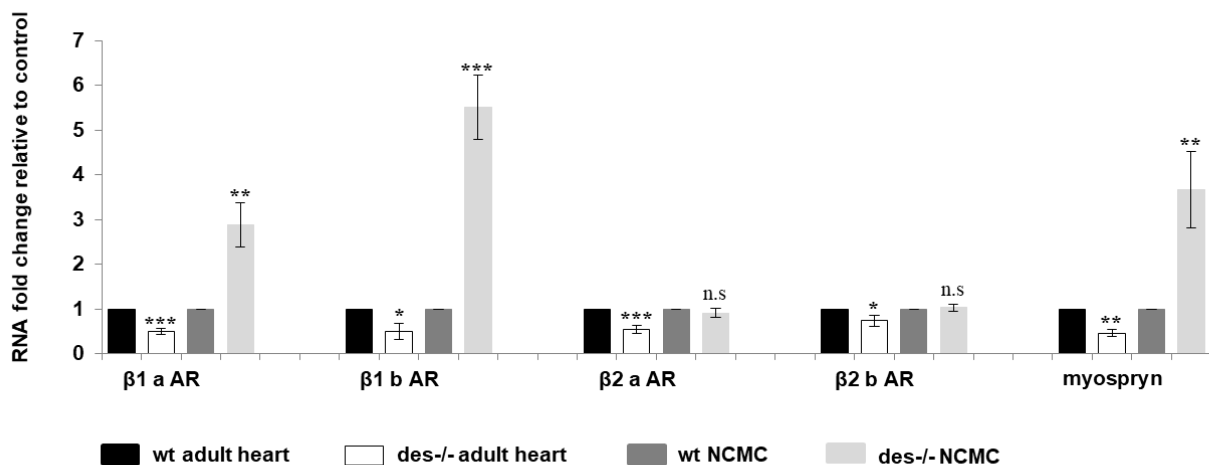
Αρχικά, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των β1 και β2 αδρενεργικών υποδοχέων, σε επίπεδο mRNA από καρδιές και πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από ποντίκια wt και des-/-, με τη μέθοδο της Real Time PCR. Να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (a και b), το ένα από βιβλιογραφική αναφορά και το δεύτερο σχεδιάστηκε από εμάς. Όπως θα αναλύσουμε και στη συνέχεια, από τα δύο αυτά διαφορετικά ζεύγη εκκινητών προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα.

Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του β1 αδρενεργικού υποδοχέα στον καρδιακό ιστό από des-/- ποντίκια (3 μηνών) ήταν μειωμένα 50% σε σύγκριση με το wt, ενώ ήταν αυξημένα 3 και 5,5 φορές αντίστοιχα για τα δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών στις πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από ποντίκια des-/-. Επιπλέον, δείξαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του β2 αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένα 50% σε σύγκριση με το wt στον καρδιακό ιστό από des-/- ποντίκια, ενώ δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα

έκφρασης του $\beta 2$ αδρενεργικού υποδοχέα στις πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από ποντίκια $des^{-/-}$ (0-3 ημερών) (Εικόνα 27).

Τέλος, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της *myosrygn* μέσω Real-Time PCR και βρέθηκε ότι στον καρδιακό ιστό από $des^{-/-}$ ποντίκια ήταν μειωμένα 50% σε σύγκριση με το wt, ενώ ήταν αυξημένα 3,5 φορές στις πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από ποντίκια $des^{-/-}$ (Εικόνα 27).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι στη φυσιολογική καρδιά οι $\beta 1$ υπότυποι αποτελούν τον κυρίαρχο υπότυπο, καθώς αποτελούν το 75-80% των συνολικών β -ARs. Παρόλα αυτά, στην καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρείται μείωση των $\beta 1$ υποτύπων, με παράλληλη αύξηση των $\beta 2$ υποτύπων και έτσι η αναλογία των δυο υποτύπων εξισώνεται σχεδόν στο 50:50 (Port DJ and Bristow MR, 2001; El-Armouche A and Eschenhagen Th, 2009). Τα δεδομένα μας από την παραπάνω ανάλυση έδειξαν ότι παρατηρείται μείωση στο $des^{-/-}$ μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας, τόσο στα επίπεδα έκφρασης του $\beta 1$, όσο και του $\beta 2$ αδρενεργικού υποδοχέα. Η διαφορά αυτή σε επίπεδο μεταγράφου θα πρέπει να μελετηθεί και σε πρωτεϊνικό επίπεδο.



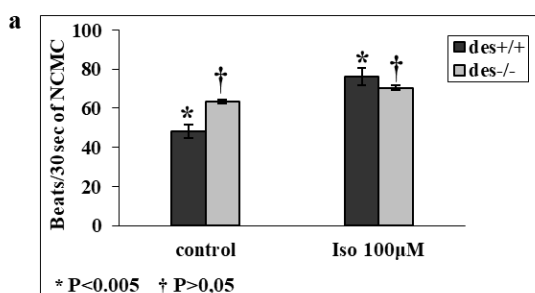
* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0001$ vs wt; n.s: not statistically significant (μη στατιστικά σημαντικό)

Εικόνα 27: Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης για τους $\beta 1$ και $\beta 2$ αδρενεργικούς υποδοχείς, καθώς και τη *myosrygn* μέσω RT-PCR σε cDNA από καρδιές ποντικών wt και $des^{-/-}$ ($N=3$ για κάθε γενότυπο, 3^{ov} μηνών), καθώς και από πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από ποντίκια wt και $des^{-/-}$ ($N=3$ ανεξάρτητα πειράματα, 0-3 ημερών ποντίκια). Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το wt. Για την ομαλοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου της β -ακτίνης. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0001$ vs wt; n.s: not statistically significant (μη στατιστικά σημαντικό).

2. Μελέτη της απόκρισης στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη, *in vitro* και *ex vivo*

2.1 Τα *des*^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα έχουν υψηλό ρυθμό σύσπασης και δεν αποκρίνονται στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη

Απομονώθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων από ποντίκια *des*^{+/+} και *des*^{-/-} και επώαστηκαν με τον μη ειδικό ολικό β-αδρενεργικό αγωνιστή, ισοπροτερενόλη (Isoproterenol/ Iso). Στη συνέχεια, μετρήθηκε ο ρυθμός σύσπασης (beating rate) των μυοκαρδιοκυττάρων με γυμνό μάτι, κάτω από ανάστροφο μικροσκόπιο, πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη. Παρατηρήσαμε ότι τα *des*^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα έχουν υψηλότερο ρυθμό σύσπασης σε σύγκριση με τα *des*^{+/+} μυοκαρδιοκύτταρα και δεν ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη, καθώς παρουσιάζουν αύξηση του ρυθμού σύσπασης μόνο 11%, σε σύγκριση με τα *des*^{+/+} που παρουσιάζουν αύξηση 58% (Εικόνα 28).



b

NCMC	Conditions		% increase
	Control	Iso 100µM	
<i>des</i> ^{+/+}	48 (beats/30sec)	76 (beats/30sec)	58 %
<i>des</i> ^{-/-}	63.5 (beats/30sec)	70 (beats/30sec)	11 %

Εικόνα 28: Αντιπροσωπευτική επίδραση του β-αδρενεργικού αγωνιστή Iso στο ρυθμό σύσπασης των μυοκαρδιοκυττάρων (NCMC). Τα *des*^{-/-} NCMC έχουν υψηλότερο ρυθμό σύσπασης από τα *des*^{+/+} NCMC. Επώαση με Iso αυξάνει το ρυθμό σύσπασης 58% στα *des*^{+/+} NCMC και μόνο 11% στα *des*^{-/-} NCMC. (*P<0,005, †P>0.05 vs control).

2.2 Οι *des*^{-/-} *ex-vivo* καρδιές (3 μηνών) εμφανίζουν υψηλό καρδιακό παλμό και σύσπαση και δεν αποκρίνονται στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη

(Σε συνεργασία με το Χ. Τζίμα, εργαστήριο Δρ. Δ. Σανούδου, ΗΒΕΑΑ)

Στη συνέχεια, θέλαμε να ελέγξουμε εάν οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις μας ισχύουν και στην περίπτωση των απομονωμένων, *ex-vivo* καρδιών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μέτρηση του καρδιακού παλμού, της σύσπασης και της πίεσης, σε perfused καρδιές πριν και έπειτα από την επώαση με ισοπροτερενόλη, από *des*^{+/+} και *des*^{-/-} ποντίκια, 3 και 6 μηνών με το Langendorff σύστημα.

Οι perfused *des*^{-/-} καρδιές από ποντίκια ηλικίας 3 μηνών, παρομοίως με τα *des*^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα, εμφανίζουν υψηλότερο καρδιακό παλμό και σύσπαση σε σύγκριση με τις *des*^{+/+}. Επιπλέον, επώαση με ισοπροτερενόλη αυξάνει τον καρδιακό παλμό μόλις 17,5% στις *des*^{-/-} καρδιές και 45% στις *des*^{+/+} καρδιές, ενώ τη σύσπαση 50% και 79% αντίστοιχα. Από τα προαναφερθέντα προκύπτει ότι οι *des*^{-/-} καρδιές δεν αποκρίνονται τόσο αποτελεσματικά στη β-αδρενεργική διέγερση με ισοπροτερενόλη (Πίνακας 12).

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι perfused καρδιές από ποντίκια ηλικίας 6 μηνών και βρέθηκε ότι τόσο οι *des*^{-/-}, όσο και οι *des*^{+/+} perfused καρδιές, εμφανίζουν παρόμοιο καρδιακό παλμό και αποκρίνονται εξίσου αποτελεσματικά στην επώαση με ισοπροτερενόλη. Με την πάροδο της ηλικίας, οι *des*^{-/-} καρδιές παρουσιάζουν μειωμένη σύσπαση, αλλά αποκρίνονται εξίσου αποτελεσματικά με τις *des*^{+/+} καρδιές στην επώαση με Iso (Πίνακας 12).

Τέλος, μετρήθηκαν και τα επίπεδα πίεσης (Εικόνα 29) και βρέθηκε ότι οι perfused *des*^{-/-} καρδιές από ποντίκια 3 μηνών εμφανίζουν υψηλότερη πίεση σε σύγκριση με τις *des*^{+/+} και δεν αποκρίνονται τόσο αποτελεσματικά στην επώαση με Iso. Οι perfused *des*^{-/-} καρδιές από ποντίκια 6 μηνών δεν εμφανίζουν καμία αλλαγή στα επίπεδα της πίεσής τους, καθώς αυτή διατηρείται σταθερή σε σύγκριση με τις αντίστοιχες *des*^{-/-} καρδιές από ποντίκια 3 μηνών και δεν παρουσιάζει καμία αξιοσημείωτη μεταβολή πριν και έπειτα από επώαση με Iso.

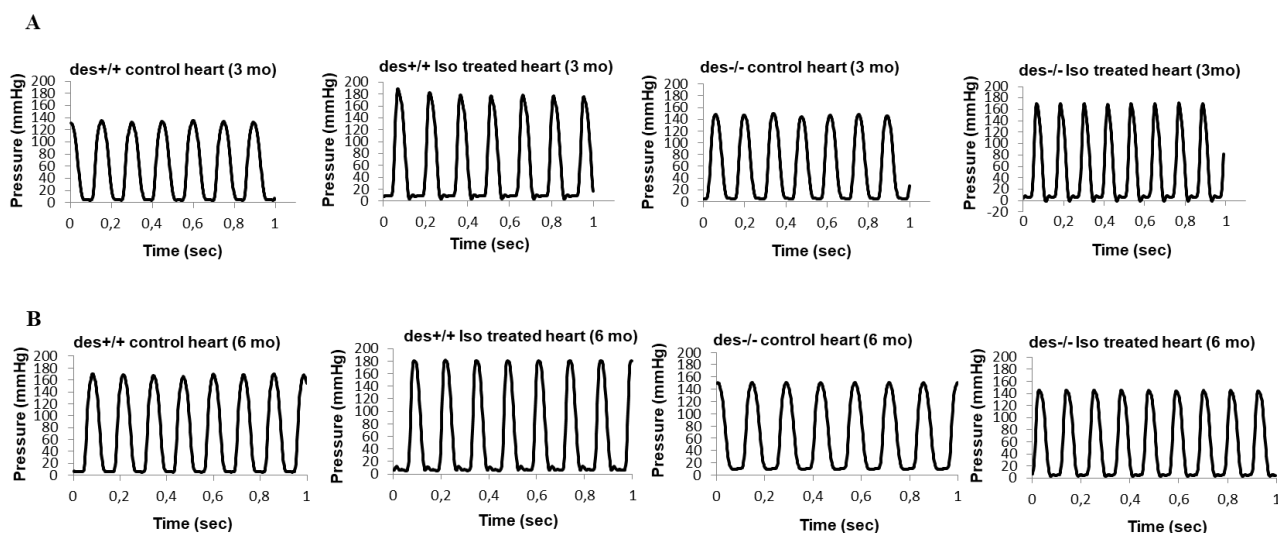
Επομένως, συνολικά τα *ex-vivo* αυτά αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα *in vitro* αποτελέσματα των *des*^{-/-} NCMC που αναφέρθηκαν προηγουμένως, καθώς οι *des*^{-/-} *ex-vivo* καρδιές (3 μηνών) εμφανίζουν υψηλό καρδιακό παλμό και σύσπαση και δεν αποκρίνονται αποτελεσματικά στη β-αδρενεργική διέγερση με

ισοπροτερενόλη. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι πιθανώς η διατάραξη του κυτταροσκελετού της δεσμίνης συνδέεται με την απευαισθητοποίηση στη β-αδρενεργική διέγερση.

Πίνακας 12: A και B. Αντιπροσωπευτική επίδραση του β-αδρενεργικού αγωνιστή Iso στον καρδιακό παλμό και στη σύσπαση σε perfused καρδιές από des^{-/-} και des^{+/+} ποντίκια 3 και 6 μηνών. Οι perfused des^{-/-} καρδιές εμφανίζουν υψηλότερο καρδιακό παλμό και σύσπαση σε σύγκριση με τις des^{+/+} και δεν αποκρίνονται τόσο αποτελεσματικά στην επώαση με Iso. Ωστόσο, οι des^{-/-} και des^{+/+} καρδιές από ποντίκια 6 μηνών εμφανίζουν παρόμοιο καρδιακό παλμό και αποκρίνονται εξίσου αποτελεσματικά στην επώαση με Iso.

A	Measurements	Des ^{+/+} heart (n=3, 3 mo old)			Des ^{-/-} heart (n=5, 3 mo old)		
		control	Iso 10μM	% change	control	Iso 10μM	% change
	Heart rate	378	548	45 %	454	533	17,5 %
	Contractility	5500	9830	79 %	7180	10781	50 %

B	Measurements	Des ^{+/+} heart (n=3, 6mo old)			Des ^{-/-} heart (n=6, 6 mo old)		
		control	Iso 10μM	% change	control	Iso 10μM	% change
	Heart rate	400	528	32 %	392	524	33,6 %
	Contractility	7015	10814	54 %	4894	7657	56,5 %



Εικόνα 29: Αντιπροσωπευτική επίδραση του β-αδρενεργικού αγωνιστή Iso στην πίεση σε perfused καρδιές από des^{-/-} και des^{+/+} ποντίκια 3 και 6 μηνών. Οι perfused des^{-/-} καρδιές από ποντίκια 3 μηνών εμφανίζουν υψηλότερη πίεση σε σύγκριση με τις des^{+/+} και δεν αποκρίνονται τόσο αποτελεσματικά στην επώαση με Iso. Οι perfused des^{-/-} καρδιές από ποντίκια 6 μηνών δεν εμφανίζουν καμία αλλαγή στα επίπεδα της πίεσης τους τόσο σε σύγκριση με τις αντίστοιχες des^{-/-} καρδιές από ποντίκια 3 μηνών, όσο και πριν και έπειτα από επώαση με Iso.

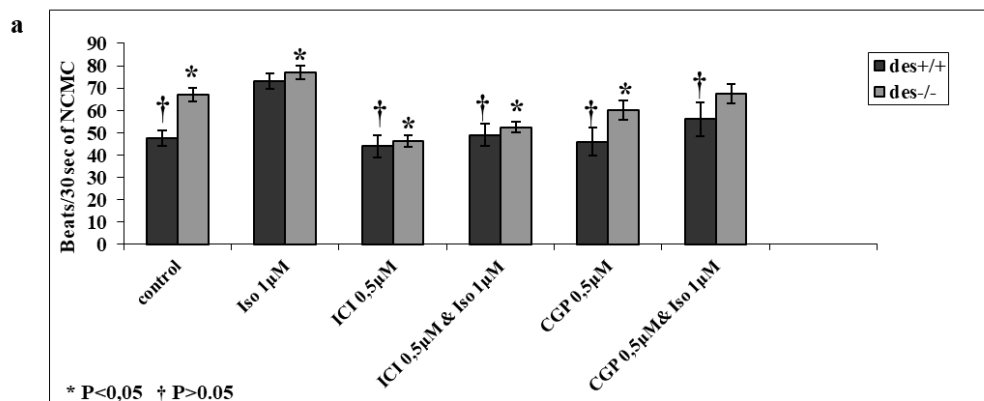
2.3 Ο υψηλός ρυθμός σύσπασης των des-/- μυοκαρδιοκυττάρων και η απευαισθητοποίηση στον β-αδρενεργικό αγωνιστή-ισοπροτερενόλη λαμβάνει χώρα πιθανόν μέσω των β2-ARs

Για να διερευνηθεί ποιος β-αδρενεργικός υποδοχέας είναι υπεύθυνος για τον υψηλό ρυθμό σύσπασης των des-/- μυοκαρδιοκυττάρων και την απευαισθητοποίηση στο β-αδρενεργικό αγωνιστή, μετρήθηκε ο ρυθμός σύσπασης των μυοκαρδιοκυττάρων με γυμνό μάτι, κάτω από ανάστροφο μικροσκόπιο, πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη, καθώς και με τον ειδικό β2-AR ανταγωνιστή (ICI 118,551) και τον ειδικό β1-AR ανταγωνιστή (CGP 20712A).

Ειδικότερα, βρέθηκε ότι επώαση μόνο με τους ειδικούς ανταγωνιστές ή ταυτόχρονα με Iso και τους ειδικούς ανταγωνιστές, στα des+/+ μυοκαρδιοκύτταρα δεν αλλάζει στατιστικά σημαντικά το ρυθμό σύσπασης σε σύγκριση με τα control κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, στα des-/- μυοκαρδιοκύτταρα, επώαση μόνο με τους ειδικούς ανταγωνιστές ή ταυτόχρονα με Iso και τους ειδικούς ανταγωνιστές επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ρυθμό σύσπασης σε σύγκριση τόσο με τα control κύτταρα, όσο και με τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με Iso.

Επιπλέον, σε des-/- μυοκαρδιοκύτταρα, ταυτόχρονη επώαση με τον ειδικό β2-AR ανταγωνιστή και Iso οδηγεί σε μείωση του ρυθμού σύσπασης, σε σύγκριση με τα control, η οποία είναι στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως, ταυτόχρονη επώαση με τον ειδικό β1-AR ανταγωνιστή και Iso επαναφέρει το ρυθμό σύσπασης των κυττάρων στα ίδια επίπεδα με τα control κύτταρα.

Από τα προαναφερθέντα, φαίνεται ότι πιθανόν ο β2-αδρενεργικός υποδοχέας και όχι ο β1-αδρενεργικός υποδοχέας, είναι υπεύθυνος για τον υψηλό ρυθμό σύσπασης των des-/- μυοκαρδιοκυττάρων και την απευαισθητοποίηση στο β-αδρενεργικό αγωνιστή (Εικόνα 30).



b

NCMC	Conditions					
	control	Iso 1µM	ICI 0,5 µM	ICI 0,5 µM & Iso 1µM	CGP 0,5µM	CGP 0,5µM & Iso 1µM
des+/+	47,5 (beats/30sec)	73 (beats/30sec)	44 (beats/30sec)	49 (beats/30sec)	46 (beats/30sec)	56 (beats/30sec)
des-/+	67 (beats/30sec)	77 (beats/30sec)	46,5 (beats/30sec)	52,5 (beats/30sec)	60 (beats/30sec)	67,5 (beats/30sec)

Εικόνα 30: Αντιπροσωπευτική επίδραση του β-αδρενεργικού αγωνιστή Iso και των ειδικών β1 και β2-AR ανταγωνιστών στο ρυθμό σύσπασης των des-/+ και des+/+ NCMC. Επώαση μόνο με τους ειδικούς ανταγωνιστές ή ταυτόχρονα με Iso και τους ειδικούς ανταγωνιστές: στα des+/+ μυοκαρδιοκύτταρα δεν αλλάζει σημαντικά το ρυθμό σύσπασης σε σύγκριση με τα control κύτταρα, ενώ στα des-/+ μυοκαρδιοκύτταρα επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό σύσπασης σε σύγκριση τόσο με τα control κύτταρα, όσο και με τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με Iso (*P<0,05, †P>0.05 vs control).

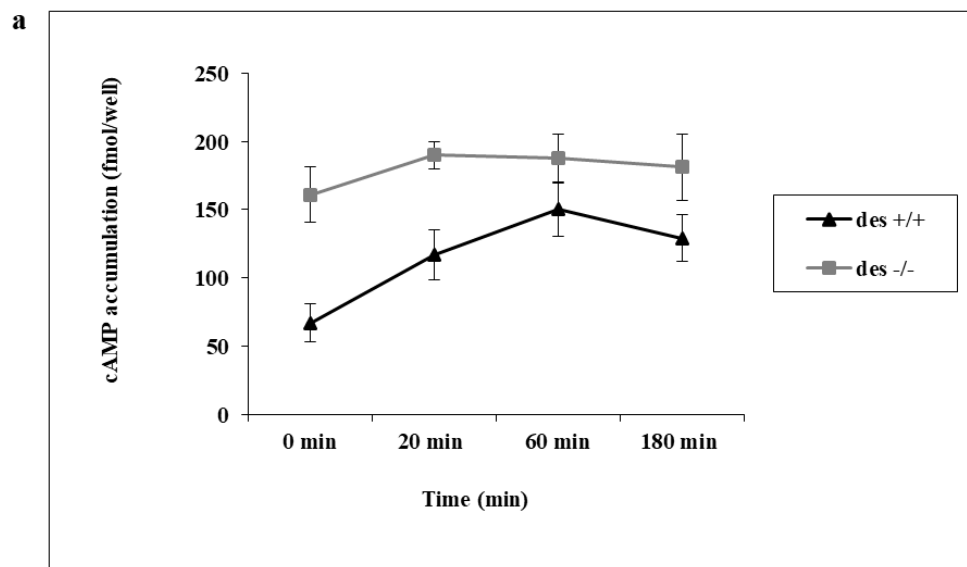
3. Τα des-/+ NCMC έχουν υψηλά επίπεδα c-AMP, τα οποία δεν μεταβάλλονται σημαντικά έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η πρόσδεση του αγωνιστή στον β-AR, οδηγεί στη διέγερση του υποδοχέα, στην ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και στη συσσώρευση του κυκλικού AMP (cyclic-AMP/c-AMP). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει διάφορα σημαντικά υποστρώματα.

Επομένως, σκοπός μας ήταν η μέτρηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου c-AMP σε NCMC, πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη, σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Σε κανονικές συνθήκες ελέγχου, τα des-/+ NCMC έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα c-AMP σε σύγκριση με τα des+/+NCMC. Είναι αξιωματικό ότι ο αυξημένος ρυθμός σύσπασης των des-/+ μυοκαρδιοκυττάρων, καθώς και ο υψηλός καρδιακός παλμός και σύσπαση των des-/+ καρδιών, είναι σε συμφωνία με τα αυξημένα επίπεδα του ενδοκυττάρου c-AMP (Εικόνα 31).

Επιπλέον, δείξαμε ότι στα *des*^{+/+} NCMC, όπως είναι αναμενόμενο, η επώαση με ισοπροτερενόλη οδηγεί σταδιακά σε αύξηση των επιπέδων του c-AMP. Τα *des*^{-/-} NCMC φαίνεται να μην αποκρίνονται στην επώαση με ισοπροτερενόλη, καθώς τα επίπεδα του c-AMP δεν μεταβάλλονται σημαντικά έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη (Εικόνα 31).

Η έλλειψη απόκρισης στη συσσώρευση του c-AMP, έπειτα από επώαση με τον β-αδρενεργικό αγωνιστή στα *des*^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα, είναι σε συμφωνία με την απευαισθητοποίηση στη σηματοδότηση του β-αδρενεργικού υποδοχέα. Πιθανώς το ικρίωμα της δεσμίνης και της AKAP-myospryn διαδραμματίζουν κάποιο ρόλο στην απευαισθητοποίηση του υποδοχέα.



b

NCMC	cAMP accumulation			
	0 min	20 min	60 min	180 min
Des^{+/+}	67	117	150	129
Des^{-/-}	161	190	187,5	181

Εικόνα 31: Επίδραση της επώασης με Iso στη συσσώρευση του c-AMP σε *des*^{-/-} και *des*^{+/+} NCMC, σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα *des*^{-/-} NCMC έχουν υψηλότερα επίπεδα c-AMP σε σύγκριση με τα *des*^{+/+} NCMC. Στα *des*^{+/+} NCMC η επώαση με Iso οδηγεί σταδιακά σε αύξηση των επιπέδων του c-AMP, την ίδια στιγμή που τα *des*^{-/-} NCMC φαίνεται να μην αποκρίνονται στην επώαση με Iso.

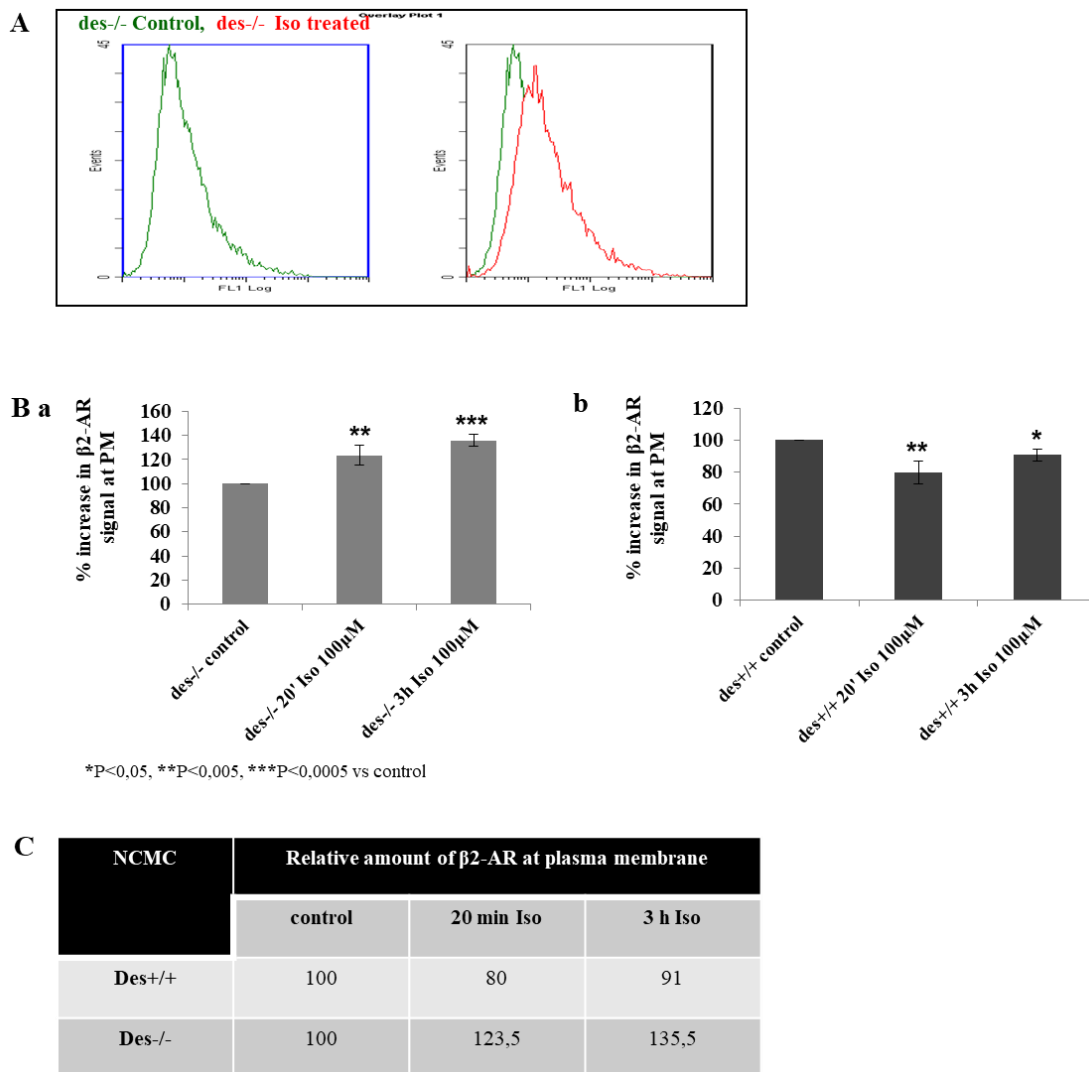
4. Η ανακύκλωση του β2 αδρενεργικού υποδοχέα είναι επηρεασμένη στα des-/- μυοκαρδιοκύτταρα

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η ενεργοποίηση της PKA, ως απόκριση στη β-αδρενεργική διέγερση έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του ίδιου του β2-AR υποδοχέα. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην απευαισθητοποίησή του και στην ενδοκύττωσή του σε ενδοσώματα με τη διαμεσολάβηση των arrestins, καθώς και την ανακύκλωση του υποδοχέα και την αποικοδόμησή του στα λυσοσώματα.

Θέλαμε λοιπόν, αρχικά να εξετάσουμε εάν ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ανακύκλωση του υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μέτρηση με κυτταρομετρία ροής (FACs ανάλυση) της σχετικής ποσότητας του β2-AR στην πλασματική μεμβράνη των des-/- και des+/+ μυοκαρδιοκυττάρων πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη για 20 min και 3 ώρες.

Ειδικότερα, όπως είναι αναμενόμενο, στα des+/+ μυοκαρδιοκύτταρα παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση του σήματος του β2-AR που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη, λόγω της ανακύκλωσης του υποδοχέα και της αποικοδόμησής του στα λυσοσώματα. Πιο συγκεκριμένα, στα 20 min επώασης παρατηρήθηκε μείωση 20%, ενώ στις 3 ώρες 9%. Αντίθετα, στα des-/- μυοκαρδιοκύτταρα παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση του σήματος του β2-AR που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη και πιο συγκεκριμένα η αύξηση του σήματος ήταν 23% στα 20 min και 35% έπειτα από 3 ώρες (Εικόνα 32).

Η σημαντική συσσώρευση του β2-αδρενεργικού υποδοχέα στη σαρκοπλασματική μεμβράνη των des-/- μυοκαρδιοκυττάρων έπειτα από επώαση με τον β-αδρενεργικό αγωνιστή ισοπροτερενόλη προτείνει έναν πιθανό ρόλο του κυτταροσκελετού της δεσμίνης, πιθανώς σε συνδυασμό με την AKAP λειτουργία της myospryn, στην ανακύκλωση του β2 αδρενεργικού υποδοχέα.

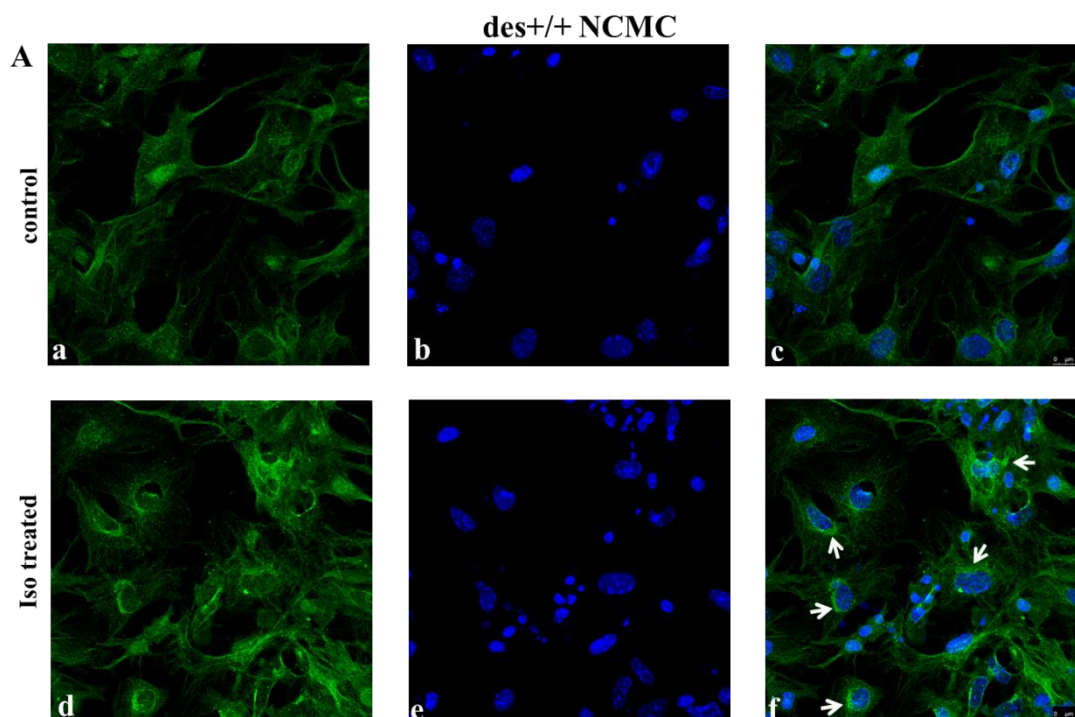


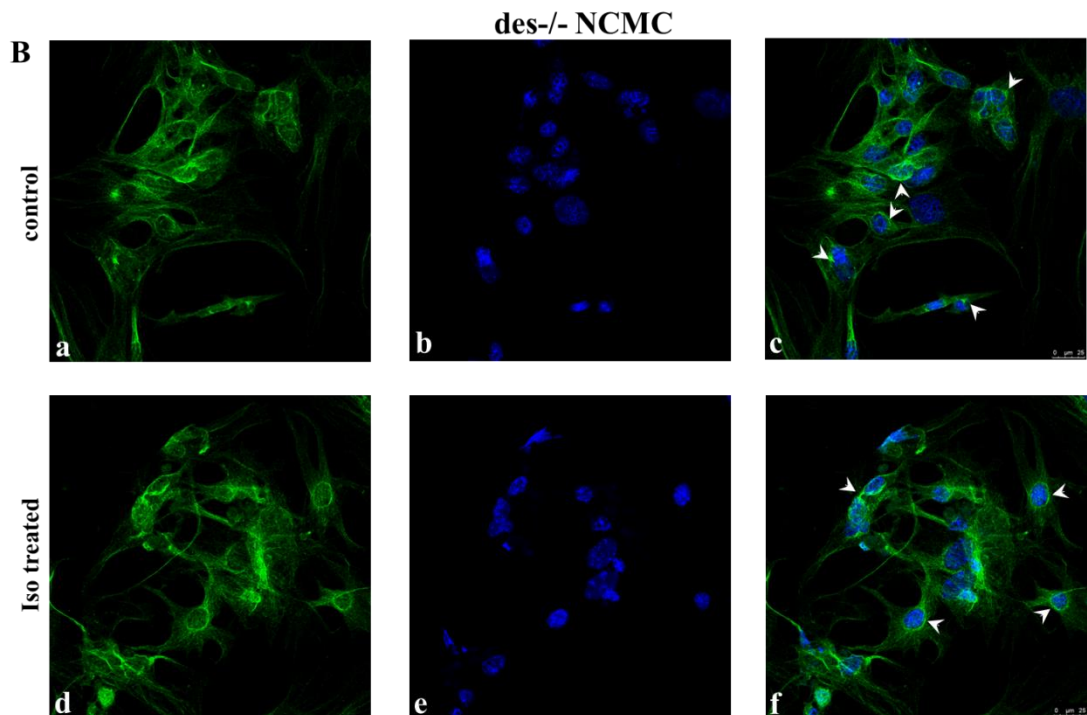
Εικόνα 32: Μελέτη της σχετικής ποσότητας του $\beta 2$ -AR που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη πριν και έπειτα από επώαση με Iso όπως μετρήθηκε με την ανάλυση FACs **A**. Υπερκάλυψη των ιστογραμμάτων (histogram overlap) από την ανάλυση FACs των des-/- NCMC πριν και έπειτα από επώαση με Iso. Στα des-/- NCMC παρατηρείται σημαντική αλλαγή στο σήμα του $\beta 2$ -AR στην πλασματική μεμβράνη, έπειτα από επώαση με Iso (100 μ M για 3 ώρες), όπως φαίνεται και από τη μετατόπιση στο ιστόγραμμα. **B** και **C**. Στα des-/- NCMC παρατηρείται σταδιακή αύξηση του σήματος του $\beta 2$ -AR που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη έπειτα από επώαση με Iso και πιο συγκεκριμένα η αύξηση είναι 20% έπειτα από 20 min και 35% έπειτα από 3 ώρες. Στα des+/+ NCMC παρατηρείται σταδιακή μείωση του σήματος του $\beta 2$ -AR που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη έπειτα από επώαση με Iso και πιο συγκεκριμένα η μείωση είναι 20% έπειτα από 20 min και 9% έπειτα από 3 ώρες. (*P<0,05, **P<0,005, ***P<0,0005 vs control).

Παράλληλα, εξετάσαμε εάν ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ανακύκλωση του υποδοχέα και με ανάλυση ανοσοφθορισμού. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες *des*^{+/+} και *des*^{-/-} μυοκαρδιοκυττάρων και μελετήθηκε ο εντοπισμός του υποδοχέα πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη (100μM για 1h).

Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι στα *des*^{+/+} μυοκαρδιοκύτταρα, χωρίς επώαση με ισοπροτερενόλη, ο υποδοχέας εντοπίζεται κυρίως στην περιφέρεια του κυττάρου (Εικόνα 33 A a,c). Επώαση με ισοπροτερενόλη για 1h, οδηγεί στην ενδοκύττωση του υποδοχέα και τον εντοπισμό του στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα (Εικόνα 33 λευκά βέλη Af). Από την άλλη πλευρά, στα *des*^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα, χωρίς επώαση με ισοπροτερενόλη, ο υποδοχέας έχει πιο έντονο περι-πυρηνικό εντοπισμό (juxtannuclear) (Εικόνα 33 λευκές κεφαλές βέλων Bc) σε σύγκριση με τα *des*^{+/+} μυοκαρδιοκύτταρα. Επώαση με ισοπροτερενόλη δεν αλλάζει δραμαματικά την τοπολόγηση του υποδοχέα, καθώς αυτός συνεχίζει να εντοπίζεται στην περιπυρηνική περιοχή (Εικόνα 33 λευκές κεφαλές βέλων Bf).

Από την ανάλυση των εικόνων του ανοσοφθορισμού φαίνεται ότι το ικρίωμα που σχηματίζει ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης (με την AKAP myospryn) πιθανώς να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον εντοπισμό και την ανακύκλωση του υποδοχέα.





Εικόνα 33: Ο εντοπισμός του β_2 -AR στα μυοκαρδιοκύτταρα πριν και έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη. **A.** Στα $des^{+/+}$ μυοκαρδιοκύτταρα, χωρίς επώαση με ισοπροτερενόλη, ο υποδοχέας βρίσκεται κυρίως στην περιφέρεια του κυττάρου (A a,c). Επώαση με ισοπροτερενόλη, οδηγεί στην ενδοκύττωση του υποδοχέα στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα (λευκά βέλη Af). **B.** Στα $des^{-/-}$ μυοκαρδιοκύτταρα, χωρίς επώαση με ισοπροτερενόλη, ο υποδοχέας εντοπίζεται στην περι-πυρηνική περιοχή (juxtannuclear) (λευκές κεφαλές βέλων Bc). Επώαση με ισοπροτερενόλη δεν αλλάζει δραματικά την τοπολόγηση του υποδοχέα, καθώς συνεχίζει να εντοπίζεται στην περιπυρηνική περιοχή (λευκές κεφαλές βέλων Bf). Μπάρες κλίμακας: 25 μm .

Δημιουργία μοντέλων ποντικών για τις *in vivo* μελέτες

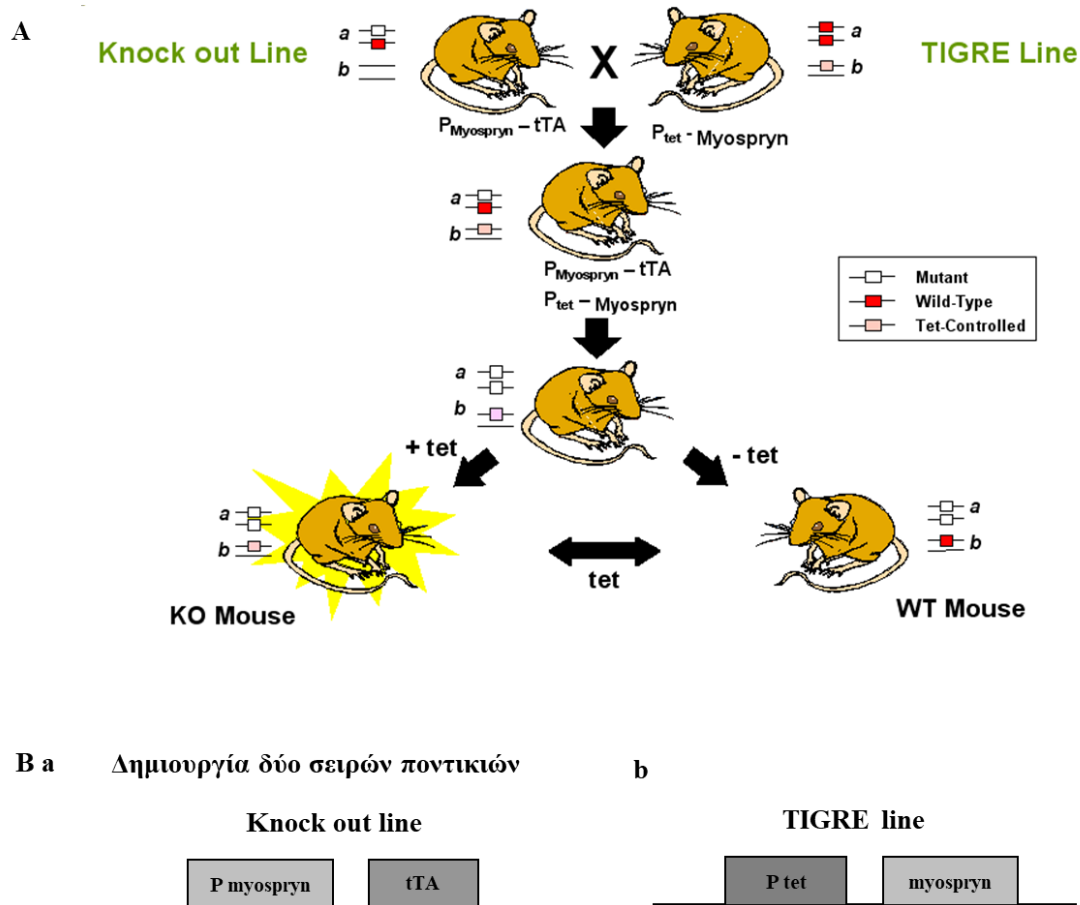
5. Σύνοψη στρατηγικής για την απενεργοποίηση του γονιδίου της *myospryn*

Για να διερευνήσουμε το ρόλο της *myospryn in vivo* και τη σημασία της αλληλεπίδρασης της δεσμίνης με τη *myospryn*, απενεργοποιήσαμε το γονίδιο της *myospryn*, χρησιμοποιώντας ένα επαγόμενο tet-off σύστημα διπλού χτυπήματος (two-hit conditional tet-off system). Το σύστημα αυτό αποτελεί μια διπλή προσέγγιση που βασίζεται στη τεχνολογία που εξασφαλίζει ρυθμιζόμενη και εξαρτώμενη έκφραση από την τετρακυκλίνη. Περιλαμβάνει τη δημιουργία και τη διασταύρωση δύο σειρών ποντικών (Εικόνα 34):

α) της knock out σειράς όπου έχουμε έκφραση του tTA (Tet-transactivator) στη θέση του γονιδίου της *myospryn* (Εικόνα 34 Ba) και

β) της TIGRE (tightly regulated) σειράς για αυστηρά ρυθμιζόμενη έκφραση του γονιδίου της *myospryn* υπό τον έλεγχο του Tet στοιχείου απόκρισης (Tet-responsive element-TRE) (Εικόνα 34 Bb).

Όταν οι δύο αυτές σειρές διασταυρωθούν, knock out και TIGRE σειρά το στοιχείο tTA προσδένεται στον υποκινητή tetO με αποτέλεσμα να έχουμε έκφραση του γονιδίου στόχου. Σημειώνεται ότι παρουσία τετρακυκλίνης (tertacycline)/δοξικυκλίνης (doxycycline) η transactivating protein-tTA δεν προσδένεται στην αλληλουχία του χειριστή της τετρακυκλίνης (tetO), καταστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφή του γονιδίου της *myospryn*.



Εικόνα 34: Α. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας του conditional knock out μοντέλου της myospryn έπειτα από διασταύρωση της knock out σειράς και της TIGRE σειράς. Β. Σχηματική αναπαράσταση των φορέων στόχευσης των δύο σειρών.

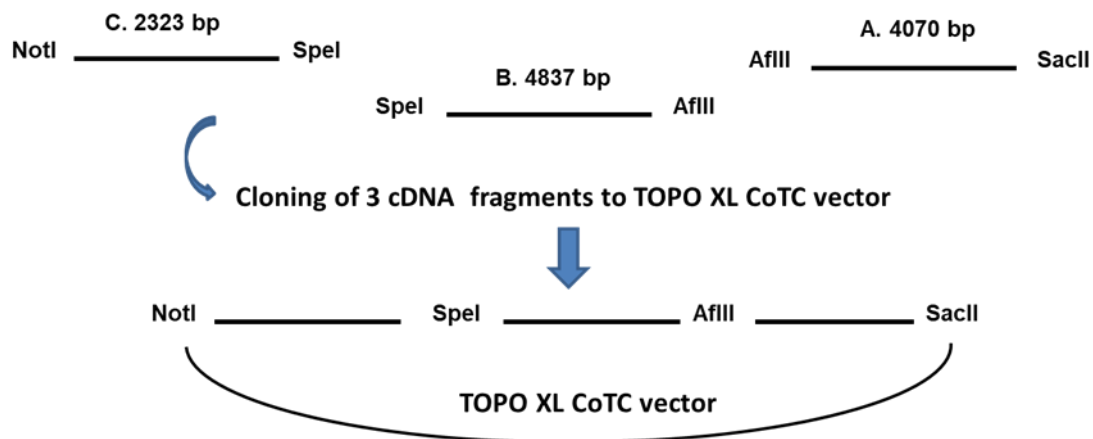
5.1 Κατασκευή του φορέα στόχευσης της TIGRE σειράς διαγονιδιακών ποντικών

Για τη δημιουργία της TIGRE διαγονιδιακής σειράς κατασκευάστηκε ο φορέας στόχευσης (targeting vector) της σειράς tetO-myospryn, όπου η έκφραση της myospryn ελέγχεται από τον tetO υποκινητή. Για να εξασφαλιστεί αυστηρός έλεγχος της myospryn από τον tetO υποκινητή εκατέρωθεν της κασέτας έκφρασης tetO-myospryn έχουν συμπεριληφθεί από δύο μονωτές (insulators). Οι μονωτές χρησιμοποιούνται έτσι ώστε να αποφευχθεί η μεταγραφική διαρροή.

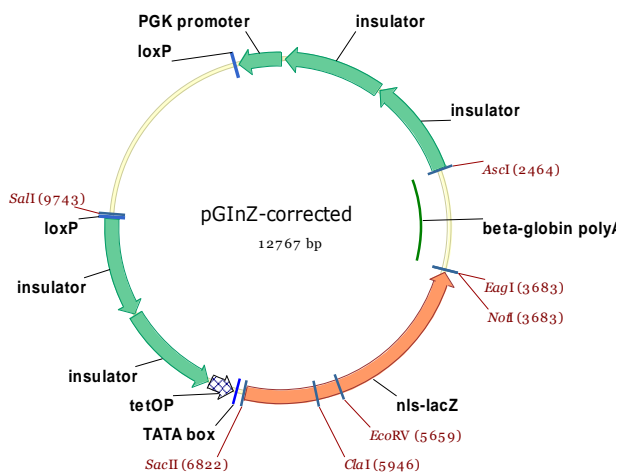
Αρχικά, λοιπόν κλωνοποιήθηκαν σταδιακά σε τρία βήματα, τα τρία τμήματα του cDNA της myospryn (τμήματα A, B και C) (βλέπε παράρτημα) στον TOPO XL φορέα (βλέπε Παράρτημα) (Εικόνα 35) και στη συνέχεια, ολόκληρο πλέον το cDNA

της *myospryn* υποκλωνοποιήθηκε στον pGlnZ φορέα (ευγενική χορηγία Δρ. Δ. Βασιλάτη) (βλέπε Παράρτημα), ο οποίος περιέχει όλα τα στοιχεία (τον tetO υποκινητή και τους μονωτές) που απαιτούνται για τη δημιουργία του φορέα στόχευσης της TIGRE διαγονιδιακής σειράς (Εικόνα 36).

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται συνοπτικά η στρατηγική για την κατασκευή του targeting vector της TIGRE διαγονιδιακής σειράς.



Εικόνα 35: Σχηματική αναπαράσταση των τριών τμημάτων του cDNA της *myospryn* -τμήματα A, B και C (fragments A, B, C)-, φέροντας πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού με σκοπό να πραγματοποιηθεί σταδιακά (σε 3 βήματα) η κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών στον TOPO XL φορέα.



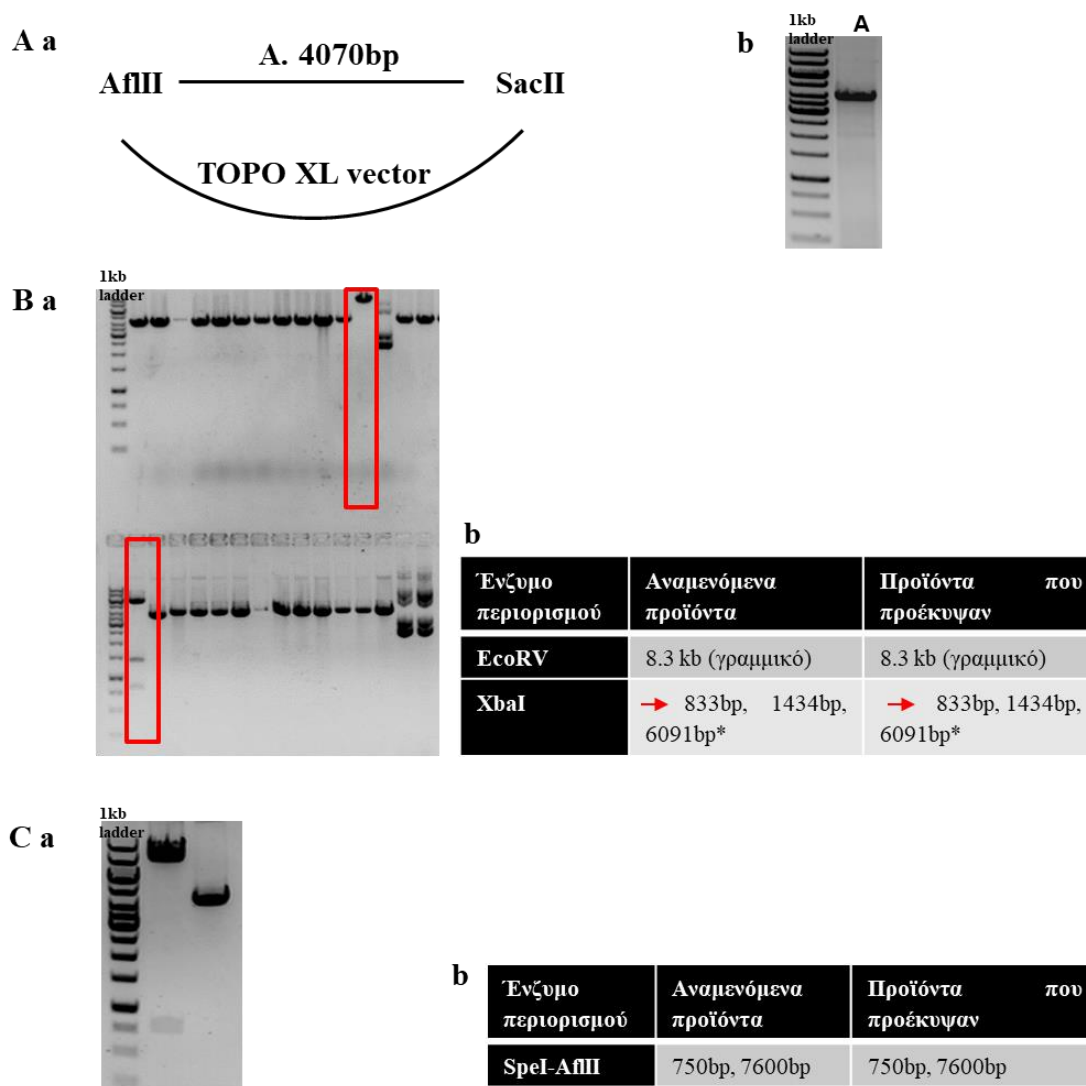
Εικόνα 36: Ο pGlnZ πλασμιδιακός φορέας. Σχηματική απεικόνιση των στοιχείων που απαιτούνται για τη δημιουργία του φορέα στόχευσης της TIGRE διαγονιδιακής σειράς: i) ο tetO υποκινητής (tetO) και ii) οι μονωτές (insulators) εκατέρωθεν των οποίων θα κλωνοποιηθεί το cDNA της *myospryn*.

5.1.1 Κλωνοποίηση του τμήματος A του cDNA της myospryn στον TOPO XL φορέα

Το τμήμα A (fragment A) του cDNA της myospryn, μεγέθους 4.070bp (Εικόνα 35 ανωτέρω), πολλαπλασιάστηκε με PCR με κατάλληλους εκκινητές που φέρουν πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού, και πιο συγκεκριμένα των ενζύμων AfIII και SacII. Το AfIII είναι ενδογενές ένζυμο περιορισμού του cDNA της myospryn και διαθέτει μια μοναδική θέση περιορισμού στο cDNA της. Όσον αφορά το SacII, προστέθηκε στον άλλον εκκινητή με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στο στάδιο της υποκλωνοποίησης στον pGlnZ φορέα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR και απομόνωση και καθαρισμός του από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction). Επιπρόσθετα, ο TOPO XL φορέας επώαστηκε αρχικά με το ένζυμο περιορισμού EcoRV με σκοπό να γίνει γραμμικός, στη συνέχεια επώαστηκε με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση με σκοπό να αποφωσφορυλιωθεί και να αποτραπεί η επανασύνδεσή του και τέλος, απομονώθηκε και καθαρίστηκε από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction). Το τμήμα A του cDNA της myospryn και ο TOPO XL φορέας έπειτα από τις προαναφερθείσες διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση σύνδεσης (ligation).

Ο έλεγχος της επιτυχούς κλωνοποίησης του τμήματος A στον TOPO XL φορέα πραγματοποιήθηκε τόσο με διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού EcoRV, XbaI και SpeI-AfIII, όσο και με αλληλούχιση (sequencing) (Εικόνα 37).



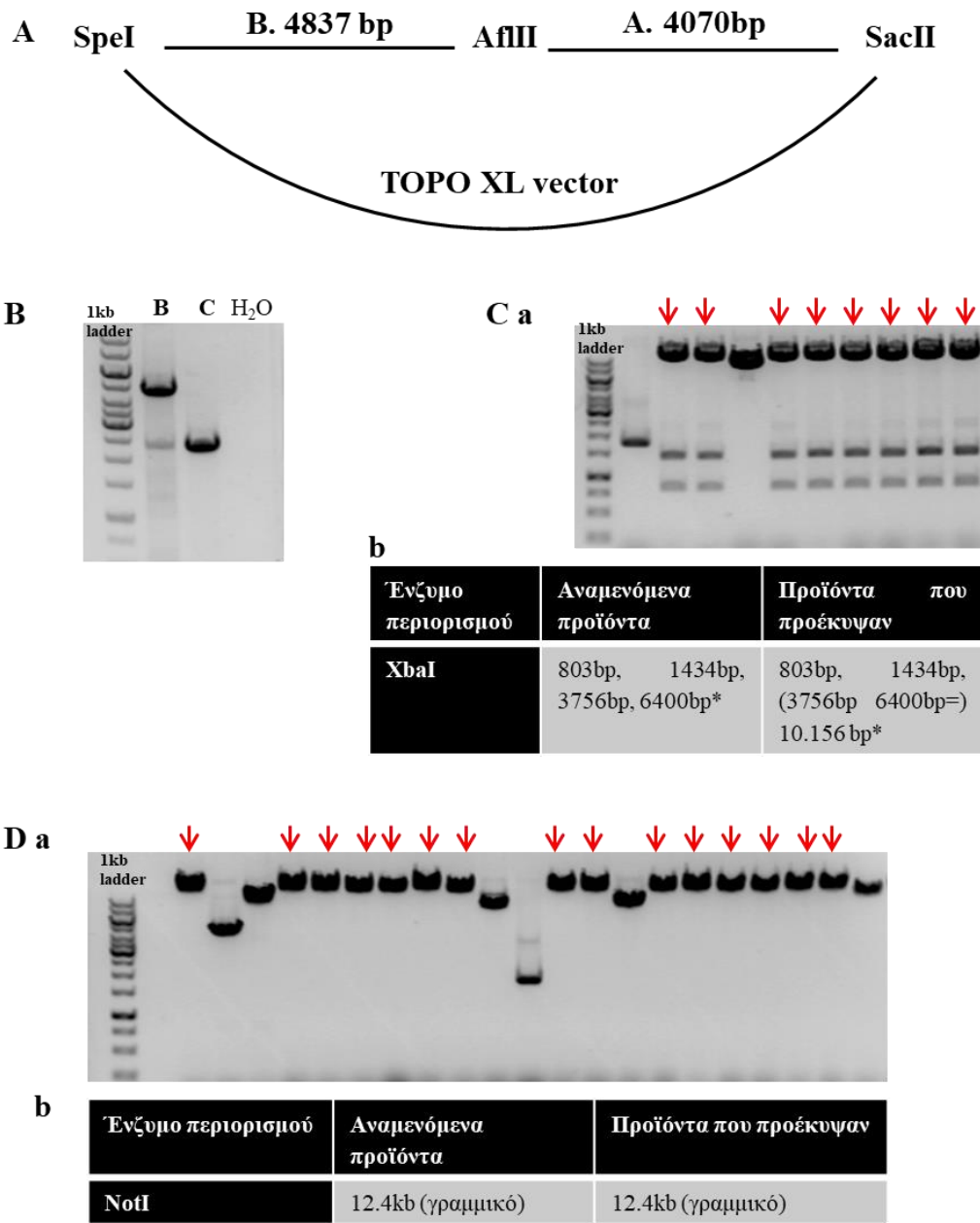
Εικόνα 37: **A.** Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος A (A fragment) του cDNA της myospryn που φέρει πλευρικά τα ένζυμα περιορισμού AflIII και SacII και του TOPO XL φορέα. Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR για το τμήμα A του cDNA της myospryn. **B.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το τμήμα A του cDNA της myospryn- με τα ένζυμα περιορισμού EcoRV (επάνω μέρος της εικόνας) και XbaI (κάτω μέρος της εικόνας), και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. *Σημείωση: Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει τη φορά της κλωνοποίησης που είναι και η επιθυμητή. Με το κόκκινο πλαίσιο επισημαίνεται ο θετικός κλώνος που έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα. Το ένζυμο περιορισμού XbaI εμφανίζει ευαισθησία στη μεθυλίωση. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το τμήμα A του cDNA της myospryn- με τα ένζυμα περιορισμού SpeI-AflIII και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Στο δεξί πηγαδάκι παρατηρούμε την ηλεκτροφορητική ανάλυση ενός αρνητικού κλώνου.

5.1.2 Κλωνοποίηση του τμήματος B του cDNA της myospryn στον TOPO XL/A φορέα

Το τμήμα B (fragment B) του cDNA της myospryn, μεγέθους 4.837bp (Εικόνα 35 ανωτέρω), πολλαπλασιάστηκε με PCR με κατάλληλους εκκινητές που φέρουν πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού, και πιο συγκεκριμένα των ενζύμων SpeI και AflIII. Σημειώνεται ότι τόσο το SpeI, όσο και το AflIII είναι ενδογενή ένζυμα περιορισμού του cDNA της myospryn και διαθέτουν το καθένα μια μοναδική θέση περιορισμού στο cDNA της.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του προϊόντος της PCR και του TOPO XL/A φορέα με AflIII και SpeI, έτσι ώστε να είναι εφικτή η αντίδραση σύνδεσης με κολλώδη άκρα (sticky end ligation). Και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε επώαση του TOPO XL/A φορέα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση με σκοπό να αποφωσφορυλιωθεί και να αποτραπεί η επανασύνδεσή του, ηλεκτροφόρηση τόσο του TOPO XL/A φορέα, όσο και του προϊόντος της PCR και απομόνωση και καθαρισμός τους από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).

Ο έλεγχος της επιτυχούς κλωνοποίησης του τμήματος B στον TOPO XL/A φορέα πραγματοποιήθηκε τόσο με διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού XbaI και NotI, όσο και με αλληλούχιση (sequencing) (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: **A.** Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος B (B fragment) του cDNA της myospryn που φέρει πλευρικά τα ένζυμα περιορισμού AfIII και SpeI και του TOPO XL/A φορέα. **B.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR για τα τμήματα B και C του cDNA της myospryn. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL/A φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το τμήμα B του cDNA της myospryn- με το ένζυμο περιορισμού XbaI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Με το κόκκινο βελάκι επισημαίνονται οι θετικοί κλώνοι που έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα. *Σημείωση: Το ένζυμο περιορισμού XbaI εμφανίζει ευαισθησία στη μεθυλίωση. **D.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της πέψης -του TOPO XL/A φορέα, στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το τμήμα B του cDNA της myospryn- με το ένζυμο περιορισμού NotI και παρατήρηση του αναμενόμενου προϊόντος. Με το κόκκινο βελάκι επισημαίνονται οι θετικοί κλώνοι που έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα.

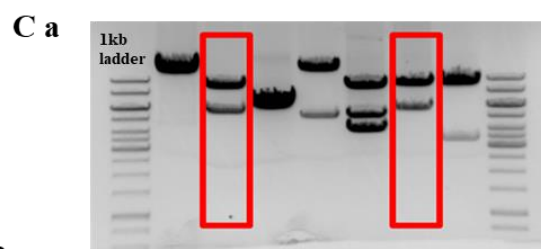
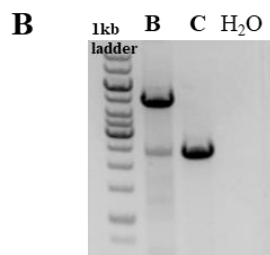
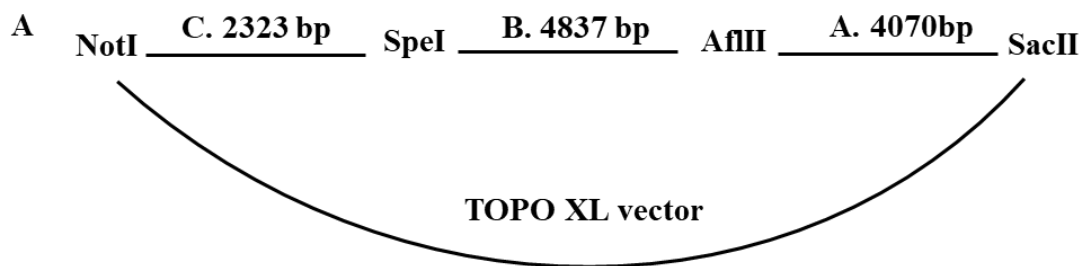
5.1.3 Κλωνοποίηση του τμήματος C του cDNA της myosrygn στον TOPO XL

A/B φορέα

Το τμήμα C (fragment C) του cDNA της myosrygn μεγέθους 2.323bp (Εικόνα 35 ανωτέρω), πολλαπλασιάστηκε με PCR με κατάλληλους εκκινητές που φέρουν πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού, και πιο συγκεκριμένα των ενζύμων SpeI και NotI. Σημειώνεται ότι το SpeI είναι ενδογενές ένζυμο περιορισμού του cDNA της myosrygn και διαθέτει μια μοναδική θέση περιορισμού στο cDNA της. Όσον αφορά το NotI, προστέθηκε στον άλλον εκκινητή με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στο στάδιο της υποκλωνοποίησης στον pGlnZ φορέα.

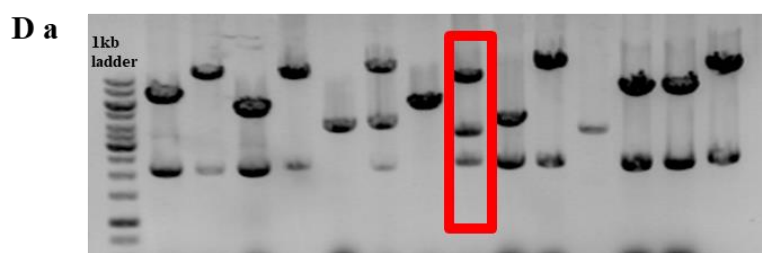
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR και απομόνωση και καθαρισμός του από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction). Στον TOPO XL A/B φορέα αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού MluI, ακολούθησε η διαδικασία του «γεμίσματος-fill in» με το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I και κατακρήμνιση με χλωροφόρμιο-φαινόλη-ισομυλική αλκοόλη. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού SpeI και επώαση του φορέα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση με σκοπό να αποφωσφορυλιωθεί και να αποτραπεί η επανασύνδεσή του. Τέλος, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του TOPO XL A/B φορέα και απομόνωση και καθαρισμός του από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction). Το τμήμα C του cDNA της myosrygn και ο TOPO XL A/B φορέας, έπειτα από τις προαναφερθείσες διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση σύνδεσης (ligation).

Ο έλεγχος της επιτυχούς κλωνοποίησης του τμήματος C στον TOPO XL A/B φορέα πραγματοποιήθηκε τόσο με διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού SacII-SpeI και EcoRV-NotI, όσο και με αλληλούχιση (sequencing) (Εικόνα 39). Είναι απαραίτητη και σπουδαία η αλληλούχιση ολόκληρου του cDNA της myosrygn, καθώς δεν πρέπει να φέρει καμία μετάλλαξη, έτσι ώστε να εκφράζεται κανονικά στην TIGRE διαγονιδιακή σειρά.



b

Ένζυμο περιορισμού	Αναμενόμενα προϊόντα	Προϊόντα που προέκυψαν
SacII-SpeI	5823bp, 8907bp	5823bp, 8907bp



c

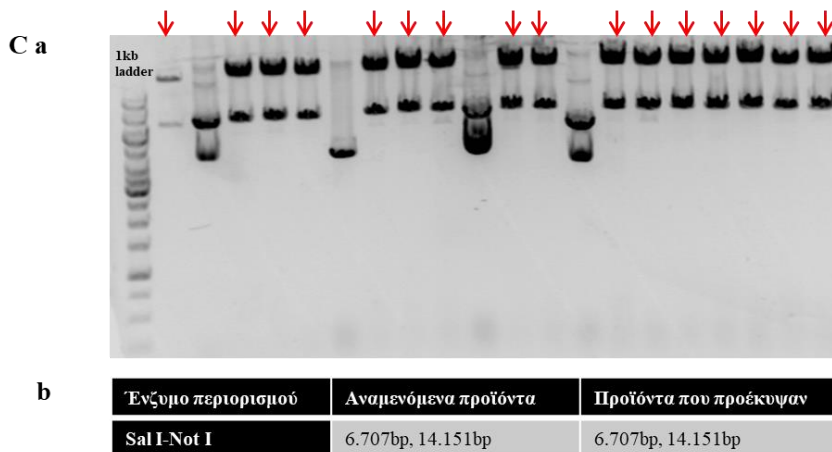
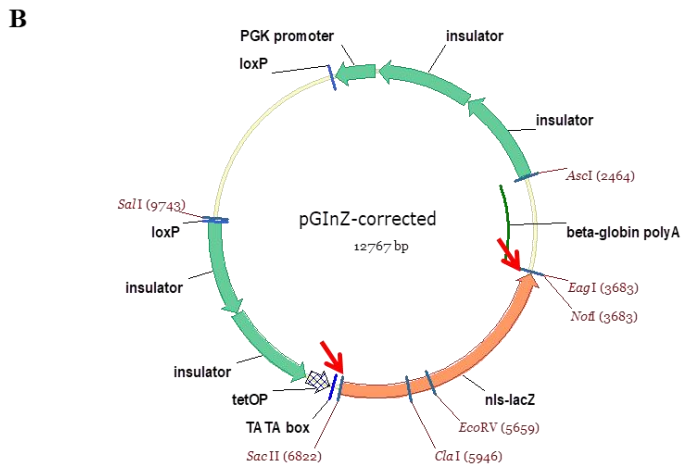
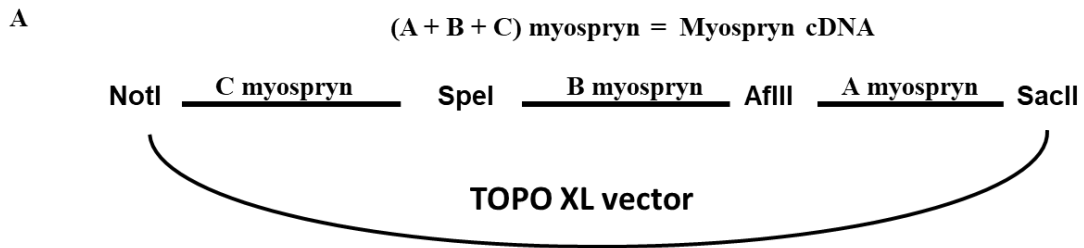
Ένζυμο περιορισμού	Αναμενόμενα προϊόντα	Προϊόντα που προέκυψαν
EcoRV-NotI	2500bp, 3500bp, 8730bp	2500bp, 3500bp, 8730bp

Εικόνα 39: **A.** Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος C (C fragment) του cDNA της myospryn που φέρει πλευρικά τα ένζυμα περιορισμού SpeI και NotI και του TOPO XL A/B φορέα. **B.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR για τα τμήματα B και C του cDNA της myospryn. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL A/B φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το τμήμα C του cDNA της myospryn- με τα ένζυμα περιορισμού SacII-SpeI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Με το κόκκινο πλαίσιο επισημαίνονται οι θετικοί κλώνοι που έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα. **D.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL A/B φορέα, στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το τμήμα C του cDNA της myospryn- με τα

ένζυμα περιορισμού EcoRV-NotI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Με το κόκκινο πλαίσιο επισημαίνονται οι θετικοί κλώνοι που έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα.

6. Υποκλωνοποίηση του φορέα στόχευσης από τον TOPO XL στον pGlnZ φορέα

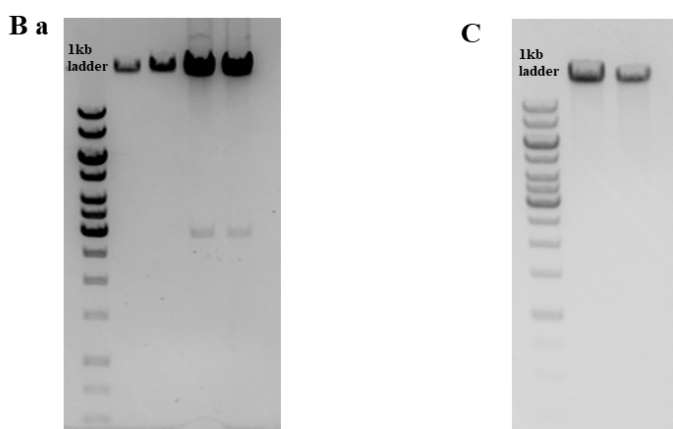
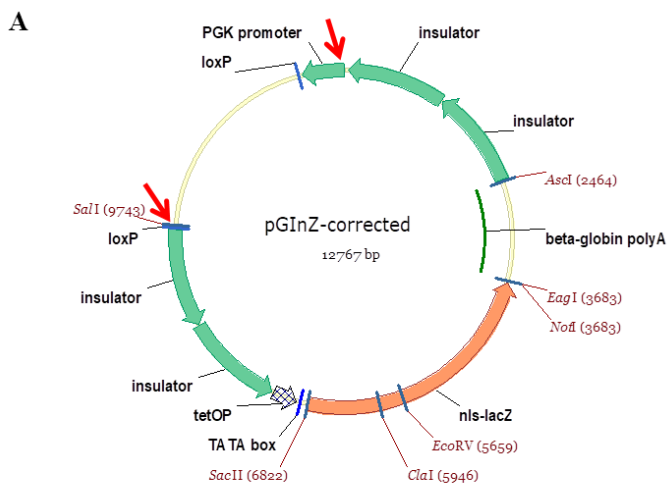
Πραγματοποιήθηκε επιτυχής κλωνοποίηση των τμημάτων A, B και C του cDNA της *myospryn* στον TOPO XL φορέα μέσω αντίδρασης σύνδεσης (ligation). Ο έλεγχος της επιτυχούς κλωνοποίησης έγινε τόσο με διαγνωστικές πέψεις όπου όλοι οι συνδυασμοί ενζύμων περιορισμού έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα, όσο και με αλληλούχιση (sequencing) του φορέα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του TOPO XL A/B/C φορέα με NotI και SacII, έτσι ώστε να προκύψει ο φορέας στόχευσης που θα υποκλωνοποιηθεί με αντίδραση σύνδεσης με κολλώδη άκρα στον pGlnZ φορέα. Να σημειωθεί ότι από τον pGlnZ φορέα έχουμε προηγουμένως αφαιρέσει το *lacZ* με κατάλληλη πέψη (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: **A.** Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων A, B και C του cDNA της myospryn που φέρουν πλευρικά τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίησή τους στον TOPO XL φορέα. **B.** Ο pGlnZ πλασμιδιακός φορέας. Με κόκκινο βέλος επισημαίνονται τα ένζυμα περιορισμού SacII και NotI που χρησιμοποιήθηκαν για την απομάκρυνση του lacZ. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης του pGlnZ φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί ο φορέας στόχευσης της myospryn με τα ένζυμα περιορισμού SalI-NotI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Με το κόκκινο βέλος επισημαίνονται οι θετικοί κλώνοι που έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα.

Πραγματοποιήθηκε επιτυχής υποκλωνοποίηση του cDNA της myospryn από τον TOPO XL φορέα στον pGlnZ φορέα, ο οποίος περιέχει όλα τα στοιχεία (τον tetO υποκινητή και τους μονωτές) που απαιτούνται για τη δημιουργία του φορέα στόχευσης της TIGRE διαγονιδιακής σειράς.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pGlnZ που περιέχει το cDNA της myospryn με τα ένζυμα περιορισμού SalI και AgeI με σκοπό την απομάκρυνση αλληλουχιών προκαρυωτικού DNA (origin of replication, ampicillin resistance και PGK promoter). Το προκαρυωτικό DNA θα πρέπει να απομακρυνθεί, καθώς μπορεί να αυξήσει τη θνησιμότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων που θα πραγματοποιηθούν οι ενέσεις για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήσαμε μετά την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SalI και AgeI, ήταν κατακρήμνιση με χλωροφόρμιο-φαινόλη-ισομυλική αλκοόλη, ηλεκτροφόρηση σε low melt gel αγαρόζη, απομόνωση της επιθυμητής ζώνης μεγέθους περίπου 18kb, επώαση με το ένζυμο β-αγαράση και τέλος, κατακρήμνιση του DNA και επαναιώρησή του σε διάλυμα για ενέσεις με σκοπό θα ενεθεί σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων (Εικόνα 41).



b

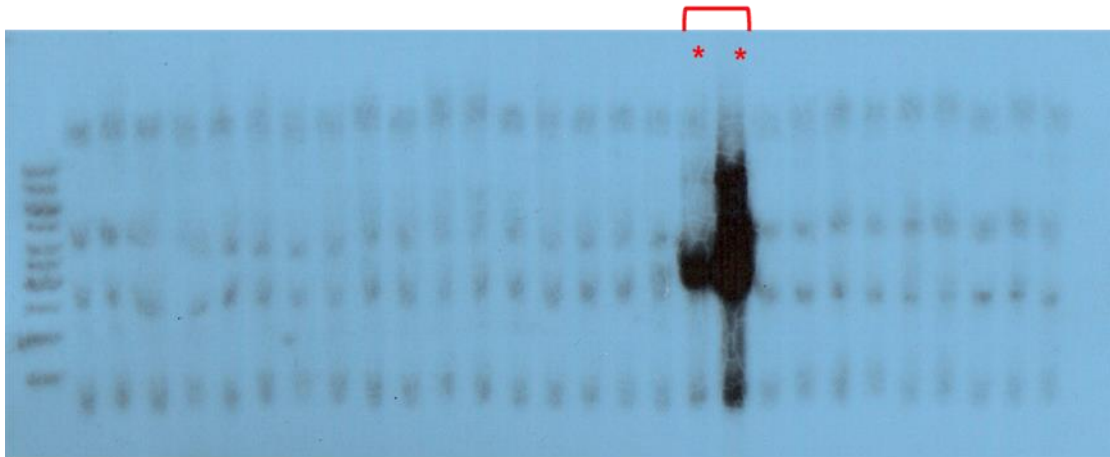
Ένζυμο περιορισμού	Αναμενόμενα προϊόντα	Προϊόντα που προέκυψαν
AgeI	20.858bp (γραμμικό)	20.858bp (γραμμικό)
AgeI-SalI	2.905bp, 17.953bp	2.905bp, 17.953bp

Εικόνα 41: **A.** Ο pGlnZ πλασμιδιακός φορέας. Με κόκκινο βέλος επισημαίνονται τα ένζυμα περιορισμού SalI και AgeI που χρησιμοποιήθηκαν για την απομάκρυνση των αλληλουχιών του προκαρυωτικού DNA. **B.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης του pGlnZ φορέα, στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το cDNA της myosrpn με τα ένζυμα περιορισμού AgeI και AgeI-SalI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του φορέα στόχευσης της TIGRE διαγονιδιακής σειράς μεγέθους περίπου 18kb που θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών.

Έπειτα από τις προαναφερθείσες διαδικασίες ο φορέας στόχευσης της TIGRE διαγονιδιακής σειράς ενέθηκε σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων στελέχους C57BL/6J με τη συνήθη τεχνική δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών (Gordon JW et al. 1980).

7. Δημιουργία της TIGRE διαγονιδιακής σειράς - tetOmyo

Ο φορέας στόχευσης της TIGRE διαγονιδιακής σειράς (βλέπε παράρτημα) ενέθηκε σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων στελέχους C57BL/6J με τη συνήθη τεχνική δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών (Gordon JW et al. 1980) και όπως αυτή περιγράφεται συνοπτικά στο κεφάλαιο 4 στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Προέκυψαν δύο διαγονιδιακές σειρές ποντικών, η tetOmyo 1 και η tetOmyo 2 (Εικόνα 42).



Εικόνα 42: Southern blot ανάλυση των διαγονιδιακών ποντικών της TIGRE διαγονιδιακής σειράς. Παρατηρούμε με κόκκινο αστεράκι τους δύο θετικούς ιδρυτές αποικίας (founders).

Τέλος, τα ποντίκια της TIGRE διαγονιδιακής σειράς -tetO-myospryn- θα μπορούν να διασταυρωθούν με τα ετερόζυγα ποντίκια για τη myospryn της knock out σειράς -myospryn-tTA-, για να προκύψει το conditional knock out μοντέλο της myospryn για ενεργοποίηση/αδρανοποίηση του γονιδίου της κατά βούληση.

8. Κατασκευή του φορέα στόχευσης της myospryn knock out σειράς ποντικών

8.1 Κατασκευή του φορέα στόχευσης μέσω ανασυνδυασμού σε BAC κλώνους

Για την κατασκευή του φορέα στόχευσης της knock out σειράς myospryn-tTA χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pMOSStTA (ευγενική χορηγία Δρ. Δ. Βασιλάτη) (βλέπε Παράρτημα) που περιέχει όλα τα στοιχεία ('tTA-PGK-neo-pA') που απαιτούνται για τη δημιουργία του φορέα αυτού. Για να εξασφαλιστεί η πλήρης αδρανοποίηση του γονιδίου της myospryn, καθοδικά των σημάτων πολυανδενυλίωσης του φορέα pMOSStTA, κλωνοποιήθηκε ένας αποσιωπητής της μεταγραφής (transcriptional terminator) (Ευγενική χορηγία NJ. Proudfoot) (βλέπε παράρτημα) (Dye MJ et al. 2001) και προέκυψε η κασέτα έκφρασης (cassette/CST) 'tTA-PGK-neo-pA-term'.

Ο φορέας στόχευσης θα πρέπει να περικλείεται από αλληλουχίες ομολογίας της myospryn (μεγέθους 3 και 5 kb περίπου), για να πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός στην επιθυμητή περιοχή στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES cells). Οι περιοχές αυτές θα πρέπει να προέρχονται από BAC κλώνους, των οποίων το DNA να είναι ισογονιδιακό με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Σημειώνεται ότι χρησιμοποιήθηκαν δύο BAC κλώνοι, ο πρώτος 129SV (bMQ-427A5), ο οποίος όμως δεν περιείχε το 1ο εξόνιο της myospryn και ο δεύτερος C57/B16 (RP23-237P18) που περιέχει ολόκληρη τη γενωμική αλληλουχία της myospryn.

Σε πρώτο στάδιο, στην κασέτα έκφρασης 'tTA-PGK-neo-pA-term' προστέθηκαν πλευρικά 50 bp άκρα ομολογίας της myospryn για στόχευση στους BAC κλώνους. Στον C57/B16 κλώνο στοχεύσαμε στο 1ο εξόνιο, ενώ στον 129SV στοχεύσαμε στο 2ο εξόνιο. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση του 129SV κλώνου που στοχεύσαμε το 2ο εξόνιο πριν την προσθήκη των περιοχών ομολογίας, προστέθηκαν οι 2A ιϊκές αλληλουχίες (de Felipe P et al. 2006; Trichas G et al. 2008) για ανεξάρτητη και ισόποση έκφραση του 1ου εξωνίου της myospryn και του tTA στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, για να μην επηρεαστεί η έκφραση του tTA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για επιλογή των BAC κλώνων που είχαν προσλάβει μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού την κασέτα έκφρασης 'tTA-PGK-neo-pA-term'.

Τέλος, η κασέτα έκφρασης 'tTA-PGK-neo-pA-term' πλαισιωμένη εκατέρωθεν από περιοχές ομολογίας της myospryn θα υποκλωνοποιηθεί σε έναν πλασμιδιακό φορέα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο φορέας που θα προκύψει θα είναι ο

φορέας στόχευσης της knock out σειράς myosrygn-tTA και θα χρησιμοποιηθεί για τον ηλεκτρομετασχηματισμό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι προσπάθειες ομόλογου ανασυνδυασμού που πραγματοποιήθηκαν και με τους δύο BAC κλώνους (129SV και C57/B16), δεν θα αναλυθούν στο σημείο αυτό, καθώς υπάρχουν αναλυτικά όλα τα αποτελέσματα στη διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού μου. Αξίζει πάντως να αναφέρουμε ότι καμία από αυτές τις προσπάθειες δε στέφτηκε με επιτυχία. Για το λόγο αυτό η προσέγγιση αυτή εγκαταλείφθηκε και ο φορέας στόχευσης κατασκευάστηκε μέσω μοριακής κλωνοποίησης.

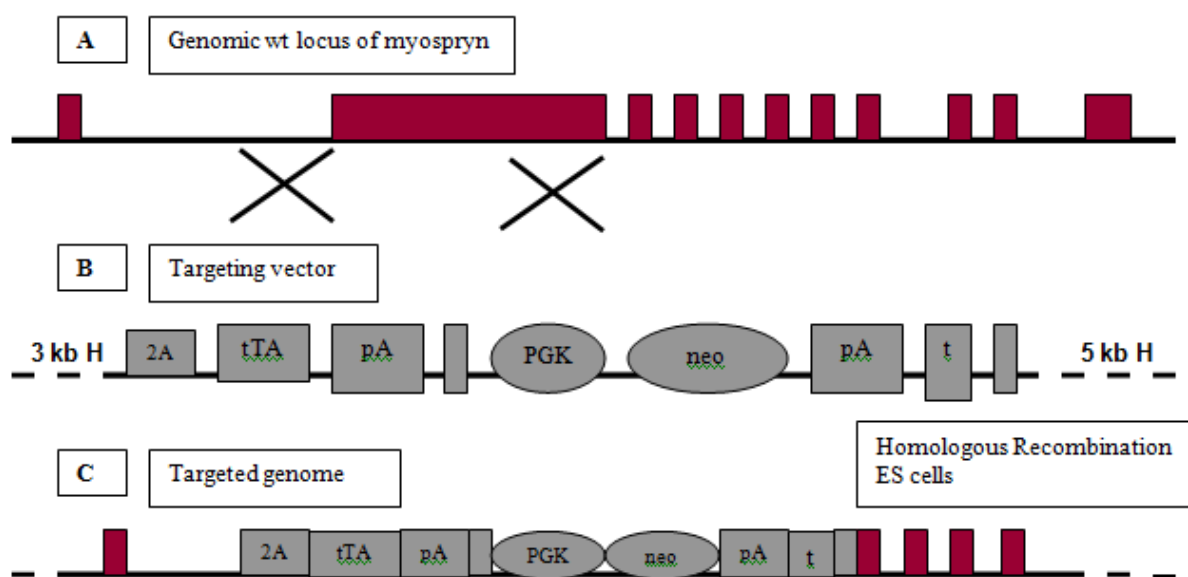
8.2 Κατασκευή του φορέα στόχευσης μέσω μοριακής κλωνοποίησης

Για την κατασκευή του φορέα στόχευσης της knock out σειράς myosrygn-tTA χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pMOSTTA (βλέπε παράρτημα) που περιέχει όλα τα στοιχεία ('tTA-PGK-neo-pA') που απαιτούνται για τη δημιουργία του φορέα αυτού. Για να εξασφαλιστεί η πλήρης αδρανοποίηση του γονιδίου της myosrygn καθοδικά των σημάτων πολυανδενυλίωσης του φορέα pMOSTTA, κλωνοποιήθηκε ένας αποσιωποποιητής της μεταγραφής (transcriptional terminator) (Dye MJ et al. 2001) (βλέπε παράρτημα) και προέκυψε η κασέτα έκφρασης (cassette/CST) 'tTA-PGK-neo-pA-term'.

Ο φορέας στόχευσης θα πρέπει να περικλείεται εκατέρωθεν από αλληλουχίες ομολογίας της myosrygn, μεγέθους 3 και 5 kb περίπου αντίστοιχα (myosrygn's homologous arms) για να πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός στην επιθυμητή περιοχή στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES cells). Οι περιοχές αυτές, 3 και 5 kb αντίστοιχα, πολλαπλασιάστηκαν με PCR, με κατάλληλους εκκινητές που φέρουν πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού και κλωνοποιήθηκαν πλευρικά της κασέτας έκφρασης 'tTA-PGK-neo-pA-term'.

Σημειώνεται ότι στοχεύσαμε το 2^ο εξόνιο της myosrygn και για αυτό το λόγο πριν την προσθήκη των περιοχών ομολογίας, προστέθηκαν οι 2A ιϊκές αλληλουχίες (de Felipe P et al. 2006; Trichas G et al. 2008) (βλέπε Παράρτημα) για ανεξάρτητη και ισόποση έκφραση του 1^{ου} εξωνίου της myosrygn και του tTA στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, για να μην επηρεαστεί η έκφραση του tTA. Επομένως η κασέτα έκφρασης που χρησιμοποιήσαμε είναι η ακόλουθη, '2A-tTA-PGK-neo-pA-term'.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται συνοπτικά η στρατηγική για την κατασκευή του targeting vector της myospryn knock out σειράς (Εικόνα 43).

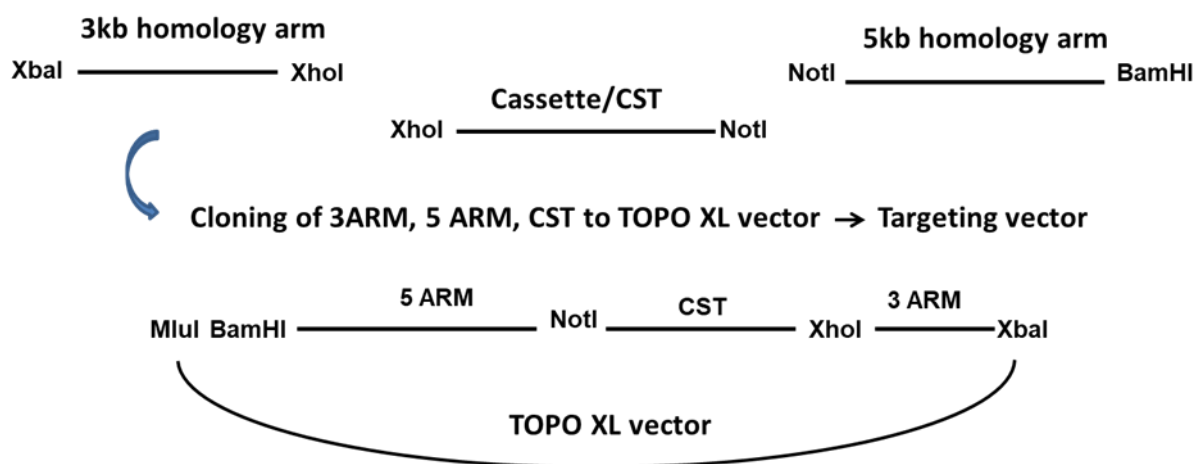


Εικόνα 43: Α. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιωματικού τόπου της myospryn, καθώς και της οργάνωσης των εξωνίων-εσωνίων της. Το ‘X’ υποδηλώνει τις περιοχές που θα πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Πιο συγκεκριμένα, η 3kb περιοχή ομολογίας είναι στο 1ο εσώνιο, ακριβώς πριν την έναρξη του 2ου εξωνίου. Η 5kb περιοχή ομολογίας είναι στο 2ο εξώνιο. Β. Σχηματική αναπαράσταση του targeting vector πλαισιωμένου εκατέρωθεν από τις περιοχές ομολογίας της myospryn. C. Σχηματική αναπαράσταση του ανασυνδυασμένου γονιδιωματικού τόπου, έπειτα από επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό, όπου έχουμε έκφραση του tTA αντί για τη myospryn.

Ακολουθεί επεξήγηση των διαφόρων συμβόλων της εικόνας:

- **tTA:** ελεγχόμενος από την τετρακυκλίνη ενεργοποιητής tTA (tetracycline-controlled transactivator)
- **2A:** 2A ιΐκές αλληλουχίες
- **pA:** αλληλουχίες σημάτων πολυαδενυλίωσης (poly-A)
- **PGK:** υποκινητής του γονιδίου του μυός της κινάσης 1 του φωσφογλυκερικού (PGK-promoter)
- **Neo:** το γονίδιο της φωσφοτρανφεράσης της νεομυκίνης (neomycin phosphotransferase/ neo)
- **LoxP:** LoxP αλληλουχίες
- **t:** αποσιωποποιητής της μεταγραφής (transcriptional terminator)
- **3 kb και 5 kb H:** αλληλουχίες ομολογίας του γονιδίου της myospryn μήκους 3 kb και 5 kb αντίστοιχα

Η κασέτα έκφρασης (cassette/CST) ‘2A-tTA-PGK-neo-pA-term’, η 3kb και η 5kb περιοχή ομολογίας (homology arm) της *myosrpn*, όπως προαναφέραμε, πολλαπλασιάστηκαν με PCR με κατάλληλους εκκινητές, με σκοπό σταδιακά να γίνει η κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών σε έναν κατάλληλο φορέα. Στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε ο TOPO XL, ο οποίος είναι κατάλληλος για την κλωνοποίηση μεγάλων προϊόντων PCR (3-10kb). Παρακάτω, παρουσιάζεται σχηματικά η στρατηγική της κλωνοποίησης (Εικόνα 44).

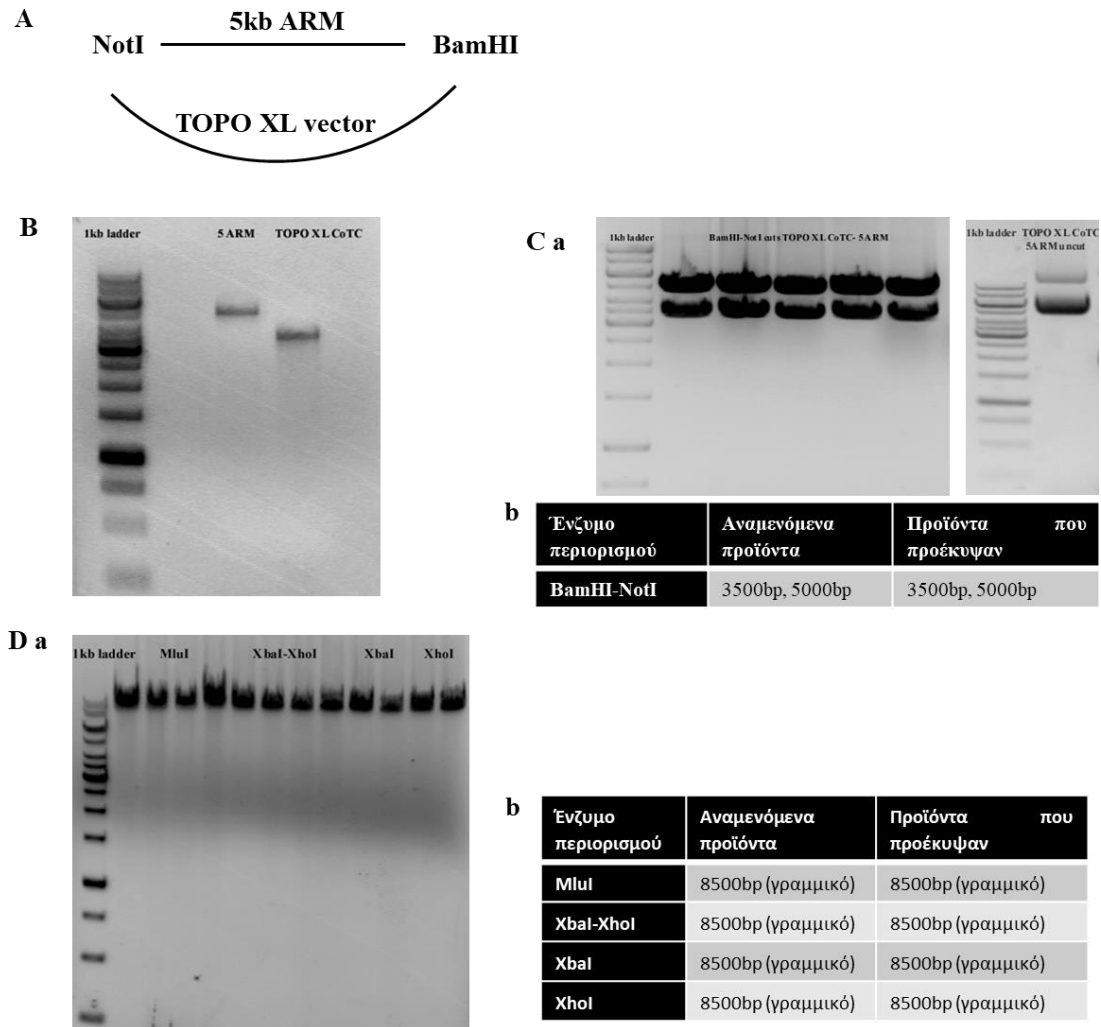


Εικόνα 44: Σχηματική αναπαράσταση της 3kb και 5kb περιοχής ομολογίας της *myosrpn* (homology arm) καθώς και της κασέτας έκφρασης (cassette/CST), φέροντας πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού με σκοπό να γίνει σταδιακά (σε 3 βήματα) η κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών στον TOPO XL φορέα, έτσι ώστε να προκύψει ο targeting vector της knock out σειράς.

8.2.1 Κλωνοποίηση της 5kb περιοχής ομολογίας της *myosrpn* στον TOPO XL φορέα

Η 5kb περιοχής ομολογίας (5ARM), πολλαπλασιάστηκε με PCR με κατάλληλους εκκινητές που φέρουν πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού, και πιο συγκεκριμένα των ενζύμων BamHI και NotI. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του προϊόντος της PCR και του TOPO XL φορέα με BamHI και NotI, έτσι ώστε να είναι εφικτή η αντίδραση σύνδεσης με κολλώδη άκρα (sticky end ligation). Ακολούθησε επώαση του TOPO XL φορέα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση με σκοπό να αποφωσφορυλιωθεί και να αποτραπεί η επανασύνδεσή του, ηλεκτροφόρηση τόσο του TOPO XL φορέα, όσο και του προϊόντος της PCR και απομόνωση και καθαρισμός τους από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction). Ο

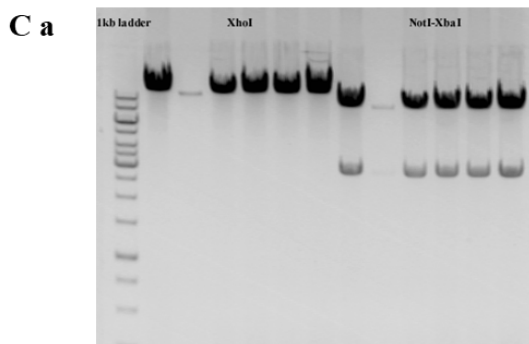
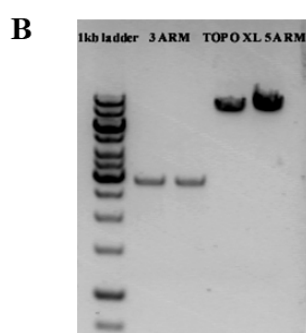
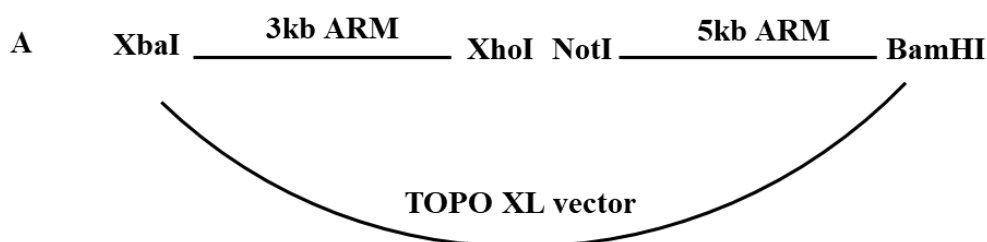
έλεγχος της επιτυχούς κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε τόσο με διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού BamHI-NotI, XbaI-XhoI, XbaI, XhoI και MluI, όσο και με αλληλούχιση (sequencing) (Εικόνα 45).



Εικόνα 45: **A.** Σχηματική αναπαράσταση της 5kb περιοχής ομολογίας (5ARM) που φέρει πλευρικά τα ένζυμα περιορισμού, NotI και BamHI και του TOPO XL φορέα. **B.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR για την 5kb περιοχή ομολογίας της myospryn (5ARM) και του προϊόντος της πέψης του TOPO XL φορέα, έτσι ώστε να γίνει γραμμικός και να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση σύνδεσης. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το 5ARM- με τα ένζυμα περιορισμού BamHI-NotI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Στη δεξιά εικόνα, ηλεκτροφορητική ανάλυση του άκοπου TOPO XL 5ARM φορέα. **D.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της πέψης -του TOPO XL φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το 5ARM- με τα ένζυμα περιορισμού MluI (πηγαδάκια 1-4), XbaI-XhoI (πηγαδάκια 5-8), XbaI (πηγαδάκια 9,10), XhoI (πηγαδάκια 11,12) και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων.

8.2.2 Κλωνοποίηση της 3kb περιοχής ομολογίας της myosprgn στον TOPO XL/5ARM φορέα

Η 3kb περιοχής ομολογίας (3ARM), πολλαπλασιάστηκε με PCR με κατάλληλους εκκινητές που φέρουν πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού, και πιο συγκεκριμένα των ενζύμων XbaI και XhoI. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του προϊόντος της PCR και του TOPO XL/5ARM φορέα με XbaI και XhoI, έτσι ώστε να είναι εφικτή η αντίδραση σύνδεσης με κολλώδη άκρα (sticky end ligation). Ακολούθησε, επώαση του TOPO XL/5ARM φορέα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση με σκοπό να αποφωσφορυλιωθεί και να αποτραπεί η επανασύνδεσή του, ηλεκτροφόρηση τόσο του TOPO XL/5ARM φορέα, όσο και του προϊόντος της PCR και απομόνωση και καθαρισμός τους από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction). Ο έλεγχος της επιτυχούς κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε τόσο με διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού XhoI, NotI-XbaI, όσο και με αλληλούχιση (sequencing) (Εικόνα 46).



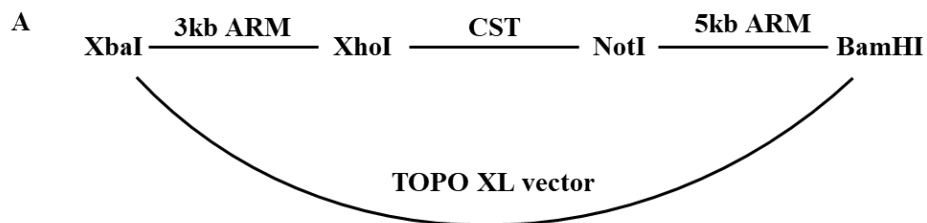
b

Ενζυμο περιορισμού	Αναμενόμενα προϊόντα	Προϊόντα που προέκυψαν
XhoI	11.5kb (γραμμικό)	11.5kb (γραμμικό)
NotI-XbaI	8.5kb, 3kb	8.5kb, 3kb

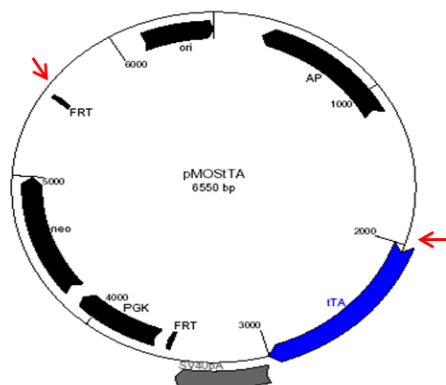
Εικόνα 46: A. Σχηματική αναπαράσταση της 3kb περιοχής ομολογίας (3ARM) που φέρει πλευρικά τα ένζυμα περιορισμού, XbaI και XhoI και του TOPO XL/5ARM φορέα. **B.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR για την 3kb περιοχή ομολογίας (3ARM) και του προϊόντος της πέψης του TOPO XL/5ARM φορέα, έτσι ώστε να γίνει γραμμικός και να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση σύνδεσης. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL στον οποίο έχουν κλωνοποιηθεί τα 5 και 3 ARMs- με τα ένζυμα περιορισμού XhoI, NotI-XbaI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων.

8.2.3 Κλωνοποίηση της κασέτας έκφρασης (CST) στον TOPO XL 5/3 ARM φορέα

Η κασέτα έκφρασης (CST) '2A-tTA-PGK-neo-pA-term', πολλαπλασιάστηκε με PCR με κατάλληλους εκκινητές που φέρουν πλευρικά αλληλουχίες ενζύμων περιορισμού, και πιο συγκεκριμένα των ενζύμων XhoI και NotI. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη του προϊόντος της PCR και του TOPO XL 5/3 ARM φορέα με XhoI και NotI, έτσι ώστε να είναι εφικτή η αντίδραση σύνδεσης με κολλώδη άκρα (sticky end ligation). Ακολούθησε, επώαση του TOPO XL 5/3 ARM φορέα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση με σκοπό να αποφωσφορυλιωθεί και να αποτραπεί η επανασύνδεσή του, ηλεκτροφόρηση τόσο του TOPO XL 5/3 ARM φορέα, όσο και του προϊόντος της PCR και απομόνωση και καθαρισμός τους από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction). Ο έλεγχος της επιτυχούς κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε τόσο με διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού XhoI-NotI και MluI, όσο και με αλληλούχιση (sequencing) (Εικόνες 47, 48). Σημειώνεται ότι πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολόκληρης της κασέτας έκφρασης (CST), καθώς είναι πολύ σπουδαίο όλα τα στοιχεία της 2A, tTA, pA, PGK, Neo, LoxP και t (για επεξήγηση βλέπε στη Σελ. 189), να μην φέρουν καμία μετάλλαξη.



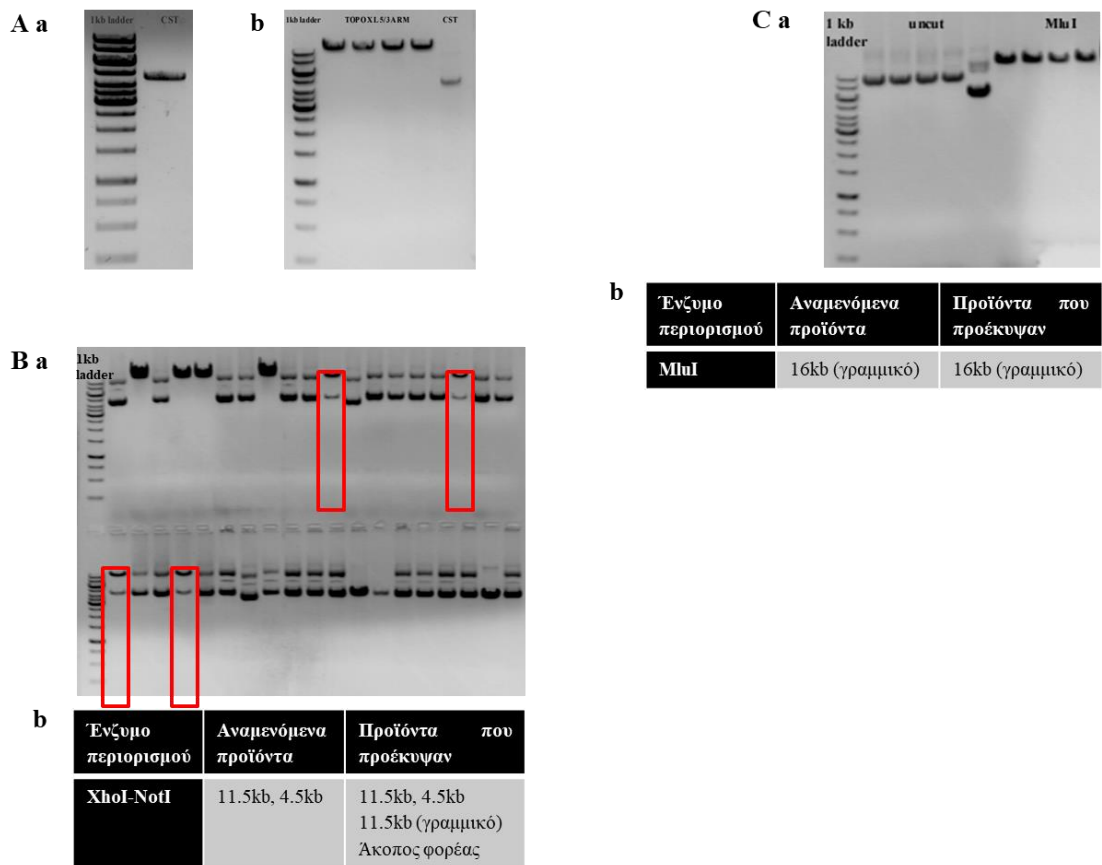
B a



b



Εικόνα 47: **A.** Σχηματική αναπαράσταση της κασέτας έκφρασης (CST) που φέρει πλευρικά τα ένζυμα περιορισμού, XhoI και NotI και του TOPO XL 5/3 ARM φορέα. **B.** Ο pMOSStA πλασμιδιακός φορέας. Σχηματική απεικόνιση των στοιχείων που απαιτούνται για τη δημιουργία του φορέα στόχευσης της knock out σειράς.



Εικόνα 48: **A.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR για την κασέτα έκφρασης (CST) (a) και του προϊόντος της πέψης του TOPO XL 5/3 ARM φορέα, έτσι ώστε να γίνει γραμμικός και να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση σύνδεσης (b). **B.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της πέψης -του TOPO XL 5/3ARM στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί η CST- με τα ένζυμα περιορισμού XhoI-NotI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Με το κόκκινο πλαίσιο επισημαίνονται οι θετικοί κλώνοι που έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα. **C.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της πέψης -του TOPO XL 5/3ARM φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί η CST- με το ένζυμο περιορισμού MluI και παρατήρηση των αναμενόμενων προϊόντων. Στην αριστερή πλευρά της εικόνας παρατηρούμε τον άκοπο TOPO XL 5/3ARM CST φορέα.

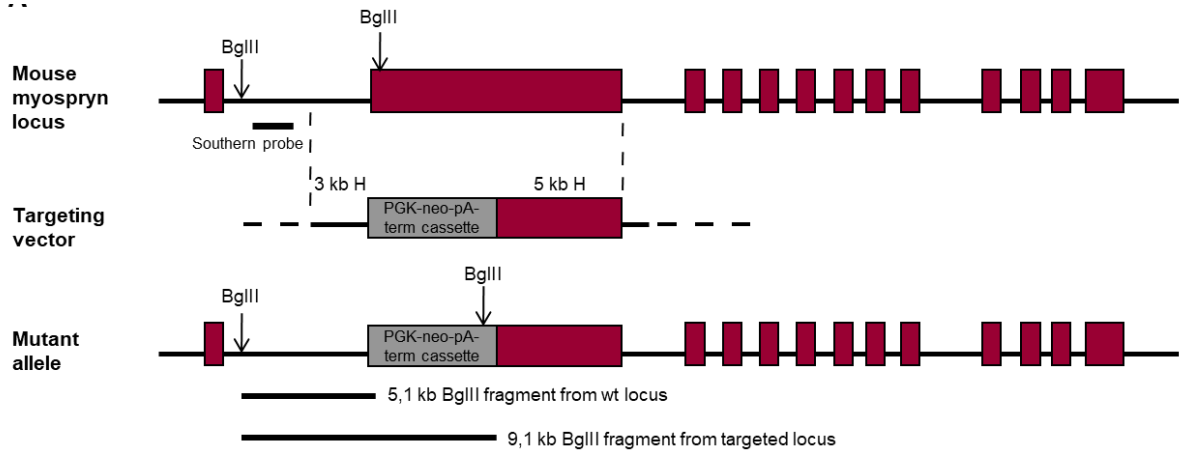
9. Ομόλογος ανασυνδυασμός του φορέα στόχευσης της *myosprgn* knock out σειράς στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES)

(Σε συνεργασία με τη Δρ. Ε. Βασιλάκη, εργαστήριο Δρ. Α. Κλινάκη, ΙΒΕΑΑ)

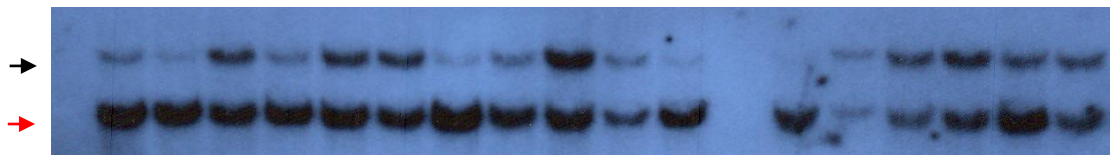
Ο φορέας στόχευσης της knock out σειράς (TOPO XL 5/3 ARM CST) έγινε γραμμικός έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού MluI (βλέπε Εικόνα 48 C) και χρησιμοποιήθηκε για τον ηλεκτρομετασχηματισμό των 129/SV W4 εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων (ES cells), έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιωματικού τόπου της *myosprgn* (Εικόνα 49).

Εφαρμόσαμε θετική επιλογή στις καλλιέργειες με το αντιβιοτικό geneticin/G418, μετά από 24h και για 10 συνεχείς ημέρες. Το γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα στο G418 είναι η 3΄φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης (Neomycin phosphotransferase, NEO). Το G418 είναι ένα αντιβιοτικό που αναστέλει την πρωτεϊνική σύνθεση. Έτσι σταθερά διαμολυσμένα ES κύτταρα με τον φορέα στόχευσης θα μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία του G418. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήσαμε επιλογή με G418, ώστε να διαχωρίσουμε τους κλώνους που έχουν ενσωματώσει με ομόλογο ή μη ομόλογο τρόπο τον φορέα, από αυτούς που δεν τον έχουν ενσωματώσει καθόλου.

Συνολικά, απομονώσαμε 1920 κλώνους που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, οι οποίοι αναπτύχθηκαν περαιτέρω, καταψύθηκαν μεμονωμένα και προετοιμάστηκε γενωμικό DNA από αυτούς, έτσι ώστε να ελεγχθούν με ανάλυση με Southern και με PCR για την ορθότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού. Στο σύνολο των κλώνων που ελέγχθηκαν, με τη χρήση ιχνηθέτη εκτός των περιοχών ομολογίας της *myosprgn*, βρέθηκαν 17 κλώνοι που είχαν ενσωματώσει τον φορέα στόχευσης και άρα είχε πραγματοποιηθεί με επιτυχία ο ομόλογος ανασυνδυασμός, στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιωματικού τόπου της *myosprgn* (Εικόνα 50). Ειδικότερα, η επιτυχία του ομόλογου ανασυνδυασμού ήταν μόλις 0,9%.



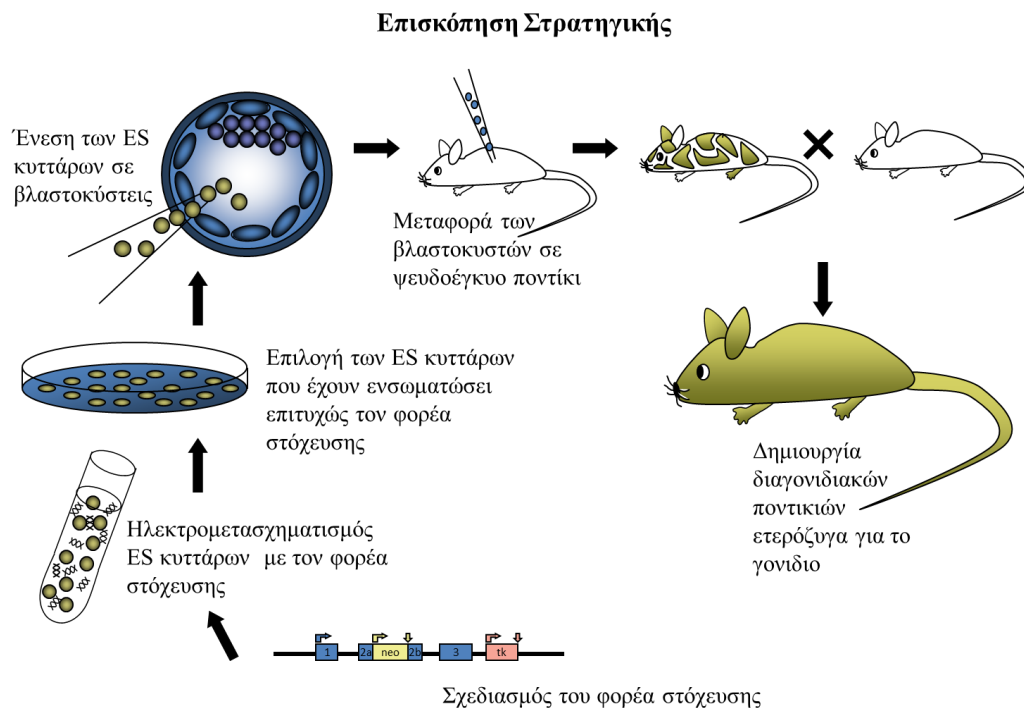
Εικόνα 49: Αποσιώπηση του γονιδίου της myosrygn. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιακού τόπου της myosrygn, του φορέα στόχευσης και του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου που παράγεται από ομόλογο ανασυνδυασμό. Τα 13 εξόνια του γονιδίου της myosrygn συμβολίζονται με έγχρωμα παραλληλόγραμμα. Η κασέτα έκφρασης έκφρασης ‘2A-tTA-PGK-neo-pA-term’ διασπά την κωδική αλληλουχία της myosrygn στο δεύτερο τεράστιο εξόνιο της. Η θέση για πέψη με το ένζυμο περιορισμού BglIII στην κασέτα έκφρασης παρέχει έναν μάρτυρα για πιστοποίηση του επιτυχούς ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο ιχνηθέτης (Southern probe) που απεικονίζεται στην εικόνα χρησιμοποιήθηκε για γονοτύπηση.



Εικόνα 50: Southern blot ανάλυση των 17 κλώνων που έχουν ενσωματώσει τον φορέα στόχευσης στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιωματικού τόπου της myosrygn με τη χρήση ιχνηθέτη εκτός των περιοχών ομολογίας της myosrygn. Παρατηρούμε με κόκκινο βέλος τη wt ζώνη στα 5.117bp και με μαύρο βέλος τη targeted ζώνη στα 9.135bp.

10. Δημιουργία της Knock-out σειράς/ Myospryn+/- και Myospryn-/-

Για τη δημιουργία της knock out σειράς -myospryn-tTA- χρησιμοποιήθηκαν 7 διαφορετικές σειρές 129/SV W4 εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων που είχαν ενσωματώσει με επιτυχία τον φορέα στόχευσης στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιωματικού τόπου της myospryn. Τα εμβρυϊκά αυτά βλαστικά κύτταρα ενέθηκαν σε βλαστοκύστες (host blastocysts), οι οποίες μεταφέρθηκαν σε ένα ψευδοέγκυο ποντίκι και προέκυψαν 6 χίμαιρες (chimeras) (Εικόνα 51).



Εικόνα 51: Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία του ετερόζυγου ποντικού για το γονίδιο της myospryn.

Στον πίνακα 13 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά οι ES κλώνοι που ενέθηκαν, οι απόγονοι που προέκυψαν και ειδικότερα ο αριθμός των χιμαιρικών ποντικών και το ποσοστό χιμαιρισμού τους.

Πίνακας 13: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ενέσεων των ES κλώνων σε βλαστοκύστες για τη δημιουργία χιμαιρικών ποντικών για το γονίδιο της myospryn.

Αριθμός ES κλώνου	Αριθμός απογόνων	Χιμαιρικά ποντίκια	Σχόλια
1. 7D1	0	0	Όχι εγκυμοσύνη
2. 8G8	1	0	Θηλυκό ποντίκι που πέθανε
3. 5E5	5	0	
4. 6C3	4	1 αρσενικό, 100% ποσοστό χιμαιρισμού	Κυστίτιδα όρχεων στο χιμαιρικό ποντίκι
5. 7A1	3	2 αρσενικά, 70-80% ποσοστό χιμαιρισμού	
6. 4F2	3	1 αρσενικό, 90% ποσοστό χιμαιρισμού	
7. 6H10	3	1 αρσενικό, 90% ποσοστό χιμαιρισμού 1 θηλυκή χίμαιρα	Κυστίτιδα όρχεων στο χιμαιρικό αρσενικό ποντίκι
8. 7D1	1	1 αρσενικό, 100% ποσοστό χιμαιρισμού	Φίμωση πέους στο χιμαιρικό ποντίκι
9. 8G8	0	0	Εγκυμοσύνη

Οι 6 χίμαιρες που προέκυψαν είχαν ποσοστό χιμαιρισμού 70-100%, όπως αυτό εκτιμήθηκε έπειτα από την εξωτερική μακροσκοπική παρατήρηση του μωσαϊκισμού του τριχώματός τους (Εικόνα 52). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα χιμαιρικά ποντίκια με ποσοστό χιμαιρισμού 100%, παρουσίασαν διάφορες ανωμαλίες, όπως ερμαφροδιτισμό, κυστίτιδα, στειρότητα με αποτέλεσμα να μην είναι γόνιμα.

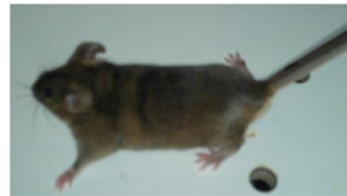
A.



Χίμαιρα 1 (70-80%)

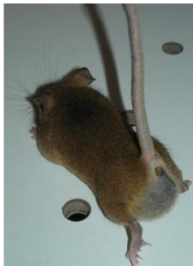


Χίμαιρα 2 (70-80%)

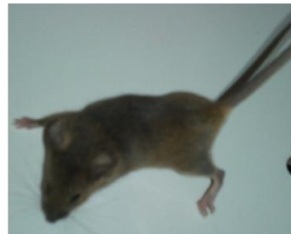


Χίμαιρα 3 (90%)

B.



Χίμαιρα 5 (100%)
Ερμαφρόδιτο με
κυστίτιδα.



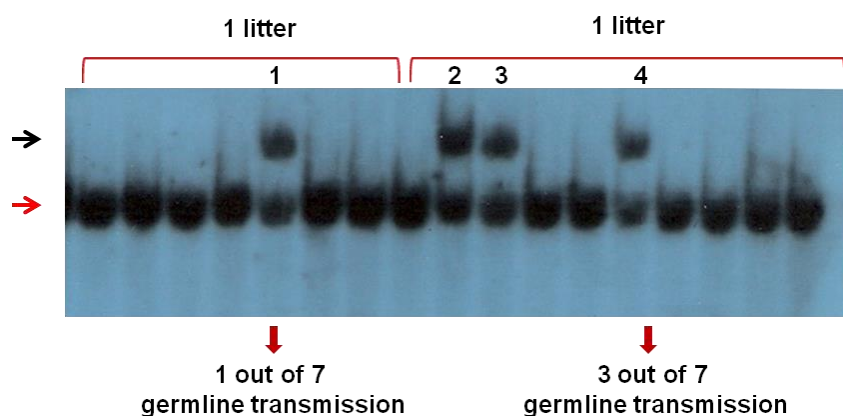
Χίμαιρα 6 (100%)
Στείρο ποντίκι.



Χίμαιρα 7 (100%)
Ερμαφρόδιτο με
κυστίτιδα.

Εικόνα 52: Δημιουργία 6 χμαιρικών ποντικών από διαφορετικούς κλώνους εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. **A.** Τα χμαιρικά ποντίκια 1, 2 και 3 με ποσοστό χμαιρισμού 70-90%, παρουσίασαν καλή αναπαραγωγική ικανότητα. **B.** Τα χμαιρικά ποντίκια 4, 5 και 6 με ποσοστό χμαιρισμού 100% παρουσίασαν διάφορες ανωμαλίες όπως ερμαφροδιτισμό, κυστίτιδα, στειρότητα με αποτέλεσμα να μην είναι γόνιμα.

Δύο γόνιμες αρσενικές χίμαιρες με ποσοστό χμαιρισμού 70-90% (από τους ES κλώνους 5 και 6, βλέπε πίνακα 13), διασταυρώθηκαν με 129/SV θηλυκές με σκοπό τη δημιουργία της knock-out σειράς -*myosprgn*-tTA (*myo*-tTA)-. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε η επιτυχής μετάδοση στη βλαστική σειρά (*germline transmission*), όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 53).



Εικόνα 53: Southern blot ανάλυση δύο τοκετομάδων (litter) από δύο διαφορετικές χίμαιρες. Στην πρώτη τοκετομάδα έχουμε μετάδοση στη βλαστική σειρά σε 1 από τα 7 ποντίκια, ενώ στη δεύτερη τοκετομάδα σε 3 από τα 7 ποντίκια. Παρατηρούμε με κόκκινο βέλος τη wt ζώνη στα 5.117bp και με μαύρο βέλος τη targeted ζώνη στα 9.135bp.

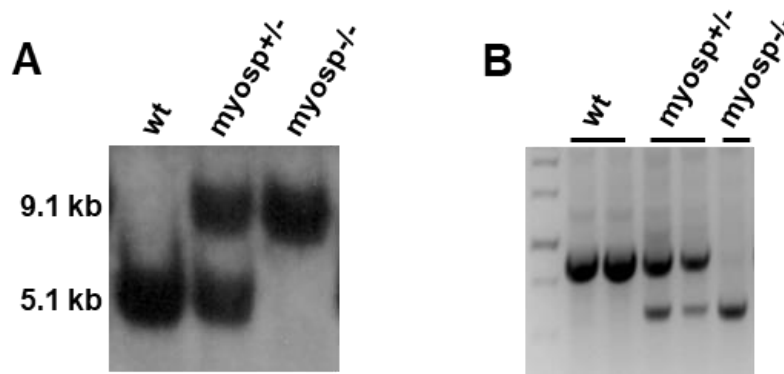
Τα ποντίκια της knock-out σειράς -*myosprgn*-tTA είναι ετερόζυγα ως προς τη *myosprgn* και θα τα αποκαλούμε *myosp*^{+/-}. Παρά την αρχική μας υπόθεση ότι η έλλειψη του γονιδίου της *myosprgn* θα προκαλέσει εμβρυϊκή θνησιμότητα, διασταυρώσαμε ετερόζυγα *myosp*^{+/-} ποντίκια μεταξύ τους και προς μεγάλη μας έκπληξη προέκυψαν τα *myosprgn* null (*myosp*^{-/-}) ποντίκια. Τα *myosp*^{-/-} ποντίκια επιβίωσαν και παρουσίασαν τις αναμενόμενες Μενδελικές αναλογίες. Τόσο τα αρσενικά, όσο και τα θηλυκά *myosprgn* null ποντίκια ήταν γόνιμα και δεν εμφάνιζαν καμία εμφανή ανατομική ανωμαλία σε σύγκριση με τα wt και τα ετερόζυγα ποντίκια.

Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό, -όπως αναφερθήκαμε και εκτενώς παραπάνω-, ότι ενώ κλωνοποιήσαμε ολόκληρο το cDNA της *myosprgn* και δημιουργήσαμε την TIGRE διαγονιδιακή σειρά ποντικών, τα ποντίκια αυτά δεν θα τα χρησιμοποιήσουμε στην παρούσα τουλάχιστον μελέτη.

Θα εστιάσουμε στη μελέτη των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών για να διερευνήσουμε το ρόλο της *myosprgn* στην καρδιά, καθώς και τη βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης της *myosprgn* με τη δεσμίνη.

11. Πιστοποίηση της δημιουργίας των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών

Η ταυτοποίηση του γενοτύπου των wt, *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών πραγματοποιήθηκε τόσο με ανάλυση κατά Southern, όσο και με PCR όπως φαίνεται και στην Εικόνα 54 A και B. Να σημειωθεί ότι ο ιχνηθέτης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση κατά Southern προήλθε από το 1^ο εσώνιο του γονιδιωματικού τόπου της *myosprgn* και βρίσκεται εκτός των περιοχών ομολογίας της *myosprgn*. Ο ιχνηθέτης (Southern probe) που χρησιμοποιήθηκε για τη γονοτύπηση απεικονίζεται στην εικόνα 49.



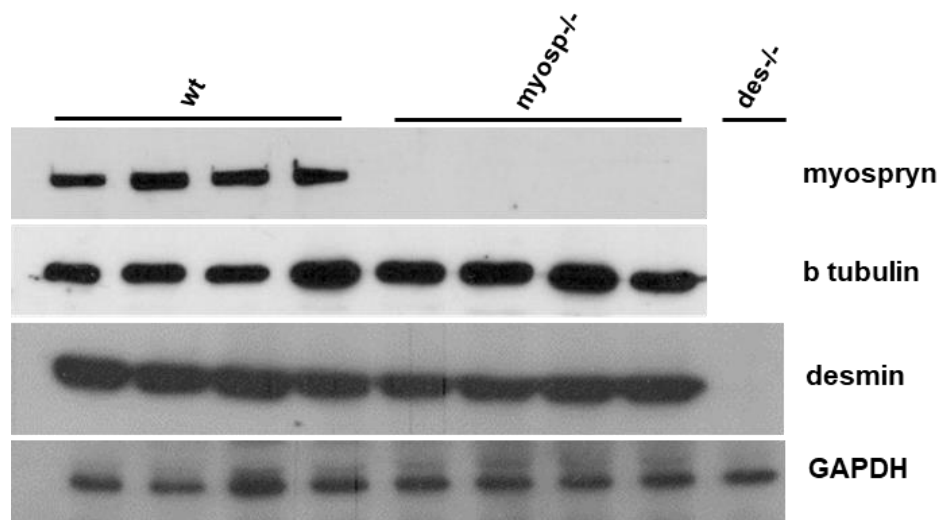
Εικόνα 54: **A.** Ανάλυση κατά Southern από γονιδιωματικό DNA ποντικών wt, *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-}. Παρατηρούμε τη wt ζώνη στα 5.1kb και την targeted ζώνη στα 9.1kb. **B.** PCR ανάλυση από DNA ποντικών wt, *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Southern. Παρατηρούμε τη wt ζώνη στα 910bp και την targeted ζώνη στα 589bp.

12. Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων και των μεταγράφων στα διάφορα μοντέλα ποντικών

Πραγματοποιήσαμε Western και RT-PCR ανάλυση σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και σε cDNA, αντίστοιχα, από καρδιές *myosprgn* null ποντικών και επιβεβαιώθηκε η απουσία της πρωτεΐνης της *myosprgn*, καθώς και η έλλειψη του mRNA της (Εικόνα 55, 56 A). Θέλαμε επίσης να ελέγξουμε την έκφραση της δεσμίνης με RT-PCR και Western ανάλυση και διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο της πρωτεΐνης μεταξύ των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών σε σύγκριση με τα wt (Εικόνα 55). Όσον αφορά το επίπεδο έκφρασης του mRNA της δεσμίνης βρέθηκε μια πολύ μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών σε σύγκριση με τα wt (Εικόνα 56 C).

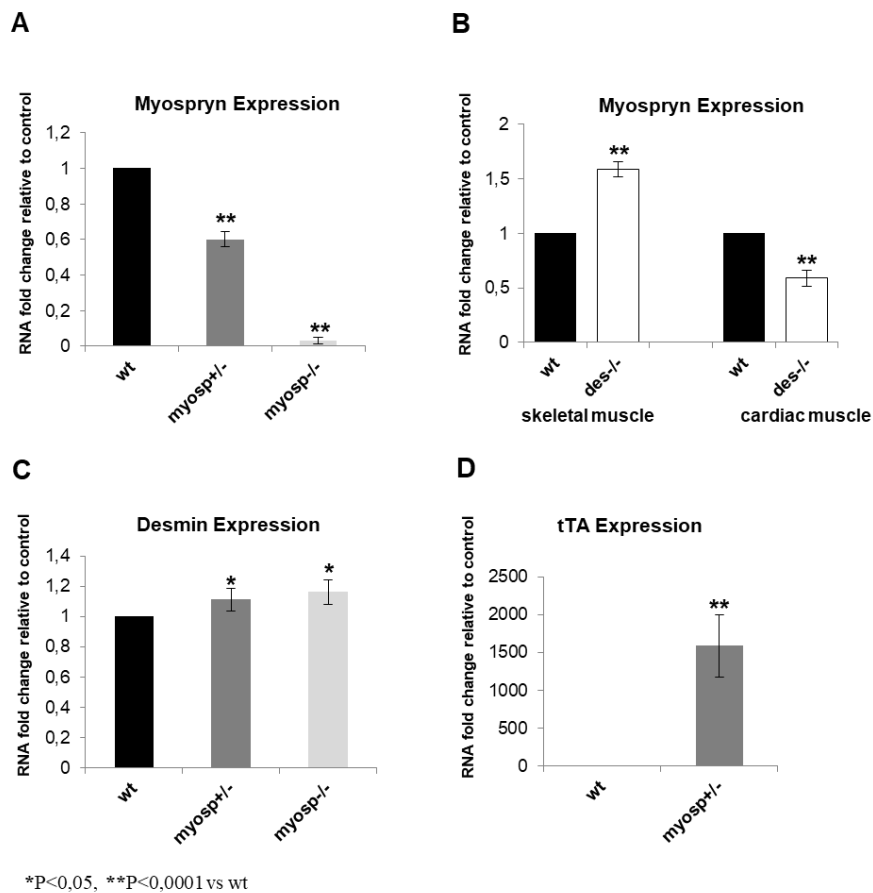
Από την άλλη πλευρά, να σημειωθεί ότι είχε μελετηθεί η έκφραση της *myosprgn* σε καρδιακό και σκελετικό μυ από ποντίκια αγρίου τύπου και με έλλειψη δεσμίνης. Τα επίπεδα έκφρασης της *myosprgn* στον καρδιακό ιστό από *des*^{-/-} ποντίκι ήταν μειωμένα 0,5 φορές σε σύγκριση με το wt, ενώ στο σκελετικό μυ από *des*^{-/-} ποντίκι ήταν αυξημένα 1,5 φορές σε σύγκριση με το wt (Εικόνα 56 B).

Τέλος, η έκφραση του tTA (Tet-transactivator) όπως είναι αναμενόμενο παρουσιάζει τεράστια αύξηση στα δείγματα καρδιάς *myosp*^{+/-} σε σύγκριση με αυτά από ποντίκια αγρίου τύπου wt (Εικόνα 56 D).



Εικόνα 55: Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης για τη *myosprgn* και τη δεσμίνη μέσω ανοσοαποτόπωσης κατα Western σε ολικά καρδιακά εκχυλίσματα από wt (N=8), *myosp*^{-/-} (N=6) και *des*^{-/-} (N=3)

ποντικά. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης β -tubulin και GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) χρησιμοποιήθηκαν ως επίπεδα αναφοράς.



Εικόνα 56: Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης για τη myospryn (**A** και **B**), τη δεσμίνη (**C**) και το tTA (**D**) μέσω RT-PCR σε cDNA από καρδιές ποντικών wt, myosp+/-, myosp-/- και des-/- (N=4 για κάθε γενότυπο). Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το wt. Για την ομαλοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου της β -ακτίνης. (*P<0,05, **P<0,0001 vs wt).

13. Η απουσία της myosr^{gry} προκαλεί διατακτική μυοκαρδιοπάθεια

13.1 Η απουσία της myosr^{gry} προκαλεί ίνωση στο μυοκάρδιο και ανωμαλίες στους θαλάμους της myosr^{-/-} καρδιάς

Μορφολογικός χαρακτηρισμός των myosr^{+/-} και των myosr^{-/-} καρδιών από ποντίκια ηλικίας 6 και 10 μηνών έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές σε σύγκριση με τα wt (Εικόνα 58 Aa-c). Από την άλλη πλευρά, οι καρδιές από ποντίκια myosr^{-/-} ηλικίας 9-12 μηνών συχνά εμφανίζουν αύξηση του μεγέθους των κόλπων (Εικόνα 58 Ad).

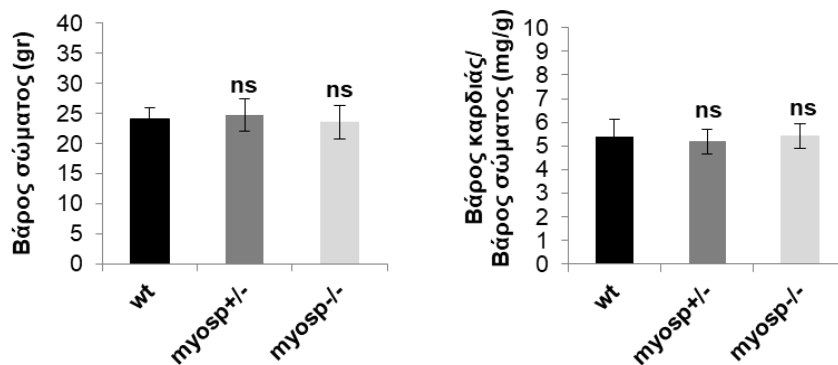
Παρόλα αυτά, οι μετρήσεις του βάρους σώματος και του λόγου του βάρους καρδιάς/βάρους σώματος των myosr^{+/-} και myosr^{-/-} ποντικών ηλικίας 6 μηνών έδειξαν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές σε σύγκριση με τα wt (Πίνακας 14, Εικόνα 57).

Περαιτέρω μελέτη της ανατομίας καρδιών από myosr^{+/-} και myosr^{-/-} ποντίκια αποκάλυψε λέπτυνση των τοιχωμάτων και διάταση του ιστού (Εικόνα 58 Ba-d). Ο διατακτικός φαινότυπος επαληθεύτηκε επίσης και με την ηχοκαρδιογραφική ανάλυση (βλέπε αντίστοιχη ενότητα στη συνέχεια).

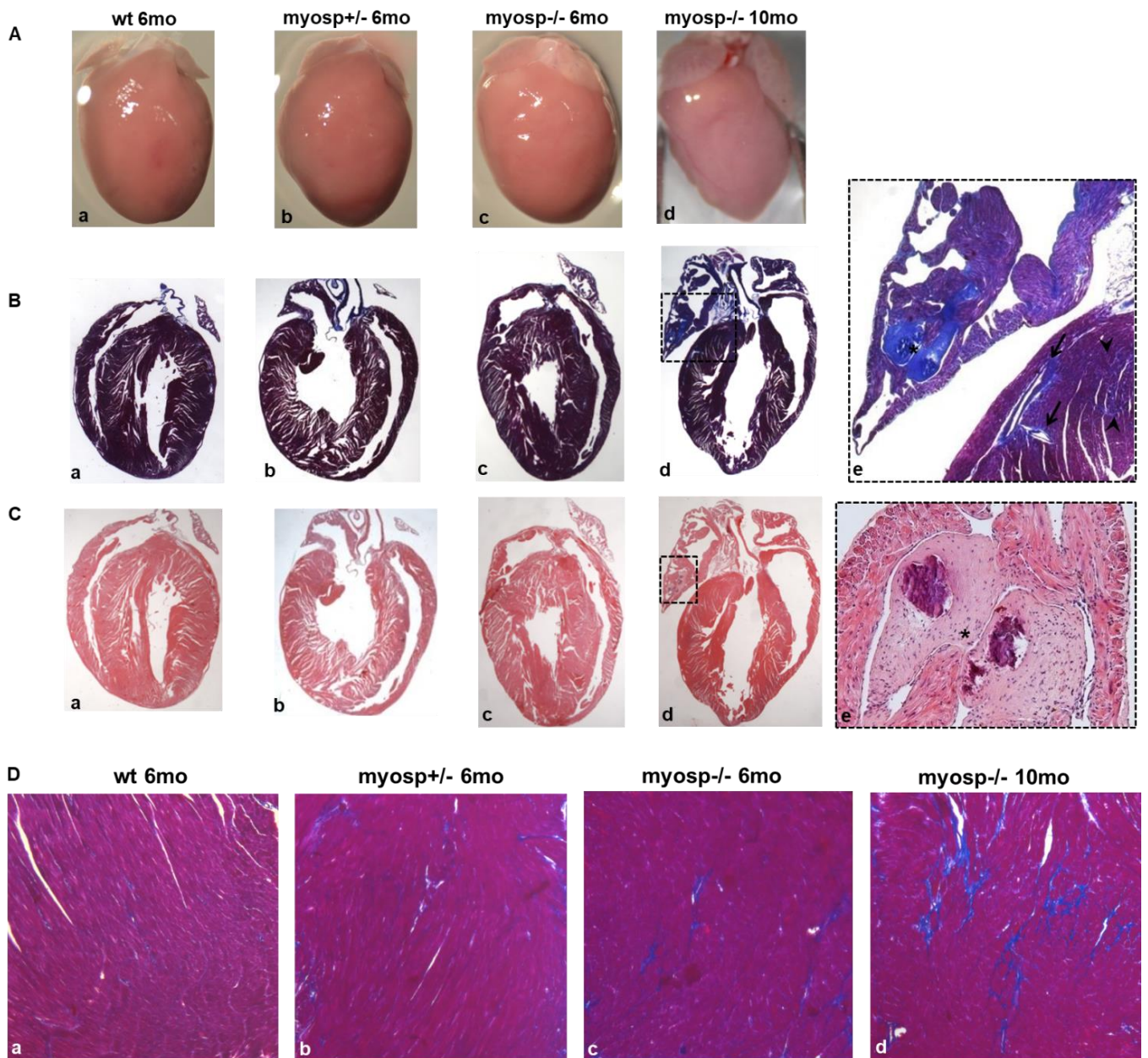
Ιστολογική ανάλυση με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης (Εικόνα 58 Ca-d) και τριχρωμίας Masson's (Εικόνα 58 Ba-d) αποκάλυψε την ύπαρξη περιαγγειακής (perivascular fibrosis) (Εικόνα 58 Be μαύρο βέλος) και/ή διάμεσης ίνωσης (interstitial fibrosis) (Εικόνα 58 Be μαύρη κεφαλή βέλους) στα myosr^{-/-} ποντίκια ηλικίας 6 και 10 μηνών, με το φαινόμενο να είναι πιο συχνό και έντονο στα ποντίκια μεγαλύτερης ηλικίας. Να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε ίνωση στις καρδιές από myosr^{+/-} ποντίκια. Δεν πρέπει κανείς να παραλείψει, ότι η μεγέθυνση των κόλπων της καρδιάς στα myosr^{-/-} ποντίκια ηλικίας 9-12 μηνών συνοδεύεται από ίνωση των κόλπων (Εικόνα 58 Be, Ce).

Πίνακας 14: Μετρήσεις του βάρους σώματος και του λόγου βάρους καρδιάς/βάρος σώματος. Μελέτη της επίδρασης της μειωμένης έκφρασης της *myosprgn* (*myosp^{+/-}*) και της έλλειψης της (*myosp^{-/-}*) στο βάρος του μυοκαρδίου, αλλά και στο βάρος σώματος ποντικών, έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των *myosp^{+/-}* και *myosp^{-/-}* ποντικών σε σύγκριση με τα *wt*.

Ποντίκι	<i>wt</i> 6mo old n = 11	<i>myosp^{+/-}</i> 6mo old n = 16	<i>myosp^{-/-}</i> 6mo old n = 12
Βάρος σώματος	24 ± 1,9	24,7 ± 2,7	23,5 ± 2,8
Βάρος καρδιάς/ Βάρος σώματος	5,4 ± 0,7	5,2 ± 0,5	5,4 ± 0,5



Εικόνα 57: Μελέτη της επίδρασης της μειωμένης έκφρασης της *myosprgn* (*myosp^{+/-}*) και της έλλειψης της (*myosp^{-/-}*) στο βάρος του μυοκαρδίου, αλλά και στο βάρος σώματος ποντικών, έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των *myosp^{+/-}* και *myosp^{-/-}* ποντικών σε σύγκριση με τα *wt* [n.s: not statistically significant (μη στατιστικά σημαντικό) vs *wt*].



Εικόνα 58: Η έλλειψη της myospργγν προκαλεί ίνωση στο μυοκάρδιο και ανωμαλίες στους θαλάμους της καρδιάς. Μορφολογική (A) και ιστολογική ανάλυση με χρώση Masson (B) και αιματοξυλίνη/εωσίνης (C) σε τομές καρδιάς από ποντίκια wt, myosp+/- και myosp-/-, ηλικίας 6 και 10 μηνών. Παρατηρούμε την περιαγγειακή (Be, μαύρο βέλος) και/ή διάμεση ίνωση (Be, μαύρη κεφαλή βέλους) σε myosp-/- ποντίκια ηλικίας 10 μηνών. Χαρακτηριστικές εικόνες αύξησης του μεγέθους των κόλπων σε myosp-/- ποντίκια ηλικίας 10 μηνών (Ad, Bd, Cd), όπου παρατηρούμε τις ινωτικές περιοχές τους (Be, Ce) [(Εικόνα Be (αποτελεί μεγέθυνση του μαύρου τετράγωνου της Εικόνας Bd) και [(Εικόνα Ce (αποτελεί μεγέθυνση του μαύρου τετράγωνου της Εικόνας Cd)] (D) Ιστολογική ανάλυση με χρώση Masson σε τομές καρδιάς (τμήμα κοιλίας) από ποντίκια wt, myosp+/- και myosp-/-, ηλικίας 6 και 10 μηνών. Παρατηρούμε κυρίως τη διάμεση ίνωση σε myosp-/- ποντίκια ηλικίας 10 μηνών. (N=6 για κάθε γενότυπο).

13.2 Λειτουργικές διαταραχές της myosp-/- καρδιάς

Προκειμένου να μελετηθεί συνολικά η καρδιακή δομή και λειτουργία, πραγματοποιήθηκαν δυσδιάστατα ηχοκαρδιογραφήματα (M-mode 2D-Directed echocardiography) σε αρσενικά και θηλυκά wt και myosp-/- ποντίκια ηλικίας 3, 6, και 12 μηνών (Εικόνα 60). Οι ηχοκαρδιογραφικές παράμετροι δείχνουν στατιστικά σημαντική διαταραχή της καρδιακής λειτουργίας των myosp-/- ποντικίων σε σύγκριση με τα wt. Ο φαινότυπος αυτός όπως είναι αναμενόμενο είναι χειρότερος στα μεγαλύτερα ζώα. Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι τα θηλυκά ποντίκια εμφανίζουν χειρότερο φαινότυπο από τα αρσενικά της ίδιας ηλικιακής ομάδας, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια (Συμπληρωματικοί πίνακες 1, 2).

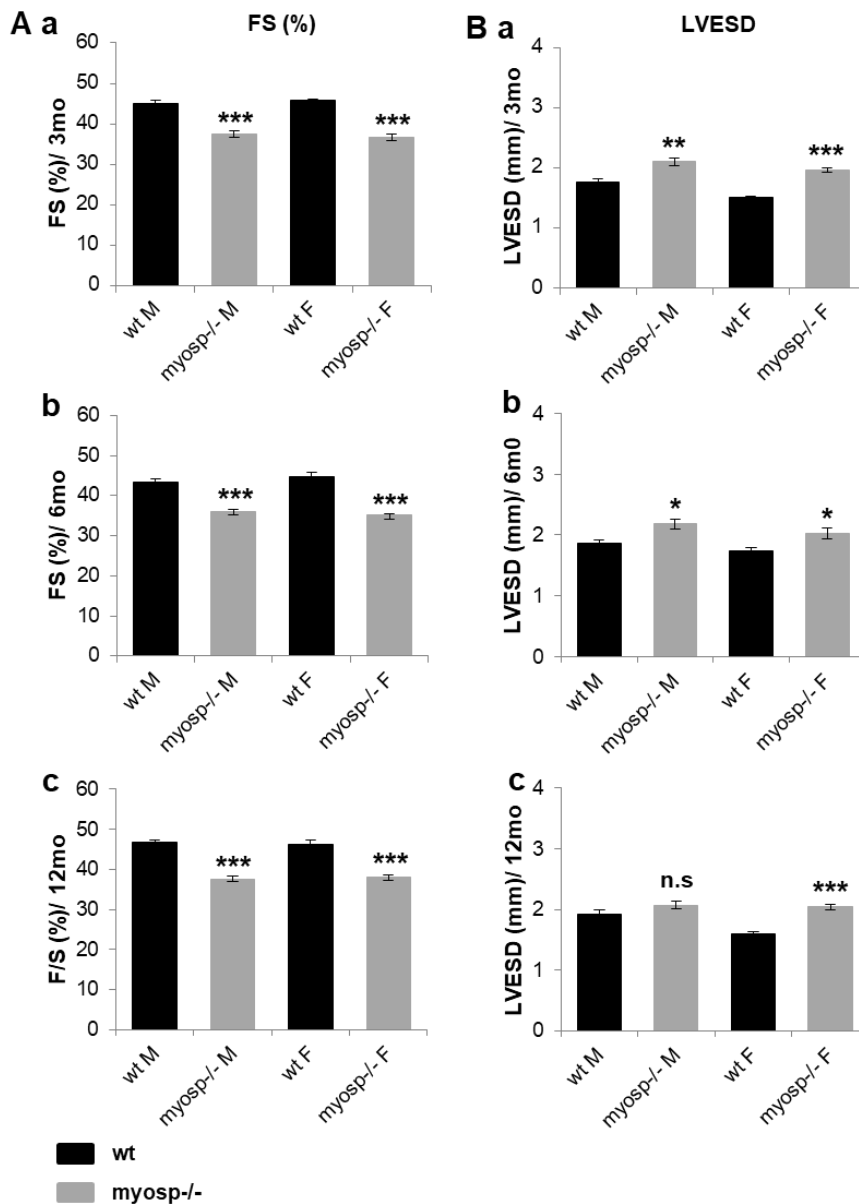
Η ηχοκαρδιογραφική μελέτη έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού της κλασματικής βράχυνσης (%FS) (~20%) των myosp-/- ποντικίων (αρσενικά και θηλυκά) (Εικόνα 59A), γεγονός που υποδεικνύει επηρεασμένη καρδιακή λειτουργία. Επιπλέον, η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας (LVESD) βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη (~6-30%), ανάλογα το φύλο και την ηλικία των myosp-/- ποντικίων, σε σύγκριση με τα wt (Εικόνα 59B) γεγονός που δείχνει επηρεασμένη τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μείωση του %FS στα αρσενικά ποντίκια είναι 17-20%, ενώ στα θηλυκά 18-20% και επομένως, τόσο τα αρσενικά, όσο και τα θηλυκά myosp-/- ποντίκια παρουσιάζουν παρόμοια καρδιακή λειτουργία (Εικόνα 59A) (Συμπληρωματικοί πίνακες 1, 2). Από την άλλη πλευρά, η αύξηση του LVESD στα αρσενικά ποντίκια είναι 6-19%, ενώ στα θηλυκά 16-30%, γεγονός που δείχνει ότι τα θηλυκά myosp-/- ποντίκια εμφανίζουν πιο επηρεασμένη λειτουργία της αριστερής κοιλίας σε σύγκριση με τα αρσενικά ποντίκια της ίδια ηλικιακής ομάδας και επομένως, χειρότερο φαινότυπο (Εικόνα 59B) (Συμπληρωματικοί πίνακες 1, 2). Τέλος, τα θηλυκά ποντίκια ηλικίας 3 και 12 μηνών (και όχι 6 μηνών) και όχι τα αρσενικά, εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση του LVEDD (Εικόνα 61A) (Συμπληρωματικοί πίνακες 1, 2), γεγονός που δείχνει ότι τα θηλυκά ποντίκια έχουν πιο διατατικό φαινότυπο σε σύγκριση με τα αρσενικά.

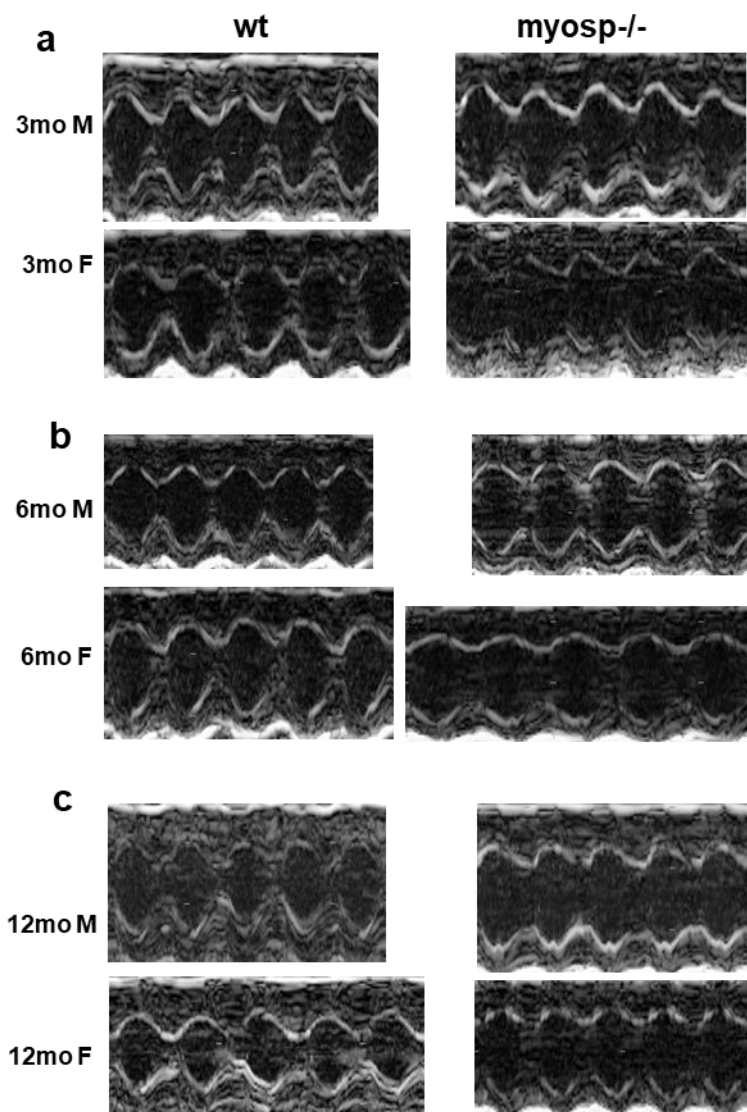
Επιπλέον, παρατηρήθηκε γενική συστολική δυσλειτουργία στα myosp-/- ποντίκια, καθώς πέρα από τις διαφορές στη τελοσυστολική διάμετρο της αριστερής κοιλίας (LVESD) (Εικόνα 59B), βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές και στο πάχος του οπίσθιου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη συστολή (PWTs) (Εικόνα 61B).

Μια άλλη καρδιακή παράμετρος, ο λόγος της ακτίνας της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας προς το τελοδιαστολικό πάχος του οπισθίου τοιχώματος (LV radius/PWTd, r/h) που είναι δείκτης του στρες στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας, βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα myosp-/- ποντίκια σε σύγκριση με τα wt (Εικόνα 61C).

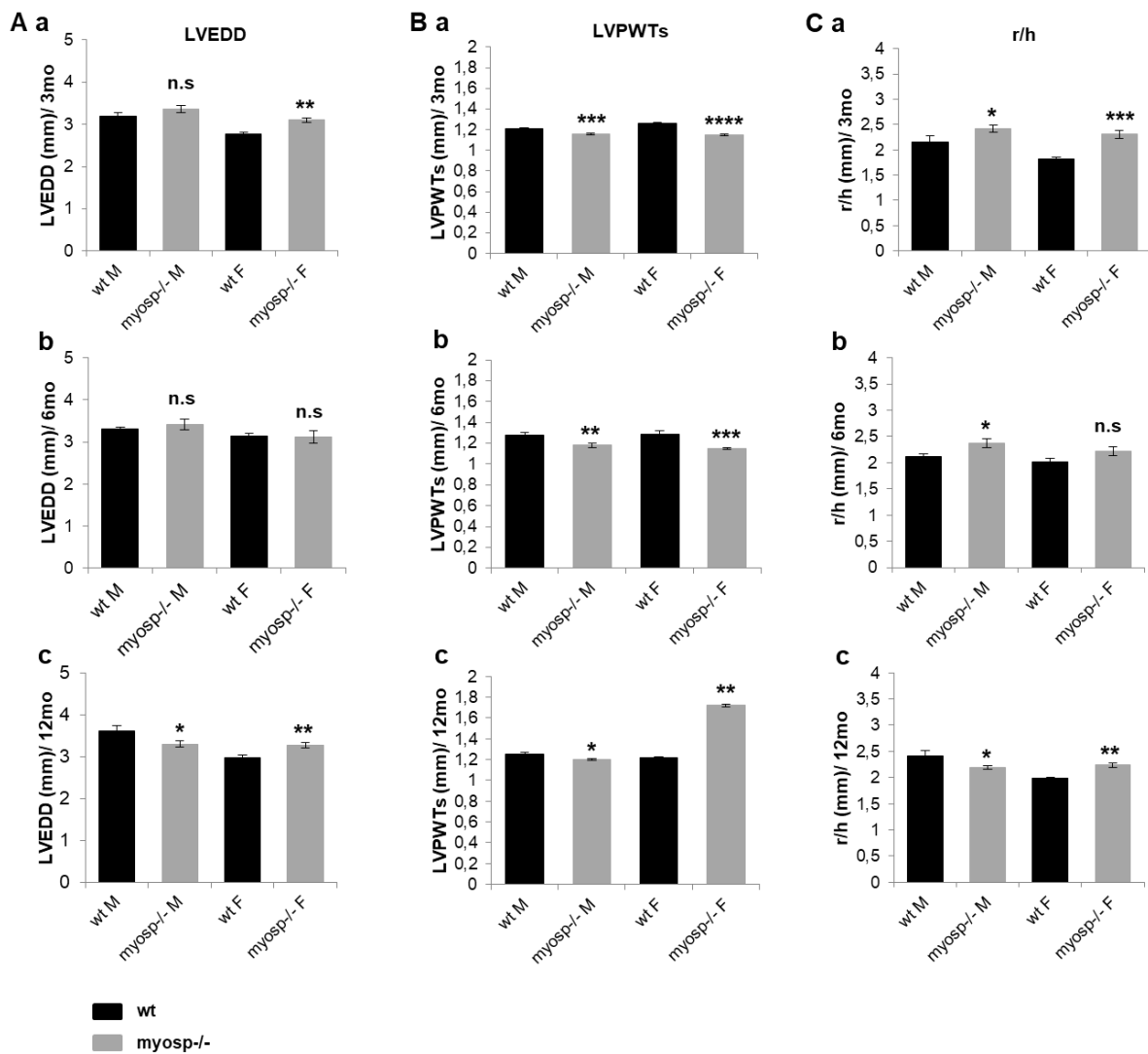
Πραγματοποιήσαμε επίσης, ηχοκαρδιογραφική μελέτη σε αρσενικά και θηλυκά myosp+/- ετερόζυγα ποντίκια ηλικίας 6 μηνών (Συμπληρωματικοί πίνακες 3, 4). Αξίζει να αναφέρουμε κάποια ενδιαφέροντα ευρήματα της μελέτης των ποντικών αυτών. Η ηχοκαρδιογραφική μελέτη των θηλυκών και όχι των αρσενικών myosp+/- ποντικών έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού της κλασματικής βράχυνσης (%FS) περίπου 12%. Στην ιστολογική μελέτη παρατηρήσαμε ότι τα myosp+/- ποντίκια έχουν διατατικό φαινότυπο, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την αύξηση τόσο της τελοσυστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (LVESD), όσο και της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (LVEDD). Ειδικότερα, η παράμετρος LVESD είναι αυξημένη 16% τόσο στα αρσενικά, όσο και στα θηλυκά myosp+/- ποντίκια, ωστόσο μόνο στα αρσενικά ποντίκια η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική, γεγονός που δείχνει επηρεασμένη τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας. Τέλος, η καρδιακή παράμετρος r/h που όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι δείκτης του στρες στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας, βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα myosp+/- αρσενικά ποντίκια σε σύγκριση με τα wt (Συμπληρωματικοί πίνακες 3, 4).



Εικόνα 59: Η απουσία της *myosrygn* προκαλεί διαταραχή της καρδιακής λειτουργίας και διατακτική μυοκαρδιοπάθεια. Ηχοκαρδιογραφία σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια wt και *myosp-/-*, ηλικίας 3, 6 και 12 μηνών. **A.** Δεδομένα για το ποσοστό κλασματικής βράχυνσης της αριστερής κοιλίας (percent of fractional shortening/ %FS) για τις προαναφερθέντες κατηγορίες. **B.** Δεδομένα για τη τελοσυστολική διάμετρο αριστερής κοιλίας (LV end-systolic diameter, LVESD) για τις προαναφερθέντες κατηγορίες. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA με Bonferroni-Dunn post-hoc test, * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0001$ vs wt; n.s: not statistically significant (μη στατιστικά σημαντικό).



Εικόνα 60: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ηχοκαρδιογραφημάτων μέσω ανάλυσης υπερηχογραφίας (M-Mode 2D-Directed).



Εικόνα 61: Ηχοκαρδιογραφία σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια wt και myosp-/-, ηλικίας 3, 6 και 12 μηνών. **A.** Δεδομένα για τη τελοδιαστολική διάμετρο αριστερής κοιλίας (LV end-diastolic diameter, LVEDD) για τις προαναφερθέντες κατηγορίες. **B.** Δεδομένα για το πάχος του οπίσθιου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη συστολή (LV posterior wall thickness at systole, PWTs) για τις προαναφερθέντες κατηγορίες. **C.** Δεδομένα του λόγου της ακτίνας της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας προς το τελοδιαστολικό πάχος του οπίσθιου τοιχώματος (LV radius/PWTd, r/h). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA με Bonferroni-Dunn post-hoc test, *P<0,05, **P<0,005, ***P<0,0001 vs wt; n.s: not statistically significant (μη στατιστικά σημαντικό).

Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου και στατιστική ανάλυση των *myosp*^{-/-} vs *wt* ποντικών σε αρσενικά ποντίκια ηλικίας 3, 6 και 12 μηνών. Μέσος όρος±SE. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA με Bonferroni-Dunn post-hoc test, *P<0,05, **P<0,005, ***P<0,0005, **** P<0,0001 vs *wt*.

a.

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{-/-}
Males 3mo	N=10	N=14
HR	570,16±12,95	543,07±17,95
LVEDD (mm)	3,19±0,08	3,36±0,09
LVESD (mm)	1,76±0,05	2,10±0,07**
LVPWTd (mm)	0,72±0,01	0,70±0,01*
LVPWTs (mm)	1,21±0,01	1,16±0,01***
FS (%)	44,92±0,87	37,57±0,78****
r/h	2,16±0,12	2,42±0,07*

b.

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{-/-}
Males 6mo	N=7	N=7
HR	530,71±14,67	555,43±32,27
LVEDD (mm)	3,31±0,05	3,41±0,13
LVESD (mm)	1,87±0,05	2,18±0,08*
LVPWTd (mm)	0,78±0,01	0,72±0,01**
LVPWTs (mm)	1,28±0,02	1,18±0,02**
FS (%)	43,39±0,83	36,07±0,48****
r/h	2,12±0,04	2,37±0,08*

c.

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{-/-}
Males 12mo	N=7	N=11
HR	545,86±23,12	628,97±5,85**
LVEDD (mm)	3,62±0,12	3,31±0,08*
LVESD (mm)	1,92±0,07	2,07±0,06
LVPWTd (mm)	0,75±0,02	0,75±0,01
LVPWTs (mm)	1,25±0,02	1,2±0,01*
FS (%)	46,64±0,74	37,60±0,71****
r/h	2,41±0,11	2,19±0,04*

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου και στατιστική ανάλυση των *myosp*^{-/-} vs *wt* ποντικών σε θηλυκά ποντίκια ηλικίας 3, 6 και 12 μηνών. Μέσος όρος±SE. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA με Bonferroni-Dunn post-hoc test, *P<0,05, **P<0,005, ***P<0,0005, **** P<0,0001 vs *wt*.

a.

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{-/-}
Females 3mo	N=5	N=5
HR	584,53±22,9	566,46±18,87
LVEDD (mm)	2,78±0,03	3,10±0,06**
LVESD (mm)	1,51±0,02	1,96±0,04****
LVPWTd (mm)	0,76±0,01	0,67±0,01****
LVPWTs (mm)	1,26±0,01	1,15±0,01****
FS (%)	45,79±0,33	36,65±0,89****
r/h	1,82±0,03	2,31±0,08***

b.

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{-/-}
Females 6mo	N=4	N=8
HR	547,91±26,28	526,25±19,31
LVEDD (mm)	3,15±0,05	3,12±0,14
LVESD (mm)	1,74±0,06	2,02±0,09*
LVPWTd (mm)	0,78±0,01	0,70±0,01*
LVPWTs (mm)	1,29±0,03	1,15±0,01***
FS (%)	44,76±1,12	35,13±0,41****
r/h	2,02±0,06	2,22±0,08

c.

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{-/-}
Females 12mo	N=7	N=10
HR	550,58±12,93	574,23±14,66
LVEDD (mm)	2,98±0,06	3,28±0,07**
LVESD (mm)	1,60±0,03	2,04±0,05****
LVPWTd (mm)	0,75±0,01	0,73±0,01
LVPWTs (mm)	1,22±0,01	1,72±0,01**
FS (%)	46,24±1,14	37,91±0,61****
r/h	1,98±0,03	2,24±0,04**

Συμπληρωματικός Πίνακας 3. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου και στατιστική ανάλυση των *myosp*^{+/-} vs *wt* ποντικών σε αρσενικά ποντίκια ηλικίας 6 μηνών. Μέσος όρος±SE. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA με Bonferroni-Dunn post-hoc test, *P<0,05, **P<0,005 vs *wt*.

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{+/-}
Males 6mo	N=7	N=13
HR	530,71±14,67	501,48±18,34
LVEDD (mm)	3,31±0,05	3,70±0,09*
LVESD (mm)	1,87±0,05	2,19±0,07**
LVPWTd (mm)	0,78±0,01	0,74±0,01*
LVPWTs (mm)	1,28±0,02	1,30±0,06
FS (%)	43,39±0,83	40,48,07±0,74
r/h	2,12±0,04	2,51±0,09*

Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου και στατιστική ανάλυση των *myosp*^{+/-} vs *wt* ποντικών σε θηλυκά ποντίκια ηλικίας 6 μηνών. Μέσος όρος±SE. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA με Bonferroni-Dunn post-hoc test, *P<0,05 vs *wt*

Genotype	wt	<i>myosp</i> ^{+/-}
Females 6mo	N=4	N=8
HR	547,91±26,28	512,50±16,06
LVEDD (mm)	3,15±0,05	3,35±0,20
LVESD (mm)	1,74±0,06	2,03±0,15
LVPWTd (mm)	0,78±0,01	0,72±0,01*
LVPWTs (mm)	1,29±0,03	1,21±0,02*
FS (%)	44,76±1,12	39,58±0,91*
r/h	2,02±0,06	2,32±0,16

Παράρτημα Συμπληρωματικών Πινάκων

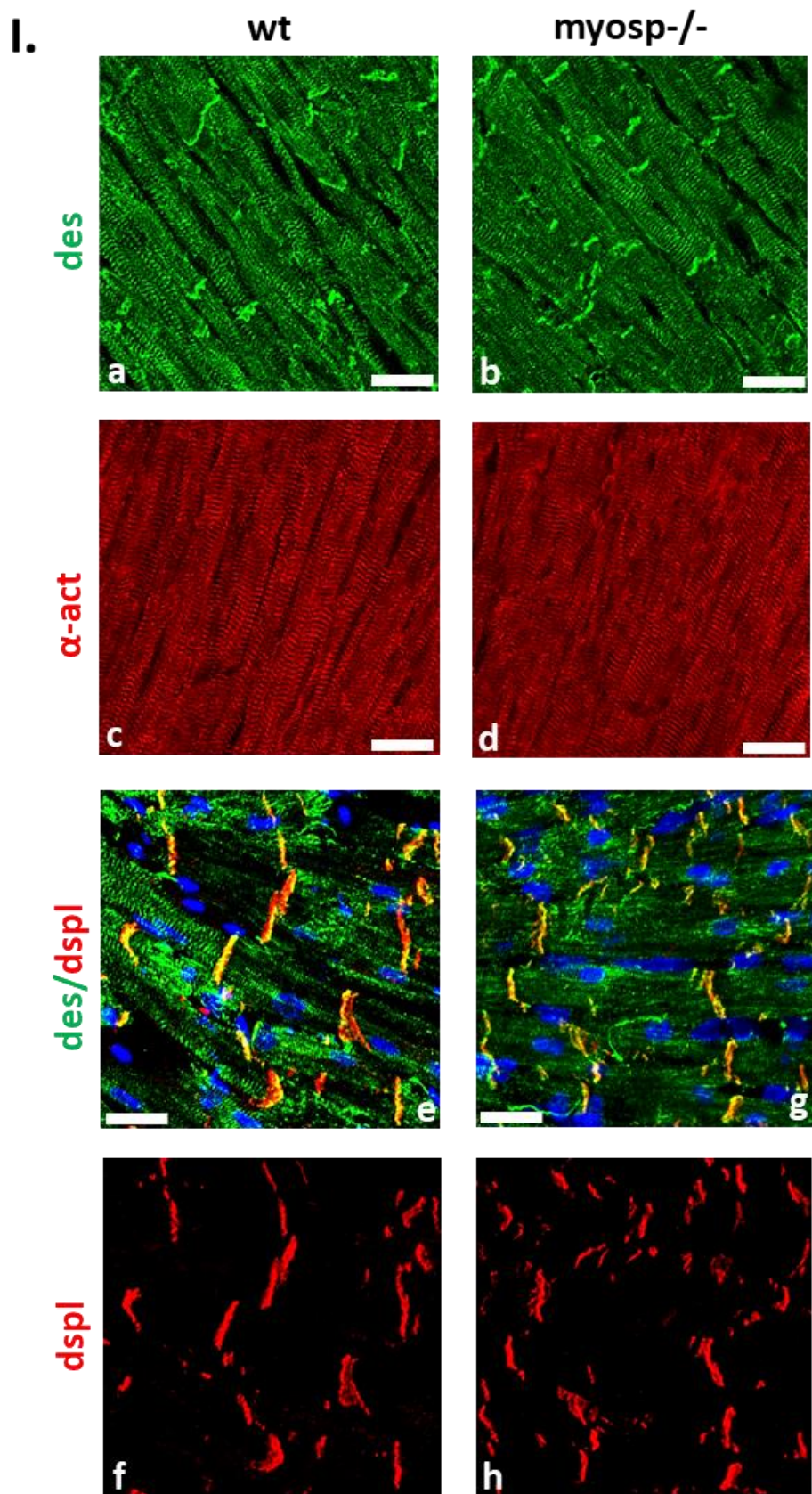
HR	Heart Rate - Καρδιακός ρυθμός (παλμοί ανά λεπτό)
LVEDD(mm)	Left Ventricular End Diastolic Dimension - Τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας
LVESD(mm)	Left Ventricular End Systolic Dimension - Τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας
PWTd (mm)	Posterior Wall Thickness Diastole - Πάχος οπίσθιου τοιχώματος στη διαστολή
PWTs (mm)	Posterior Wall Thickness Systole - Πάχος οπίσθιου τοιχώματος στη συστολή
FS%	Percent of fractional shortening - Ποσοστό κλασματικής βράχυνσης
r/h	LV radius to PWT ratio - Ακτίνα της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας προς το τελοδιαστολικό πάχος του οπίσθιου τοιχώματος

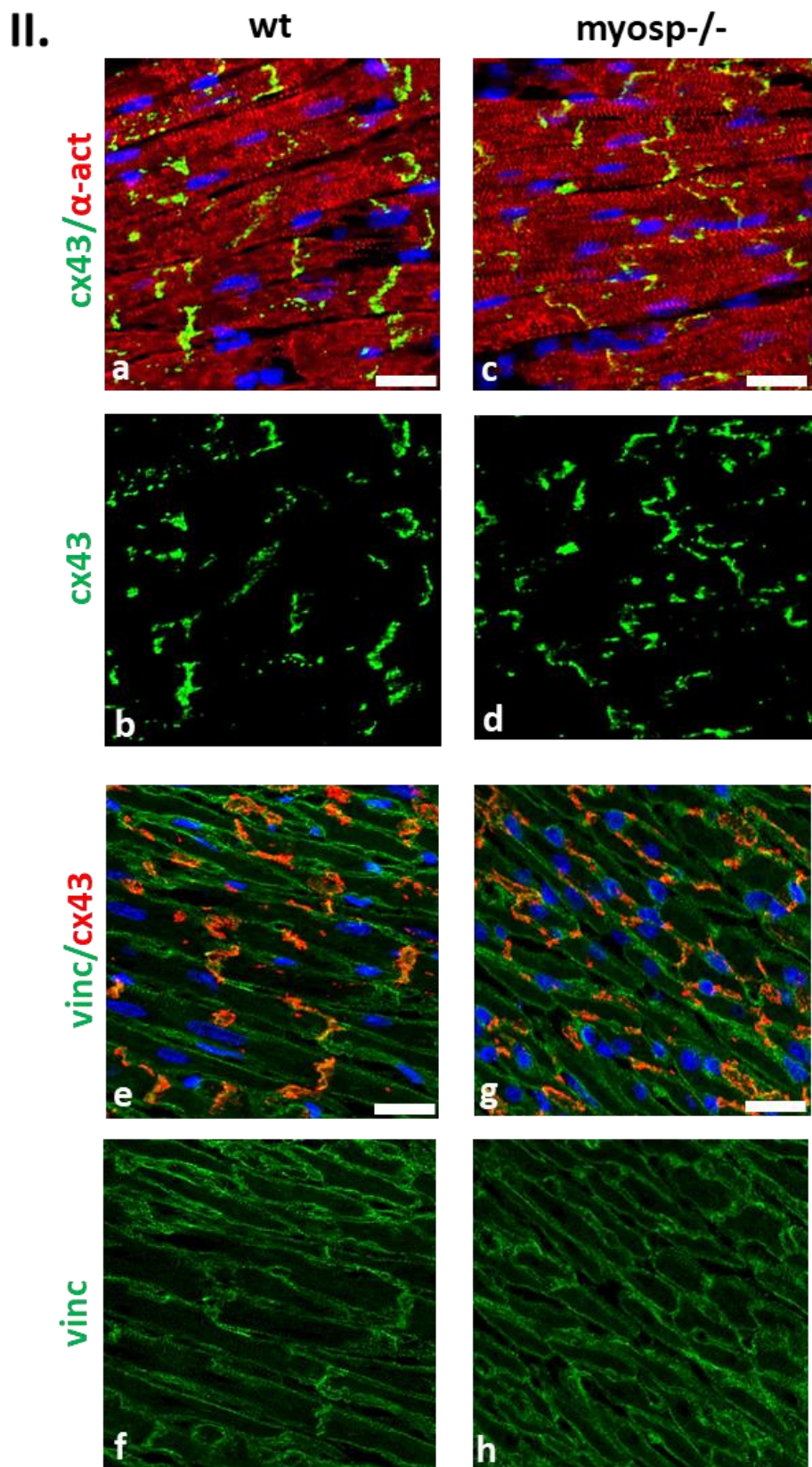
14. Η απουσία της myosrygn δεν επηρεάζει την οργάνωση της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων

Μελετήσαμε τις επιπτώσεις της έλλειψης της myosrygn στην ορθή τοπολόγηση της δεσμίνης (des), με ανάλυση ανοσοφθορισμού σε τομές μυοκαρδίου από myosp-/- ποντίκια. Ειδικότερα, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 62. Ia, b), η ανάλυση αυτή έδειξε ότι δεν επηρεάζεται η ορθή οργάνωση του δικτύου της δεσμίνης, καθώς η δεσμίνη διατηρεί την τοπολογία της τόσο στους Z δίσκους, όσο και στους εμβόλιμους δίσκους. Επιπλέον, η ανάλυση για την πρωτεΐνη των μυοϊνιδίων, α-ακτινίνη (α-actinin/α-act) έδειξε ότι η δομή των μυοϊνιδίων διατηρείται ακέραια στο myosp-/- μυοκάρδιο (Εικόνα 62. Ic, d). Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με την ανάλυση υπερδομής του καρδιακού μυός των myosp-/- ποντικίων με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω, και έδειξε ότι στο μυοκάρδιο των myosp-/- ποντικίων, η δομή των σαρκομεριδίων φαίνεται να μην επηρεάζεται, με τα μυοϊνίδια να είναι καλά πακεταρισμένα και οργανωμένα.

Στη συνέχεια, θέλαμε να μελετήσουμε εάν η απουσία της myosrygn επηρεάζει την τοπολογία των πρωτεϊνών των εμβόλιμων δίσκων και των κοσταμεριδίων και πραγματοποιήσαμε ανάλυση ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας αντισώματα ενάντια στις δεσμοπλακίνη (desmoplakin/dspl) (Εικόνα 62. Ie, f, g, h), βινκουλίνη (vinculin/vinc) (Εικόνα 62. IIe, f, g, h) και κοννεξίνη 43 (connexin-43/cx43) (Εικόνα 62. IIIa, b, c, d), οι οποίες είναι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των δεσμοσωμάτων (desmosomes), των συνδέσμων προσκόλλησης (adherens junctions) και των χασματοσυνδέσεων (gap junctions) αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι η vinculin εντοπίζεται εκτός από τους εμβόλιμους δίσκους και στα κοσταμερή. Συνολικά, οι αναλύσεις αυτές έδειξαν ότι η απουσία της myosrygn δεν επηρεάζει την τοπολόγηση βασικών πρωτεϊνών των εμβόλιμων δίσκων και των κοσταμεριδίων. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς δεν είναι σε συμφωνία με τις ανωμαλίες στην υπερδομή των εμβόλιμων δίσκων, όπως έδειξε η ανάλυση αυτών με ηλεκτρονική μικροσκοπία (θα αναλυθεί στη συνέχεια). Πιθανώς η παρατηρούμενη αποδιοργάνωση των εμβόλιμων δίσκων να οφείλεται είτε στον απεντοπισμό κάποιας άλλης πρωτεΐνης των εμβόλιμων δίσκων, πέρα από τα μόρια που εξετάστηκαν, είτε στην υψηλή διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Από την ανάλυση των εικόνων του ανοσοφθορισμού φαίνεται ότι myosrygn δεν επηρεάζει την οργάνωση της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων.





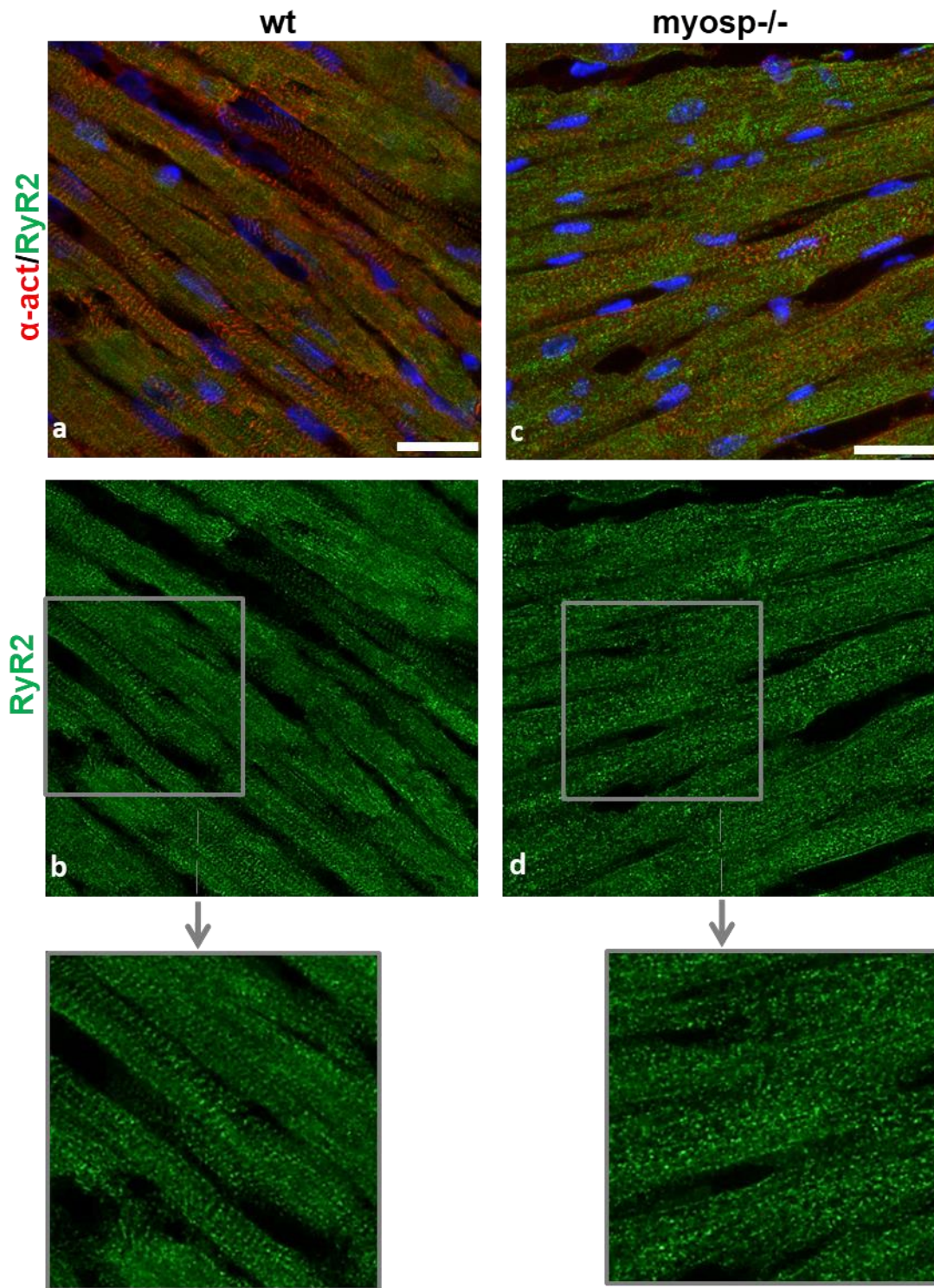
Εικόνα 62: Στο *myosp-/-* μυοκάρδιο, η απουσία της *myosp* δεν επηρεάζει την παρουσία των πρωτεϊνών της συστατικής συσκευής και των κοσταμεριδίων. Μελέτες ανοσοφθορισμού για τη

δεσμίνη (des), την α -ακτινίνη (α -act), καθώς και των πρωτεϊνών δεσμοπλακίνη (desmoplakin/dspl), κοννεξίνη 43 (connexin-43/cx43) και βινκουλίνη (vinculin/vinc) σε τομές από καρδιές ποντικών ηλικίας 5-6 μηνών. Η πρωτεΐνη των μυοϊνιδίων α -ακτινίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποιότητας της τομής. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst. Μπάρες κλίμακας: 25 μ m.

15. Ο απεντοπισμός του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2) στο myosp-/- μυοκάρδιο

Θελήσαμε να διερευνήσουμε με ανάλυση ανοσοφθορισμού σε τομές μυοκαρδίου από myosp-/- ποντίκια, εάν η τοπολογία του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2) επηρεάζεται από την έλλειψη της myospryn. Αξίζει να σημειωθεί ότι η SPRY συντηρημένη περιοχή στο C-τελικό άκρο της myospryn, έχει βρεθεί σε διάφορες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων είναι και ο υποδοχέας RyR2. Η κοινή αυτή συντηρημένη περιοχή υποθέταμε ότι πιθανώς να επιτρέπει την αλληλεπίδραση της myospryn με τον υποδοχέα RyR2. Όπως προαναφέρθηκε ανωτέρω, όντως η myospryn βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα RyR2 (Benson MA et al. 2017).

Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 63), η ανάλυση ανοσοφθορισμού έδειξε ότι επηρεάζεται ο ορθός εντοπισμός του υποδοχέα στις myospryn null καρδιές, καθώς ο υποδοχέας RyR2 δεν εμφανίζει το γραμμωτό πρότυπο εντοπισμού στο σαρκοπλασματικό δίκτυο (μεγενθυμένο γκρι τετράγωνο της εικόνας 63 b), αλλά ένα πιο στικτό πρότυπο (μεγενθυμένο γκρι τετράγωνο της εικόνας 63 b).



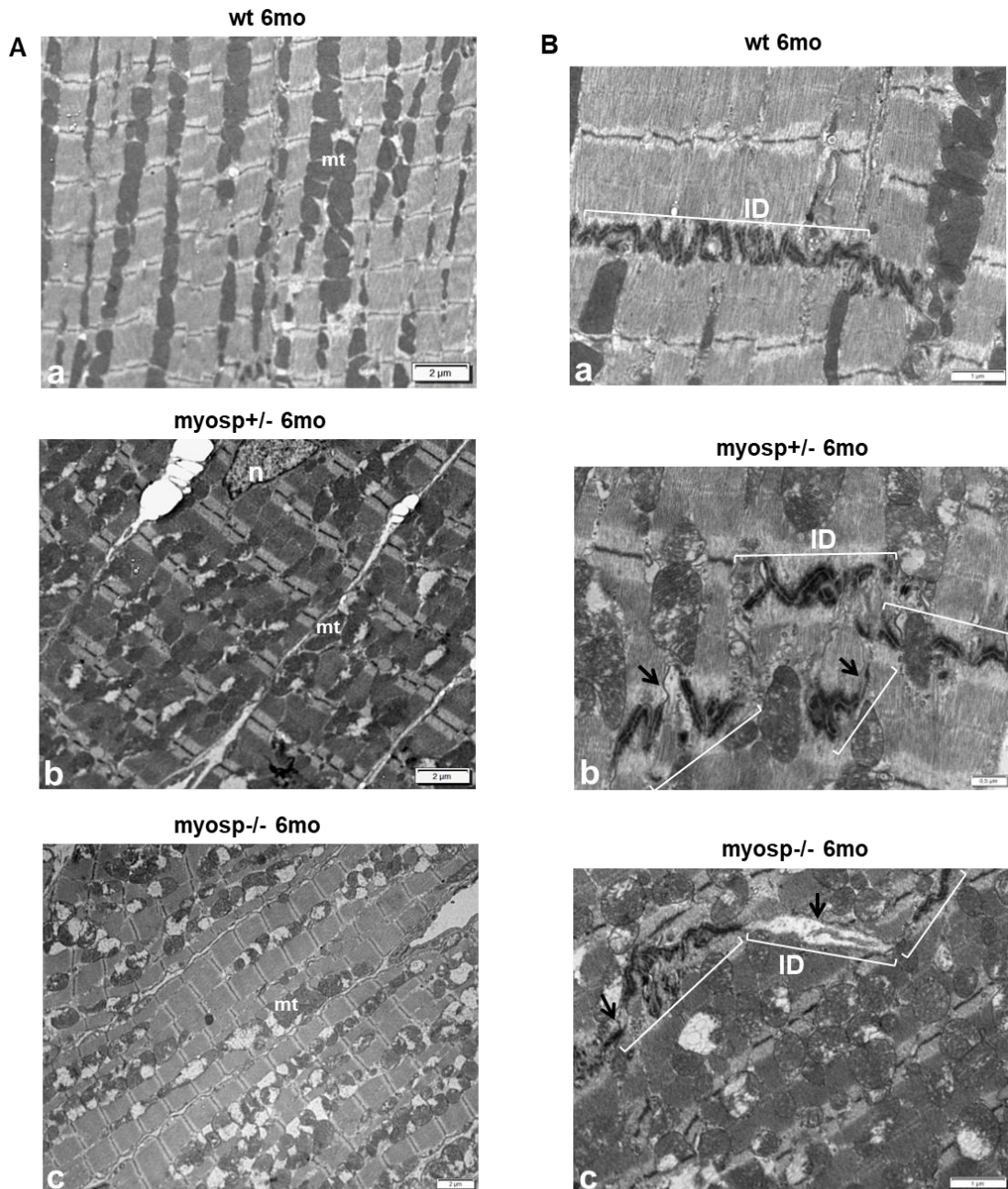
Εικόνα 63: Στο *myosp-/-* μυοκάρδιο, η απουσία της *myosprgn* επηρεάζει την τοπολογία του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2). Μελέτες ανοσοφθορισμού για τον υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2) σε τομές από καρδιές ποντικών ηλικίας 5-6 μηνών. Η πρωτεΐνη των μυοϊνιδίων α-ακτινίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποιότητας της τομής. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst. Μπάρες κλίμακας: 25μm.

16. Η απουσία της *myosp^{ry}* οδηγεί σε αλλοίωση της δομής των εμβόλιμων δίσκων

Αναλύθηκε η υπερδομή του καρδιακού μύος των *myosp^{+/-}* και *myosp^{-/-}* ποντικών με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Στο μυοκάρδιο των *myosp^{-/-}* ποντικών η δομή των σαρκομεριδίων φαίνεται να μην επηρεάζεται, με τα μυοϊνίδια να είναι καλά πακεταρισμένα και οργανωμένα (Εικόνα 64A).

Αντίθετα, όπως αναφέραμε εκτενώς και στην εισαγωγή, το *des^{-/-}* μυοκάρδιο παρουσιάζει μεγάλες αλλαγές στην υπερδομή του σε σύγκριση με το *wt*. Ειδικότερα, στο *des^{-/-}* μυοκάρδιο παρατηρείται αποδιοργάνωση και καταστροφή των μυοϊνιδίων, ενώ το πιο εμφανές πρόβλημα είναι τα ελαττώματα στη μορφολογία και την τοπολογία των μιτοχονδρίων, στα οποία όμως θα αναφερθούμε εκτενώς στη συνέχεια.

Όσον αφορά τους εμβόλιμους δίσκους, στα μυοκαρδιοκύτταρα ποντικών αγρίου τύπου αυτοί εμφανίζονται συνεχόμενοι, παράλληλοι προς τους Z-δίσκους και με κυματοειδή εμφάνιση (Εικόνα 64Ba). Αντίθετα, στα μυοκαρδιοκύτταρα ποντικών *myosp^{+/-}* και *myosp^{-/-}* οι εμβόλιμοι δίσκοι παρουσιάζουν σημαντική αποδιοργάνωση, ασυνέχειες και γενικότερες δομικές ανωμαλίες, συγκριτικά με τις χαρακτηριστικές δομές φυσιολογικών εμβόλιμων δίσκων των *wt* μυοκαρδιοκυττάρων (Εικόνα 64Bbc). Επομένως, η οργάνωση των δομών των εμβόλιμων δίσκων στο *myosp^{+/-}* και *myosp^{-/-}* μυοκάρδιο είναι ελαττωματική.



Εικόνα 64: Η απουσία της *myosryg* προκαλεί σοβαρές δομικές ανωμαλίες στους εμβόλιμους δίσκους του καρδιακού ιστού. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 6 μηνών, wt (N=4), *myosp+/-* (N=3) και *myosp-/-* (N=5). **A.** Η δομή των σαρκομεριδίων διατηρείται ακέραια στο μυοκάρδιο των *myosp+/-* και *myosp-/-* ποντικών (b, c). **B.** Η χαρακτηριστική δομή των εμβόλιμων δίσκων (λευκές παρενθέσεις) όπως φαίνεται στα wt και στα *myosp+/-* και *myosp-/-* μυοκαρδιοκύτταρα παρουσιάζεται διαταραγμένη με χαρακτηριστικές ασυνέχειες και την αποδιοργάνωσή τους, όπως αναδεικνύεται με τα μαύρα βέλη. mt: μιτοχόνδρια, ID: εμβόλιμοι δίσκοι. Μπάρες κλίμακας: 2 μm, 1 μm, 0,5 μm.

17. Το μυοκάρδιο των *myosp*^{-/-} ποντικών εμφανίζει σοβαρές δομικές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια

Η ανάλυση της υπερδομής του καρδιακού μυός των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών ανέδειξε σοβαρές ανωμαλίες στην υπερδομή των μιτοχονδρίων. Οι μιτοχονδριακές ανωμαλίες περιλαμβάνουν τη μη σωστή τοπολόγησή τους και την αποδιοργανωμένη αναδίπλωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης κατά των σχηματισμό των *cristae*.

Ειδικότερα, σε πολλά μιτοχόνδρια παρατηρείται ανεξέλεγκτη δημιουργία κυστιδίων κατά των σχηματισμό των πτυχώσεων (*blebbing cristae*), ενώ σε άλλα παρατηρείται εκτεταμένος εκφυλισμός των πτυχώσεων (*cristolysis*) (Εικόνα 65d, e). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μιτοχόνδρια με διάχυτο εκφυλισμό, συχνά παρατηρείται λύση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό που απαντάται σε πολύ μεγάλο βαθμό, είναι τα ενδομιτροχονδριακά έγκλειστα κυστίδια (*internal mitochondrial vacuoles*) (Εικόνα 65b, c, e). Τα ενδομιτροχονδριακά αυτά έγκλειστα μπορεί να είναι αρκετά σφαιρικά κυστίδια μέσα στο ίδιο μιτοχόνδριο ή μπορεί να έχουν τη μορφή κυστιδίων που περιβάλλονται από παραπάνω από μια μεμβράνη και έχουν τη χαρακτηριστική εμφάνιση των *onion-like-rings* (Εικόνα 65b).

Ένα τελευταίο χαρακτηριστικό της υπερδομής των μιτοχονδρίων του *myosp*^{+/-} και του *myosp*^{-/-} μυοκαρδίου είναι ότι σε περιοχές όπου οι βλάβες των μιτοχονδρίων είναι εκτεταμένες, παρατηρείται “κενό” κυτταροπλάσματος γύρω από κατεστραμμένα μιτοχόνδρια (Εικόνα 66a, b, c). Στα “κενά” αυτά σημεία παρατηρείται η ύπαρξη κυστιδίων και/ή πιθανώς μεμβρανών απομόνωσης πλησίον των μιτοχονδρίων.

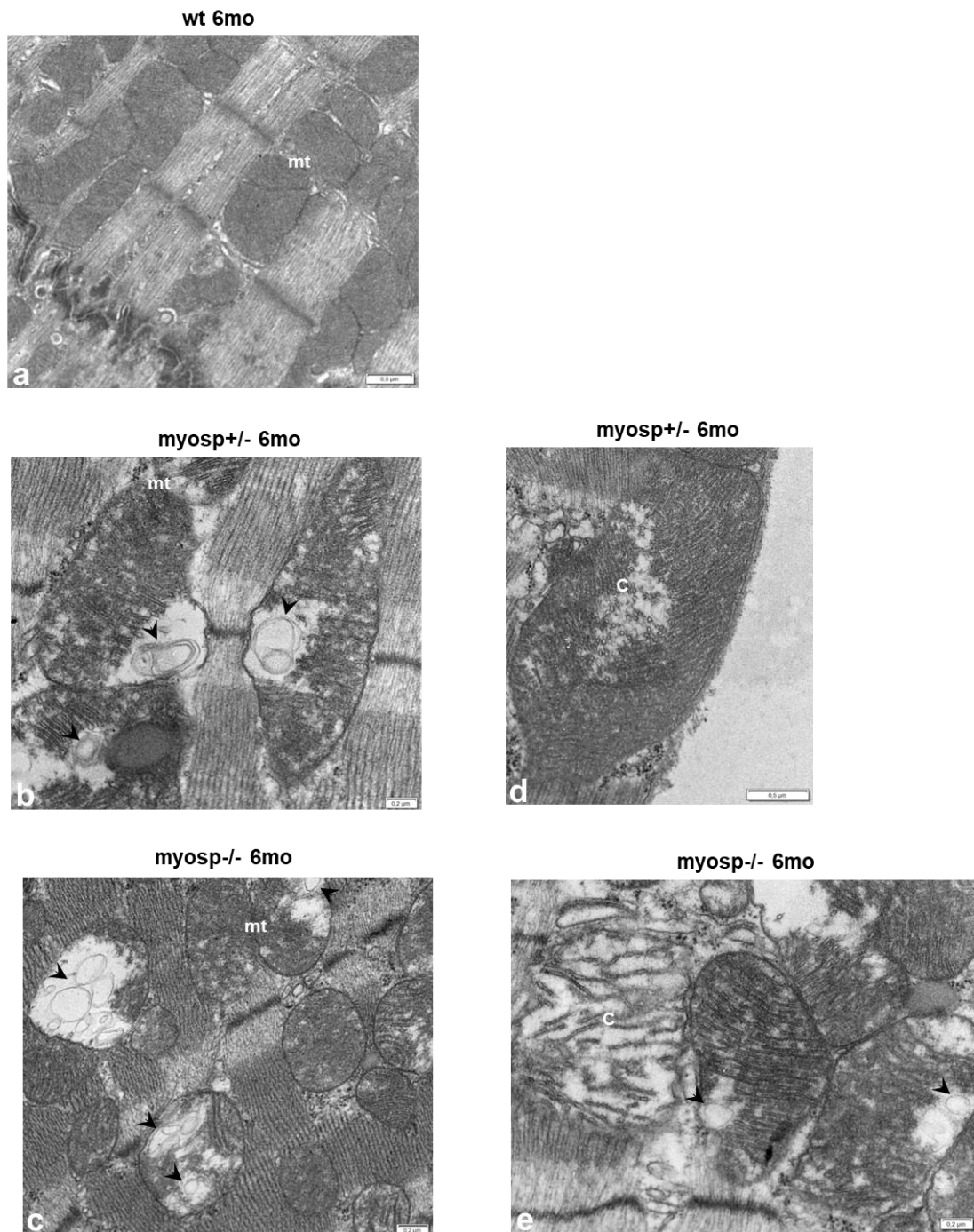
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα μιτοχονδριακά αυτά ελαττώματα εμφανίζονται τόσο στις *myosp*^{+/-}, όσο και στις *myosp*^{-/-} καρδιές, αλλά είναι σε μεγαλύτερο βαθμό στο μυοκάρδιο από τα *myosp*^{-/-} ποντίκια και όπως είναι αναμενόμενο χειροτερεύουν με την πάροδο της ηλικίας.

Οι εικόνες με τις μιτοχονδριακές ανωμαλίες στο *myosp*^{+/-} και στο *myosp*^{-/-} μυοκάρδιο προτείνουν την ύπαρξη μη φυσιολογικής μιτοφαγίας και πιθανώς τον υπερβολικό σχηματισμό μεμβρανών απομόνωσης πλησίον των μιτοχονδρίων. Τα σοβαρά μιτοχονδριακά προβλήματα των *myosp*^{-/-} ποντικών σε συνδυασμό με τη σύνδεση με τα λυσοσώματα και τις λυσοσωμικές πρωτεΐνες (όπως έχει αναφερθεί

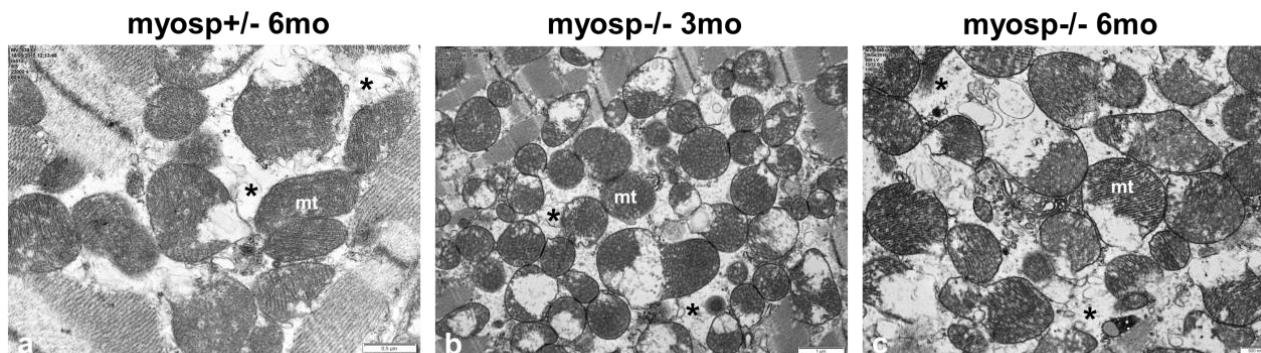
εκτενώς στην εισαγωγή), προτείνουν έναν πιθανό ρόλο της *myosp1gn* (μαζί με τη δεσμίνη) στο φυσικό και λειτουργικό cross-talk σαρκοπλασματικού δικτύου-μιτοχονδρίων (μέσω των MAMs), καθώς και στο σχηματισμό του αυτοφαγосώματος, στην ωρίμανση και στη λειτουργία του.

Όπως αναφέραμε εκτενώς και στην εισαγωγή, το *des*^{-/-} μυοκάρδιο παρουσιάζει μεγάλες αλλαγές στην υπερδομή του σε σύγκριση με το wt. Εκτός της αποδιοργάνωσης και της καταστροφής των μυοϊνιδίων, το πιο εμφανές πρόβλημα είναι τα ελαττώματα στη μορφολογία και την τοπολογία των μιτοχονδρίων, τα οποία ξεκινούν από πολύ νωρίς. Τα μιτοχονδριακά προβλήματα περιλαμβάνουν οίδημα της μήτρας, αλλαγή στο σχήμα και στη θέση και δραματικές αλλαγές στη μορφολογία της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Σε πολλά μιτοχόνδρια οι πτυχώσεις φαίνονται κατεστραμμένες, με μεγάλο ποσοστό να απουσιάζουν εντελώς από το μιτοχόνδριο.

Συνεπώς, τόσο το *myosp*^{-/-} και το *myosp*^{+/-}, όσο και το *des*^{-/-} μυοκάρδιο εμφανίζουν σοβαρές μιτοχονδριακές ανωμαλίες, με το κάθε μοντέλο να εμφανίζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ελαττώματα.



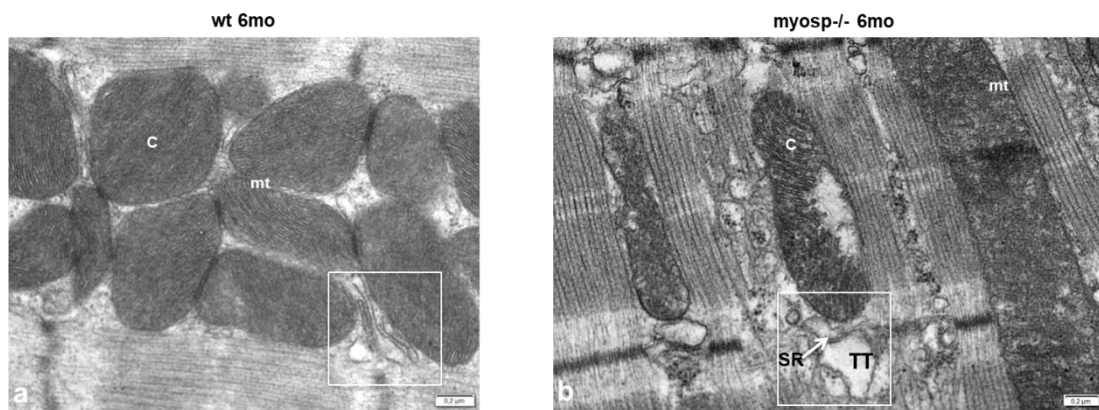
Εικόνα 65: Η απουσία της *myosp* προκαλεί σοβαρές δομικές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια του καρδιακού ιστού. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 6 μηνών, wt (N=4), *myosp*^{+/-} (N=3) και *myosp*^{-/-} (N=5). Εκτεταμένες μιτοχονδριακές ανωμαλίες στο μυοκάρδιο των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών. Τα χαρακτηριστικά ενδομιτροχονδριακά έγκλειστα συσσωματώματα είναι εμφανή με τις μαύρες κεφαλές βέλους (b,c,e). Στις εικόνες (d) και (e) παρατηρούμε την αποδιοργανωμένη αναδίπλωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και πιο συγκεκριμένα το blebbing (d) και τον εκφυλισμό της (e). mt: μιτοχόνδρια, C: εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Μπάρες κλίμακας: 0,5μm, 0,2μm.



Εικόνα 66: Η απουσία της *myosp* προκαλεί σοβαρές δομικές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια του καρδιακού ιστού. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 3 και 6 μηνών, *myosp*^{+/-} (N=3) και *myosp*^{-/-} (N=5). Εκτεταμένες μιτοχονδριακές ανωμαλίες στο μυοκάρδιο των *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} ποντικών όπου παρατηρείται “κενό” κυτταροπλάσματος (μαύρος αστερίσκος) γύρω από κατεστραμμένα μιτοχόνδρια. Στα “κενά” αυτά σημεία παρατηρείται η ύπαρξη κυστιδίων και/ή πιθανώς μεμβρανών απομόνωσης. mt: μιτοχόνδρια. Μπάρες κλίμακας: 0,5μm, 1μm.

18. Η υπερδομή των μεμβρανών του σαρκοπλασματικού δικτύου και των T-σωληνίσκων είναι διαταραγμένη στο μυοκάρδιο των *myosp*^{-/-} ποντικών

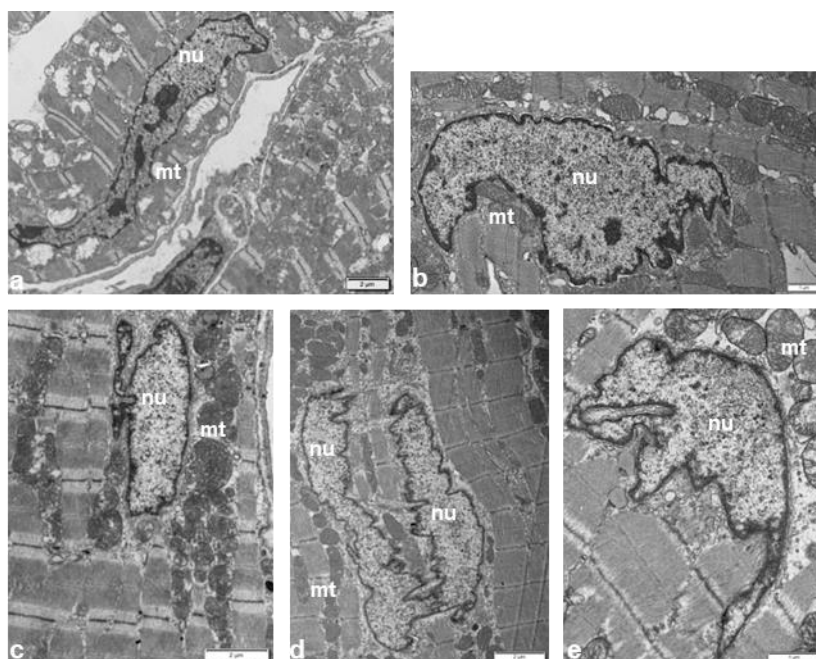
Η μελέτη της υπερδομής του καρδιακού μύος των *myosp*^{-/-} ποντικών με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας επεκτάθηκε και στις μεμβράνες του σαρκοπλασματικού δικτύου (SR) και των T-σωληνίσκων (T-tubules). Ειδικότερα, η δυαδική δομή που σχηματίζουν οι δύο αυτές μεμβράνες στα μυοκαρδιοκύτταρα φαίνεται να έχει διαταραχθεί εξαιτίας της έλλειψης της *myosp* και συχνά παρατηρείται απώλεια των σημείων επαφής μεταξύ του σαρκοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων (Εικόνα 67b). Το πιο χαρακτηριστικό εύρημα που εμφανίζει το μυοκάρδιο των *myosp*^{-/-} ποντικών είναι η διόγκωση των μεμβρανών αυτών (Εικόνα 67b). Τέλος, να σημειωθεί ότι οι ανωμαλίες αυτές παρατηρήθηκαν και στο μυοκάρδιο των *myosp*^{+/-} ποντικών, αλλά σε μικρότερη συχνότητα.



Εικόνα 67: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 6 μηνών, wt (N=4) και myosp^{-/-} (N=5). Οι μεμβράνες του σαρκοπλασματικού δικτύου και των T-σωληνίσκων είναι συχνά επηρεασμένες και εμφανίζονται διογκωμένες, όπως φαίνεται και στο λευκό τετράγωνο. Συχνά παρατηρείται απώλεια των σημείων επαφής μεταξύ του σαρκοπλασματικού δικτύου και των μιτοχόνδριων (b). mt: μιτοχόνδρια, C: εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Μπάρες κλίμακας: 0,2μm.

19. Η υπερδομή των πυρήνων στο μυοκάρδιο των myosp^{+/-} και myosp^{-/-} ποντικών είναι επηρεασμένη

Μελετήθηκε η υπερδομή των πυρήνων στο μυοκάρδιο των myosp^{+/-} και myosp^{-/-} ποντικών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μερικοί πυρήνες παρουσίαζαν ανωμαλίες στο σχήμα και στην τοπολογία, με χαρακτηριστικό τον πολύ αναδιπλωμένο πυρηνικό φάκελο και την ασυνήθιστη εγγύτητά τους με τα μιτοχόνδρια (Εικόνα 68).



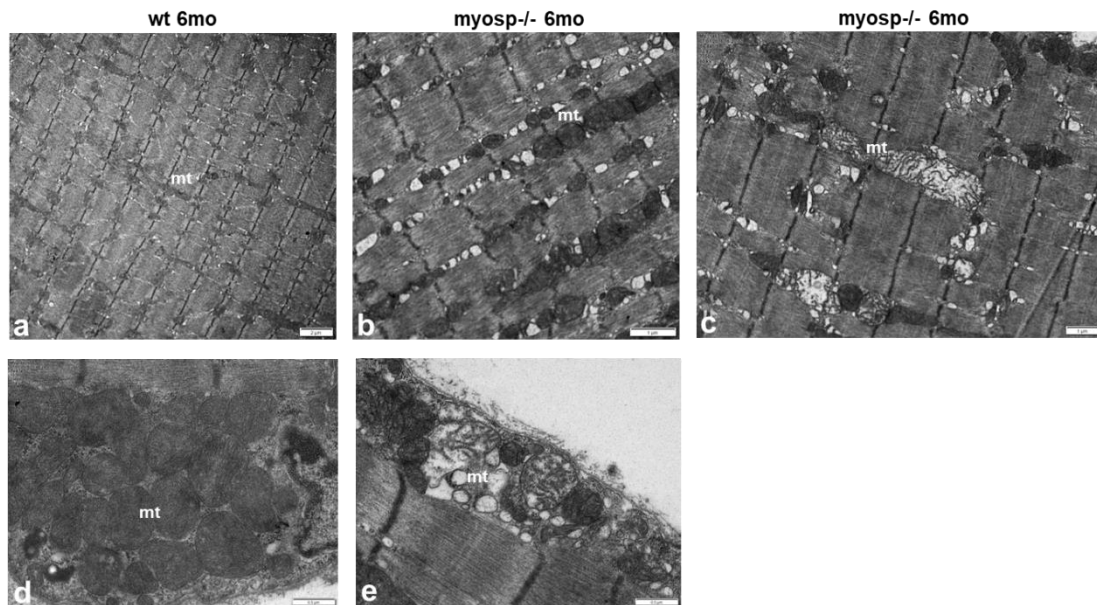
Εικόνα 68: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 6 μηνών, *myosp*^{+/-} (N=3) και *myosp*^{-/-} (N=5) αναδεικνύουν τις ανωμαλίες στους πυρήνες, τόσο στο σχήμα με τον αναδιπλωμένο πυρηνικό φάκελο (b-e), όσο και την τοπολογία με την ασυνήθηστη εγγύτητά τους με τα μιτοχόνδρια (a-e). mt: μιτοχόνδρια, nu: πυρήνας. Μπάρες κλίμακας: 2μm, 1μm.

20. Οι σκελετικοί μύες των *myosp*^{-/-} ποντικών εμφανίζουν σοβαρές δομικές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια

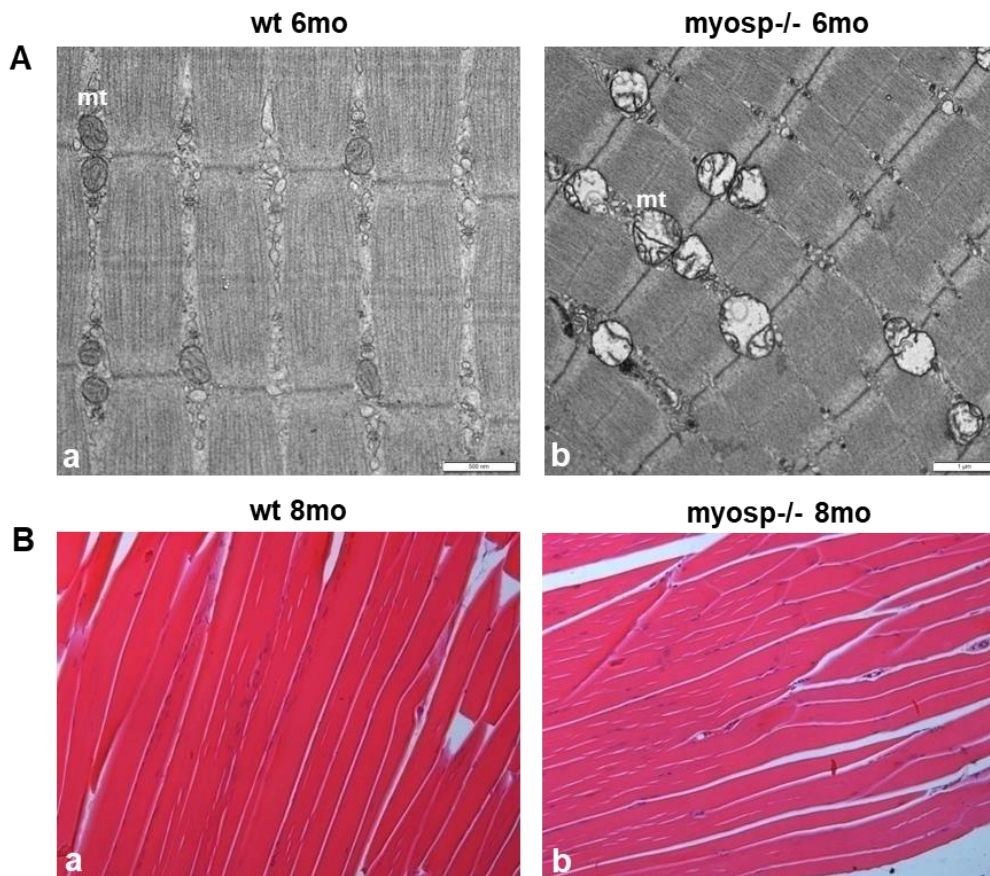
Εξετάσαμε τις συνέπειες της απουσίας της *myosp* στο σκελετικό μυ ποντικών ηλικίας 3 και 6 μηνών, εξαιτίας, των σοβαρών ανωμαλιών στην υπερδομή του μυοκαρδίου. Ειδικότερα, εξετάσαμε την υπερδομή τόσο του οξειδωτικού πελματικού μύος (*soleus*), όσο και του γλυκολυτικού γαστροκνημίου (*gastrocnemius*). Όπως φαίνεται και από τις αντίστοιχες εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Εικόνα 69, 70), και οι δύο τύποι μύος παρουσιάζουν ακέραιη τη δομή των σαρκομεριδίων (Εικόνα 69, 70).

Ειδικότερα, για το γαστροκνήμιο, ιστολογική ανάλυση με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης σε τομές του συγκεκριμένου μύος επαλήθευσε την ακέραιη δομή των μυοϊνιδίων (Εικόνα 70Bb). Από την άλλη πλευρά τόσο ο πελματικός μυς, όσο και το γαστροκνήμιο εμφανίζουν σοβαρές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια, και ειδικότερα ο πελματικός μυς λόγω του μεγάλου αριθμού μιτοχονδριων που διαθέτει.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποδιοργανωμένη αναδίπλωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (cristae) και ο εκφυλισμός της είναι χαρακτηριστικό τόσο των μιτοχονδρίων που βρίσκονται μεταξύ των μυοϊνιδίων, όσο και των υποσαρκεϊλληματικών (Εικόνα 69e). Σε πολλά μιτοχόνδρια οι πτυχώσεις φαίνονται κατεστραμμένες και σε ένα μεγάλο ποσοστό απουσιάζουν τελείως από τα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 69: Οι μιτοχονδριακές ανωμαλίες στο σκελετικό μυ των *myosp*^{-/-} ποντικών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε τομές σκελετικού πελματικού μυός ποντικών ηλικίας 6 μηνών, wt (N=4) και *myosp*^{-/-} (N=5). Αναδεικνύεται η ακέραιη οργάνωση των σαρκομεριδίων, καθώς και τα σοβαρά μιτοχονδριακά προβλήματα τόσο των μιτοχονδρίων που βρίσκονται μεταξύ των μυοϊνιδίων (b, c), όσο και των υποσαρκεϊλληματικών (e). mt: μιτοχόνδρια. Μπάρες κλίμακας: 2 μ m, 1 μ m, 500nm.



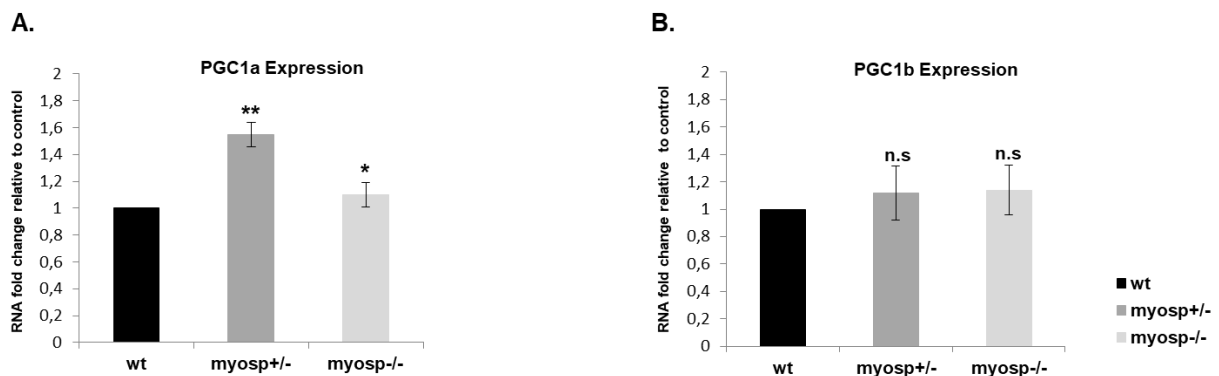
Εικόνα 70: Οι μιτοχονδριακές ανωμαλίες στο σκελετικό μυ των *myosp*^{-/-} ποντικών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε τομές σκελετικού γαστροκνημίου μυός (A) ποντικών ηλικίας 6 μηνών, wt (N=4) και *myosp*^{-/-} (N=5). Αναδεικνύεται η ακέραιη οργάνωση των σαρκομεριδίων, καθώς και τα σοβαρά μιτοχονδριακά προβλήματα. B. Η ιστολογική ανάλυση με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης σε τομές γαστροκνημίου από ποντίκια wt, και *myosp*^{-/-}, ηλικίας 8 μηνών δείχνει την ακέραιη μορφή των μυοϊνιδίων. mt: μιτοχόνδρια. Μπάρες κλίμακας: 1μm, 500nm.

21. Μελέτη της βιογένεσης των μιτοχονδρίων στα *myosp*^{-/-} ποντίκια

Η βιογένεση των μιτοχονδρίων εξασφαλίζει τον απαραίτητο αριθμό μιτοχονδρίων για την ορθή λειτουργία του κυττάρου και εξισορροπεί την έκφραση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Ο συντονισμός των πολύπλοκων αυτών διαδικασιών ρυθμίζεται κυρίως από την PGC1 (peroxisome proliferator-activated receptors) οικογένεια μεταγραφικών συνεργοποιητών και των στόχων τους (NRF1, PPARs και TFAM).

Δεδομένου των σοβαρών μιτοχονδριακών ανωμαλιών στο μυοκάρδιο τόσο των *myosp*^{+/-}, όσο και των *myosp*^{-/-} ποντικών, εξετάσαμε εάν αλλάζει η έκφραση των γονιδίων των παραγόντων PGC-1a και PGC-1b. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλλαγή στα επίπεδα του μεταγράφου του PGC-1b τόσο στο *myosp*^{-/-}, όσο και στο *myosp*^{+/-} μυοκάρδιο. Στα επίπεδα του μεταγράφου του PGC-1a βρέθηκε μια μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση τόσο στο *myosp*^{-/-}, όσο και στο *myosp*^{+/-} μυοκάρδιο (Εικόνα 71).

Εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν βρέθηκαν σημαντικές αλλαγές του PGC-1, γονιδίου κλειδί για τη βιογένεση, στο *myosp*^{-/-} μυοκάρδιο δεν εξετάσαμε τους στόχους τους (NRF1, PPARs και TFAM). Στο μέλλον θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση του μιτοχονδριακού DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο από καρδιές αγρίου τύπου, *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-}, για να μελετηθεί η ποσότητα των μιτοχονδρίων μεταξύ των γενοτύπων.



* $P < 0,05$, ** $P < 0,0001$ vs wt; n.s: not statistically significant (μη στατιστικά σημαντικό).

Εικόνα 71: Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης για το PGC-1a (A) και το PGC-1b (B) μέσω RT-PCR σε cDNA από καρδιές ποντικών wt, *myosp*^{+/-} και *myosp*^{-/-} (N=4 για κάθε γενότυπο). Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το wt. Για την ομαλοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου της β-ακτίνης. [$*P < 0,05$, ** $P < 0,0001$ vs wt; n.s: not statistically significant (μη στατιστικά σημαντικό)].

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Η έλλειψη της *myospryn* δεν προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα στα ποντίκια

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δημιουργήσαμε για πρώτη φορά παγκοσμίως το knock-out μοντέλο ποντικού της TRIM-like πρωτεΐνης *myospryn*. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η έλλειψη της *myospryn* δεν προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα στα ποντίκια, όπως ήταν η αρχική μας υπόθεση. Η υπόθεση αυτή βασιζόταν σε δύο δεδομένα που πρότειναν έναν ζωτικό ρόλο της *myospryn* στη σωστή καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία. Πρώτον, η *myospryn* εκφράζεται πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη, την εμβρυϊκή μέρα E10.5 (Durham JT et al. 2006). Δεύτερον, προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας με την *in vivo* καταστολή του μεταγράφου της *myospryn* (knock-down με antisense morpholino) στο πειραματικό μοντέλο του zebrafish, έδειξαν προβλήματα στην ανάπτυξη και στη λειτουργία της καρδιάς (Kouloumenta and Capetanaki, unpublished data, Kouloumenta, PhD thesis 2008).

Επομένως, με τη μελέτη μας εξακριβώσαμε εάν η *myospryn* είναι ζωτικής σημασίας στα θηλαστικά και δη στα ποντίκια *in vivo* και τις επιδράσεις της εξάλειψής της στη μακροσκοπική μορφολογία, τη λειτουργικότητα, τη γονιμότητα και τη βιωσιμότητα των ποντικίων. Τα αποτελέσματά μας, προς μεγάλη μας έκπληξη έδειξαν ότι τα ποντίκια με έλλειψη της *myospryn* ήταν παρόμοια, όσον αφορά τα εξωτερικά σωματικά χαρακτηριστικά, τη μακροσκοπική ανατομία, τη λειτουργικότητα (συμπεριλαμβανομένης και της αναπαραγωγής) και τη βιωσιμότητα, σε σύγκριση με τα wt και τα ετερόζυγα ποντίκια και επιπλέον, παρουσίασαν τις αναμενόμενες Μενδελικές αναλογίες.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι μελέτες έχουν δείξει ότι τα βασικά γονίδια (essential genes) που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και τη γονιμότητα, είναι λιγότερο πιθανό να έχουν παράλογα γονίδια και είναι πιθανότερο να είναι μέρος ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών (White JK et al. 2013). Όπως βρέθηκε πρόσφατα, η *myospryn* έχει παράλογο γονίδιο τη *minispryn* (Benson MA et al. 2017) και επομένως, είναι λιγότερο πιθανό να αποτελεί βασικό γονίδιο, απαραίτητο για την επιβίωση και τη γονιμότητα.

Επιπρόσθετα, αρκετές πρόσφατες αναφορές σε έναν αριθμό οργανισμών μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου του zebrafish (Law SH and Sargent TD, 2014; Kok FO et al. 2015), του Arabidopsis (Chen X et al. 2014; Gao Y et al. 2015) και του ποντικού (De Souza AT et al. 2006; Daude N et al. 2012), έχουν αποκαλύψει φαινοτυπικές

διαφορές μεταξύ των knock-out μοντέλων (mutants) και των knock-down (antisense-treated animals, morpholino/MO). Αυτές οι διαφορές έχουν αποδοθεί σε διάφορους λόγους, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της έκφρασης σχετιζόμενων γονιδίων, της τοξικότητας ή των επιπτώσεων εκτός στόχων (off-target effects) των αντινοσηματικών (anti-sense) αντιδραστηρίων (Robu ME et al. 2007; Olejniczak M et al 2010; Jackson AL and Linsley PS, 2010; Baek ST et al. 2014). Μια εναλλακτική εξήγηση προτάθηκε πρόσφατα βασισμένη σε μια μελέτη στο zebrafish που ανέφερε ότι οι προτεινόμενες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης και η επακόλουθη αντιστάθμισή τους (genetic compensation) παρατηρήθηκε στα knock-out, αλλά όχι στα knock-down ζώα (Rossi A et al. 2015). Ειδικότερα, η γενετική αντιστάθμιση ενεργοποιείται στις knock-out προσεγγίσεις, αλλά όχι στις knock-down, λόγω των επιγενετικών μεταβολών έπειτα από βλάβη του DNA στα ανώτερα θηλαστικά (El-Brolosy MA and Stainier D.Y.R., 2017). Επιπλέον, μελέτες προτείνουν τα μονοπάτια επιτήρησης mRNA, όπως ncRNAs (small non-coding RNAs), uORFs (upstream open reading frames), RBPs (RNA-binding proteins) και miRNAs (microRNAs), ως δυνητικούς παίκτες στη γενετική αντισταθμιστική απόκριση (El-Brolosy MA and Stainier D.Y.R., 2017). Επομένως, υποθέτουμε ότι κάποια από τις προαναφερθείσες εξηγήσεις ισχύει και στην περίπτωση του myospryn knock-out μοντέλου στο ποντίκι, που σε αντίθεση με το knock-down στο zebrafish, δεν εμφανίζει εμβρυϊκή θνησιμότητα.

2. Τεχνικές προκλήσεις για τη δημιουργία του myospryn null μοντέλου

Στο σημείο αυτό είναι σπουδαίο να αναφερθεί ότι ο γονιδιακός τόπος της myospryn ήταν εξαιρετικά δύσκολος στη στόχευση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πολλές προσπάθειες κατασκευής του φορέα στόχευσης της knock out σειράς της myospryn, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε BAC κλώνους, και καμία από αυτές τις προσπάθειες δε στέφτηκε με επιτυχία. Για αυτό το λόγο η προσέγγιση αυτή εγκαταλείφθηκε και ο φορέας στόχευσης κατασκευάστηκε μέσω μοριακής κλωνοποίησης.

Ο φορέας στόχευσης της knock out σειράς χρησιμοποιήθηκε για τον ηλεκτρομετασχηματισμό εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων (ES cells), έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιακού τόπου της myospryn. Συγκεκριμένα χρειάστηκε να ελέγξουμε 1920 κλώνους

εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων που παρουσίασαν αντίσταση στο αντιβιοτικό geneticin G418 (για 10 συνεχείς ημέρες), για να βρούμε μόλις 17 κλώνους που είχαν ενσωματώσει με επιτυχία τον φορέα στόχευσης στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιακού τόπου της *myosprgn* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Ειδικότερα, η επιτυχία του ομόλογου ανασυνδυασμού ήταν πολύ χαμηλή, μόλις 0,9%.

Στα περισσότερα ES κύτταρα, ο φορέας στόχευσης ενσωματώνεται τυχαία στο γονιδίωμα. Σε ελάχιστα κύτταρα πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του φορέα στόχευσης και της ακολουθίας του συγγενούς DNA με συχνότητα περίπου 10^{-5} - 10^{-6} (Templeton NS et al. 1997; Hall B et al. 2009). Παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού είναι οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται κατά την ηλεκτροδιάτρηση (πχ. αυξημένος αριθμός κυττάρων που διαμολύνονται, αύξηση κυτταρικής επιβίωσης) και η πυκνότητα επίστρωσης των κυττάρων αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση. Έχει αναφερθεί, επίσης ότι η χρήση φορέα στόχευσης του ίδιου γενετικού υπόβαθρου με αυτό των ES κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα στόχευσης αυξάνει τη συχνότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού (te Riele H et al. 1992; Hall B et al. 2009). Επιπλέον, η συχνότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού μπορεί να επηρεαστεί από το μήκος της ομολογίας που χρησιμοποιείται στον φορέα και φαίνεται να εξαρτάται από τη θέση του εκάστοτε γονιδίου. Το γεγονός αυτό, πιθανώς να αντανακλά σε διαφορές που υπάρχουν στη δομή της χρωματίνης στον κάθε γονιδιακό τόπο και επομένως, στη δυσκολία ή την ευκολία προσπέλασης της χρωματίνης από τον ενζυματικό μηχανισμό που εμπλέκεται.

3. Το νεοδημιουργηθέν *myosprgn null* μοντέλο διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας

Το νεοδημιουργηθέν πειραματικό μοντέλο με έλλειψη της *myosprgn* εμφανίζει διατακτικό φαινότυπο, ο οποίος επαληθεύτηκε τόσο από την ιστολογική, όσο και από την ηχοκαρδιογραφική ανάλυση. Ειδικότερα, η ιστολογική ανάλυση έδειξε παντελή έλλειψη ασβεστίωσης στο *myosprgn null* μυοκάρδιο, ενώ όπως είναι γνωστό η ασβεστίωση αποτελεί χαρακτηριστικό της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας λόγω έλλειψη της δεσμίνης (Milner DJ et al. 1996; Milner DJ et al. 1999). Επιπλέον, η εκτεταμένη ίνωση είναι ένα χαρακτηριστικό του *des*^{-/-} μυοκαρδίου, αλλά δεν παρατηρήθηκε σε τομές καρδιών από ετερόζυγα *myosprgn* (*myosp*^{+/-}) ποντίκια. Να

σημειωθεί ότι οι καρδιές από *myosprgn null* (*myosp-/-*) ποντίκια ηλικίας 6 και 10 μηνών εμφάνισαν ινωτικές περιοχές, με το φαινόμενο να είναι πιο έντονο στα μεγαλύτερα ζώα. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των *myosp-/-* καρδιών, κυρίως από ποντίκια ηλικίας 10 μηνών ήταν οι ανωμαλίες στους θαλάμους της καρδιάς και δη η διάταση των κόλπων (αμφικολπική διάταση) που συνοδευόταν από ίνωση των κόλπων και στάση του αίματος και δημιουργία πήγματος.

Οι εικόνες αυτές προσομοιάζουν με αυτές πειραματικών μοντέλων ποντικών με κολπική μαρμαρυγή (atrial fibrillation/AF) (Riley G et al. 2012; Li N et al. 2014), όπου παρατηρείται αμφικολπική διάταση. Ειδικότερα, σε ένα τέτοιο διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού με καταστολή του ρυθμιστή CREM (cAMP response element modulator), βρέθηκε μειωμένη φωσφορυλίωση του CREM, η οποία συσχετίστηκε με αλλοιωμένη Ca^{2+} ομοιόσταση και πιο συγκεκριμένα με διαρροή ασβεστίου που μεσολαβείται από τους υποδοχείς RyRs. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την προοδευτική ανάπτυξη υποστρώματος κολπικής μαρμαρυγής (Li N et al. 2014). Να σημειωθεί ότι ο CREM ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων cAMP response element binding (CREB)/activating transcription factors (ATF) και είναι ένας στόχος φωσφορυλίωσης από την PKA (Li N et al. 2014). Η έλλειψη της AKAP-*myosprgn* στο μυοκάρδιο θα μπορούσε να επηρεάσει τη φωσφορυλίωση διαφόρων σημαντικών υποστρωμάτων. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε η *myosprgn* αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα RyR2 (Benson MA et al. 2017) και όπως δείξαμε στην παρούσα μελέτη η απουσία της οδηγεί σε μη ορθό εντοπισμό του υποδοχέα στις *myosprgn null* καρδιές. Το γεγονός αυτό πιθανώς να διαταράσσει, την μεσολαβούμενη από τους υποδοχείς RyRs, διαρροή ασβεστίου, οδηγώντας έτσι πιθανώς σε ανάπτυξη αρρυθμιών και κολπικής μαρμαρυγής. Επομένως, η αμφικολπική διάταση που παρατηρείται σε μεγάλα σε ηλικία *myosprgn null* ποντίκια, πιθανώς να οφείλεται στον απεντοπισμό των RyR υποδοχέων.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι η έλλειψη της *myosprgn* προκαλεί διαταραγμένη καρδιακή λειτουργία, όπως προέκυψε από τη στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού της κλασματικής βράχυνσης (%FS) (περίπου 20%). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα θηλυκά ποντίκια εμφανίζουν χειρότερο φαινότυπο από τα αρσενικά της ίδιας ηλικιακής ομάδας. Επομένως, το φύλο πρέπει να λαμβάνεται προσεκτικά υπόψη κατά τη χρήση του *myosprgn null* ποντικού ως μοντέλο διατατικής μυοκαρδιοπάθειας.

Παρόμοια ανισότητα μεταξύ των φύλων στην καρδιακή λειτουργία έχει παρατηρηθεί και στο mdx μοντέλο για τη μελέτη της μυοκαρδιοπάθειας Duchenne, όπου τα θηλυκά ποντίκια εμφάνιζαν χειρότερο φαινότυπο (Bostick B et al. 2010). Επιπλέον, στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές, στις οποίες τα θηλυκά ποντίκια εμφανίζουν πιο σοβαρή καρδιακή νόσο από τα αρσενικά (Meyer S et al. 2014). Τέτοια παράδειγμα αφορούν σε περιπτώσεις: α) διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας (Ponten A et al. 2003; Tripathi R et al. 2017), β) διαβητικής μυοκαρδιοπάθειας (diabetic cardiomyopathy) (Zhang X et al. 2003; Ren J and Ceylan-Isik A, 2004; Toedebusch R et al. 2018), γ) περιοριστικής μυοκαρδιοπάθειας (Rivenes SM et al. 2000), δ) μυοκαρδιοπάθειας Takotsubo (Stollberger C and Finsterer J, 2011) και άλλων μορφών μυοκαρδιοπαθειών (Meyer S et al. 2014).

Οι διαφορές φύλου αναγνωρίζονται ολοένα και περισσότερο ως κρίσιμος παράγοντας για τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των καρδιακών παθήσεων (Mendelsohn ME et al. 2005; Huxley VH, 2007; Prabhavathi K et al. 2014). Τυπικά, οι καρδιακές παθήσεις είναι πιο σοβαρές στους άνδρες από ό, τι στις γυναίκες, καθώς η επικρατούσα υπόθεση είναι ότι τα οιστρογόνα μπορεί να διαδραματίσουν προστατευτικό ρόλο (Konhilas JP and Leinwand LA, 2007; Prabhavathi K et al. 2014).

4. Η myospryn δεν είναι απαραίτητη για την οργάνωση της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων

Οι μελέτες ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι στα myospryn null ποντίκια η σωστή τοπολόγηση της δεσμίνης, η οποία όπως προαναφέραμε αλληλεπιδρά με τη myospryn (Kouloumenta A et al. 2007), δεν επηρεάζεται, υποδεικνύοντας ότι η myospryn δεν είναι υπεύθυνη για την ορθή οργάνωση του δικτύου της δεσμίνης. Ειδικότερα, στο myosp^{-/-} μυοκάρδιο η δεσμίνη βρέθηκε να διατηρεί την τοπολογία της τόσο στους Z δίσκους, όσο και στους εμβόλιμους δίσκους. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι πιθανώς η σύνδεση της δεσμίνης με αυτές τις δομές μεσολαβείτε από άλλες πρωτεΐνες.

Επιπλέον, δείξαμε ότι η απουσία της myospryn δεν φαίνεται να επηρεάζει την τοπολόγηση βασικών πρωτεϊνών των εμβόλιμων δίσκων και των κοσταμεριδίων, όπως η desmoplakin, η vinculin και η connexin 43, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές

πρωτεΐνες των δεσμοσωμάτων (desmosomes/desmoplakin), των συνδέσμων προσκόλλησης (adherens junctions/vinculin) και των χασματοσυνδέσεων (gap junctions/connexin 43) αντίστοιχα. Η vinculin εντοπίζεται εκτός από τους εμβόλιμους δίσκους και στα κοσταμερή. Αξίζει να σημειωθεί ότι η myosrygn και η δεσμίνη συντοπολογούνται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα, στους εμβόλιμους δίσκους και στα κοσταμερίδια των μυοκαρδιοκυττάρων (Kouloumenta A et al. 2007). Προτείνεται επομένως ότι η σωστή στόχευση των πρωτεϊνών αυτών και/ή η διατήρησή τους εκεί, δεν εξαρτάται από τη myosrygn. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς δεν είναι σε συμφωνία με τις ανωμαλίες στην υπερδομή των εμβόλιμων δίσκων, όπως έδειξε η ανάλυση αυτών με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι κάποια άλλη πρωτεΐνη των εμβόλιμων δίσκων, πέρα από τα μόρια που εξετάστηκαν πιθανώς να απεντοπίζεται ή ότι οι διαφορές αυτές πιθανώς να οφείλονται στην υψηλή διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας εντόπισαν αλλαγές στην τοπολογία της connexin 43 και άλλων πρωτεϊνών των εμβόλιμων δίσκων, στο TNF- α μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας (Panagoroulou P et al. 2008; Parathanasiou S et al. 2015) και στο LmnaH222P/H222P μοντέλο ποντικού με λαμινοπάθεια (Galata Z et al. 2018). Τέλος, σε ασθενείς με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια έχουν ταυτοποιηθεί αλλαγές στην τοπολογία της connexin 43, desmoplakin και catenin $\alpha 3$ (Ortega A et al. 2017) και σε ασθενείς με συγγενή καρδιακή ανεπάρκεια η έκφραση της connexin 43 είναι μειωμένη και το μέγεθος των χασματοσυνδέσεων (gap junctions) είναι μειωμένο (Bruce AF et al. 2008).

Παρομοίως, στο μοντέλο ποντικού με έλλειψη της AKAP/synemin, οι πρωτεΐνες τόσο της συσταλτής συσκευής, όσο και των κοσταμεριδίων δεν παρουσίασαν μεταβολές στον εντοπισμό τους στο synemin null μυοκάρδιο (Garcia-Pelagio KP et al. 2018). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η synemin δεν απαιτείται για τη σωστή αρχιτεκτονική της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων. Να σημειωθεί ότι διαπιστώθηκαν μικρές, αλλά σε σημαντικό βαθμό αλλαγές, στις synemin-null καρδιές, στα σχετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης των PKA RII, 70s6K και ERK1/2, οι οποίες είναι κρίσιμες για τη λειτουργία των μυοκαρδιοκυττάρων (Garcia-Pelagio KP et al. 2018). Καθώς η synemin είναι ταυτόχρονα μια δομική και ρυθμιστική πρωτεΐνη (ως AKAP), τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι διαδραματίζει

κυρίως σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην καρδιά και ότι οι συνέπειες της απουσίας επηρεάζουν έμμεσα την κατάσταση φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στόχων.

Υποθέτουμε ότι κάτι παρόμοιο συμβαίνει και με τη myospryn, καθώς δεν απαιτείται για την οργάνωση της συσταλτής συσκευής και των κοσταμεριδίων, αλλά πιθανώς να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της PKA ή/και της calcineurin, μέσω προσαρμογής της συγκέντρωσής τους σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές για να ασκήσουν τη δράση τους στα διάφορα υποστρώματα.

5. Η απουσία της myospryn επηρεάζει τον εντοπισμό του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2)

Η μελέτη ανοσοφθορισμού έδειξε ότι στα myospryn null ποντίκια ο υποδοχέας της ρυανοδίνης RyR2, με τον οποίον αλληλεπιδρά η myospryn (Benson MA et al. 2017), είναι απεντοπισμένος. Σε μια τελευταία μελέτη διαπιστώθηκε ότι η myospryn ήταν ικανή να συσσωρεύσει τον υποδοχέα RyR2 σε ετερόλογα κύτταρα (COS-7) (Benson MA et al. 2017). Επομένως, η myospryn αποτελεί το πρώτο παράδειγμα πρωτεΐνης που μπορεί να συσσωρεύσει ενεργά τους υποδοχείς RyRs. Εντούτοις, στο σκελετικό μυ είναι επίσης πιθανό η myospryn να προάγει τη συσσώρευση των RyRs, μεταβάλλοντας τη δομή του σαρκοπλασματικού δικτύου. Είναι επομένως δελεαστικό να υποθέσουμε ότι μία λειτουργία του συμπλόκου της myospryn στον καρδιακό μυ είναι στο σχηματισμό και τη διατήρηση των συστάδων των RyR υποδοχέων και η απουσία της οδηγεί στην απώλεια του ορθού εντοπισμού των συστάδων αυτών. Αν και είναι ξεκάθαρο ότι η συσσώρευση των RyR υποδοχέων είναι απαραίτητη για τη σύζευξη διέγερσης-συστολής στην καρδιά, λίγα είναι γνωστά για τις διεργασίες που οδηγούν στη συσσώρευση των RyR υποδοχέων (Yin CC et al. 2005). Είναι γνωστό ότι ένα από τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά που αποτελούν τη βάση της καρδιακής ανεπάρκειας είναι η εξασθενημένη διαρροή ασβεστίου που μεσολαβείται από τους υποδοχείς RyRs (Blayney LM and Lai FA, 2009). Επιπλέον, η διαταραγμένη αναδόμηση των T-σωληνίσκων στην καρδιακή ανεπάρκεια και την υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια οδηγεί σε ανωμαλίες στη σηματοδότηση του Ca^{2+} που σχετίζεται με ορφανούς υποδοχείς RyRs (Song LS et al. 2006). Είναι συνεπώς σημαντικό να προσδιοριστεί εάν το σύμπλοκο της myospryn εμπλέκεται στην

αποσύνδεση (uncoupling) των υποδοχέων RyRs στα διαφορετικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας και μυοκαρδιοπάθειας.

6. Η υπερδομή των myosprgn null μεμβρανικών οργανιδίων είναι διαταραγμένη

6.α Μιτοχονδριακές ανωμαλίες

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα της συγκεκριμένης διατριβής είναι οι σοβαρές ανωμαλίες στον καρδιακό και σκελετικό μυ των myosprgn null ποντικών, κυρίως στη διανομή των μιτοχονδρίων, στη μορφολογία τους και στην υπερδομή τους. Είναι σπουδαίο να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που η myosprgn συνδέεται με τα μιτοχόνδρια. Ειδικότερα, στο myosprgn null μυοκάρδιο, σε πολλά μιτοχόνδρια παρατηρήθηκε ανεξέλεγκτη δημιουργία κυστιδίων κατά των σχηματισμό των πτυχώσεων (blebbing cristae), ενώ σε άλλα εκτεταμένος εκφυλισμός των πτυχώσεων (cristolysis). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μιτοχόνδρια με διάχυτο εκφυλισμό, συχνά παρατηρείται λύση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που απαντάται σε πολύ μεγάλο βαθμό, είναι τα ενδομιτροχονδριακά έγκλειστα κυστίδια (internal mitochondrial vacuoles). Τα ενδομιτροχονδριακά αυτά έγκλειστα μπορεί να είναι αρκετά σφαιρικά κυστίδια μέσα στο ίδιο μιτοχόνδριο ή μπορεί να έχουν τη μορφή κυστιδίων που περιβάλλονται από παραπάνω από μια μεμβράνη και έχουν τη χαρακτηριστική εμφάνιση των onion-like-rings. Ένα τελευταίο χαρακτηριστικό της υπερδομής των μιτοχονδρίων είναι ότι σε περιοχές όπου οι βλάβες των μιτοχονδρίων είναι εκτεταμένες, παρατηρείται “κενό” κυτταροπλάσματος γύρω από κατεστραμμένα μιτοχόνδρια. Στα “κενά” αυτά σημεία παρατηρείται η ύπαρξη κυστιδίων και/ή πιθανώς μεμβρανών απομόνωσης πλησίον των μιτοχονδρίων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα μιτοχονδριακά αυτά ελαττώματα εμφανίζονται τόσο στις myosp+/-, όσο και στις myosp-/- καρδιές, αλλά είναι σε μεγαλύτερο βαθμό στο μυοκάρδιο από τα myosp-/- ποντίκια και όπως είναι αναμενόμενο χειροτερεύουν με την πάροδο της ηλικίας.

Συνολικά, τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι ο υπερβολικά μεγάλος αριθμός κατεστραμμένων μιτοχονδρίων στον καρδιακό και σκελετικό μυ των myosprgn null ποντικών, πιθανώς να συνδέεται με έλλειψη της ισορροπίας μεταξύ σύντηξης και σχάσης (fusion/fission) και με μια αναποτελεσματική και κορεσμένη διεργασία της μιτοφαγίας, για την απομάκρυνση των μη λειτουργικών μιτοχονδρίων (Twig G et al.

2008; Westermann B, 2010; Westermann B, 2012). Ο μιτοχονδριακός ποιοτικός έλεγχος περιλαμβάνει πολλαπλά επίπεδα επίβλεψης και προστασίας για τον περιορισμό της μιτοχονδριακής βλάβης και για την αποτελεσματική απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, για τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης. Η μιτοχονδριακή σύντηξη και σχάση ελέγχουν το σχήμα και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, ενώ η μιτοχονδριακή μεταφορά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διανομής των μιτοχονδρίων και στην απομάκρυνση των γηρασμένων και κατεστραμμένων μιτοχονδρίων για αποικοδόμηση. Αυτά τα βασικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων δρουν σε συνεργασία με το μονοπάτι της μιτοφαγίας (Westermann B, 2010; Cai Q and Tammineni P, 2016).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το πρωταρχικό χαρακτηριστικό της παθολογίας των Des-/- ποντικών είναι οι ανωμαλίες στην υπερδομή των μιτοχονδρίων, οι οποίες είναι εμφανείς από τη δεύτερη βδομάδα μετά τη γέννα, πριν προκύψει οποιαδήποτε άλλη καρδιακή δυσλειτουργία (Milner DJ et al. 2000). Παρόμοιες ανωμαλίες στη υπερδομή των μιτοχονδρίων με τα *myospryn* null ποντίκια έχουν αναφερθεί και στο knock out μοντέλο ποντικού της μυοειδικής RING finger πρωτεΐνης MuRF1 και MuRF2 (Witt CC et al. 2008). Να σημειωθεί ότι τόσο η MuRF1 (TRIM63), όσο και η MuRF2 (TRIM55), ανήκουν στην οικογένεια των TRIM πρωτεϊνών (βλέπε ταξινόμηση Εικόνα 10, Ενότητα Εισαγωγής, Κεφάλαιο 3) και διαθέτουν την περιοχή RING που τους προσδίδει δραστηριότητα E3 λιγάση της ουμπικιτίνης (Watanabe M and Hatakeyama S, 2017), κάτι που απουσιάζει από την TRIM-like *myospryn* (TRIM76).

Επιπρόσθετα, και στο μοντέλο ποντικού που προσομοιάζει το ανθρώπινο Barth σύνδρομο διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας, έχουν βρεθεί παρόμοια μιτοχονδριακά προβλήματα που παραπέμπουν σε ανώμαλη μιτοφαγία (Acehan D et al. 2011). Το μοντέλο αυτό προκύπτει από την καταστολή της τρανσακετυλάσης tafazzin, η οποία απαιτείται για την αναδόμηση (remodeling) της cardiolipin. Η cardiolipin είναι ένα κρίσιμο φωσφολιπίδιο για τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και τη δομική τους ακεραιότητα (Acehan D et al. 2011). Στο μοντέλο αυτό βρέθηκε επίσης ότι το μέγεθος και η μορφολογία των MAMs είναι διαταραγμένα και έτσι αυτές εμφανίζονται διογκωμένες (Acehan D et al. 2011). Να σημειωθεί ότι οι MAMs διευκολύνουν μεταξύ άλλων τη μεταφορά φωσφολιπιδίων μεταξύ του ER και των μιτοχονδρίων (Scharwey M et al. 2013).

Επομένως, στα *myosrygn null* ποντίκια με τα σοβαρά μιτοχονδριακά προβλήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιηθεί ανάλυση φωσφολιπιδίων, είτε με TLC (thin liquid chromatography), είτε με HPLC (high performance liquid chromatography), καθώς υποθέτουμε ότι η *myosrygn* πιθανώς να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια μέσω των MAMs. Η διαδικασία αυτή είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των μεμβρανών και την επιβίωση του κυττάρου (Tatsuta T et al. 2014). Τέλος, η ανώμαλη μιτοφαγία μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια παρέχουν λιπίδια για το σχηματισμό της μεμβράνης απομόνωσης και της μεμβράνης του αυτοφαγосώματος (Hailey DW et al. 2010) και στα *myosrygn null* ποντίκια τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν εκτεταμένες ανωμαλίες.

6.β Ανωμαλίες σαρκοπλασματικού δικτύου και T-σωληνίσκων

Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης μας, είναι η διόγκωση των μεμβρανών του σαρκοπλασματικού δικτύου (SR) και των T-σωληνίσκων (T-tubules) που προσομοιάζουν με αυτές τόσο των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (διατακτική και ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια) (Zhang HB et al. 2013), όσο και αυτών από το μοντέλο ποντικίου με έλλειψη της caveolin 2 (Schubert W et al. 2007). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι μεταβολές στην έκφραση και την ακεραιότητα σε ένα ή περισσότερα μέλη του συμπλόκου DGC (dystrophin glycoprotein complex), όπως για παράδειγμα στη dystrophin έχουν παρατηρηθεί στην ανθρώπινη καρδιακή ανεπάρκεια σε τελικό στάδιο (Vatta M et al. 2002) και η αναδόμηση της dystrophin σχετίζεται με διογκωμένους T-σωληνίσκους στην ανθρώπινη καρδιακή ανεπάρκεια (Kaprielian RR et al. 2000). Όπως προαναφέραμε, η *myosrygn* αλληλεπιδρά με τη dystrophin (Reynolds JG et al. 2008), ενώ η δεσμίνη και η caveolin-3 συνεντοπίζονται και αλληλεπιδρούν με το συνδεδεμένο με τη dystrophin σύμπλοκο του κοσταμεριδίου (Song KS et al. 1996). Είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι οποιαδήποτε διαταραχή του κριώματος *myosrygn*-δεσμίνης και των αλληλεπιδρώντων με αυτό μορίων, μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ανωμαλίες στο μυοκάρδιο

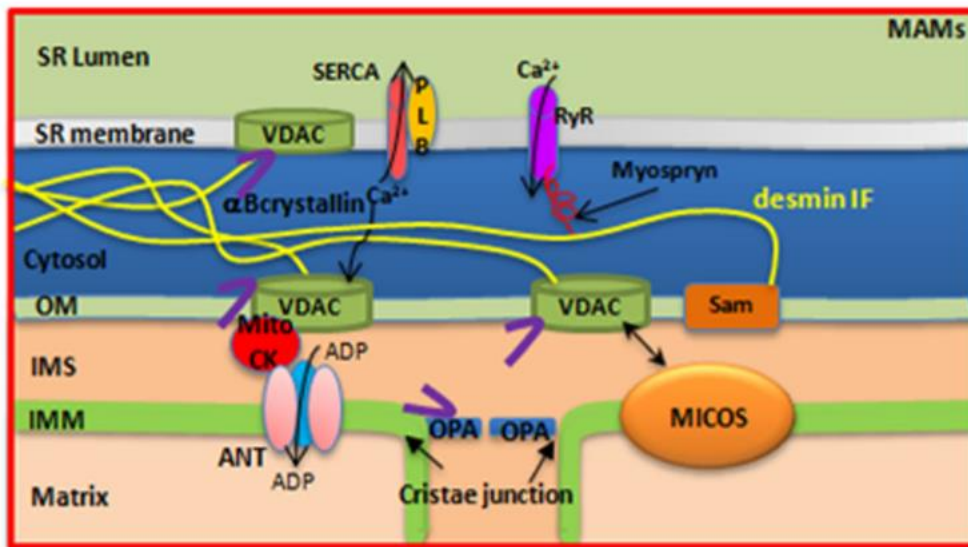
Τέλος, δεν πρέπει να παραλείψουμε ότι η σύσπαση της καρδιάς ξεκινά μέσω της διαδικασίας της σύζευξης διέγερσης-συστολής (excitation-contraction coupling/ECC) του καρδιακού μυός. Ειδικότερα, τα κανάλια Ca^{2+} τύπου L (L-type Ca^{2+} channels/LCC) στην πλασματική μεμβράνη και στους T-σωληνίσκους, ενεργοποιούν την απελευθέρωση του Ca^{2+} από τους υποδοχείς της ρυανοδίνης (RyR2) στο

σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR) και την έναρξη της σύσπασης των μυοκαρδιοκυττάρων (Wang SQ et al. 2001; Orchard CH et al. 2009). Δομικές αλλαγές στους T-σωληνίσκους, όπως για παράδειγμα η διόγκωσή τους που παρατηρήθηκε στο *myospryn* null μοντέλο, μπορούν να οδηγήσουν στην “απομάκρυνση” των καναλιών LCC από τους υποδοχείς RyRs. Αυτό μπορεί να αυξήσει το χρόνο που απαιτείται για να αυξηθούν τα επίπεδα ασβεστίου μέσα στο κύτταρο, οδηγώντας έτσι σε ασθενέστερες συστολές και αρρυθμίες (Dibb KM et al 2009; Ibrahim M et al. 2011). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι ένα πλήθος πρωτεϊνών-κλειδιά (π.χ. διεγερτική G-πρωτεΐνη, Gs) του β αδρενεργικού μονοπατιού σηματοδότησης εντοπίζονται στους T-σωληνίσκους (Laflamme MA and Becker PL, 1999). Ειδικότερα, οι β2-AR συν-εντοπίζονται με τα κανάλια LCC στους T-σωληνίσκους, αυξάνοντας την πιθανότητα για επεξεργασία μικρών σημάτων Ca^{2+} που θα μπορούσαν να είναι σημαντικά για την πρόκληση υπερτροφίας και τον έλεγχο της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου (Davare MA et al. 2001; Balijepalli RC et al. 2006). Η ταυτοποίηση του συμπλόκου σηματοδότησης β2-AR/LCC στους T-σωληνίσκους, υποδηλώνει ότι πιθανώς αυτό διαταράσσεται στο *myospryn* null μοντέλο όπου οι T-σωληνίσκοι είναι αποδιοργανωμένοι.

7. Πιθανή σύνδεση της *myospryn* με τις MAMs

Προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η δεσμίνη και η αB-κρυσταλλίνη τοπολογούνται στις MAMs, τη φυσική και λειτουργική σύνδεση του ενδοπλασματικού/σαρκοπλασματικού (ΕΔ/ΣΔ) δικτύου με τα μιτοχόνδρια όπου αλληλεπιδρούν με τη μιτοφιλίνη (Mic60), το βασικό συστατικό του συμπλόκου MICOS, και με άλλα μέλη και αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνες του MICOS, όπως η VDAC, η Sam50 και η OPA1 (Εικόνα 72) (Diokmetzidou A et al. 2016a). Το σύμπλοκο MICOS, μέσω αλληλεπιδράσεων με αρκετές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, ρυθμίζει ποικίλες λειτουργίες, όπως ο σχηματισμός των σημείων επαφής (contact sites) μεταξύ της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (outer mitochondrial membrane/OMM) και της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (inner mitochondrial membrane/IMM), η οργάνωση της IMM, η βιογένεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, η ακεραιότητα του mtDNA και η ρύθμιση της μιτοφαγίας (Rampelt H et al. 2017).

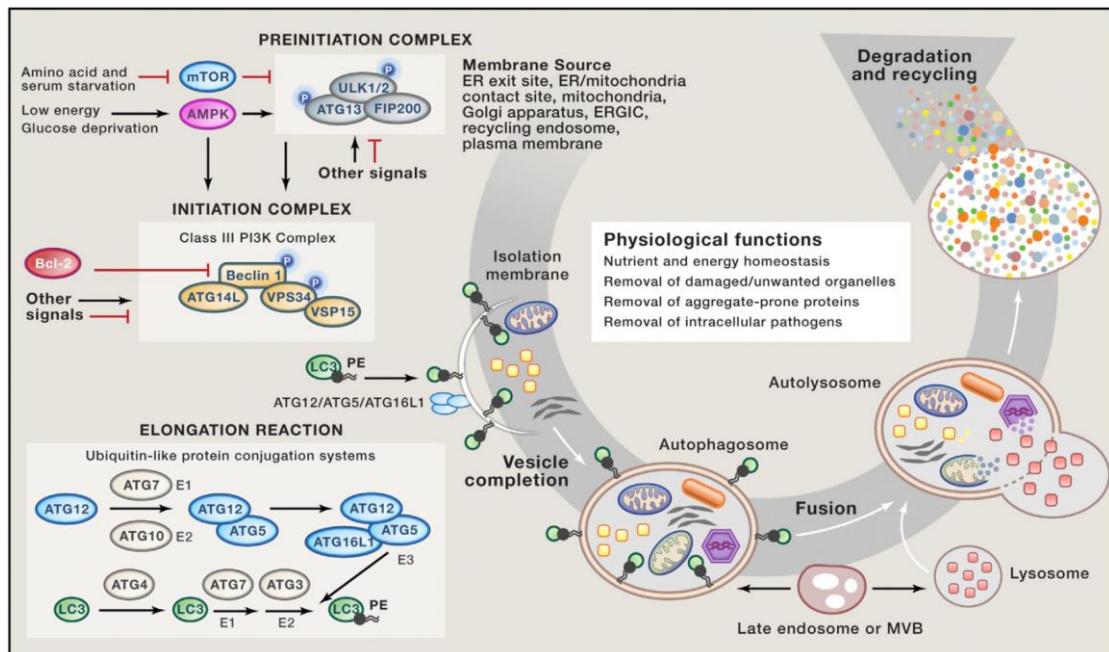
Μια πρόσφατη σύνδεση της myospryn με τον υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR2) (Benson MA et al. 2017), έδειξαν επιπρόσθετα της VDAC (Diokmetzidou A et al. 2016a), έναν έμμεσο τρόπο σύνδεσης της δεσμίνης στο ΣΔ δίκτυο των μυοκαρδιοκυττάρων (Εικόνα 72). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι MAMs, τα σημεία επαφής όπου το ΕΔ/ΣΔ δίκτυο συνδέεται στην εξωτερική και την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, είναι σημεία απαραίτητα για πολλαπλές βασικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου: 1) τη μεταφορά ασβεστίου (Ca^{2+}) και μεταβολιτών, 2) τη σύνθεση και ανταλλαγή λιπιδίων, 3) τη ρύθμιση της διαμετακίνησης (trafficking) και της δυναμικής του ΕΔ/ΣΔ δικτύου και των μιτοχονδρίων (ενδοκυτταρική μεταφορά, κινητικότητα και μορφολογία), 4) τη βιοενεργητική των μιτοχονδρίων και τον κυτταρικό θάνατο, 5) το ER στρες, 6) το σχηματισμό του αυτοφαγώματος και 7) του φλεγμονοσώματος (Naon D and Scorrano L, 2014; Sassano ML et al. 2017).



Εικόνα 72: Πιθανή σύνδεση της myospryn με τις MAMs. Η διατήρηση της εγγύτητας των οργανιδίων, όπως στην περίπτωση των μιτοχονδρίων με το ΕΔ/ΣΔ δίκτυο, μέσω των συνδεόμενων με τα μιτοχόνδρια μεμβρανών MAMs, από τα ενδιάμεσα ινίδια μπορεί να διευκολύνει την επικοινωνία των οργανιδίων και τις λειτουργίες τους. Η δεσμίνη εντοπίζεται στις MAMs όπου αλληλεπιδρά με τη VDAC, ενώ η myospryn αλληλεπιδρά τόσο με τη δεσμίνη, όσο και με τον υποδοχέα RyR στο ΣΔ (Tsikitis M et al. 2018).

Συνολικά, τα προαναφερθέντα δεδομένα, σε συνδυασμό με τη σύνδεση της TRIM-like πρωτεΐνης myosrygn με τα λυσοσώματα και τις λυσοσωμικές πρωτεΐνες προτείνουν ένα πιθανό ρόλο της myosrygn (μαζί με τη δεσμίνη) στη φυσική και λειτουργική σύνδεση του ΕΔ/ΣΔ δικτύου και των μιτοχονδρίων μέσω των MAMs, καθώς και στη διεργασία της αυτοφαγίας-μιτοφαγίας. Είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η πιθανή τοπολόγηση της myosrygn στις MAMs και ο σχηματισμός του δικτύου myosrygn-δεσμίνης, πιθανώς να διευκολύνει την κατευθυνόμενη στόχευση πρωτεϊνών και μεταβολιτών στα μιτοχόνδρια, να σταθεροποιεί πρωτεϊνικές γέφυρες μεταξύ μιτοχονδρίων και ενδοπλασματικού δικτύου ή/και να προσελκύει πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αυτοφαγία (Εικόνα 72).

Η διαδικασία της αυτοφαγίας/μιτοφαγίας αποτελείται από αρκετά βήματα, συμπεριλαμβάνοντας την έναρξη της αυτοφαγίας (σχηματισμός της μεμβράνης απομόνωσης και του φαγοφόρου), την εγκόλπωση του φορτίου (συσσωμάτωμα πρωτεϊνών και κατεστραμμένα οργανίδια -συγκεκριμένα μιτοχόνδρια στη μιτοφαγία), το σχηματισμό του αυτοφαγισώματος και τελικά την απομάκρυνσή του, η οποία συμβαίνει μετά τη σύντηξή του με τα λυσοσώματα, επιτρέποντας την καταστροφή του φορτίου από τα λυσοσωμικά ένζυμα (Εικόνα 73) (Green DR and Levine B, 2014).



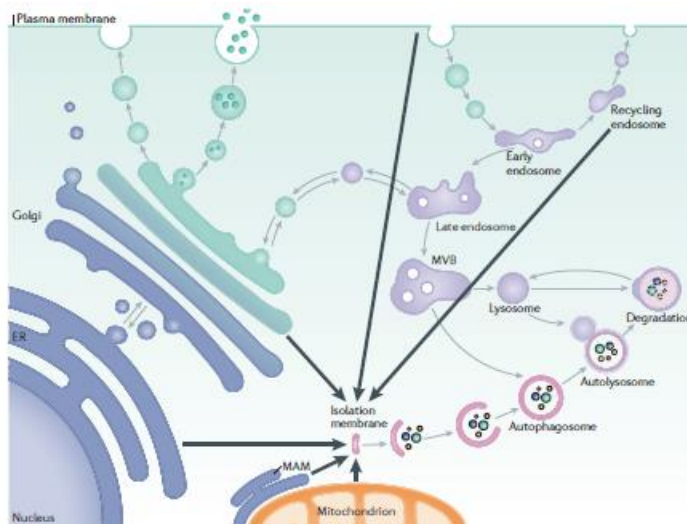
Εικόνα 73: Τα στάδια της αυτοφαγίας. 1) Δημιουργία του προ-εναρκτήριου συμπλόκου (ή σύμπλοκο ULK) (preinitiation complex), 2) δημιουργία του εναρκτήριου συμπλόκου (ή σύμπλοκο κλάσης III PI3K) (initiation complex) και σχηματισμός της μεμβράνης απομόνωσης (isolation membrane), 3) αντίδραση επιμήκυνσης της μεμβράνης απομόνωσης (elongation reaction) (ή σύστημα σύζευξης πρωτεΐνης τύπου ουμπικιτίνης) (or ubiquitin-like protein conjugation system), 4) σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος (autophagosome formation), 5) σχηματισμός του αυτολυσοσώματος (autolysosome formation) και 6) αποικοδόμηση (degradation) και ανακύκλωση (recycling) (Green DR and Levine B, 2014).

Υποθέτουμε ότι υπάρχει σύνδεση της *myosrygn* σε μια ή σε περισσότερες από τις προαναφερθείσες διεργασίες, και πιο συγκεκριμένα στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος, στην ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος και στο σχηματισμό του αυτοφαγολυσοσώματος. Για τη μελέτη της εμπλοκής και της σπουδαιότητας της *myosrygn* σε αυτές τις διεργασίες θα πρέπει να μελετηθούν, για παράδειγμα, οι συνέπειες της ασιτίας στην τοπολόγηση του προαυτοφαγοσωμικού-αυτοφαγοσωμικού μάρτυρα ATG14L, του μάρτυρα σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος ATG5 (καθώς επίσης και άλλα μόρια του εναρκτήριου συμπλόκου PI(3)K), της STX17 και DFPC1 στις MAMs (Εικόνα 73). Επιπλέον, η απουσία της *myosrygn* στο νεοδημιουργηθέν *myosrygn* null μοντέλο, πιθανώς να διαταράσσει τη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με τα λυσοσώματα, καθώς όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας στο *desmin* null μοντέλο ποντικίου παρατηρείται ανώμαλη διανομή των λυσοσωμάτων (Kouloumenta A et al. 2007). Για την εξέταση της σπουδαιότητας της *myosrygn* στη διαδικασία της αυτοφαγίας και ειδικότερα στην ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος και στο σχηματισμό του αυτοφαγολυσοσώματος, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί: α) μέτρηση των επιπέδων του p62 έπειτα από επαγωγή και καταστολή της αυτοφαγίας, β) μελέτη της μετατόπισης του GFP-LC3 στο αυτοφαγόσωμα και σε σφαιρικές και ημισφαιρικές δομές, γ) μελέτη των αλλαγών της αναλογίας LC3-II/LC3-I και δ) εκτίμηση του βαθμού σύντηξης του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα, είτε *in vivo* με τη διασταύρωση του *myosp*^{-/-} null ποντικίου με το *mito-QC* ποντίκι (McWilliams T et al. 2016), ένα διαγονιδιακό ποντίκι με pH-ευαίσθητο φθορίζων μιτοχονδριακό σήμα, είτε εναλλακτικά με τον προσδιορισμό της επικάλυψης του GFP-LC3 με το LysoTracer.

Όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα ανωτέρω, ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα της συγκεκριμένης διατριβής, είναι τα εκτεταμένα μιτοχονδριακά προβλήματα, με

εικόνες που υποδηλώνουν μη φυσιολογική μιτοφαγία και δυνητικά εκτεταμένο σχηματισμό μεμβρανών πλησίον των μιτοχονδρίων. Η myosrpn που είναι μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το BLOC-1 σύμπλοκο πιθανώς να εμπλέκεται στη διαμετακίνηση τόσο των πρωτεϊνών, όσο και των λιπιδίων για το σχηματισμό της μεμβράνης απομόνωσης (Εικόνα 74) (Lamb CA et al. 2013). Επομένως, όπως προαναφέρθηκε, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιηθεί ανάλυση φωσφολιπιδίων στα myosrpn null ποντίκια, καθώς υποθέτουμε ότι η myosrpn πιθανώς να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια μέσω των MAMs.

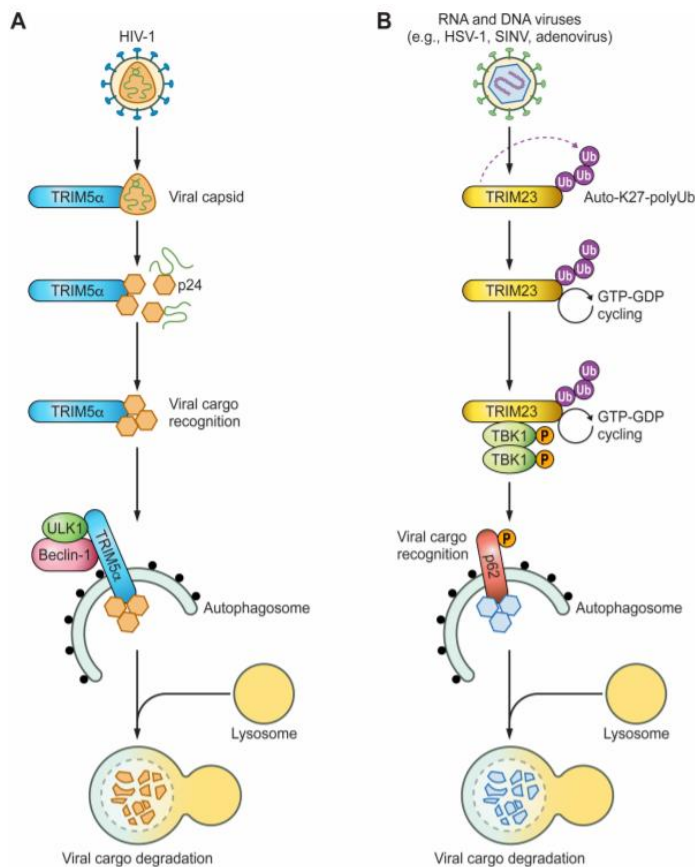
Τέλος, δεν πρέπει να παραλείψουμε να αναφέρουμε ότι η μιτοφαγία αποικοδομεί ειδικά τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια μέσω της δράσης των υποδοχέων αυτοφαγίας (Deng Z et al. 2017). Οι κύριοι υποδοχείς της μιτοφαγίας είναι η optineurin (OPTN) και η NDP52 (nuclear dot protein 52 kDa) (Wong YC and Holzbaur EL, 2014; Lazarou M et al. 2015). Πιο αναλυτικά, τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια προσελκύουν την parkin για την ουμπικιτινίωση πρωτεϊνών στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στοχεύοντας τα μιτοχόνδρια για αυτοφαγοσωματική εγκόλπωση και αποικοδόμηση. Με τη σειρά της, η optineurin προσελκύεται ενεργά σε μιτοχόνδρια με πολύ-ουμπικιτίνη που έχουν επισημανθεί με parkin και δεσμεύει την αυτοφαγοσωματική πρωτεΐνη LC3 (microtubule-associated protein light chain 3), και αυτή η πρόσδεση προωθεί το σχηματισμό του αυτοφαγώματος γύρω από τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια (Wong YC and Holzbaur EL, 2014). Είναι δελεαστικό να υποθέσουμε ότι το ικρίωμα που δημιουργεί ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης με τη myosrpn, πιθανώς να προσελκύει τους διάφορους απαιτούμενους ρυθμιστές των προαναφερθεισών διεργασιών και οποιαδήποτε διαταραχή αυτού του ικρίωματος θα οδηγούσε σε προβληματική μιτοφαγία.



Εικόνα 74: Η προέλευση της αυτοφαγοσωματικής μεμβράνης. Διάφορα οργανίδια, όπως το ΕΔ δίκτυο, τα μιτοχόνδρια, οι MAMs, το Golgi, η πλασματική μεμβράνη και τα ανακυκλούμενα ενδοσώματα έχουν εμπλακεί στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος (δηλαδή της μεμβράνης απομόνωσης και του φαγοφόρου) και στην επακόλουθη επιμήκυνση της μεμβράνης (Lamb CA et al. 2013).

8. Νέοι ρόλοι των TRIM πρωτεϊνών στην αυτοφαγία

Οι υποθέσεις που αναφέρθηκαν ανωτέρω, σχετικά με τον πιθανό ρόλο της myosrypn και της δεσμίνης στη φυσική και λειτουργική σύνδεση του ΕΔ/ΣΔ δικτύου και των μιτοχονδρίων μέσω των MAMs, καθώς και στη διεργασία της αυτοφαγίας-μιτοφαγίας, ενισχύονται περαιτέρω από μερικές τελευταίες μελέτες στη βιβλιογραφία, οι οποίες έδειξαν ότι οι μισές πρωτεΐνες της TRIM οικογένειας μπορούν να ρυθμίζουν την αυτοφαγία (Mandell MA et al. 2014a; 2014b). Ειδικότερα, οι TRIMs πρωτεΐνες έχουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς τρόπους δράσης, μπορούν είτε να δρουν ως αυτοφαγικοί υποδοχείς, είτε ως πλατφόρμες (ρυθμιστές των υποδοχέων) για την προσέλκυση των βασικών ρυθμιστών της αυτοφαγίας και τη ρύθμιση της δραστηκότητάς τους (Εικόνα 75) (Kimura T et al. 2016; Sparrer KMJ and Gack MU, 2018). Ως αυτοφαγικοί υποδοχείς οι TRIMs μπορούν να αναγνωρίζουν κατευθείαν ενδογενείς και εξωγενείς στόχους (Kimura T et al. 2016).



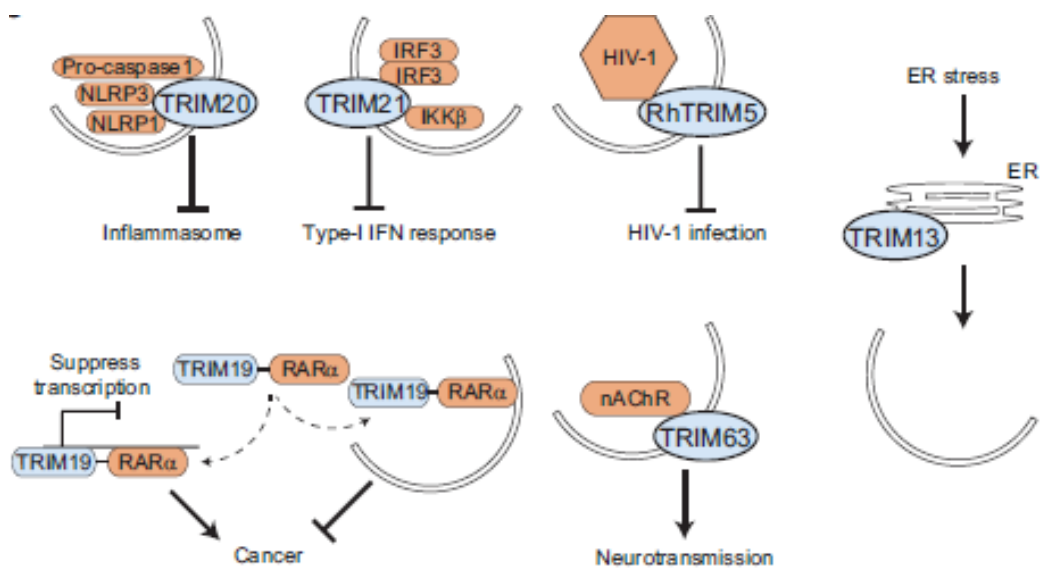
Εικόνα 75: Οι πρωτεΐνες TRIM ρυθμίζουν την αυτοφαγία που επάγεται από ιούς. Οι πρωτεΐνες TRIM έχουν τουλάχιστον 2 διαφορετικούς τρόπους δράσης: A) μπορούν να λειτουργούν ως αυτοφαγικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν ειδικά και στοχεύουν τον ιό για αυτοφαγολυσosomalική αποικοδόμηση (περίπτωση της TRIM5α), ή B) ρυθμίζουν τη δραστηριότητα μορίων κλειδιά της αυτοφαγίας (περίπτωση της TRIM23) (Sparrer KMJ and Gack MU, 2018).

Στη συνέχεια, παραθέτουμε κάποια δεδομένα για την εμπλοκή των TRIM πρωτεϊνών στην αυτοφαγία. Έχει δείχθει για παράδειγμα ότι η προαυτοφαγική λειτουργία της TRIM32 βασίζεται στην ικανότητά της να δεσμεύει τις πρωτεΐνες αυτοφαγίας AMBRA1 και ULK1 και να διεγείρει τη δραστηριότητα της ULK1. Οι μεταλλάξεις της TRIM32 που προκαλούν τη δυστροφία τύπου LGMD2H (μυϊκής δυστροφίας τύπου 2H) μειώνουν την ικανότητά της να συνδέεται με την ULK1 και να επάγει την αυτοφαγία (Di Rienzo M et al. 2019). Να σημειωθεί ότι έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της νηστείας, η φωσφορυλίωση της δεσμίνης αυξάνει και ενισχύει την αποικοδόμηση του κυτταροσκελετού της δεσμίνης με τη μεσολάβηση της TRIM32, γεγονός που φαίνεται να διευκολύνει την διάσπαση των Z-ζωνών (α-actinin) και των λεπτών νηματίων (actin, tropomyosin, troponins) (Cohen Sh et al. 2012). Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει ότι η TRIM5a αλληλεπιδρά με το Sequestosome 1/p62, το Atg8s των θηλαστικών, την ULK1 και τη Beclin 1 (Mandell MA et al. 2014a). Η TRIM5a είναι επίσης ένας ειδικός υποδοχέας της αυτοφαγίας που μεσολαβεί στον περιορισμό του HIV-1 ιού (Εικόνα 75) (Mandell MA et al. 2014b).

Οι TRIM πρωτεΐνες μπορούν να δρουν ως εξειδικευμένοι υποδοχείς για περιπτώσεις πολύ ειδικής αυτοφαγίας (αυτοφαγία ακριβείας/precision autophagy), μορίων κλειδιά του φλεγμονοσώματος και του συστήματος απόκρισης στην ιντερφερόνη τύπου 1. Για παράδειγμα, η TRIM20 στοχεύει μόρια του φλεγμονοσώματος, συμπεριλαμβανομένου των NLRP3, NLRP1 και της προκασπασης 1, για αποικοδόμηση μέσω αυτοφαγίας, ενώ η TRIM21 στοχεύει το IRF3 (Kimura T et al. 2015; 2017). Επιπλέον, η TRIM17 εστιάζει ‘τη μηχανή της αυτοφαγίας’ σε μια συγκεκριμένη περιοχή στο κύτταρο (Mandell MA et al. 2014a) και συνεισφέρει στην αυτοφαγία των ενδιάμεσων σωμάτων (midbodies), ενώ μπορεί να οδηγεί ενεργά άλλους στόχους για αποικοδόμηση (Εικόνα 76) (Mandell MA et al. 2017).

Είναι πολύ ενδιαφέρον, ότι η TRIM76/myosprryn έχει ταυτοποιηθεί ως ένας αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας, καθώς το knock-down της μέσω siRNA, οδήγησε σε επαγωγή της αυτοφαγίας (Mandell MA et al. 2014a). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η TRIM76, καθώς και οι TRIM17, TRIM21 και TRIM47, συνεισφέρουν στην απομάκρυνση των ενδιάμεσων σωμάτων (midbodies) μέσω της αυτοφαγίας (Mandell MA et al. 2017; Venuto S and Merla G, 2019). Ειδικότερα, τα ενδιάμεσα σώματα είναι πυκνές πρωτεϊνικές δομές, οι οποίες περιέχουν τα κατάλοιπα της μηχανής της κυτταρικής διαίρεσης. Δημιουργούνται στο σημείο της αποκοπής, κληρονομούνται από ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα και απομακρύνονται με αυτοφαγία (Pohl C and Jentsch S, 2009). Αυτές οι δομές μπορεί να μην είναι αδρανείς, αλλά αντ' αυτού φαίνεται να συνεισφέρουν στην κυτταρική σηματοδότηση και να επηρεάζουν τη διαφοροποίηση, με τα κύτταρα που περιέχουν αυξημένο αριθμό ενδιάμεσων σωμάτων να έχουν περισσότερα χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων (Dionne LK et al. 2015). Όπως προαναφέρθηκε, αρκετές πρωτεΐνες TRIMs (TRIM17, TRIM21, TRIM47) και η TRIM76/myosprryn ελέγχουν τον αριθμό των ενδιάμεσων σωμάτων ανά κύτταρο (Mandell MA et al. 2017; Venuto S and Merla G, 2019).

Συνολικά, τα προαναφερθέντα δεδομένα προτείνουν έναν νέο μηχανισμό όπου μια TRIM πρωτεΐνη ρυθμίζει την επιλεκτική αυτοφαγία, προωθώντας τη στόχευση κάποιων υποστρωμάτων, ενώ παράλληλα εμποδίζει τη στόχευση κάποιων άλλων. Αυτοί οι διπλοί και αντίθετοι ρόλοι των TRIM πρωτεϊνών και πιθανώς της TRIM76/myosprryn, μπορεί να δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα να διαθέτουν ενισχυμένη ακρίβεια, όσον αφορά την επιλογή του φορτίου.



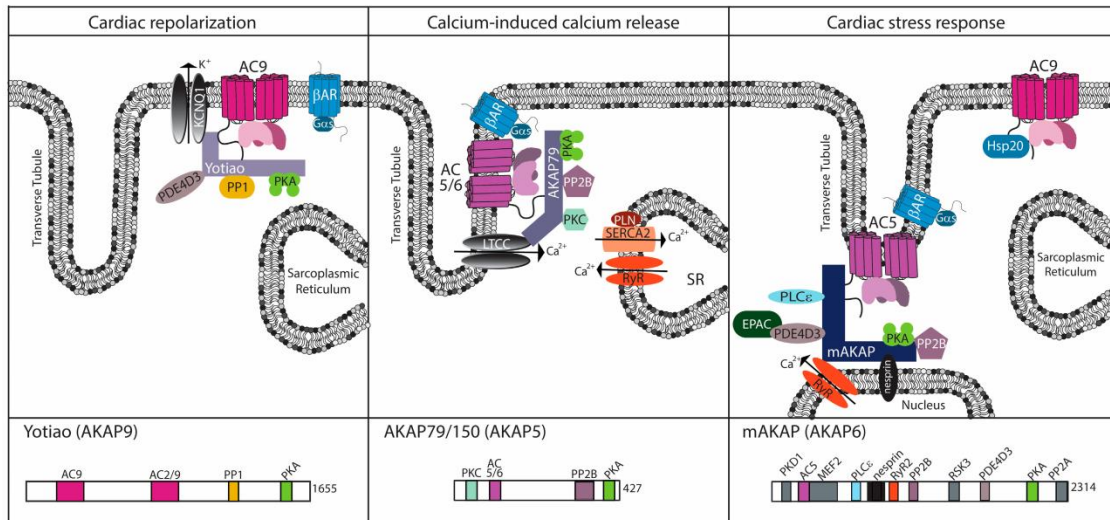
Εικόνα 76: Παραδείγματα αυτοφαγίας ακριβείας. Στόχευση ενδογενών (έμφυτα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, με τη μεσολάβηση των TRIM20 και TRIM21) και εξωγενών φορτίων (ιός HIV-1 με τη μεσολάβηση της TRIM5). Κάποια επιπλέον παραδείγματα: 1) η πρωτεΐνη σύντηξης TRIM19-RARα παίζει ρόλο στον καρκίνο, 2) η TRIM63 προάγει την αυτοφαγική αποικοδόμηση του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR) και 3) η TRIM13 ελέγχει την αυτοφαγία σε απόκριση στο ER στρες. Αναφέρονται οι φυσιολογικές επιπτώσεις (Kimura T et al. 2016).

Στο σημείο αυτό είναι σπουδαίο να αναφέρουμε ότι η myospryn αντιπροσωπεύει μια μυοειδική AKAP και βασισμένοι σε αυτό μπορούμε να αναμένουμε ότι ο σωστός συντονισμός της PKA σηματοδότησης στις MAMs μπορεί να ρυθμίζεται, τουλάχιστον μερικώς, από το δίκτυο που σχηματίζει η myospryn με τη δεσμίνη. Έτσι, στις καρδιές με έλλειψη της myospryn, πιθανώς η καταστροφή του κυτταροπλασματικού δικτύου συγκρότησης για τη ρύθμιση του PKA μονοπατιού, οδηγεί στην ανώμαλη ενεργοποίηση της PKA. Το δίκτυο αυτό μπορεί να χρησιμεύει τόσο για την PKA, όσο και για το BLOC-1, προωθώντας τη φωσφορύλιωση μιας υπομονάδας του BLOC-1 συμπλόκου και στη συνέχεια προσελκύοντας ειδικές πρωτεΐνες της αυτοφαγίας. Έχει δειχτεί ότι η μιτοχονδριακή AKAP121 (γνωστή επίσης ως AKAP1, ή AKAP149 ως η ανθρώπινη ομόλογη), προσελκύει στα μιτοχόνδρια σηματοδοτικά σύμπλοκα που περιέχουν την PKA κινάση και την SRC κινάση τυροσίνης, οδηγώντας έτσι στον αυξημένο μιτοχονδριακό μεταβολισμό και στη φωσφορύλιωση της Bad, η οποία αποτελεί υπόστρωμα της PKA και έχει την ιδιότητα να μπλοκάρει την απόπτωση (Czachor A et al. 2016).

9. Το ικρίωμα δεσμίνης-AKAP/myospryn στη β -AR σηματοδότηση

Όπως αναφέραμε ανωτέρω, αλλά και στην εισαγωγή, η myospryn είναι μια AKAP πρωτεΐνη που προσδένει στην PKA (Kouloumenta A et al. 2007; Reynolds JG et al. 2007). Οι AKAPs παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της PKA μέσω προσαρμογής της συγκέντρωσής της σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές, όπως οι ειδικές εγκολπωματικές περιοχές (caveolae), όπου εντοπίζονται οι β 2-ARs στα μυοκαρδιοκύτταρα (Rybin VO et al. 2000; Xiang Y et al. 2002). Το ικρίωμα που δημιουργεί το δίκτυο των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης με τη myospryn, πιθανώς να προσδένει τους διάφορους απαιτούμενους ρυθμιστές της PKA. Στους ρυθμιστές αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι ρυθμιστές της αδενυλικής κυκλάσης και οι φωσφοδιεστεράσες (PDEs), καθώς και διαφορετικές φωσφατάσες στο ίδιο σύμπλοκο (Ruehr ML et al. 2004).

Είναι πολύ σημαντικό ότι οι AKAPs, όπως η AKAP79 και η AKAP12 (gravin), λειτουργούν ως ικρίωματα του β 2-AR και των συμπλόκων κινασών-φωσφατασών, παρέχοντας έτσι ένα κινητό ικρίωμα κατά τη διάρκεια της απευαισθητοποίησης των υποδοχέων (Εικόνα 77) (Fan G et al. 2001; Baldwin TA and Dessauer CW, 2018). Ειδικότερα, η gravin στοχεύει την PKA, την PKC, την calcineurin και άλλα σηματοδοτικά μόρια στον β 2-AR (Guillory AN et al. 2013). Επιπλέον, η gravin μεσολαβεί στην απευαισθητοποίηση/επανευαισθητοποίηση του υποδοχέα διευκολύνοντας τη φωσφορυλίωση του από τις PKA και PKC (Guillory AN et al. 2013). Να σημειωθεί ότι η gravin είναι η πιο κοντινή ομόλογη AKAP της myospryn (Reynolds JG et al. 2007). Μελέτες έχουν δείξει ότι και η AKAP79 στοχεύει την PKA, την PKC, την πρωτεϊνική φωσφατάση PP2B (calcineurin) και άλλα σηματοδοτικά μόρια στον β 2-AR (Fraser ID et al. 2000).



Εικόνα 77: Οι AKAPs εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις εντός του μυοκαρδιοκυττάρου για τη διευκόλυνση της φυσιολογικής λειτουργίας τους. Για κάθε AKAP, αντιπροσωπεύεται ένα υποσύνολο γνωστών εταίρων δέσμευσης και οι θέσεις αλληλεπιδράσεών τους (Baldwin TA and Dessauer CW, 2018).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο αυξημένος ρυθμός σύσπασης των *des*^{-/-} μυοκαρδιοκυττάρων, καθώς και ο υψηλός καρδιακός παλμός και σύσπαση των *des*^{-/-} καρδιών, είναι σε συμφωνία με τα αυξημένα επίπεδα του ενδοκυττάρου cyclic-AMP. Να σημειωθεί ότι στο *gravin* null μοντέλο ποντικού βρέθηκε αυξημένη σύσπαση των *gravin*^{-/-} καρδιών, λόγω μειωμένης φωσφορυλίωσης του β2-AR, αλλά δεν παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αύξηση στην παραγωγή του cAMP (Guillory AN et al. 2013). Είναι πολύ σημαντικό να μελετηθεί αν και πως μεταβάλλεται η φωσφορυλίωση του β2-AR τόσο στα *des*^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα, όσο και στα *myospr*^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα.

Επιπλέον, δείξαμε ότι τα υψηλά επίπεδα cAMP των *des*^{-/-} μυοκαρδιοκυττάρων, δεν μεταβάλλονται σημαντικά έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη, γεγονός που είναι σε συμφωνία με απευαισθητοποίηση στη σηματοδότηση του β-αδρενεργικού υποδοχέα. Το ικρίωμα που σχηματίζει ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης με την AKAP/*myospr*^γ, πιθανώς να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον εντοπισμό της PKA και στην προσέλκυση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απευαισθητοποίηση του υποδοχέα με αποτέλεσμα τη μειωμένη φωσφορυλίωση του β2-AR και την εξασθενημένη απευαισθητοποίηση του υποδοχέα. Όπως προαναφέραμε, η *gravin* μεσολαβεί στην απευαισθητοποίηση/επανευαισθητοποίηση του υποδοχέα διευκολύνοντας τη φωσφορυλίωση του από τις PKA και PKC (Guillory AN et al.

2013). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί μειωμένη προσέλκυση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απευαισθητοποίηση του β 2-AR υποδοχέα, όπως η GRK2 και η β -arrestin, απουσία της gravin (Lin F et al. 2000). Και στην περίπτωση της AKAP79, η πλατφόρμα που σχηματίζει με τα διάφορα σηματοδοτικά μόρια στον β 2-AR προάγει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα μετά από διέγερση με αγωνιστή, μεσολαβώντας έτσι στην απευαισθητοποίηση/επανευαισθητοποίηση του υποδοχέα (Fraser ID et al. 2000).

Ένα επιπλέον εύρημα της μελέτης αυτής είναι η σημαντική συσσώρευση του β 2-αδρενεργικού υποδοχέα στη σαρκοπλασματική μεμβράνη των des-/μυοκαρδιοκυττάρων, έπειτα από επώαση με το β -αδρενεργικό αγωνιστή ισοπροτερενόλη, γεγονός που προτείνει έναν πιθανό ρόλο του κυτταροσκελετού της δεσμίνης, σε συνδυασμό με την AKAP λειτουργία της myospryn, στη σηματοδότηση και την ανακύκλωση του β 2 αδρενεργικού υποδοχέα. Για όλους τους παραπάνω λόγους, είναι πολύ δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η δεσμίνη μπορεί να διευκολύνει την AKAP λειτουργία της myospryn και περιμένουμε ότι η διατάραξη του κυτταροσκελετού της δεσμίνης μπορεί να συνδέεται με τον ανώμαλο εντοπισμό και ενεργοποίηση της PKA και με μη φυσιολογική σηματοδότηση του β 2-αδρενεργικού υποδοχέα. Αξίζει τέλος, να αναφερθεί ότι είναι σπουδαία να μελετηθεί η σηματοδότηση του β 2-AR τόσο στα myosp-/- μυοκαρδιοκύτταρα, όσο και στις myosp-/- καρδιές.

Ε. Συμπεράσματα-Καινοτομίες

Τα αποτελέσματα της έρευνας στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής οδήγησαν σε ιδιαίτερα σημαντικά ευρήματα, τα οποία θα συνοψιστούν στη συνέχεια.

- Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη παγκόσμια περιγραφή της δημιουργίας των *myosrpn null* ποντικών. Παρά την αρχική μας υπόθεση για εμβρυική θνησιμότητα απουσία της *myosrpn*, τα *myosrpn null* ποντίκια επιβίωσαν, ήταν γόνιμα και παρουσίασαν τις αναμενόμενες Μενδελικές αναλογίες.
- Η έλλειψη της *myosrpn* προκαλεί διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, η οποία χαρακτηρίζεται από λεπύτωση των τοιχωμάτων και διάταση του ιστού, ανωμαλίες στους θαλάμους της καρδιάς (αμφικολπική διάταση), ίνωση και διαταραχή της καρδιακής λειτουργίας.
- Η ανάλυση ανοσοφθορισμού έδειξε ότι στο *myosrpn null* μυοκάρδιο τόσο η δεσμίνη, όσο και βασικά πρωτεϊνικά συστατικά των εμβόλιμων δίσκων και των κοσταμεριδίων, δεν χάνουν τον φυσιολογικό εντοπισμό τους. Παρατηρήσαμε όμως ότι ο υποδοχέας της ρυανοδίνης (RyR2) απαντάται απεντοπισμένος.
- Δείξαμε επίσης ότι στο μυοκάρδιο των *myosp-/-* ποντικών η υπερδομή των σαρκομεριδίων φαίνεται να μην επηρεάζεται, με τα μυοϊνίδια να είναι καλά πακεταρισμένα και οργανωμένα, ενώ οι εμβόλιμοι δίσκοι παρουσιάζουν σημαντική αποδιοργάνωση, ασυνέχειες και γενικότερες δομικές ανωμαλίες.
- Το πιο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι οι σοβαρές ανωμαλίες στην υπερδομή των μιτοχονδρίων στον καρδιακό και σκελετικό μυ των *myosp-/-* ποντικών, με περίεργα ενδομιτοχονδριακά έγκλειστα κυστίδια και εκτεταμένο εκφυλισμός των πτυχώσεων, χωρίς να αποκλείεται η ανώμαλη μιτοφαγία. Είναι σπουδαίο να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που η *myosrpn* συνδέεται με σοβαρές ανωμαλίες στον άξονα μιτοχονδρίων-σαρκοπλασματικού δικτύου (ΣΔ). Με τη μελέτη αυτού του μοντέλου θα ενισχύσουμε την υπόθεση μας ότι η

προστασία των μιτοχονδρίων μπορεί να αποτελέσει ένα κοινό στόχο για θεραπευτικές προσεγγίσεις στις μυοκαρδιοπάθειες.

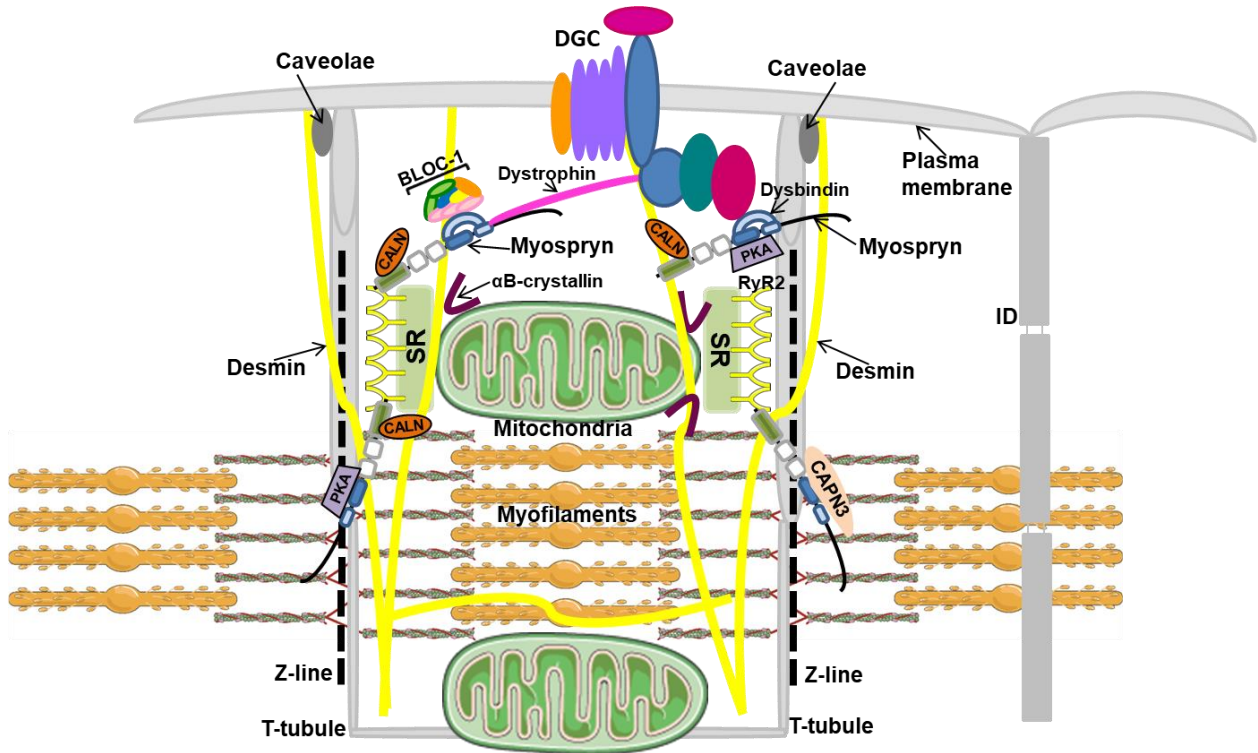
- Τα εκτεταμένα μιτοχονδριακά προβλήματα που συχνά συνοδεύονται από διόγκωση του σαρκοπλασματικού δικτύου (ΣΔ) και των T-σωληνίσκων και οι εικόνες που υποδηλώνουν μη φυσιολογική μιτοφαγία και δυνητικά εκτεταμένο σχηματισμό μεμβρανών πλησίον των μιτοχονδρίων, σε συνδυασμό με τη σύνδεση της TRIM-like πρωτεΐνης myospryn με τα λυσοσώματα και τις λυσοσωμικές πρωτεΐνες και τον εντοπισμό της δεσμίνης στις MAMs, προτείνουν ένα πιθανό ρόλο της myospryn μαζί με τη δεσμίνη στη φυσική και λειτουργική σύνδεση του ΕΔ/ΣΔ δικτύου και των μιτοχονδρίων μέσω των MAMs.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο αυξημένος ρυθμός σύσπασης των des^{-/-} μυοκαρδιοκυττάρων, καθώς και ο υψηλός καρδιακός παλμός και σύσπαση των des^{-/-} καρδιών, είναι σε συμφωνία με τα αυξημένα επίπεδα του ενδοκυττάρου cyclic-AMP. Επιπλέον, δείξαμε ότι τα υψηλά επίπεδα cAMP των des^{-/-} μυοκαρδιοκυττάρων, δεν μεταβάλλονται σημαντικά έπειτα από επώαση με ισοπροτερενόλη, γεγονός που είναι σε συμφωνία με απευαισθητοποίηση στη σηματοδότηση του β-αδρενεργικού υποδοχέα.
- Ένα τελευταίο εύρημα της μελέτης αυτής είναι η σημαντική συσσώρευση του β2-αδρενεργικού υποδοχέα στη σαρκοπλασματική μεμβράνη των des^{-/-} μυοκαρδιοκυττάρων, έπειτα από επώαση με το β-αδρενεργικό αγωνιστή ισοπροτερενόλη, γεγονός που προτείνει έναν πιθανό ρόλο του κυτταροσκελετού της δεσμίνης, σε συνδυασμό με την AKAP λειτουργία της myospryn, στη σηματοδότηση και την ανακύκλωση του β2 αδρενεργικού υποδοχέα
- Προτείνουμε ότι το ικρίωμα που σχηματίζει ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης με την AKAP/myospryn, πιθανώς να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της PKA, μέσω προσαρμογής της συγκέντρωσής της σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές και στην προσέλκυση διάφορων ρυθμιστών της PKA (φωσφατάσες, φωσφοδιεστεράσες κτλ.). Επομένως, και ο σωστός συντονισμός της PKA σηματοδότησης στις MAMs μπορεί να ρυθμίζεται από το δίκτυο myospryn-δεσμίνης.

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι το δίκτυο myosryn-δεσμίνης μπορεί να εμπλέκεται στην ολοκλήρωση σηματοδοτικών διαδικασιών και μεταφοράς μέσω: α) ορθής στόχευσης πρωτεϊνών και λιπιδίων στα μιτοχόνδρια και σε άλλα οργανίδια (ΕΔ, πυρήνας, λυσοσώματα και σχετιζόμενα οργανίδια/ αυτοφαγοςώματα) με τέτοιο τρόπο ώστε να διευκολύνει τον ορθό σχηματισμό των συμπλόκων και τη βιογένεση των οργανιδίων και β) σταθεροποίησης των σωστά σχηματισμένων συμπλόκων, καθώς επίσης και τη σωστή τοπολογησή τους στα κυτταρικά διαμερίσματα.

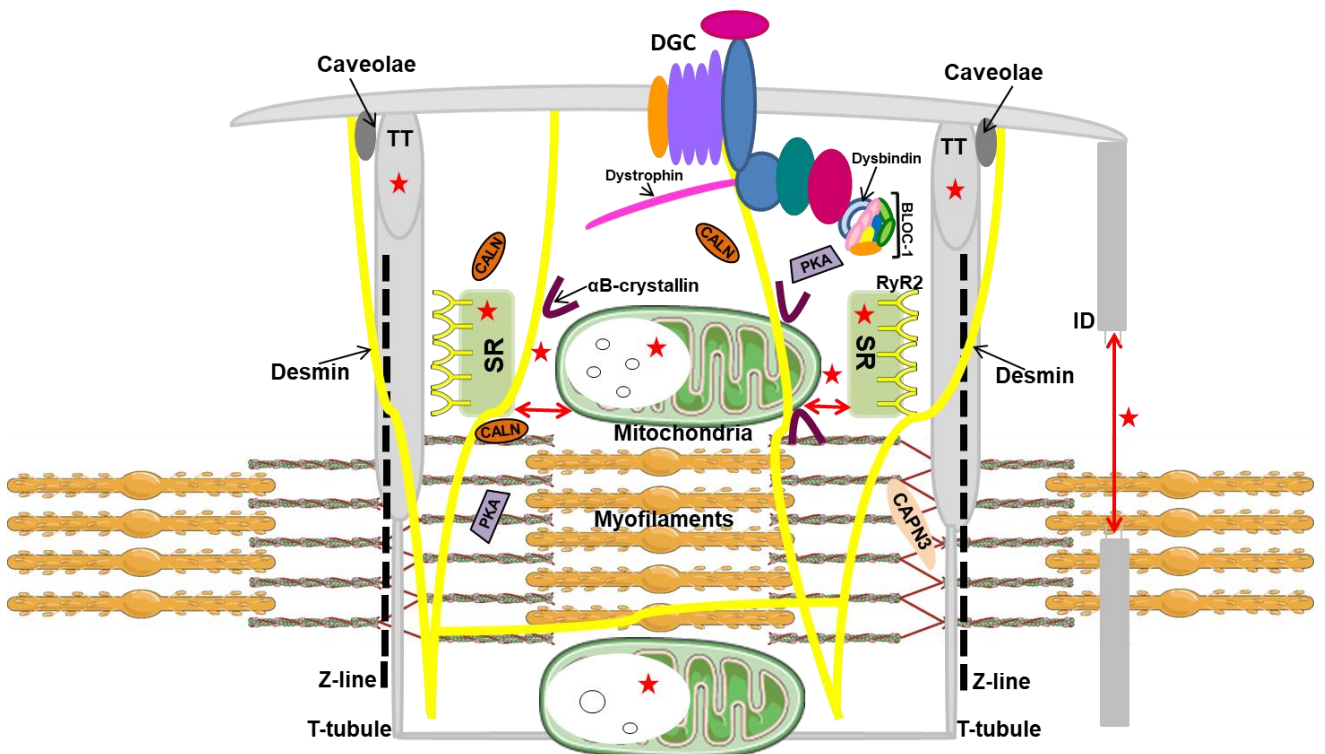
Οι σύγχρονες θεραπείες των μυοκαρδιοπαθειών στοχεύουν στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, παρά στα κυτταρικά ελαττώματα που οδηγούν στην παθολογική αναδιοργάνωση του μυοκαρδίου και στην καρδιακή δυσλειτουργία. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα συμβάλλουν στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης των μυοκαρδιοπαθειών και μπορούν να βοηθήσουν καταλυτικά στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών θεραπειάς. Ο πιθανός προστατευτικός ρόλος της myosryn, αλλά και της δεσμίνης και της αΒ-κρυσταλλίνης στα μιτοχόνδρια δημιουργεί προοπτικές για θεραπευτική στόχευση των μιτοχονδρίων. Οι αλλαγές στη μορφολογία και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων αποτελούν κοινό σημείο για πολυάριθμες ασθένειες, περιλαμβάνοντας μυοπάθειες, νευροπάθειες, νευροεκφυλιστικές διαταραχές, μεταβολικές ασθένειες και διάφορους τύπους καρκίνου.

ΣΤ. Προτεινόμενο μοντέλο του ικρίωματος μυοσπρυγ-δεσμίνης στην
εναρμόνιση ζωτικής σημασίας διεργασιών των μυοκαρδιοκυττάρων.

WT



Myosp-/-



Εικόνα 78. Σχηματική αναπαράσταση του ικριώματος της myosprgn (μαύρη γραμμή με συντηρημένες περιοχές στο C-τελικό άκρο της) με τη δεσμίνη (κίτρινη γραμμή) και των αλληλεπιδράσεων της myosprgn με τις: δεσμίνη, dysbindin και επομένως το BLOC-1, dystrophin, PKA, calcineurin (CALN), calpain-3 (CAPN3) και RyR2, τόσο σε wt, όσο και σε myosp^{-/-}. Επίσης, υποδεικνύεται ο εντοπισμός της δεσμίνης και της αB-κρυσταλλίνης στις MAMs. Τέλος, παρουσιάζονται οι ανωμαλίες που εντοπίζονται στο myosp^{-/-} μοντέλο διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας. Ειδικότερα: 1) οι εκτεταμένες μιτοχονδριακές ανωμαλίες, 2) η διόγκωση των μεμβρανών του σαρκοπλασματικού δικτύου (SR) και των T-σωληνίσκων (TT), 3) η απώλεια των σημείων επαφής μιτοχονδρίων-σαρκοπλασματικού δικτύου (SR) και 4) η αποδιοργάνωση των εμβόλιμων δίσκων (IDs). Η αποδιοργάνωση το ικριώματος myosprgn-δεσμίνης οδηγεί στην αποτυχία ολοκλήρωσης σηματοδοτικών διαδικασιών (προσέλκυση ρυθμιστών όπως φωσφατάσες, φωσφοδιεστεράσες κτλ), μεταφοράς (στόχευση πρωτεϊνών και λιπιδίων για το σχηματισμό συμπλόκων και τη βιογένεση οργανιδίων) και τοπολόγησής τους στα κυτταρικά διαμερίσματα. Πλασματική μεμβράνη (plasma membrane), Z-δίσκοι (Z-line), εμβόλιμοι δίσκοι (Intercalated Discs/IDs), T-σωληνίσκοι (T-tubules/TT), εγκολπωματικές περιοχές (caveolae), σύμπλοκο dystrophin-γλυκοπρωτεΐνης (dystrophin glycoprotein complex/DGC), μυοϊνίδια (myofilaments), μιτοχόνδρια (mitochondria).

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abazyan B, Dziedzic J, Hua K, Abazyan S, Yang C, Mori S, Pletnikov MV, Guilarte TR. Chronic exposure of mutant DISC1 mice to lead produces sex-dependent abnormalities consistent with schizophrenia and related mental disorders: a gene-environment interaction study. *Schizophr Bull.* 2014; 40: 575-584

Acehan D, Vaz F, Houtkooper RH, James J, Moore V, Tokunaga C, Kulik W, Wansapura J, Toth MJ, Strauss A, Khuchua Z. Cardiac and Skeletal Muscle Defects in a Mouse Model of Human Barth Syndrome. *The Journal of Biological Chemistry.* 2011; 286(2): 899-908

Al-Shammari AR, Bhardwaj SK, Musaelyan K, Srivastava LK and Szele FG. Schizophrenia-related dysbindin-1 gene is required for innate immune response and homeostasis in the developing subventricular zone. *npj Schizophrenia.* 2018; 4:15

Ameen NA, Figueroa Y, Salas PJ. Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J Cell Sci.* 2001; 114: 563-575

Anderson J, Li Z, Goubel F. Models of skeletal muscle to explain the increase in passive stiffness in desmin knockout muscle. *J Biomech.* 2002; 35(10): 1315-1324

Appert-Collin A, Cotecchia S, Nenniger-Tosato M, Pedrazzini T, Diviani D. The A-kinase anchoring protein (AKAP)-Lbc-signaling complex mediates alpha1 adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(24): 10140-10145

Arbustini E, Narula N, Dec GW, Reddy KS, Greenberg B, Kushwaha S, Marwick T, Pinney S, Bellazzi R, Favalli V, Kramer C, Roberts R, Zoghbi WA, Bonow R, Tavazzi L, Fuster V, Narula J. The MOGE(S) classification for a phenotype-genotype nomenclature of cardiomyopathy: endorsed by the World Heart Federation. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62(22): 2046-72

Ashfield R, Enriquez-Harris P, Proudfoot NJ. Transcriptional termination between the closely linked human complement genes C2 and factor B: common termination factor for C2 and c-myc? *The EMBO Journal.* 1991; 10 (13): 4197-4207

Baek ST, Kerjan G, Bielas SL, Lee JE, Fenstermaker AG, Novarino G, et al. Off-target effect of doublecortin family shRNA on neuronal migration associated with endogenous microRNA dysregulation. *Neuron.* 2014; 82(6): 1255-62

Baldwin TA, Dessauer CW. Function of adenylyl cyclase in heart: the AKAP connection. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2018; 5(1)

Balijepalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW, Kamp TJ. Localization of cardiac L-type Ca^{2+} channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for β_2 -adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 7500-7505

Bandyopadhyay A, Shin DW, Ahn JO, Kim DH. Calcineurin regulates ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels in rat heart. *Biochem J*. 2000; 352(Pt 1): 61-70

Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kaushik S, Kiffin R, Cuervo AM. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell*. 2010; 39: 535-547

Bard F and Malhotra V. The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006; 22: 439-455

Bassel-Duby R and Olson EN. Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 311: 1133-1141

Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R, de Ferranti SD, Ferguson JF, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Lutsey PL, Mackey JS, Matchar DB, Matsushita K, Mussolino ME, Nasir K, O'Flaherty M, Palaniappan LP, Pandey A, Pandey DK, Reeves MJ, Ritchey MD, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sampson UKA, Satou GM, Shah SH, Spartano NL, Tirschwell DL, Tsao CW, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018; 137(12): e67-e492.

Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E, Hawkes R, Blake DJ. Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem*. 2001; 276: 24232-24241

Benson MA, Tinsley CL, Blake DJ. Myospryn is a novel binding partner for dysbindin in muscle. *J Biol Chem*. 2004; 279:10450-10458

Benson MA, Tinsley CL, Waite AJ, Carlisle FA, Sweet SMM, Ehler E, George CH, Lai FA, Martin-Rendon E, Blake DJ. Ryanodine receptors are part of the myospryn complex in cardiac muscle. *Sci Rep*. 2017; 7(1):6312

Bhuin T and Roy JK. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp. Cell Res*. 2014; 328: 1-19

Blankson H, Holen I, Seglen PO. Disruption of the cyokeratin cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Exp Cell Res.* 1995; 218: 522-530

Blayney LM and Lai FA. Ryanodine receptor-mediated arrhythmias and sudden cardiac death. *Pharmacol Ther.* 2009; 123: 151-177

Bonifacino JS and Glick BS. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell.* 2004; 116: 153-166

Bostick B, Yue Y, Duan D. Gender influences cardiac function in the mdx model of Duchenne cardiomyopathy. *Muscle Nerve.* 2010; 42(4): 600-603

Braunwald E. Cardiomyopathies. *Circulation Research.* 2017; 121(7): 711-721

Brooks DA. The endosomal network. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2009; 47: S9-S17

Bruce AF, Rothery S, Dupont E, Severs NJ. Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc Res.* 2008; 77: 757-765

Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell.* 1992; 70: 715-728

Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: A key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell.* 2000; 11: 467-480

Cai Q and Tammineni P. Alterations in Mitochondrial Quality Control in Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.* 2016; 10: 24

Capalbo L, D'Avino PP, Archambault V, Glover DM. Rab5 GTPase controls chromosome alignment through Lamin disassembly and relocation of the NuMA-like protein Mud to the poles during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 17343-17348

Cahill TJ, Ashrafian H, Watkins H. Genetic Cardiomyopathies Causing Heart Failure. *Circ Res.* 2013;113:660-675

Capetanaki Y, Milner DJ and Weitzer G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct Funct.* 1997; 22; 103-116.

Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton in healthy and failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000; 5(3): 203-220

Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12(8): 339348

Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* 2007; 313(10):2063-2076

Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 32:113-120

Capitani M, Sallese M. The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett* 2009; 583: 3863-3871

Carnegie GK, Smith FD, McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD. AKAP-Lbc nucleates a protein kinase D activation scaffold. *Mol Cell.* 2004; 15: 889-899

Carnegie GK, Means CK and Scott JD. A-Kinase Anchoring Proteins: From protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life.* 2009; 61(4): 394-406

Chang L, Barlan K, Chou YH, Grin B, Lakonishok M, Serpinskaya AS, Shumaker DK, Herrmann H, Gelfand VI, Goldman RD. The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. *J Cell Sci.* 2009; 122(16): 2914-2923

Chen H, Zhang A, Wu JC. Harnessing cell pluripotency for cardiovascular regenerative medicine. *Nature Biomedical Engineering.* 2018; 2: 392-398

Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(52): 20990-20995

Chen XW, Feng YQ, Hao CJ, Guo XL, He X, Zhou ZY, Guo N, Huang HP, Xiong W, Zheng H, Zuo PL, Zhang CX, Li W, Zhou Z. DTNBP1, a schizophrenia susceptibility gene, affects kinetics of transmitter release. *J Cell Biol* 2008; 181(5): 201-791

Chen X, Lee G, Maher BS, Fanous AH et al. GWA study data mining and independent replication identify cardiomyopathy associated 5 (CMYA5) as a risk gene for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2011; 16(11): 1117-1129

Chen X, Ma W, Zhang S, Paluch J, Guo W, Dickman DK. The BLOC-1 Subunit Pallidin Facilitates Activity-Dependent Synaptic Vesicle Recycling. *eNeuro*:4. 2017

Chen X, Grandont L, Li H, Hauschild R, Paque S, Abuzeineh A, et al. Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature.* 2014; 516(7529): 90-3

Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes

through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res.* 2000; 87: 1172-1179.

Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schroder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013; 125(1): 47-75

Cogli L, Progida C, Bramato R, Bucci C. Vimentin phosphorylation and assembly are regulated by the small GTPase Rab7a. *Biochim Biophys Acta.* 2013a; 1833: 1283-1293

Cogli L, Progida C, Thomas CL, Spencer-Dene B, Donno C, Schiavo G, Bucci C. Charcot-Marie-Tooth type 2b disease-causing Rab7a mutant proteins show altered interaction with the neuronal intermediate filament peripherin. *Acta Neuropathol.* 2013b; 25: 257-272

Cohen Sh, Zhai B, Gyri SP, Goldberg AL. Ubiquitination by TRIM32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol.* 2012; 198(4): 575-589

Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation.* 1999; 100: 2210-2212

Conover G and Gregorio CC. The desmin coil 1B mutation K190A impairs nebulin Z-disc assembly and stabilizes actin thin filaments. *J Cell Sci.* 2011; 124(20): 3464-3476

Czachor A, Failla A, Lockey R, Kolliputi N. Pivotal role of AKAP121 in mitochondrial physiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016; 310(8): C625-8

Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N Engl J Med.* 2000; 342(11):770-780

Dal Ferro M, Severini GM, Gigli M, Mestroni L, Sinagra G. Chapter: Genetics of Dilated Cardiomyopathy: Current Knowledge and Future Perspectives. Book: Dilated Cardiomyopathy. Springer Cham. 2019; pp45-69: https://doi.org/10.1007/978-3-030-13864-6_5

Daude N, Wohlgemuth S, Brown R, Pitstick R, Gapeshina H, Yang J, et al. Knockout of the prion protein (PrP)-like Sprn gene does not produce embryonic lethality in combination with PrP(C)-deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 2012; 109(23): 9035-4

Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. A β_2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} channel $\text{Ca}_v1.2$. *Science*. 2001; 293: 98-101

De Felipe P, Luke GA, Hughes LE, Gani D, Halpin C, Ryan MD. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends in Biotechnology*. 2006; 24(2); 68-75

Delevoeye C, Heiligenstein X, Ripoll L, Gilles-Marsens F, Dennis MK, Linares RA, Derman L, Gokhale A, Morel E, Faundez V, Marks MS, Raposo G. BLOC-1 Brings Together the Actin and Microtubule Cytoskeletons to Generate Recycling Endosomes. *Curr Biol*. 2016; 26: 1-13

De Lucia C, Eguchi A, Koch WJ. New Insights in Cardiac β -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. *Front Pharmacol*. 2018; 9:904

De Souza AT, Dai X, Spencer AG, Reppen T, Menzie A, Roesch PL, et al. Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice. *Nucleic acids research*. 2006; 34(16): 4486-94

Deng Z, Purtell K, Lachance V, Wold MS, Chen S, Yue Z. Autophagy Receptors and Neurodegenerative Diseases. *Trends Cell Biol*. 2017; 27(7): 491-504

Dennis MK, Delevoeye C, Acosta-Ruiz A, Hurbain I, Romao M, Hesketh GG, Goff PS, Sviderskaya EV, Bennett DC, Luzio JP, Galli T, Owen DJ, Raposo G, Marks MS. BLOC-1 and BLOC-3 regulate VAMP7 cycling to and from melanosomes via distinct tubular transport carriers. *J Cell Biol*. 2016; 214: 293-308

Dibb KM, Clarke JD, Horn MA, Richards MA, Graham HK, Eisner DA, Trafford AW. Characterization of an extensive transverse tubular network in sheep atrial myocytes and its depletion in heart failure. *Circulation: Heart Failure*. 2009; 2(5): 482-489

Dickman DK, Tong A, Davis GW. Snapin is critical for presynaptic homeostatic plasticity. *J Neurosci*. 2012; 32: 8716-8724

Di Giovanni J and Sheng ZH. Regulation of synaptic activity by snapin-mediated endolysosomal transport and sorting. *EMBO J*. 2015; 34: 2059-2077

Diokmetzidou A, Soumaka E, Kloukina I, Tsikitis M, Makridakis M, Varela A, Davos CH, Georgopoulos S, Anesti V, Vlahou A, Capetanaki Y. Desmin and alphaB-crystallin interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival. *J Cell Sci*. 2016a; 129(20): 3705-3720

Diokmetzidou A, Tsikitis M, Nikouli S, Kloukina I, Tsoupri E, Papathanasiou S, Psarras S, Mavroidis M, Capetanaki Y. Strategies to study desmin in cardiac muscle and culture systems. *Methods Enzymol.* 2016b; 568:427-459

Di Pietro SM, Falcon-Perez JM, Tenza D, Setty SR, Marks MS, Raposo G, Dell'angelica EC. BLOC-1 Interacts with BLOC-2 and the AP-3 Complex to Facilitate Protein Trafficking on Endosomes. *Mol Biol Cell.* 2006; 17: 4027-4038

Dionne LK, Wang XJ, Prekeris R. Midbody: from cellular junk to regulator of cell polarity and cell fate. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 35: 51-58

Di Rienzo M, Antonioli M, Fusco C, Liu Y, Mari M, Orhon I, Refolo G, Germani F, Corazzari M, Romagnoli A, Ciccocanti F, Mandriani B, Pellico MT, De La Torre R, Ding H, Dentice M, Neri M, Ferlini A, Reggiori F, Kulesz-Martin M, Piacentini M, Merla G, Fimia GM. Autophagy induction in atrophic muscle cells requires ULK1 activation by TRIM32 through unanchored K63-linked polyubiquitin chains. *Science Advances.* 2019; 5(5)

Diviani D, Scott JD. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 8): 1431-1437

Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J.* 2001; 20(8): 1921-1930

Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS, Scott JD. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature.* 2005; 437(7058): 574-578

Donnelly M LL, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, Dam E, Gani D, Ryan MD. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *Journal of General Virology.* 2001; 82: 1027-1041

Dorn GW II, Tepe NM, Lorenz JN, Koch WJ, Liggett SB. Low- and high level transgenic expression of β 2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in *Gaq*-overexpressing mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 6400-6405

Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Trafficking of G Protein-Coupled Receptors. *Circ Res.* 2006; 99: 570-582

Durham JT, Brand OM, Arnold M, Reynolds JG, Muthukumar L, Weiler H, Richardson JA, Naya FJ. Myospryn is a direct transcriptional target for MEF2A that

encodes a striated muscle, α -actinin-interacting, costamere-localized protein. *J Biol Chem*. 2006; 281(10): 6841-6849

Dye MJ and Proudfoot NJ. Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA polymerase II. *Cell*. 2001; 105: 669-681

Dye MJ, Gromak N, Proudfoot NJ. Exon tethering in transcription by RNA polymerase II. *Molecular Cell*. 2007; 21: 849-859

Ebert AD, Diecke S, Chen IY, Wu JC. Reprogramming and transdifferentiation for cardiovascular development and regenerative medicine: where do we stand? *EMBO Mol Med*. 2015; 7(9): 1090-103

El-Armouche A and Eschenhagen Th. β -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009; 14: 225-241

El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*. 2017; 13(7): e1006780

Enriquez-Harris P, Levitt N, Briggs D, Proudfoot NJ. A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription. *The EMBO Journal*. 1991; 10 (7); 1833-1842

Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén AS, Hellman J, Chou YH, Goldman RD. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci*. 2004; 117: 919-932

Faigle W, Colucci-Guyon E, Louvard D, Amigorena S, Galli T. Vimentin filaments in fibroblasts are a reservoir for SNAP23, a component of the membrane fusion machinery. *Mol Biol Cell*. 2000; 11: 3485-3494

Falcon-Perez JM, Starcevic M, Gautam R, Dell'Angelica EC. BLOC-1, a novel complex containing the pallidin and muted proteins involved in the biogenesis of melanosomes and platelet-dense granules. *J Biol Chem*. 2002; 277: 28191-28199

Fan G, Shumay E, Wang H, Malbon CC. The scaffold protein gravin (cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein 250) binds the beta 2 adrenergic receptor via cytoplasmic Arg-329 to Leu-413 domain and provides a mobile scaffold during desensitization. *J Biol Chem*. 2001; 276: 24005-24014

Florescu C. Book: Current Perspectives on Cardiomyopathies. Chapter 2: Genetic Evaluation of Hypertrophic Cardiomyopathy. IntechOpen. 2018; <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79626>

Fraser ID, Tavalin SJ, Lester LB, Langeberg LK, Westphal AM, Dean RA, Marrion NV, Scott JD. A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *Embo J*. 1998; 17(8): 2261-2272

Fraser ID, Cong M, Kim J, Rollins EN, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Scott JD. Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Curr Biol*. 2000; 10(7): 409-12

Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1379-82

Fruman DA, Pai SY, Klee CB, Burakoff SJ, Bierer BE. Measurement of calcineurin phosphatase activity in cell extracts. *Methods*. 1996; 9: 146-154

Fuchs E and Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63: 345-382

Fuchs E and Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*. 1998; 279(5350): 514-519

Fuchs E and Karakesisoglou I. Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev*. 2001;15: 1-14

Fountoulakis M, Soumaka E, Rapti K, Mavroidis M, Tsangaris G, Maris A, Weisleder N, Capetanaki Y. Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38(3): 461-474

Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 9302-6

Galata Z, Kloukina I, Kostavasili I, Varela A, Davos CH, Makridakis M, Bonne G, Capetanaki Y. Amelioration of desmin network defects by α B-crystallin overexpression confers cardioprotection in a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by LMNA gene mutation. *J Mol Cell Cardiol*. 2018; 125: 73-86

Ganley IG, Carroll K, Bittova L, Pfeffer S. Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 5420-5430

Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao Y. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112(7): 2275-80

Garcia-Pelagio KP, Chen L, Joca HC, Ward CH, Lederer WJ, Bloch RJ. Absence of synemin in mice causes structural and functional abnormalities in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018; 114: 354-363

Gard DL and Lazarides E. Cyclic AMP-modulated phosphorylation of intermediate filament proteins in cultured avian myogenic cells. *Mol Cell Biol*. 1982; 2(9): 1104-1114

Gentil BJ, McLean JR, Xiao S, Zhao B, Durham HD, Robertson J. A two-hybrid screen identifies an unconventional role for the intermediate filament peripherin in regulating the subcellular distribution of the SNAP25-interacting protein, SIP30. *J Neurochem*. 2014; 131: 588-6014

Ghiani CA, Starcevic M, Rodriguez-Fernandez IA, Nazarian R, Cheli VT, Chan LN, Malvar JS, de Vellis J, Sabatti C, Dell'Angelica EC. The dysbindin-containing complex (BLOC-1) in brain: developmental regulation, interaction with SNARE proteins and role in neurite outgrowth. *Mol Psychiatry*. 2010; 15:115, 204-115

Ghiani CA and Dell'Angelica EC. Dysbindin-containing complexes and their proposed functions in brain: from zero to (too) many in a decade. 2011 ASN NEURO 3(2)

Ghahramani Seno MM, Trollet C, Athanasopoulos T, Graham IR, Hu P, Dickson G. Transcriptomic analysis of dystrophin RNAi knockdown reveals a central role for dystrophin in muscle differentiation and contractile apparatus organization. *BMC Genomics*. 2010; 11: 345

Gillard BK, Clement R, Colucci-Guvon E, Babinet C, Schwarzmann G, Taki T, Kasama T, Marcus DM. Decreased synthesis of glycosphingolipids in cells lacking vimentin intermediate filaments. *Exp Cell Res*. 1998; 242: 561-572

Gokhale A, Larimore J, Werner E, So L, Moreno-De-Luca A, Lese-Martin C, Lupashin VV, Smith Y, Faundez V. Quantitative proteomic and genetic analyses of the schizophrenia susceptibility factor dysbindin identify novel roles of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1. *J Neurosci*. 2012; 32: 3697-3711

Gokhale A, Hartwig C, Freeman AH, Das R, Zlatic SA, Vistein R, Burch A, Carrot G, Lewis AF, Nelms S, Dickman D, Puthenveedu M, Cox DN, Faundez V. The Proteome of BLOC-1 Genetic Defects Identifies the Arp2/3 Actin Polymerization Complex to Function Downstream of the Schizophrenia Susceptibility Factor Dysbindin at the Synapse. *J Neurosci*. 2016; 36: 12393-12411

Goldfarb LG, Olive M, Vicart P, Goebel HH. Intermediate filament diseases: desminopathy. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 642:131-164

Goldfarb LG, Dalakas MC. Tragedy in a heart beat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest.* 2009; 119(7):1806-1813

Goldstone DC, Walker PA, Calder LJ, Coombs PJ, Kirkpatrick J, Ball NJ, Hilditch L, Yap MW, Rosenthal PB, Stoye JP, Taylor IA. Structural studies of postentry restriction factors reveal antiparallel dimers that enable avid binding to the HIV-1 capsid lattice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 9609-9614

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77:7380-7384

Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 1991; 64: 915-925

Gossen M and Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 5547-51

Grant BD and Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 597-608

Gray PC, Tibbs VC, Catterall WA, Murphy BJ. Identification of a 15-kDa cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. *J Biol Chem.* 1997; 272: 6297-6302

Green DR and Levine B. To Be or Not to Be? How Selective Autophagy and Cell Death Govern Cell Fate. *Cell.* 2014; 157

Gromak N, West S, Proudfoot NJ. Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(10); 3986-3996

Guillory AN, Yin X, Wijaya CS, Diaz Diaz AC, Rababa'h A, Singh S, Atrooz F, Sadayappan S, McConnell BK. Enhanced cardiac function in Gravin mutant mice involves alterations in the β -adrenergic receptor signaling cascade. *PLoS One.* 2013; 8(9): e74784

Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, Labeit S, Witt C, Peltonen L, Richard I, Udd B. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 492-500

Hailey DW, Kim PK, Satpute-Krishnan P, Rambold AS, Mitra K, Sougrat R, Lippincott-Schwartz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010; 141(4): 656-667

Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: Generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol*. 2009; 19.1217. doi:10.1002/0471143030.cb1912s44

Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 792-804

Hernandez DA, Bennett CM, Dunina-Barkovskaya L, Wedig T, Capetanaki Y, Herrmann H, Conover GM. Nebulette is a powerful cytolinker organizing desmin and actin in mouse hearts. *Mol Biol Cell*. 2016. 27(24): 3869-3882

Hewavitharana T and Wedegaertner PB. Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal*. 2012; 24: 25-34

Hikita T, Taya S, Fujino Y, Taneichi-Kuroda S, Ohta K, Tsuboi D, Shinoda T, Kuroda K, Funahashi Y, Uruguchi-Asaki J, Hashimoto R, Kaibuchi K. Proteomic analysis reveals novel binding partners of dysbindin, a schizophrenia-related protein. *J Neurochem*. 2009; 110: 1567-1574

Houseweart MK and Cleveland DW. Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10: 93-101

Hsiung A, Naya FJ, Chen X, Shiang R. A schizophrenia associated CMYA5 allele displays differential binding with desmin. *J Psychiatr Res*. 2019;111:8-15

Huxley VH. Sex and the cardiovascular system: the intriguing tale of how women and men regulate cardiovascular function differently. *Adv Physiol Educ*. 2007; 31: 17-22

Ibrahim M, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM. (2011-09-22). The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011; 278(1719): 2714-2723

Ikawa K, Satou A, Fukuhara M, Matsumura S, Sugiyama N, Goto H, Fukuda M, Inagaki M, Ishihama Y, Toyoshima F. Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle*. 2014; 13: 126-137

Inamdar AA, Inamdar AC. Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. *J Clin Med*. 2016; 5(7): E62

Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J*. 2005; 24: 3834-3845

Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature reviews Drug discovery*. 2010; 9(1): 57-67

Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci*. 2004; 117: 4837-4848

Jahn R. Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1014: 170-178

Jia JM, Hu Z, Nordman J, Li Z. The schizophrenia susceptibility gene dysbindin regulates dendritic spine dynamics. *J Neurosci*. 2014; 34: 13725-13736

Kano S, Miyajima N, Fukuda S, Hatakeyama S. Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2. *Cancer Res*. 2008; 68: 5572-5580

Kapiloff MS, Jackson N, Airhart N. mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J Cell Sci*. 2001; 114(Pt 17): 3167-3176

Kaprielian RR, Stevenson S, Rothery SM, et al. Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium. *Circulation*. 2000; 101: 2586-2594

Kessler D, Gruen GC, Heider D, Morgner J, Reis H, Schmid KW, Jendrossek V. The action of small GTPases Rab11 and Rab25 in vesicle trafficking during cell migration. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 29(5-6): 647-56

Kielbasa OM, Reynolds JG, Wu CL, Snyder CM, Cho MY, Weiler H, Kandarian S, Naya FJ. Myospryn is a calcineurin interacting protein that negatively modulates slow-fiber-type transformation and skeletal muscle regeneration. *FASEB J*. 2011; 25(7): 2276-2286

Kikuchi M, Okumura F, Tsukiyama T, Watanabe M, Miyajima N, Tanaka J, Imamura M, Hatakeyama S. TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793: 1828-1836

Kim J, Gee HY and Lee MG. Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *Journal of Cell Science*. 2018; 131

Kimura T, Jain A, Choi SW, Mandell MA, Schroder K, Johansen T, Deretic V. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *The Journal of Cell Biology*. 2015; 210(6): 973-989

Kimura T, Mandell MA, Deretic V. Precision autophagy directed by receptor regulators-emerging examples within the TRIM family. *J Cell Sci*. 2016; 129(5): 881-891

Kimura T, Jain A, Choi SW, Mandell MA, Johansen T, Deretic V. TRIM Directed Selective Autophagy Regulates Immune Activation. *Autophagy*. 2017; 13(5): 989-990

Kiral FR, Kohrs FE, Jin EJ, Hiesinger PR. Rab GTPases and Membrane Trafficking in Neurodegeneration. *Curr Biol*. 2018; 28(8): 471-486

Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer Ch, Lubbert H, Bujard H. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 10933-38

Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Developmental cell*. 2015; 32(1): 97-108

Koliopoulos MG, Esposito D, Christodoulou E, Taylor IA, Rittinger K. Functional role of TRIM E3 ligase oligomerization and regulation of catalytic activity. *EMBO J*. 2016; 35: 1204-1218

Konhilas JP, Leinwand LA. The effects of biological sex and diet on the development of heart failure. *Circulation*. 2007; 116: 2747-2759

Kostareva A, Kiselev A, Gudkova A, Frishman G, Ruepp A, Frishman D, Smolina N, Tarnovskaya S, Nilsson D, Zlotina A, Khodyuchenko T, Vershinina T, Pervunina T, Klyushina A, Kozlenok A, Sjoberg G, Golovljova I, Sejersen T, Shlyakhto E. Genetic Spectrum of Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy Uncovered by Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163362

Kouloumenta A, Mavroidis M, and Capetanaki Y. Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin. *J Biol Chem*. 2007; 282: 35211-35221

Kouloumenta A and Capetanaki Y. Study of the role of desmin IFs in the mechanisms of cell death in cardiomyopathies: desmin protein interactions, PhD thesis, 2008

Kritzer MD, Li J, Dodge-Kafka K and Kapiloff MS. AKAPs: The Architectural Underpinnings of Local cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(2): 351-358

Kurokawa J, Motoike HK, Rao J, Kass RS. Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(46): 16374-16378

Kurzchalia TV, Gorvel JP, Dupree P, Parton R, Kellner R, Houthaeve T, Gruenberg J, Simons K. Interactions of Rab5 with cytosolic proteins. *J Biol Chem.* 1992; 267: 18419-18423

Laflamme MA, Becker PL. G(s) and adenylyl cyclase in transverse tubules of heart: implications for cAMP-dependent signaling. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: 1841-1848

Lamb CA, Yoshimori T and Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews/Mol Cell Biol.* 2013; 14: 759-774

Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edström L., Ehler E, Udd B, Gautel M. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science.* 2005; 308: 1599-1603

Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 2015; 524: 309-314

Law SH, Sargent TD. The serine-threonine protein kinase PAK4 is dispensable in zebrafish: identification of a morpholino-generated pseudophenotype. *PLoS ONE.* 2014; 9(6): e100268

Lefkowitz RJ, Rockman HA and Koch WJ. Catecholamines, Cardiac β -adrenergic receptor, and heart failure. *Circulation.* 2000; 101: 1634-1637

Leo-Macias A, Liang FX, Delmar M. Ultrastructure of the intercellular space in adult murine ventricle revealed by quantitative tomographic electron microscopy. *Cardiovascular Research.* 2015; 107: 442-452

Li CJ, Chen CS, Yiang GT, Tsai AP, Liao WT, Wu MY. Advanced Evolution of Pathogenesis Concepts in Cardiomyopathies. *J Clin Med.* 2019; 8(4): 520

Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW II. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation.* 2000; 101: 1707-1714

- Li M**, Luo XJ, Zhang X, Yang ZH, Xiang K, Xiao X, Su B, Zhao YL, Shen Y, Xu Q, Chen XN, Chen JC, Liu XY, Yin LD, Ma XY, Yang SY, Yu J, Diao HB, Shi XD. A common variant of the cardiomyopathy associated 5 gene (CMYA5) is associated with schizophrenia in Chinese population. *Schizophr Res.* 2011; 129(2-3) :217-9
- Li N**, Chiang DY, Wang S, Wang S, Sun L, Voigt N, Repress JL, Ather S et al. Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model. *Circulation.* 2014; 129: 1276-1285
- Li W**, Zhang Q, Oiso N, Novak EK, Gautam R, O'Brien EP, Tinsley CL, Blake DJ, Spritz RA, Copeland NG, Jenkins NA, Amato D, Roe BA, Starcevic M, Dell'Angelica EC, Elliott RW, Mishra V, Kingsmore SF, Paylor RE, Swank RT. Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nat Genet* 2003; 35: 84-89
- Li X**, Matta SM, Sullivan RD and Bahouth SW. Carvedilol reverses cardiac insufficiency in AKAP5 knockout mice by normalizing the activities of calcineurin and CaMKII. *Cardiovasc Res.* 2014; 104: 270-279
- Lin F**, Wang Hy, Malbon CC. Gravin-mediated formation of signaling complexes in beta 2-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J Biol Chem.* 2000; 275: 19025-19034
- Lin X**, Tombler E, Nelson PJ, Ross M, Gelman IH. A novel src and ras-suppressed protein kinase C substrate associated with cytoskeletal architecture. *J Biol Chem.* 1996; 271(45): 28430-28438
- Logan J**, Falck-Pedersen E, Darnell JE, Shenk T. A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse β major-globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 8306-8310
- Lu L**, Cai Q, Tian JH, Sheng ZH. Snapin associates with late endocytic compartments and interacts with late endosomal SNAREs. *Biosci Rep.* 2009; 29: 261-269
- Lygren B**, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, Lorenz D, Wiesner B, Rosenthal W, Zaccolo M, Tasken K, Klussmann E. AKAP complex regulates Ca^{2+} re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2007; 8(11): 1061-1067

Lymperopoulos A and Bathgate A. Pharmacogenomics of the heptahelical receptor regulators G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: the known and the unknown. *Pharmacogenomics*. 2012; 13: 323-341

Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic Nervous System in Heart Failure Pathophysiology and Therapy. *Circ Res*. 2013;113: 739-753

Madamanchi A. β -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *MJM*. 2007; 10(2): 99-104

Malhotra V. Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *EMBO J*. 2013; 32: 1660-1664

Mandell MA, Jain A, Arko-Mensah J, Chauhan S, Kimura T, Dinkins Ch, Silvestri G, Munch J, Kirchhoff F, Simonsen A, Wei Y, Levine B, Johansen T, Deretic V. TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell*. 2014a; 30(4): 394-409

Mandell MA, Kimura T, Jain A, Johansen T, Deretic V. TRIM proteins regulate autophagy: TRIM5 is a selective autophagy receptor mediating HIV-1 restriction. *Autophagy*. 2014b; 10(12): 2387-2388

Mandell MA, Jain A, Kumar S, Castleman MJ, Anwar T, Eskelinen EL, Johansen T, Prekeris R, Deretic V. Correction: TRIM17 contributes to autophagy of midbodies while actively sparing other targets from degradation. *J Cell Sci*. 2017; 130(6): 1194

Margiotta A, Bucci C. Role of Intermediate Filaments in Vesicular Traffic. *Cells*. 2015;5:20.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101: 365-376

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosembliit N, Marks AR. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/ isoleucine zippers. *J Cell Biol*. 2001; 153(4): 699-708

Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1KCNE1 potassium channel. *Science*. 2002; 295(5554): 496-499

Masuda Y, Takahashi H, Sato S, Tomomori-Sato C, Saraf A, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S. TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin. *Nat Commun.* 2015; 6: 7299

Mavroidis M and Capetanaki Y. Extensive Induction of Important Mediators of Fibrosis and Dystrophic Calcification in Desmin-Deficient Cardiomyopathy. *AJP* . 2002; 160(3): 943-952

Mavroidis M, Davos CH, Psarras S, Varela A, Athanasiadis NC, Katsimpoulas M, Kostavasili I, Maasch C, Vater A, van Tintelen JP, Capetanaki Y. Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2015; 110(3):27

Maxfield FR and McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 121-132

McNiven MA and Thompson HM. Vesicle formation at the plasma membrane and trans-Golgi network: the same but different. *Science* 2006; 313: 1591-1594

McWilliam T, Prescott AR, Allen GFG, Tamjar J, Munson MJ, Thomson C, Muqit MMK, Ganley IG. mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *J Cell Biol.* 2016; 214(3): 333-345

Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science.* 2005; 308: 1583-1587

Mermelstein CS, Martins ER, Portilho DM, Costa ML. Association between the muscle-specific proteins desmin and caveolin-3 in muscle cells. *Cell Tissue Res.* 2007; 327(2): 343-51

Merrifield CJ, Perrais D, Zenisek D. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell.* 2005; 121: 593-606

Meyer S, van der Meer P, van Tintelen JP, van den Berg MP. Sex differences in cardiomyopathies. *Eur J Heart Fail.* 2014; 16(3): 238-47

Michalak M, Fu SY, Milner RE, Busaan JL, Hance JE. Phosphorylation of the carboxyl-terminal region of dystrophin. *Biochem Cell Biol.* 1996; 74:431-437

Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol.* 1996; 134(5):1255-1270

Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, Gerdes AM, Capetanaki Y. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and

cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31(11): 2063-2076

Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol.* 2000; 150(6): 1283-1298

Molteni R, Calabrese F, Racagni G, Fumagalli F, Riva MA. Antipsychotic drug actions on gene modulation and signaling mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2009; 124(1): 74-85

Morgan JR, Comstra HS, Cohen M, Faundez V. Presynaptic membrane retrieval and endosome biology: defining molecularly heterogeneous synaptic vesicles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5:a016915

Mruk DD, Lau AS, Sarkar O, Xia W. Rab4a GTPase catenin interactions are involved in cell junction dynamics in the testis. *J Androl.* 2007; 28: 742-754

Mullin AP, Gokhale A, Larimore J, Faundez V. Cell biology of the BLOC-1 complex subunit dysbindin, a schizophrenia susceptibility gene. *Mol Neurobiol.* 2011; 44: 53-64

Myagmar BE, Flynn JM, Cowley PM, Swigart PM, Montgomery MD, Thai K, et al. Adrenergic receptors in individual ventricular myocytes: the beta-1 and alpha-1b are in all cells, the alpha-1a is in a subpopulation, and the beta-2 and beta-3 are mostly absent. *Circ Res.* 2017; 120: 1103-1115

Najafi A, Sequeira V, Kuster DW, van der Velden J. β -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur J Clin Invest.* 2016; 46(4): 362-74

Nakagami H, Kikuchi Y, Katsuya T, Morishita R, Akasaka H, Saitoh S, Rakugi H, Kaneda Y, Shimamoto K, Ogihara T. Gene polymorphism of myospryn (Cardiomyopathy-Associated 5) is associated with left ventricular wall thickness in patients with hypertension. *Hypertens Res.* 2007; 30(12): 1239-1246

Naon D and Scorrano L. At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843: 2184-2194

Napolitano LM and Meroni G. TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life.* 2012; 64: 64-71

Nauert JB, Klauck TM, Langeberg LK, Scott JD. Gravin, an autoantigen recognized by serum from myasthenia gravis patients, is a kinase scaffold protein. *Curr Biol.* 1997; 7(1): 52-62

Navedo MF, Nieves-Cintrón M, Amberg GC, Yuan C, Votaw VS, Lederer WJ, McKnight GS, Santana LF. AKAP150 is required for stuttering persistent Ca²⁺ sparklets and angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res*. 2008; 102(2): e1–e11

Newell-Litwa K, Chintala S, Jenkins S, Pare JF, McGaha L, Smith Y, Faundez V. Hermansky-Pudlak protein complexes, AP-3 and BLOC-1, differentially regulate presynaptic composition in the striatum and hippocampus. *J Neurosci*. 2010; 30: 820-831

Newell-Litwa K, Salazar G, Smith Y, Faundez V. Roles of BLOC-1 and adaptor protein-3 complexes in cargo sorting to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell*. 2009; 20: 1441-1453

Newton AC, Bootman MD, Scott JD. *Second Messengers*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016; 8(8)

Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol*. 1999; 1: 376-382

Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*. 2010; 327: 1653-1657

Okumura F, Matsunaga Y, Katayama Y, Nakayama KI, Hatakeyama S. TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J Cell Sci*. 2010; 123: 2238-2245

Olejniczak M, Galka P, Krzyzosiak WJ. Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators. *Nucleic acids research*. 2010; 38(1): 1-16

Olkkonen VM and Ikonen E. When intracellular logistics fails - genetic defects in membrane trafficking. *Journal of Cell Science*. 2006; 119: 5031-5045

Olson EN. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med*. 2004; 10(5): 467-474

Omary MB. “IF-pathies”: a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1756-1762

Orchard CH, Pasek M, Brette F. The role of mammalian cardiac t-tubules in excitation–contraction coupling: experimental and computational approaches. *Exp Physiol*. 2009; 94: 509-519

Ortega A, Tarazón E, Gil-Cayueta C, García-Manzanares M, Martínez-Dolz L, Lago F, et al. Intercalated disc in failing hearts from patients with dilated cardiomyopathy: Its role in the depressed left ventricular function. *PLoS ONE*. 2017; 12(9): e0185062.

Ozato K, Shin DM, Chang, TH, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 849-860

Panagopoulou P, Davos CH, Milner DJ, Varela E, Cameron J, Mann DL, Capetanaki Y. Desmin mediates TNF-alpha-induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *J Cell Biol*. 2008; 181(5): 761-775

Papathanasiou S, Rickelt S, Soriano ME, Schips TG, Maier HJ, Davos CH, Varela A, Kaklamanis L, Mann DL, Capetanaki Y. Tumor necrosis factor-alpha confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nat Med*. 2015; 21(9):1076-1084

Pare GC, Bauman AL, McHenry M, Michel JJ, Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS. The mAKAP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 23): 5637-5646

Parikh VN, Ashley EA. Next-Generation Sequencing in Cardiovascular Disease. Present Clinical Applications and the Horizon of Precision Medicine. *Circulation*. 2017; 135(5): 406-409

Perrot R, Julien JP. Real-time imaging reveals defects of fast axonal transport induced by disorganization of intermediate filaments. *FASEB J*. 2009; 23: 3213-3225

Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol*. 2011; 31(2): 83-88

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9): e45

Pohl C, Jentsch S. Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 65-70

Ponten A, Li X, Thoren P, Aase K, Sjoblom T, Ostman A, et al. Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-c in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2003; 163: 673-682

Port DJ and Bristow MR. Altered Beta-adrenergic Receptor Gene Regulation and Signaling in Chronic Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33: 887-905

Potokar M, Kreft M, Li L, Daniel Andersson J, Pangrsic T, Chowdhury HH, Pekny M, Zorec R. Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic*. 2007; 8: 12-20

Potokar M, Stenovec M, Gabrijel M, Li L, Kreft M, Grilc S, Pekny M, Zorec R. Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia*. 2010; 58: 1208-1219

Prabhavathi K, Selvi KT, Poornima KN, Sarvanan A. Role of biological sex in normal cardiac function and in its disease outcome - a review. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8(8): BE01-4

Psarras S, Mavroidis M, Sanoudou D, Davos CH, Xanthou G, Varela AE, Panoutsakopoulou V and Capetanaki Y. Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model. *Eur Heart J*. 2012; 33: 1954-1963

Rabouille C. Pathways of unconventional protein secretion. *Trends Cell Biol*. 2017; 27: 230-240

Rampelt H, Zerbes RM, van der Laan M, Pfanner N. Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *BBA Molecular Cell Research*. 2017; 1864(4): 737-746

Rapti K, Diokmetzidou A, Kloukina I, Milner DJ, Varela A, Davos CH, Capetanaki Y. Opposite effects of catalase and MnSOD ectopic expression on stress induced defects and mortality in the desmin deficient cardiomyopathy model. *Free Radic Biol Med*. 2017; 110: 206-218

Ren J, Ceylan-Isik A. Diabetic cardiomyopathy. *Endocrine*. 2004; 25: 73-83

Rengo G, Lympelopoulos A, Leosco D, Koch WJ. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 50: 785-792

Rengo G, Perrone-Filardi P, Femminella GD, Liccardo D, Zincarelli C, de Lucia C, Pagano G, Marsico F, Lympelopoulos A, Leosco D. Targeting the β -adrenergic receptor system through G-protein-coupled receptor kinase 2: a new paradigm for therapy and prognostic evaluation in heart failure: from bench to bedside. *Circ Heart Fail*. 2012; 5: 385-391

Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J*. 2001; 20(9): 2140-2151

Reynolds JG, McCalmon SA, Tomczyk T, Naya FJ. Identification and mapping of protein kinase A binding sites in the costameric protein myospryn. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(6): 891-902

Reynolds JG, McCalmon SA, Donaghey JA, Naya FJ. Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in Muscular dystrophy. *J Biol Chem.* 2008; 283(13): 8070-8074

Rhodes DA, de Bono B and Trowsdale J. Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology.* 2005; 116: 411-417

Riederer MA, Soldati T, Shapiro AD, Lin J, Pfeffer SR. Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol.* 1994; 125: 573-582

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell.* 1995; 81: 27-40

Riley G, Syeda F, Kichhof P, Fabritz L. An introduction to murine models of atrial fibrillation. *Frontiers in Physiology.* 2012; 3(296)

Rivenes SM, Kearney DL, Smith EO, Towbin JA, Denfield SW. Sudden death and cardiovascular collapse in children with restrictive cardiomyopathy. *Circulation.* 2000;102: 876-882

Rizzo S, Carturan E, De Gaspari M, Pilichou K, Thiene G, Basso C. Update on cardiomyopathies and sudden cardiac death. *Forensic Sci Res.* 2019; 4(3): 202-210

Robinson ML, Wallert MA, Reinitz CA, Shabb JB. Association of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase with cardiac myocyte sarcolemma. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 330(1): 181-187

Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, et al. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* 2007; 3(5): e78

Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2009; 459: 356-363

Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier DYR. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature.* 2015; 524: 230-233

Rudolf R, Khan MM, Lustrino D, Labeit S, Kettelhut IC, Navegantes LCC. Alterations of c-AMP-dependent signaling in dystrophic skeletal muscle. *Frontiers in Physiology.* 2013; 4(290)

Ruehr ML, Russell MA, Bond M. A-kinase anchoring protein targeting of protein kinase A in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37: 653-665

Russell MA, Lund LM, Haber R, McKeegan K, Cianciola N, Bond M. The intermediate filament protein, synemin, is an AKAP in the heart. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 456(2): 204-215

Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. Differential targeting of β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. *J Biol Chem.* 2000; 29;275(52): 41447-57

Ryder PV, Faundez V. Schizophrenia: the "BLOC" may be in the endosomes. *Sci Signal.* 2009;2:pe66

Ryder PV, Vistein R, Gokhale A, Seaman MN, Puthenveedu M, Faundez V. The WASH Complex, an Endosomal Arp2/3 Activator, Interacts with the Hermansky-Pudlak Syndrome Complex BLOC-1 and its Cargo Phosphatidylinositol-4-kinase Type II Alpha. *Mol Biol Cell.* 2013; 24: 2269-2284

Sacchetto R, Damiani E, Margreth A. Clues to calcineurin function in mammalian fast-twitch muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2001; 22(6): 545-559

Salazar G, Craige B, Styers ML, Newell-Litwa KA, Doucette MM, Wainer BH, Falcon-Perez JM, Dell'Angelica EC, Peden AA, Werner E, Faundez V. BLOC-1 complex deficiency alters the targeting of adaptor protein complex-3 cargoes. *Mol Biol Cell.* 2006; 17: 4014-4026

Sanchez JG, Okreglicka K, Chandrasekaran V, Welker JM, Sundquist WI, Pornillos, O. The tripartite motif coiled-coil is an elongated antiparallel hairpin dimer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 2494-2499

Sanghvi-Shah R and Weber GF. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front Cell Dev Biol.* 2017; 5:81

Sannerud R, Saraste J and Goud B. Retrograde traffic in the biosynthetic secretory route: pathways and machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15: 438-445

Sarparanta J, Blandin G, Charton K, Vihola A, Marchand S, Milic A, Hackman P, Ehler E, Richard I, Udd B. Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (CMYA5) to Tibial and Limb-girdle muscular Dystrophies. *J Biol Chem* 2010; 285(39): 30304-30315

Sassano ML, van Vliet AR, Agostinis P. Mitochondria-associated membranes as networking platforms and regulators of cancer cell fate. *Frontiers in oncology.* 2017; 7(174)

Sato T, Okumura F, Ariga T, Hatakeyama S. TRIM6 interacts with Myc and maintains the pluripotency of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2012; 125: 1544-1555

Scharwey M, Tatsuta T, Langer TH. Mitochondrial lipid transport at a glance. *Journal of Cell Science.* 2013; 126: 5317-5323

Schiattarella GG, Cattaneo F, Pironti G, Magliulo F, Carotenuto G, Pirozzi M, et al. Akap1 deficiency promotes mitochondrial aberrations and exacerbates cardiac injury following permanent coronary ligation via enhanced mitophagy and apoptosis. *PLoS One.* 2016;11:e0154076

Schroder R, Schoser B. Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. *Brain Pathol.* 2009; 19(3):483-492

Schubert W, Sotgia F, Cohen AW, Capozza F, Bonuccelli G, Bruno C, Minetti C, Bonilla E, Di Mauro S, and Lisanti MP. Caveolin-1 and Caveolin-2 Deficient Mice Both Display Numerous Skeletal Muscle Abnormalities, with Tubular Aggregate Formation. *Am J Pathol.* 2007; 170: 316-333

Selcen D, Engel AG. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. *Ann Neurol.* 2003; 54(6): 804-810

Selcen D. Myofibrillar myopathies. *Neuromuscul Disord.* 2011; 21(3): 161-171

Senter L, Ceoldo S, Petrusa MM, Salviati G. Phosphorylation of dystrophin: effects on actin binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 206: 57-63

Shah SB, Davis J, Weisleder N, Kostavassili I, McCulloch AD, Ralston E, Capetanaki Y and Lieber RL. Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. *Biophys J.* 2004; 86: 2993-3008

Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem.* 1996; 271(25): 15160-15165

Song LS, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 4305-4310

Sparrer KMJ and Gack MU. Trim proteins: new layers in virus-induced autophagy. *PLoS Pathog.* 2018; 14(2): e1006787

Starcevic M and Dell'Angelica EC. Identification of snapin and three novel proteins (BLOS1, BLOS2, and BLOS3/reduced pigmentation) as subunits of biogenesis of

lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1). *J Biol Chem.* 2004; 279: 28393-28401

Stollberger C, Finsterer J. Why does takotsubo ('broken heart syndrome') affect more females than males? *Int J Cardiol.* 2011; 147: 175-176

Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, et al. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2002;71:337-48

Styers ML, Salazar G, Love R, Peden AA, Kowalczyk AP, Faundez V. The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2004; 15: 5369-5382

Tardito D, Tura GB, Bocchio L, Bignotti S, Pioli R, Racagni G, Perez J. Abnormal levels of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits in platelets from schizophrenic patients. *Neuropsychopharmacology.* 2000; 23(2): 216-9

Takahashi S, Kubo K, Waguri S, Yabashi A, Shin HW, Katoh Y, Nakayama K. Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 17): 4049-57

Tang W, Ehrlich I, Wolf S BE, Michalski AM, Wolfl S, Hasan MT, Luthi A, Sprengel R. Faithfull expression of multiple proteins via 2A-peptide self-processing: a versatile and reliable method for manipulating brain circuits. *The Journal of Neuroscience.* 2009; 29(27): 8621-8629

Tang Y, Tian X, Wang R, Fill M, Chen SR. Abnormal termination of Ca²⁺ release is a common defect of RyR2 mutations associated with cardiomyopathies. *Circ Res.* 2012; 110: 968-977

Tatsuta T, Scharwey M, Langer Th. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends in Cell Biology.* 2014; 24(1): 44-52

Templeton NS, Roberts DD, Safer B. Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther.* 1997; 4(7): 700-9

te Riele H, Maandag ER, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(11): 5128-32

Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, Wilkins E, Wright L, Vos R, Bax J, Blum M, Pinto F, Vardas P; ESC Scientific Document Group. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Heart J.* 2018; 39(7): 508-579

Tingley WG, Pawlikowska L, Zaroff JG, Kim T, Nguyen T, Young SG, Vranizan K, Kwok PY, Whooley MA, Conklin BR. Gene-trapped mouse embryonic stem cell-derived cardiac myocytes and human genetics implicate AKAP10 in heart rhythm regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(20): 8461-8466

Tkatchenko AV, Piétu G, Cros N, Gannoun-Zaki L, Auffray C, Léger JJ, Dechesne CA. Identification of altered gene expression in skeletal muscles from Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord*. 2001; 11: 269-277

Toedebusch R, Belenchia A, Pulakat L. Diabetic Cardiomyopathy: Impact of Biological Sex on Disease Development and Molecular Signatures. *Front Physiol*. 2018; 9:453

Tripathi R, Sullivan R, Fan T-HM, Wang D, Sun Y, Reed GL, Gladysheva IP. Enhanced heart failure, mortality and renin activation in female mice with experimental dilated cardiomyopathy. *PLoS ONE*. 2017; 12(12): e0189315

Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, Schneider R, Schweiger S. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet*. 2001; 29(3): 287-294

Tsikitis M, Galata Z, Mavroidis M, Psarras S, Capetanaki Y. Intermediate filaments in cardiomyopathy. *Biophysical Reviews*. 2018; 10:1007-1031

Tsopri E, Capetanaki Y. Study of the role of myospryn in heart. MSci thesis. 2010

Tsopri E, Capetanaki Y. Myospryn: a multifunctional desmin-associated protein. *Histochem Cell Biol*. 2013; 140(1):55-63

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 2008; 27: 433-446

Udd B, Vihola A, Sarparanta J, Richard I, Hackman P. Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurobiology*. 2005; 64: 636-642

Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 1990; 265: 7248-7256

van Spaendonck-Zwarts KY, van Hessem L, Jongbloed JD, de Walle HE, Capetanaki Y, van der Kooi AJ, van Langen IM, van den Berg MP, van Tintelen JP. Desmin-related myopathy. *Clin Genet*. 2011; 80(4): 354-366

Vardjan N, Gabrijel M, Potokar M, Svajger U, Kreft M, Jeras M, De Pablo Y, Faiz M, Pekny M, Zorec R. IFN- γ -induced increase in the mobility of MHC class II

compartments in astrocytes depends on intermediate filaments. *J Neuroinflamm.* 2012; 9: 144

Vatta M, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Entman ML, Noon GP, Torre-Amione G, Bowles NE, Towbin JA. Molecular remodelling of dystrophin in patients with end-stage cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. *Lancet.* 2002; 359: 936-941

Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA. Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(19): 8374-8385

Venuto S, Merla G. E3 Ubiquitin Ligase TRIM Proteins, Cell Cycle and Mitosis. *Cells.* 2019; 8(5): pii: E510

Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet.* 1998; 20(1):92-95

Vimalanathan AK, Ehler E, Gehmlich K. Genetics of and pathogenic mechanisms in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Biophys Rev.* 2018; 10(4): 973-982

Walker MG. Pharmaceutical target identification by gene expression analysis. *Mini Rev Med Chem.* 2001; 1: 197-205

Walsh MP, Busaan JL, Fraser ED, Fu SY, Pato MD, Michalak M. Characterization of the recombinant C-terminal domain of dystrophin: phosphorylation by calmodulin-dependent protein kinase II and dephosphorylation by type 2B protein phosphatase. *Biochemistry.* 1995; 34: 5561-5568

Walter M, Chen FW, Tamari F, Wang R, Ioannou YA. Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment. *Biol Cell.* 2009; 101: 141-152

Wang H , Xu J, Lazarovici P and Zheng W. Dysbindin-1 Involvement in the Etiology of Schizophrenia. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 2044

Wang S and Peng D. Complexity of Sarcomere Protein Gene Mutations in Restrictive Cardiomyopathy. *Intech open.* 2017; Chapter 9. DOI: 10.5772/66378

Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H. Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature.* 2001; 410: 592-596

Watanabe M, Tsukiyama T, and Hatakeyama S. TRIM31 interacts with p52(Shc) and inhibits Src-induced anchorage-independent growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 388: 422-427

Watanabe M and Hatakeyama S. TRIM proteins and diseases. *J Biochem.* 2017; 161(2): 135-144

Weickert CS, Straub RE, McClintock BW, Matsumoto M, Hashimoto R, Hyde TM, et al. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61:544-55

Weisleder N, Soumaka E, Abbasi S, Taegtmeier H and Capetanaki Y. Cardiomyocyte-specific desmin rescue of desmin null cardiomyopathy excludes vascular involvement. *J Mol Cell Cardiol.* 2004a; 36: 121-128

Weisleder N, Taffet GE, Capetanaki Y. Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004b; 101(3):769-774

West S, Zaret K, Proudfoot NJ. Transcriptional termination sequences in the mouse serum albumin gene. *RNA.* 2008 (a); 12: 655-665

West S, Proudfoot NJ, Dye MJ. Molecular dissection of mammalian RNA polymerase II transcriptional termination. *Molecular Cell.* 2008 (b); 29 (5): 600-610

Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2010; 11: 872-884

Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et biophysica acta.* 2012; 1817: 1833-1838

Wettschureck N and Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews* 2005; 85(4): 1159-204

White JK, Gerdin AK, Karp NA, Ryder E, Buljan M, Bussell JN, Salisbury J, Clare S, Ingham NJ, Podrini C, Houghton R, Estabel J, Bottomley JR, Melvin DG, Sunter D, Adams NC; Sanger Institute Mouse Genetics Project, Tannahill D, Logan DW, Macarthur DG, Flint J, Mahajan VB, Tsang SH, Smyth I, Watt FM, Skarnes WC, Dougan G, Adams DJ, Ramirez-Solis R, Bradley A, Steel KP. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell.* 2013;154(2): 452-64

Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc.* 2009; 4: 1582-1590

Wilhelmsson U, Faiz M, De Pablo Y, Sjöqvist M, Andersson D, Widstrand A, Potokar M, Stenovec M, Smith PL, Shinjyo N et al. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway. *Stem Cells*. 2012; 30: 2320-2329

Witt CC, Burkart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, Labeit S. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J* 2006; 25(16): 3843-3855

Witt CC, Witt SH, Lerche S, Labeit D, Back W, Labeit S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *The EMBO Journal*. 2008; 27: 350-360

Wong YC, Holzbaur EL. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(42): E4439-48

Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2002; 13; 277(37): 34280-6

Xiang Y and Kobilka BK. Myocyte Adrenoceptor Signaling Pathways. *Science*. 2003; 300

Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M and Lakatta EG. Recent Advances in Cardiac β 2-Adrenergic Signal Transduction. *Circulation Research*. 1999; 85: 1092-1100

Xu J, Li Z, Ren X, Dong M, Li J, Shi X, Zhang Y, Xie W, Sun Z, Liu X, Dai Q. Investigation of Pathogenic Genes in Chinese sporadic Hypertrophic Cardiomyopathy Patients by Whole Exome Sequencing. *Scientific Reports*. 2015; 5:16609

Yang Q, He X, Yang L, Zhou Z, Cullinane AR, Wei A, Zhang Z, Hao Z, Zhang A, He M, Feng Y, Gao X, Gahl WA, Huizing M, Li W. The BLOS1-interacting protein KXD1 is involved in the biogenesis of lysosome-related organelles. *Traffic*. 2012; 13: 1160-1169

Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL. A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2005; 16: 964-975

Collins A, Warrington A, Taylor KA, Svitkina T. Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol*. 2011; 21: 1167-1175

Yin CC, Blayney LM, Lai FA. Physical coupling between ryanodine receptor-calcium release channels. *J Mol Biol.* 2005; 349: 538-546

Zakhary DR, Moravec CS, Bond M. Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart: alterations in human heart failure. *Circulation.* 2000; 101(12): 1459-1464

Zeigerer A, Gilleron J, Bogorad RL, Marsico G, Nonaka H, Seifert S, Epstein-Barash H, Kuchimanchi S, Peng CG, Ruda VM et al. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature.* 2012; 485: 465-470

Zeng H, Hoire K, Madisen L, Pavlova MN et al. An inducible and reversible mouse genetic rescue system. *PLOS Genetics.* 2008; 4(5)

Zhang HB, Li RC, Xu M, Xu SM, Lai YS, Wu HD, Xie XJ, Gao W, Ye H, Zhang YY, Meng X, Wang SQ. Ultrastructural uncoupling between T-tubules and sarcoplasmic reticulum in human heart failure. *Cardiovascular Research.* 2013; 98: 269-276

Zhang R, Zhang H, Li M, Li H, Li Y, Valenzuela RK, Su B, Ma J. Genetic analysis of common variants in the CMYA5 (cardiomyopathy-associated 5) gene with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013; 46: 64-9

Zhang X, Ye G, Duan J, Chen AF, Ren J. Influence of gender on intrinsic contractile properties of isolated ventricular myocytes from calmodulin-induced diabetic transgenic mice. *Endocrine Res.* 2003; 29: 227-236

Zhou B, Cai Q, Xie Y, Sheng ZH. Snapin recruits dynein to BDNF-TrkB signaling endosomes for retrograde axonal transport and is essential for dendrite growth of cortical neurons. *Cell Rep.* 2012; 2: 42-51

Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2002; 13: 121-128

Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 1607-1612

<http://www.interfil.org/index.php>, July 2019

http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/

Η. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Myospryn GenBank: AJ575748.1
Cmya5 cardiomyopathy associated 5
[Mus musculus (house mouse)]
Gene ID: 76469

1.1 Η αλληλουχία του mRNA της myospryn στο ποντίκι [Mus musculus partial mRNA for myospryn protein (12050bp)]

1 gcggggaagt tggcaggac tggaaccaga ggaagctgag ccagggccgc agaagctccg
61 tggcgaaact ttctgacgc cttctatta aaggcttggg gcgacccgc cccgcgcgc
121 gggaacccaa gcagccccgc gggccctggc aaagtgcagt cagacggaga acaccgggcg
181 aggcgtgggc agctccgact cggccagga caggcgcgat ggagagcggc gacagcggac
241 tcgagccca gggcttcta ggatggggtg cagacgagga ggtggcccag gagctggaga
301 cggaggagga gtcggagggc gagggggagg agacggcggc cgagtcggag gaggagcccc
361 acgccagtt atcagatgag gatgaggagg gcaagacaa gcaggagtgt atcgtctctg
421 acccttcctt ttcatggtg gcagttcaac gtgaagacag tgggataacc tgggagacca
481 actcaagcag atcttccact ccttgggctt ctggagaaag tcagacctcg ggaatatgta
541 gtttgaagg gtcagctctg acttctcctc caggaagtgt ttctttatt atggatgaag
601 ttaaaggac acgaaaaga actcagaagt ccaagcgtgg ctcacatca ctgcgtcggg
661 aaggcagcaa aaaaaggaat tctctggaat cacaagatgt tctgacaaac caagaagatg
721 gtcctcaat tcagaaagc cctgtgctca atattgagaa tgaaaagtca tctattggca
781 cttatgataa aacaagaagg aagaagactg catcaaatac gcctccatc actggggcta
841 tctaaaaga gcacaaacca ttagtgttga agccagtcta cataggaacg gtacaataca
901 aaataaagat gttcaattca gtaaagaag agttaattcc tacaattt tatgggacgt
961 tgccaaaagg ttatgtaatt aaggaaatac attacaggag aggaaaagat tcatctatta
1021 gtctagagcc agatttgagc aatggtggtt ctaatatagt tcccaaagg aaatttgccc
1081 agagcccaga agaagacaaa gtaagagagc ttgctccacc ctggagaggt accctctcca
1141 aagggtccag gacctcattg tttagtcacg aagagcaaaa gaaaacgtat gccgattcct
1201 atttaaatgt tcatcttca acagaacacg catttccctc cagtgccaga aatgatacag
1261 ctgatcaaga agaaaatctc agccttccac aatgatgcc acaacagcca gctgatgaat
1321 caaagacca cagaatggag ccaccaagca ctccagcaac catggtcctt gaaagagcaa
1381 aggaagaact ggaacagaat gcacaaggaa aggaaagttc agaggatgat gcttcagtct
1441 tgacaggctc agctgatgat gtgcaacagg aaggcttggg ttctgtcaac cattccatgc

1501 catgggaggc agagaaggag tctttagaga caggaccacc aagaccagcg ccagccatcc
1561 aagaaaagt ttgagccagac atggaagggc tagagccgat ttcaacagaa aaaacagaac
1621 aagcgtctga atacgttacc tcatctgagc ccatagtcta cagagaggag gagcatgcgc
1681 ctgagcccat agtccacaga gaggaggagc atgcgcctga gcccatagtt caaagagagg
1741 aggagcatgc gcctgagcct gagtccatag tccacagaga ggaggagcat ggcctgagc
1801 ccatagtcca cagagaggag gagcatgcgc ctgagcctgt gcccatagtc cacagagagg
1861 aggagcatgt gcctgagcct gagtccatag tccacagagg ggaggagcat ggcctgagc
1921 ccatagtcca cagagataag gggcatgcac tggagcccat agtccacaga gaggaggagc
1981 atgcgcctga gcccatagtc cacagagatg aggggcatgc accggagccc atagtcca
2041 gagaggagga gcatgtgcct gagcctgagt ccatagtccg caaaggggag gagcatgcgc
2101 ctgagcccat agtccacaga gaggaggagc aagtcctga gcctgagtc atagtccaca
2161 gagaagagga gcatgcgcct gagcccatag tccacagaga ggaggagcaa gtcctgagc
2221 ctgagtcct agtccacaga gaggaggagc atgcgcctga acccatggtt ctagagaag
2281 agcatgcacc tgagccata gtccgcagag aggaggagca tgcgcctgag ccatagtcc
2341 acagagagga ggagcatgcg cctgaacca tggttcatag aaaggcaca caactagaaa
2401 ggggagtgga aactctacg ccaatcacag atactactga acccgaagat tctagtctag
2461 aagaagagat catagaactt gattaccag aaagtccttt agcttctaag gagactccc
2521 catcgccttt gtcccctgaa gttaggcaca gaaaagagcc cattctacca acacagatga
2581 cattcacacc tgagcgtatc actttgtccg aggaagaaag agaggaaaac gactctgttt
2641 ctactgattc tgctttgta tctgagtatt cagtcctaca ggattgaac catacaccag
2701 agaagctgga agtagaggca gtttctgtat ctgatgtgaa atctagcaat gaacctgcag
2761 tctttcaga ggacgacgag gaactgaggt cttattcccc agctatgacc tctgtatctg
2821 agcagtcctt ttctccatcc accactgaga agacatctgc catccagtc ccactcttt
2881 caacagtttc accagtctg tctggagatg aggcctcaga gaactgtgt cactcaccag
2941 aatctgaatc tgcggctgag tattctgttc cagccatgc gcaagagttg ctgttgaaaa
3001 caggtgacca caagctcca ttaaagtcce aacgtgtttc tgagcccatc attcaggcag
3061 aagatgagaa agaagatatt gggctacttc cccagcagc actgagccag gcagttctat
3121 cggaagacga gactctagga agtggaagtt tcgcatcaga tcaaaagctg ccatttaaac
3181 cctcggtttc acaaaatgca acacgggaat cccccaaaa aacaatagat gacatgcccc
3241 aattcaaacc aagaggcctt tctgatctg caacctgtt agaagaagaa aaggaagcca
3301 ttggagttgg gctatcttca tccaatgagg tctctgcagt ggaatgcgct ctccccccac
3361 aaaccactga gctgctttct gaaagccatg cccacctcc ctgggccatc tcatccgaac
3421 aagtggtcca atcagaagaa gggagcagag accagcagcg gggctcattc tctccacac
3481 cagagcttgg ccacacatct ctgcttctaa aggggtgcctc ctcaccaca ggtctatcag

3541 agcaagggca ggaagaggac aatattgggc ccctttcccc tgattctgca tttgcgtcag
3601 aattctcatt ctcacctat ccaactcagg aactagagaa gagagagctg gggcgggatt
3661 ctccactgtg cttaacgtcc ccctctgagc agactgttct gtctgaagag gacacggaag
3721 aggctgacct cttttctccg gattcagcat cacaggtgtc aatcccacca taccgaatcg
3781 cagaaacaga gcaaaacaag gttgagccag acgaattact acctacgagg tctgtccag
3841 actatcccta cttctcagag gcagatgaag aagaggcggg gtctcagtg gtcacgcttg
3901 tgcttgagca ttctgagcca tcgcaggagc gggaggagtc ttcccctgtg aggcctgtgt
3961 tcgaagatct gacctgcca ccttcggcag ataagaccgg ccaagcagaa actatgtcag
4021 atgtccaac aattcaacc tctgtatctg aatatctcat cctggcacgg caggcgaana
4081 ctacggcatc tttggagccc gaggetgaag atttggtacc accaccaacc agtggatggg
4141 agaagagaga tgcaagagt agtctgccag cagttacaat agcagcttcc tcttctgac
4201 tctcatcagt ggtaaaggaa gaaaccacat ccgttttccc cacctctcag ccctcagttt
4261 caccgagtc aacctgtgtg **cttaag**ccag agcaggagcc cacagcacct ctcactctaa
4321 caagtgcaga tgaacagatg gctttgcccc gagtcggaag ggaaaaagct gtgctggatt
4381 ctaagaagc gacagcacac aaatcgcagg atcagacacc agagcctcgg ctcccaaatg
4441 ttccagggtc tgggatgaaa tattcagttt tgtctgactt gggagatgag ccaagggcgg
4501 atgtcaaact caatttagct ccaactgtga cttctgaact agaacagaga atgtgtcaa
4561 agaatgagcc tgaagtggca aaaccacact cacctcaga ggaaacatct atttctggac
4621 ctaaggtttt atctgcagtg aaaacggaag tgaacagga gtccaaaata accagggaac
4681 ttctcgccgc ttcacggggg agagagaggg gagcggaaca cagtccacct gtgccacctg
4741 cacttccagc attgacggaa gagacgggga aagacacaga agccagctct tctgccacca
4801 cagtgccagt aactaagctt gattcaaatt caactaaatt aggcagggat gaagtctga
4861 cagatccatc tcttccagc cctgtggaac accaggctt aaagggataa gggaagagcg
4921 agttaggcag tggtttgcct ttgccagca tgtctgcctc agaggtgta aggcctgaac
4981 ccaaactcc gtcaactca ggggttgagg tagagagaga agacaacgag ccacctcat
5041 tgcaagtgc accacatcc aaaccacgg tgccaaatga caaacacgag gagataacaa
5101 ggtctctga ttctgaaat ttagtctcag atgatttagc tccaacatta ctggcctca
5161 gacatgagat gaacaggcaa gcagaggaga catcttctcc agtgccgggg agtttctgt
5221 caggagagca agagcttata aagctcccc cagagcctga gaagcacaaa cagttatcag
5281 aagtaccaac tgctgggtca gaactcattg atagtagaga tagagataga tccttagta
5341 tagaaccagt aaaaccatc ggaacggaac cagggccttc tatcttagaa aagggccccg
5401 ctgagctca gagaagagga aaagaacaag aagaaaacag gaagcttctt gtgctgctt
5461 cagctccatt agagactgct tcttttgacc tcccattga gcaaaaagag cctaaacgga
5521 cccttcatga gggccaagct gttgaggtgc ctgatgagag cagcttctt gcagataagc

5581 cagagctggg tgtaaaca tggcagaga agaaggagaa ttggagcaa cccaagccat
5641 ttgtgacaac tgagcgtgcc agtgttacag gatcaaaagt gaaagagagt ctcatttctc
5701 caaaggacaa catctggatg ctggaaaagc cagatggctt agtcaatcag catgaagata
5761 gaaaaccagg aactgggcag ctggagtctt ctgagagcac tgatctgatg tcagagaaac
5821 ttggggctgc ttcactggat acagatcaca catctgaaac cagaaacaa gaaacaagca
5881 aagcaccagt gtctggtgag aagctatctc aggaaccag aagggttcag tcaaaggctg
5941 tagatgattc tgaggaagg agaaagctag cctctggcaa cgtggaagta ctcacccaaa
6001 gtaaatctgt ccctgctgtg aaagcaaaag ccacacctca acctccagag accccagagg
6061 tgacacaaaa gccatctgag aagtcactcg tcaactgagca aggtcttctt gcagagaagg
6121 gaaagaaagg catttcatct tttaaatcat ggatgtctag ttattgttt ggatcaagca
6181 ttccagatag taaggtctct gacaacgaag atctagaaac tegtccaggt ccctctgtag
6241 agaaagcagt acctgccata gagcctaaag gtacagtcc tgctgaggtt aatatagccg
6301 agaagccagc ggttcattca ttacctgagg tcacagtaa actggctgag gagcccaag
6361 gcgttcagt taaatccagc ataagtcaag acctaaaga aaaactcaca ttttatcaa
6421 acgaagacgt ttaaagcaa cctaagtcta actctgaaaa ctatgggcag aaggaactgc
6481 caggcttctc agaaggaatg ggcgaaagct tagctacttc agttggtgac aaacatcctg
6541 gaattcatcc ttgtccct atgggtgaga aagtgggtat ggaagaagcc caaaacatgg
6601 ctctcttca tattactgag agccaaagac gccagaagcc agaggtctct cctccgtcta
6661 tgtggaatat ttctgcactg aaggaagac caagcagtga tcacaaggaa acatggtctt
6721 cgtcatctga cgtagtagat agaatgccac agaagccaa atcagcccag tccgcctca
6781 caaggatgaa ctcagaggaa ccagcatcaa tgattctgcc agtggaatca aaaggcagtt
6841 taagtgatct tgggaagac agacttagac aagaaatgcc aaaaccact tcttggaaac
6901 attgtgaaga ggaagtggaa cgtccaacag aggagaagga tggctgggaa actagatcat
6961 ttccttggc agggaagagg ggcctggcag agaagcaaga aatcatggct cccttggaaac
7021 tcagggaaaa tgaagcagta ggagagttgc aaaggatgcc ggaatctcga ccttcaaat
7081 tggagaate aaaagctgct gagaggcttg aacagcgcac ctctccaact gaaaagctca
7141 tggaaaacc cagcaagact cttgcttgg ataggagaga aaaggaagt caggaatggg
7201 tattttcaga aggagagaag caagaatacc ccctgcagc catgcctgtg cctggagcat
7261 cagctgttc ttggataag gctcaaccac attgctggc taaaccaaca ccagttgtt
7321 aaaaaccaga acatatagtc acagaggtat acccagaaat tagggagaga aaggcagcag
7381 aaaccaacc acatcccag gaagaaggta aaactttagt agagaaaacc aaggttccc
7441 gtgtggagtc tcccatgga gaggaaacgg atggccattc tcttactcag gaaggaaatc
7501 tggagttgga aaagtcaggt gagagtagag tggatctcaa agaggaaagg aggcggttcg
7561 tgatcccga gttgccctt ggtgcttcag tggctgcgga agatggaagt gtgcagccaa

7621 gaccctatc taaggatgct gctagggcat cagacatgac tgatgaaaca aagcatttag
7681 gaacgccgcc aactcagccg tcagctgtag aaccacaaac tctgtttta ggaacttctg
7741 tagaacatgc agtgaagaaa caagaaacat ggtcagacag gcccacagtc cacactttcc
7801 agacatctaa agacgacaca gaagagatgc tgaacagtc tgttcttatt tcaaagcatc
7861 acttggaagc tgtggaagat gtgcacagaa acgaaccgcc ctcttcagca gcaagtaact
7921 atgctcagtt tatgcttagt gcatcagaga tcagtgctga tggagttcct cctatgggag
7981 gcacagccca ggagcctgaa ggcacctctg tgaagatga agaattttca gtaaccagca
8041 agccagctgg cctttcagaa gatcagaaga gtgcctttag catcatttct gaaggctgcg
8101 agatattgaa tatccatgcc cctgccttca tcccttcagt ggatcaggaa gaaagtgaac
8161 aatgcaaga taagttacag tatttgggaag agaaagcttc atttaaaagc atatctgttc
8221 atgatgagaa gaaggccgct gcttccata aaacacagaa gagcaagtta gaagttcctg
8281 ataggaaaat tacatcactg aaggaaaaca agacaaagga aactcataag acaaaggagg
8341 agatagccac agactcagga atgggtgatt tcacacctat ccaaccaca gtttctggtg
8401 aagaggatta tttgaaaaa tatactttga ttgattataa cctctccca ggctcaggaa
8461 aacagaaatc aactgttgag gaatctcag aggaagccac caaaactg acttctttcc
8521 cagaaagttc agctgaacag gccttagacc atgaatataa cttagtaaag ttagacgaga
8581 gcttttacgg gccagaaaag gacgatagca aattatctca tgcagagatg caaaagtctt
8641 tggctatcca aaaaccagat gacagaaatg ctcaaaggg tatcagtaga gatgtggact
8701 ccaggtctcc tgggatgect ttatttgatg tggaggaagg agttctatca aaaagacaaa
8761 tatttccac caccccaag gctgtcaacc ctgagctgct agaggagccc ccagcacttt
8821 ccttcttcta taaggatctg tatgaagggg cgtgtgggga gaaaaatgaa ggcgaaacag
8881 ctcagaagg tgacagtgtg gactctgaga catcattccc aaggcgacat tctgacactg
8941 atgatggacc aggtatgtat tttgagaagt acatactcaa agacgacatt cttcatgacg
9001 aatctgtaac tcaagaagat caaggccaag gcctggaaga aaagccagtt ggtgaagagg
9061 attcacagca actgagagtt gcagaaagag agatccggag aaagcctgaa **actagtttt**
9121 gggagaaaaa tctggaagaa cagcaciaaag ttgttgccg ggaaggagaa cccacaggcc
9181 acatggagac cttgatgag gcggaatgc agcagaaagc tcccattaca gagcaagtea
9241 gagcagtcac ccagaagatg agctatgcag ttccattcca ggacaccgc tgtgttctgg
9301 agagtgagcc aagcagccag ggtaatgagg caggaaatgc aagtccagat gtcaatctga
9361 atgtcccgct acaagtgtct ttcccagaag aagaatctgc agcaggtgcc acctatgctc
9421 ctgaagtatt gcaagagagg ctggtcccat ctgtgtccc ggaagagagg ctccacaata
9481 ccctgtgca ggatgagtat gactttgtt gctctctgaa tcaggaagca gccagtcaag
9541 ccactttacc agaagagcca gggtcagaat cctcaccaa agaagtgtta tctcaaggat
9601 cagaatcctt tgagcacatc agggaacagg agctcacgag tgagggggaa ccaagaatgt

9661 ctgcttcaca ggaagtgtgg gacaggacag aagaccaatc agcaagagaa tcagtgaccg
9721 ctaagacaca aaaggaaccg aaaaagactc aggctgaatc ttactgtctac acctgcaaaa
9781 gcctgtgtctc tgaatggac aaggcactgg acattcacia agaccacgag gtttcagcac
9841 tcgacacggc tataagtgtc gtaaggttc aattaggaga atttcttgag aacctacaag
9901 aaaaatcctt gaggattgaa gcttttgtta gtgagattga atcctttttt aataccattg
9961 aggaaaagtg tagcaaaaat gagaaacgac tggaaatgca gaacgaggaa atgatgaaga
10021 gggttttggc gcagtatgat gagaaagcac agagcttcga ggaagtgaag aagaagaaga
10081 tggagttcct gcatgaccag atggtccact tctgcagag catggacacg gctaaggaca
10141 ccctagagac tattgtgaga gaggcggagg agcttgacga gacagttttc ctggcttctc
10201 ttgaggaaat caatgaaagg ctgctgtctg ccatggagag cacagcttcc ttagagaaca
10261 tgctgcccgc gttctcactt ttcgaacact acgatgacag ctccggcgcga agtgaccaga
10321 tgttgaaca agtggctgtt ccacagctc ccagactaga accccaggaa ccaagctctg
10381 ctaccagcac aacaattgca gtgtactgga gctgtaaca ggaggatgtt gtggactcat
10441 tccaggtata ctgtgtagag ggcctcagg atgatcaaga aataaatgaa ctggtagaag
10501 aatatagatt aacagtgaag gaaagttgct gcatatttga agacttagaa cccgatcgt
10561 gttaccaagt gtgggtgatg gctgtcaact tcaccggatg tagcctgcc agtgaagag
10621 caatttttag gacagcaccg tccacacctg tgattcatgt agaagactgt actgtgtgtt
10681 ggaacactgc cactgtcaga tggcggcctg ccaaccggga ggccaccgag acctacactc
10741 tggagtactg cagacagcac tctctgagg gcgagggcct gagatcttcc tctggaatta
10801 aaggacacca gctcaagggt aacctcctc ccaacgacaa ttacttctc tatgtgagag
10861 ccaccaatgc ctctgggacg agtgaacaga gtgaagctgc cctcatctcc accagaggaa
10921 ctgattcct cttattgaga gaaacagctc accagctct ccagatctcc gcgaacggga
10981 cggatgatcag ctctctgag aggagacggc tgacggagat ccctcagtg ctgggtgagg
11041 agctgcctgc ctgcggccag cactactggg aaaccaccgt cgcagacagt ccagcctatc
11101 gactcggcat ctgcaccagc tcagctgtga gggctgtgtc cctgggacaa ggggagacct
11161 catggtacat gactgtctc gagccacaga gatacacatt tttctacagt ggcattgtga
11221 gtgaggtgca cgcaaccgag cgtccagcca gactgggcat tctgtggac tataccaacc
11281 agagacttct gttataaac gccgagagtg gacagctgct ctctcatctg aggcacaggt
11341 tcaacgaggg cgtgcatccc gcctttgcct tggagaagcc tgggagatgt actctgcacc
11401 tgggetttaga gccccagac tctgtcaggc acaagtgatc ctgggcattc agagtttacc
11461 agaatatgag caagagttgg ggtcagacc tatcattctg tctctcaggc aatgtgcatt
11521 atttagatag tctccacac acctgactg acgggagctc cgggtgccgc agtcagcatg
11581 agagcagagc cagggacccc gtgcctcatg gagcagtgtg tgagtggagg ggccgaaaca
11641 cagccttcc ccttggttca cagttggagt tgttctcaa agtcaaagga ttatacttg

11701 acctgaacca aaccccgaga aaaggactgt gtctgctctg ttggtcgaat tccccagtgg
11761 ctaagtcaga ggggggggag atgtgtccct ggcacacctc ttactaaggg acgtcgactt
11821 tttcacaag aaaatgtcac cttacttcac tagaggataa tgaaccctag tcattagagg
11881 aaatgttta gctgatctaa attfacaatg aattcttta ttatcacatg tgctgtagaa
11941 tgtaagcctc tcttctctga aagttaaag gtagaaaagt aatagatatc agagatttcc
12001 atttgttaa ataatggct agcatcttat aaaataaaaa aaaaaaaaaa

Σημείωση: Με κόκκινο πλαίσιο επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα
AflII: 4281/4285bp **c/ttaag** και SpeI:9111/9115 **a/ctagt** που χρησιμοποιήθηκαν για
την κατασκευή του φορέα στόχευσης της TIGRE σειράς.

1.2 Ανάλυση για πέψη με ένζυμα περιορισμού του mRNA της myospryn

- Πίνακας με τα ένζυμα που δε διαθέτουν θέσεις περιορισμού στο mRNA της myospryn.

Enzymes that don't cut

myospryn mouse 12050

Number of cuts =

#	Enzyme	Specificity
1	AclI	AA [∞] CG [∞] IT
2	AfiI	AGC [∞] GCT
3	AgeI	A [∞] CCGG [∞] T
4	AscI	GG [∞] CGCG [∞] CC
5	AseI	AT [∞] TA [∞] AT
6	AsaSI	GCG [∞] AT [∞] CGC
7	BamHI	G [∞] GATC [∞] C
8	BmgBI	CAC [∞] GTC
9	BsiWI	C [∞] GTAC [∞] G
10	BsrGI	T [∞] GTAC [∞] A
11	DraIII	CAC [∞] NNN [∞] GTG
12	FseI	GG [∞] CCGG [∞] CC
13	KasI	G [∞] GCGC [∞] C
14	MhlI	A [∞] CGCG [∞] T
15	NaeI	GCC [∞] GCC
16	NarI	GG [∞] CG [∞] CC
17	NdeI	CA [∞] TA [∞] TG
18	NgoMIV	G [∞] CCGG [∞] C
19	NotI	GC [∞] GGCC [∞] GC
20	NruI	TCG [∞] CGA
21	NsiI	A [∞] TGCA [∞] T
22	PacI	TTA [∞] AT [∞] TAA
23	PaeR7I	C [∞] TCGA [∞] G
24	PhiII	G [∞] GCGC [∞] C
25	PmeI	GTTT [∞] AAAC
26	PmlI	CAC [∞] GTG
27	PspXI	VC [∞] TCGA [∞] GB
28	RsrII	CG [∞] GWC [∞] CG
29	SbfI	CC [∞] TGCA [∞] GG
30	SfiI	GGCCN [∞] NNN [∞] NGGCC
31	SfoI	GCC [∞] GCC
32	SgrAI	CR [∞] CCGG [∞] YG
33	SnaBI	TAC [∞] GTA
34	XhoI	C [∞] TCGA [∞] G

- Πίνακας με τα ένζυμα που διαθέτουν 1 θέση περιορισμού στο mRNA της *myospryn*.

Single cutters

myospryn mouse 12050

Number of cuts = Sort order:

#	Enzyme	Specificity	Sites & flanks	Cut positions (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	AatII	G ₁ ACGT ₁ C	list	*11814/11810
2	AflII	C ₁ TAA ₁ G	list	4281/4285
3	AhdI	GACNN ₁ N ₁ NNGTC	list	8702/8701
4	AvrII	C ₁ CTAG ₁ G	list	257/261
5	BciVI	GTATCC (N) ₅ N ₁ [*]	list	5831/5830
6	BglI	GCCN ₁ NNN ₁ NGGC	list	140/137
7	BsaAI	YAC ₁ GTR	list	*6678
8	BspDI	AT ₁ CG ₁ AT	list	*#10556/10558
9	BsrFI	R ₁ CCGG ₁ Y	list	*3996/4000
10	BssHII	G ₁ CGCG ₁ C	list	*114/118
11	BstEII	G ₁ GTNAC ₁ C	list	3003/3008
12	ClaI	AT ₁ CG ₁ AT	list	*#10556/10558
13	CspCI	₁ NN ₁ (N) ₁₁ CAA(N) ₅ GTGG(N) ₁₀ ₁ NN ₁ [*]	list	5020/5018+5055/5053
14	EagI	C ₁ GGCC ₁ G	list	*337/341
15	FspI	TGC ₁ GCA	list	*2980
16	HaeII	R ₁ GCGC ₁ Y	list	*1551/1547
17	HpaI	GTT ₁ AAC	list	10820
18	PciI	A ₁ CAIG ₁ T	list	11926/11930
19	PshAI	GACNN ₁ NNGTC	list	3130
20	PvuI	CG ₁ AT ₁ CG	list	*10556/10554
21	SacII	CC ₁ GC ₁ GG	list	*140/138
22	SalI	G ₁ TCGA ₁ C	list	*11813/11817
23	SexAI	A ₁ CCWGG ₁ T	list	#8948/8953
24	SmaI	CCC ₁ GGG	list	*9459
25	SpeI	A ₁ CTAG ₁ T	list	9111/9115
26	Swal	ATTI ₁ AAAT	list	1204
27	TspMI	C ₁ CCGG ₁ G	list	*9457/9461
28	XmaI	C ₁ CCGG ₁ G	list	*9457/9461
29	ZraI	GAC ₁ GTC	list	*11812

2. TOPO XL φορέας

INVITROGEN TOPO® XL PCR Cloning Kit

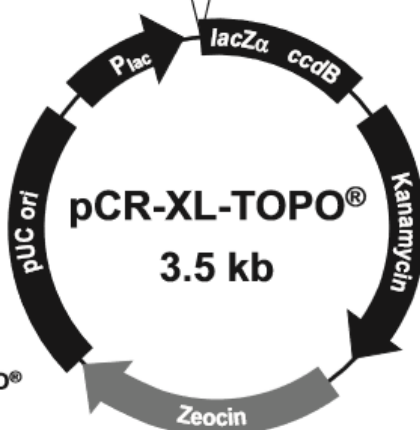
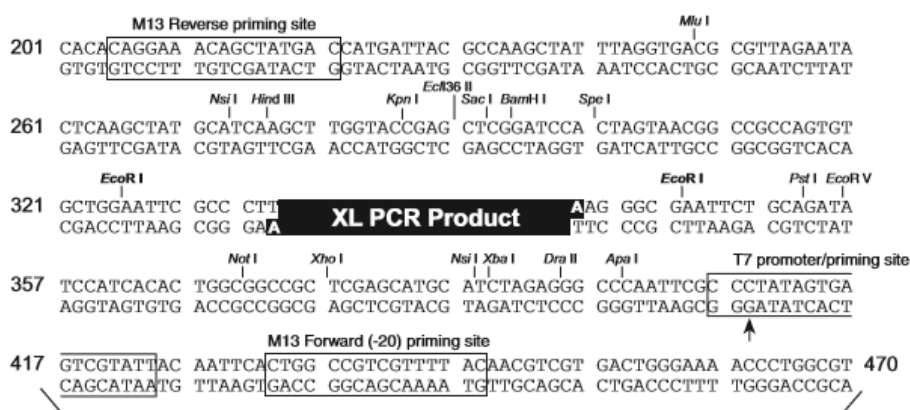
Five-minute cloning of long (3–10 kb) PCR products

Catalog numbers K4700-10, K4700-20, K4750-10, K4750-20, K7030-20

Publication part number 25-0199

Revision date 9 March 2012

2.1 Χάρτης TOPO XL φορέα



Comments for pCR-XL-TOPO® 3519 nucleotides

Lac promoter/operator region: bases 95-216

M13 Reverse priming site: bases 205-221

Lac Za ORF: bases 217-576

Multiple Cloning Site: bases 248-399

TOPO® Cloning site: bases 336-337

T7 promoter priming site: bases 406-425

M13 Forward (-20) priming site: bases 433-448

Fusion joint: bases 577-585

ccdB lethal gene ORF: bases 586-888

Kanamycin resistance ORF: bases 1237-2031

Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612

pUC origin: bases 2680-3393

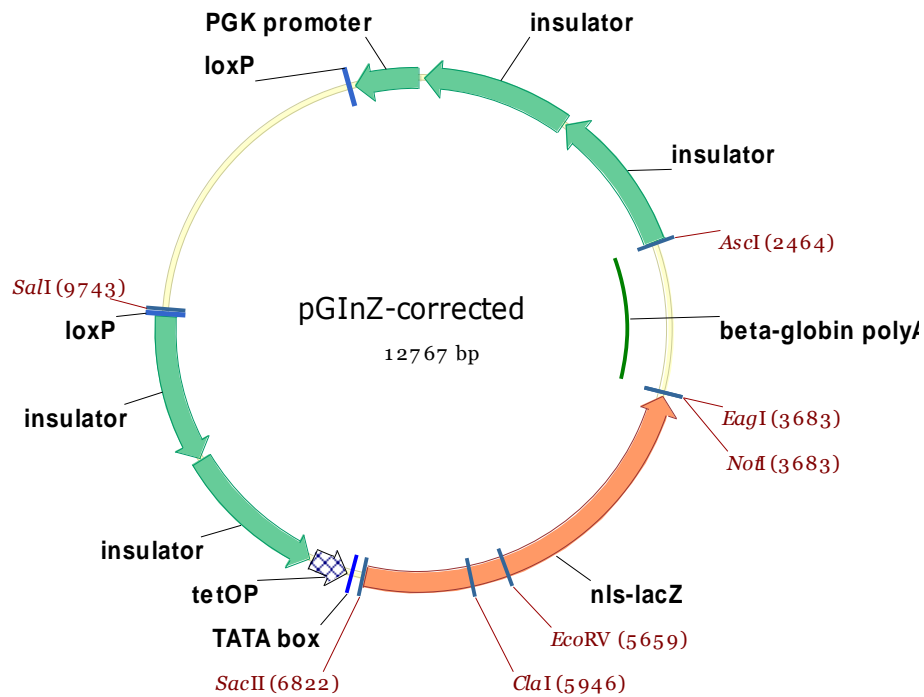
2.2 Αλληλουχία TOPO XL φορέα

AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTC
CCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCT
ATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCG
AGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAAGGGCGAATTCAGAGATATCCA
TCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCTGATTACAATTCA
CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACAT
CCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTA
TACGTACGGCAGTTAAGGTTTACACCTATAAAAAGAGAGACCGGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGT
GATATTATTGACACGCCGGGGGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTACAGATAAAGTC
TCCCGTGAACTTTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGT
GTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGACATCAAAAACGCCATT
AACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTC
ACGTAGAAAAGCCAGTCCGCAGAAAACGGTGTGACCCCCGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGG
GAAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAAGCAGGTAGCTTGCAAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTT
TTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTA
AACTGGATGGCTTTCTCGCCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGA
GGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTC
GGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTTCGGCTGTACAGCGAGGGGCGC
CCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCG
TGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG
CTATTGGGCGAAGTGCAGGGGACAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAAGTATCCATCATG
GCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAAACATCGC
ATCGAGCGAGCACGTAAGTCCGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCAT
GGCGATGCCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGCTG
GGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
GCTGACCGCTTCCCTCGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTT
GACGAGTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGT
ATTTACACCCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAA
TACATTCAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGAGGAGGG
CCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCTTCCGGTGTCAACCGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTGAGTTCT
GGACCGACCGGCTCGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGA
CCCTGTTATCAGCGCGGTCCAGGACAGGTGGTGGCGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCC
TGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCCGAGGTCGTGTCCACGAACTTCGGGACGCCTCCGGGCGGCCATGA
CCGAGATCGGCGAGACCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACCTCG
TGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT
TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA
TCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTAC
CAGCGGTGGTTTTGTTTCCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACAGCGC
AGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA
CATACCTCGTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCT
TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
GAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTTGCCACCTTACTGACTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT
CGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTGGGCTTTTGTGCGC
CTTTTGTCTACATGTTCTTCCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGGAAGCGGGAAG

3. pGlnZ φορέας

(Ευγενική χορηγία Δρ. Δ. Βασιλάτη)

3.1 Χάρτης pGlnZ φορέα



Host organism: DH5A

Cloned genes: lacZ

Promoters: PGK, tetO

Antibiotic resistance: Amp

Comments: contains loxP site

3.2 Αλληλουχία pGlnZ φορέα (12.767bp)

AATTCGAGCTCGCTAGAGCCCCATCCTCACTGACTCCGTCCTGGAGTTGGATGAGAGATAATGGCCTTACGTTGTG
CCAGGGGAGGGTCTGGGCTGGATTTAGCAAGATTTACCTTCTCCAAAGAGCGGTGCTGCAGTGGCACAGCTGCCCA
CGGAGGTGGGGGGTACCCTGCCCTGGAGGTGATGAAGAAGTGTGGGGATGTGGCACTGAGGGACATGGCCAGT
GGGCACGGTGGGTGGGTGGGGTTGGTCTTGGGGATCTTGGAGGGCTTTTCCAGCCTTCATGATTTGACGATTGTA
TGAACATCTACATGGCAATTCTCCAGCTGCCTGTCCCAGTCCACTGACCCAGCTGTATCTCTCCAGGCAAGCTCT
TCCACCCCTTCTGCTTGCATCCAGACACCATCAAACATGCAGGCTCAGACACAGGGACCAGCAGTGTCTGTGGCC
TTTTGTGCTCCTCTCCATGCTGGGTTTTAACTTGCTCTTTGTCCTTCTATCCTATCTTCTTATCCTTAAGGCTGTCT
GAACGCTGTGACTTGGAGAGTGTCCCAGAGCCCTCAACACCTGCATGTCCCACGTCCATGCTGTCTCTGCACTTCT
TATCCCAAGATCTGCCTCTCCGTGATGCACTGAATTGGCAAACATGTGTACCCCAAGACCAACAATGTCACAGC
AAACTCCCCCTTGATAGGACAAGGGGGAATGGCTTTACTGAGACAGGGGAGGTTTGGGTTGGATATGAGGAG
GCAGTTTTTCCCCAGAGGGTGGTGACGCACTGAACAGGTTGCCAAGGAGGCTGTGGATGCCCATCCCTGCAG
GCATCAAGGCCAGGCTGGATGTGGCTCTGGGCAGCCTGGGCTGTGGTTGATGACCTGCACATAGCAGGGGGT
TGGATCTGGATGAGCACTGTGCTCCTTTGCAACCCAGGCCGTTCTATGATTCTGTCAATTCTAAATCTCTTTTACG
CTAAAGCTTTTTCCCCGTATCCCCCAGGTGTCTGCAGGCTCAAAGAGCAGCGAGAAGCGTTCAGAGGAAAGCGA
TCCCGTGCCACCTTCCCCGTGCCCGGGCTGTCCCCGCACGTGCCGGCTCGGGGATGCGGGGGGAGCGCCGACC
GGAGCGGAGCCCCGGGCGCTCGCTGTGCCCCCTAGCGGGGAGGGACGTAATTACATCCCTGGGGGCTTTGGG
GGGGGCTGTCCCCGTAATCGAGCTCGGTACCCATTCTCACTGACTCCGTCCTGGAGTTGGATGAGAGATAATGG
CCTTACGTTGTGCCAGGGGAGGGTCCGGCTGGATTTAGCAAGATTTACCTTCTCCAAAGAGCGGTGCTGCAGTGG
CACAGCTGCCACGGAGGTGGGGGGTACCCTGCCCTGGAGGTGATGAAGAAGTGTGGGGATGTGGCACTGAGG
GACATGGCCAGTGGGCACGGTGGGTGGGTGGGGTTGGTCTTGGGGATCTTGGAGGGCTTTTCCAGCCTTCATGA
TTTGACGATTGTATGAACATCTACATGGCAATTCTCCAGCTGCCTGTCCCAGTCCACTGACCCAGCTGTATCTCTC
CAGGCAAGCTCTTCCACCCCTTCTGCTTGCATCCAGACACCATCAAACATGCAGGCTCAGACACAGGGACCAGCA
GTGTCTGTGGCCTTTTTGTGCTCCTCTCCATGTGGGTTTTAACTTGCTCTTTGTCCTTCTATCCTATCTTCTATCCT
TAAGGCTGTTCTGAACGCTGTGACTTGGAGAGTGTCCCAGAGCCCTCAACACCTGCATGTCCCACGTCCATGCTGT
CCTGCACTTCTTATCCCAAGATCTGCCTCTCCGTGATGCACTGAATTGGCAAACATGTGTACCCCAAGACCAAC
AATGTCACAGCAAACCTCCCCCTTGATAGGACAAGGGGGAATGGCTTTACTGAGACAGGGGAGGTTTGGGTTGG
ATATGAGGAGGCAGTTTTTCCCCAGAGGGTGGTGACGCACTGAACAGGTTGCCAAGGAGGCTGTGGATGCCCA
ATCCCTGCAGGCATTCAAGGCCAGGCTGGATGTGGCTCTGGGCAGCCTGGGCTGTGGTTGATGACCTGCACAT
AGCAGGGGGTGGATCTGGATGAGCACTGTGCTCCTTTGCAACCCAGGCCGTTCTATGATTCTGTCAATTCTAAATC
TCTCTTACAGCTAAAGCTTTTTCCCCGTATCCCCCAGGTGTCTGCAGGCTCAAAGAGCAGCGAGAAGCGTTCAG
AGGAAAGCGATCCCGTGCCACCTTCCCCGTGCCCGGGCTGTCCCCGCACGTGCCGGCTCGGGGATGCGGGGGGA
GCGCCGACCGGAGCGGAGCCCCGGGCGCTCGCTGTGCCCCCTAGCGGGGAGGGACGTAATTACATCCCTG
GGGGCTTTGGGGGGGGCTGTCCCTTAGGGGTACCCGGGGATCCGGCGCGCCAGCTTGATTCAATTAATGCAGTC
GAGTTCATAAGAGAAGAGGGACAGCTATGACTGGGAGTAGTCAGGAGAGGAGGAAAAATCTGGCTAGTAAAC
ATGTAAGGAAAATTTTAGGGATGTTAAAGAAAAAATAACACAAAAAATAAAAAAATCTAACCTCAAG
TCAAGGCTTTTCTATGGAATAAGGAATGGACAGCAGGGGGCTGTTTCATATACTGATGACCTCTTTATAGCCACCT
TTGTTTATGGCAGCCAGCATATGGCATAATGTTGCCAAACTCTAAACCAAATACTCATTCTGATGTTTTAAATGATT
TGCCCTCCCATATGTCTTCCGAGTGAGAGACAAAAAATCCACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTT
TATTACCCAGAAATCAGATGCTCAAGGGGCTTCATGATGTCCCATAATTTTTGGCAGAGGGAAAAAGATCTCAG
TGGTATTTGTGAGCCAGGGCATTGGCCACACCAGCCACCACCTTCTGATAGGCAGCCTGCACCTGAGGAGTGAAT
TCTTTGCCAAAATGATGAGACAGCACAACAACCAGCAGTGTGCCAGGAGCTGTAGGAAAAAGAAGAAGGCATG
AACATGGTTAGCAGAGGGGCCCGTTTGGACTCAGAGTATTTATCCTCATCTCAAACAGTGTATATCATTGTAAC
CATAAAGAGAAAGGCAGGATGATTACCAGGATGTAGTTGTTTCTACCAATAAGAATATTTCCACGCCAGCCAGAA
TTTATATGCAGAAAATATTCTACCTTATCATTAAATTATAACAATTGTTCTCTAAAACCTGTGCTGAAGTACAATATA
ATTACCTGATTGCCTTGAAAAAAAAGTGATTAGAGAAAAGTACTTACAATCTGACAAATAAACGAAAGTGAATTT
AAAAATTCGTTACAAATGCAAGCTAAAAGTTTAAACGAAAAAAGTTACAGAAAATGAAAAGAAAAAAGAGGAGAC
AATGGTTGTCAACAGAGTAGAAAAGTAAAAGAAAACAAAATTATCATGAGGGTCCATGGTGATACAAGGGACATCT
TCCCATCTAAAACAACACCCTGAAAACCTTGGCCCCCTCCATATAACATGAATTTTTCAATAGCGAAAAAGAAAAGA

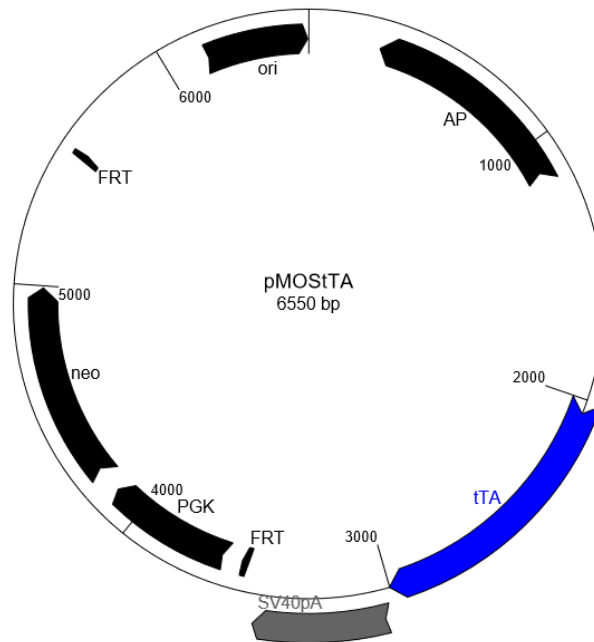
ACAATCAAGGGTCCCCAACTCACCTGAAGTTCTCAGTCTAGAGGATCCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCC
GCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAACACGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGG
TTACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCTCCACCGTACACGCCACTCGACCCGGGTACCGAGCTCGACTTTC
ACTTTTCTCTACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCG
ACTTTCACTTTTCTCTACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTA
AACTCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGGGA
GTGGTAAACTCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGAGGATCCTCTAGAGCCCCATCCT
CACTGACTCCGTCTGGAGTTGGATGAGAGATAATGGCCTTACGTTGTGCCAGGGGAGGGTGGGCTGGATTTAGC
AAGATTTACCTTCTCCAAAGAGCGGTGCTGCAGTGGCACAGCTGCCACGGAGGTGGGGGGTACCCTGCCCTGG
AGGTGATGAAGAACTGTGGGGATGTGGCACTGAGGGACATGGCCAGTGGGCACGGTGGGTGGGTGGGGTTGGGT
TTGGGGATCTTGAGGGCTTTCCAGCCTTCATGATTTGACGATTGTATGAACATCTACATGGCAATTCTCCAGCTGC
CTGTCCCAGTCTACTGACCCAGCTGTATCTCTCCAGGCAAGCTCTCCACCCCTTCTGCTTGCATCCAGACACCAT
CAAACATGCAGGCTCAGACACAGGGACCAGCAGTGTCTGTGGCCTTTTTGTGCTCCTCTCCATGCTGGGTTTTAAC
TTGCTCTTTGCTCTCTATCCTATCTTCTTATCCTTAAAGCTGTTCTGAACGCTGTGACTTGGAGAGTGTCCCAGAGC
CCTCAACACCTGCATGTCCCAGTCCATGCTGTCTGCCTTATCCCCAAGATCTGCCTCTCCGTGATGCACTG
AATTGGCAAACATGTGTACCCCCAGACCAACAATGTACAGCAAACCTCCCCCTTGATAGGACAAGGGGGAATGGC
TTTACTGAGACAGGGGAGGTTTGGGTGGATATGAGGAGGCAGTTTTTCCCCAGAGGGTGGTGACGCACTGA
ACAGGTTGCCAAGGAGGCTGTGGATGCCCCATCCCTGCAGGCATTCAAGGCCAGGCTGGATGTGGCTCTGGGCA
GCCTGGGCTGCTGGTTGATGACCCTGCACATAGCAGGGGGTGGATCTGGATGAGCACTGTGCTCCTTTGCAACCC
AGGCCGTTCTATGATTTCTGTCATCTAAATCTCTTTTACGCTAAAGCTTTTTCCCCGTATCCCCCAGGTGTCTGC
AGGCTCAAAGAGCAGCGAGAAGCGTTCAGAGGAAAGCGATCCCGTGCCACCTTCCCCGTGCCGGGCTGTCCCCG
CACGCTGCCGGTCTGGGGATGCGGGGGAGCGCCGACCGGAGCGGAGCCCCGGGGGGTCTGCTGTGCCCT
AGCGGGGAGGGACGTAATTACATCCCTGGGGCTTTGGGGGGGGCTGTCCCCGTGAGCTTCTAGAAGCTCACT
GACTCCGTCTGGAGTTGGATGAGAGATAATGGCCTTACGTTGTGCCAGGGGAGGGTGGGCTGGATTTAGCAAGA
TTTACCTTCTCAAAGAGCGGTGCTGCAGTGGCACAGCTGCCACGGAGGTGGGGGGTACCCTGCCCTGGAGGT
GATGAAGAACTGTGGGGATGTGGCACTGAGGGACATGGCCAGTGGGCACGGTGGGTGGGTGGGGTTGGGTCTTGG
GGATCTTGGAGGGCTTTTCCAGCCTTCATGATTTGACGATTGTATGAACATCTACATGGCAATTCTCCAGCTGCCTGT
CCCAGTCTACTGACCCAGCTGTATCTCTCCAGGCAAGCTTCCACCCCTTCTGCTTGCATCCAGACACCATCAA
CATGCAGGCTCAGACACAGGGACCAGCAGTGTCTGTGGCCTTTTTGTGCTCCTCTCCATGCTGGGTTTTAACTTGT
CTTTGCTCTTCTATCCTATCTTCTTATCCTTAAAGCTGTTCTGAACGCTGTGACTTGGAGAGTGTCCAGAGCCCTCA
ACACTGCATGTCCACGTCCATGCTGTCTGCCTTATCCCCAAGATCTGCCTCTCCGTGATGCACTGAATTG
GCAAACATGTGTACCCCAGACCAACAATGTACAGCAAACCTCCCCCTTGATAGGACAAGGGGGAATGGCTTACA
CTGAGACAGGGGAGGTTTGGGTGGATATGAGGAGGCAGTTTTTCCCCAGAGGGTGGTGACGCACTGAACAGGT
TGCCAAAGGAGGCTGTGGATGCCCCATCCCTGCAGGCATTCAAGGCCAGGCTGGATGTGGCTCTGGGACGCTGG
GCTGCTGGTTGATGACCCTGCACATAGCAGGGGGTGGATCTGGATGAGCACTGTGCTCCTTTGCAACCCAGGCCG
TTCTATGATTCTGTCATTCTAAATCTCTTTTACGCTAAAGCTTTTTCCCCGTATCCCCCAGGTGTCTGCAGGCTCA
AAGAGCAGCGAGAAGCGTTCAGAGGAAAGCGATCCCGTGCCACCTTCCCCGTGCCGGGCTGTCCCCGACGCTG
CCGGCTCGGGGATGCGGGGGAGCGCCGACCGGAGCGGAGCCCCGGGGGGTCTGCTGTGCCCTAGCGGGG
GAGGGACGTAATTACATCCCTGGGGCTTTGGGGGGGGCTGTCCCTCTAGAGTCGAGATAACTTCGTATAATGTAT
GCTATACGAAGTTATGTGAGGTCGACAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAAGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC
TGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCAACCGCGGGGAGAGGGGTTT
GCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGCTGCGGGAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCC
AGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
ACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAA
GCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACTGTCCGCTTTTCTCCCTCGGGAAGCGTG
GCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGTGTGTGCACGA
ACCCCCGTTACGCCCAGCGTGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTAT
CGCCACTGGCAGCAGCCTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGT
GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAA

AAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATT
ACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAAC
TCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTT
AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCG
ATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT
GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAACCAGCCAGCCG
GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG
AGTAAGTAGTTCCGACGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGT
TTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGGCAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACT
GCATAATCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
AAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGAT
GTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGA
AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTA
TTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGT
TCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAG
GCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGTGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAG
ACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGG
TGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGC
ACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTAGCATATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATTCC
CATGGCGGCTGCAGGTCGAAAGGCCCGAGATGAGGAAGAGGAGAACAGCGCGGCAGACGTGCGCTTTTGAAGC
GTGCAGAATGCCGGCCTCCGGAGGACCTTCGGGCGCCCGCCCGCCCTGAGCCGCCCCCTGAGCCGCCCCCG
GACCCACCCCTTCCAGCCTCTGAGCCAGAAAGCGAAGGAGCAAAGCTGCTATTGGCCGCTGCCCCAAAGGCCT
ACCCGCTTCCATTGCTCAGCGGTGCTGTCCATCTGCACGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCATTTGTCACGTCCT
GCACGACGCGAGCTGCGGGGCGGGGGGAACTTCTGACTAGGGGAGGAGTAGAAGGTGGCGGAAGGGGCCAC
CAAGAACCGGAGCCGGTTGGCGCCTACCGGTGGATGTGGAATGTGTGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGCGCC
AAGTGCCAGCGGGGTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTGGGAAAAGCGCCTCCCTACCCGGTAG

4. ρMOStTA φορέας

(Ευγενική χορηγία Δρ. Δ. Βασιλάτη)

4.1 Χάρτης ρMOStTA φορέα



Name	From	To	Length	Type	Strand direction
tTA	1985	2985	1001	Gene	Leading
<small>GENE</small>					
AP	283	1143	861	Misc. Feature	Complement
neo	4177	4977	801	Misc. Feature	Leading
PGK	3594	4108	515	Misc. Feature	Leading
SV40pA	3001	3458	458	Terminator	Leading
<small>TERMINATOR</small>					
ori	6130	6549	420	Misc. Feature	Leading
FRT	5494	5527	34	Misc. Feature	Leading
FRT	3503	3536	34	Misc. Feature	Leading

2 6550 bp DNA circular This sequence has been entered manually. COUNT

4.2 Αλληλουχία pMOStTA φορέα (6.550bp)

TACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG
TGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTAAATT
AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAATATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG
AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGAT
ACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC
AGCAATAAACAGCCAGCCGCGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTAT
TAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTACCATTACTACAGGC
ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGAT
CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCTCGGCTCCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGT
ATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATA
ATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTGGGGCGAAAACTCTCAAGGA
TCTTACCCTATTGAGATCCAGTTCCGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGAAATGTT
GAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGATGCCACCTGAAATTTAAAC
GTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGAA
AAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTAT
TGAGGAACGTGAACTCCAGCGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCA
CCCTAATCAAGTTTTTGGGGTGCAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGA
GCTTGACGGGAAAGCCGGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGC
TGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACCCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCCC
ATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA
AAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGCG
CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCATTACCCGGATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCCGGGACCGA
TCCAGCCTCCGCGGCCCGAATTCATATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGC
TTAATGAGGTCCGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAACCTCGCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGT
ATTGGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACT
TTTGCCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAG
TCATCGCGATGGAGCAAAAAGTACATTTAGGTACACGGCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATT
AGCCTTTTTATGCCAACAAAGTTTTTCACTAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTA
GGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCC
GCCATTATACGACAAGCTATCGAATTTATTGATACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTTCGGCCTTGAATTG
ATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTTAAATGTGAAAGTGGGTCCGCGTACAGCCGCGCGGTACGAAAAACAA
TTACGGGTCTACCATCGAGGGCTGCTCGATCTCCCGGACGACGACCCCCGAAGAGGCGGGGCTGGCGGCTCC
GCGCCTGTCTTTCTCCCCGCGGGACACACGCGCAGACTGTGACGGCCCCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGA
CGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTCCGATCTGGACATGTT
GGGGGACGCCCGGTCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAG
TTTGAGCAGATGTTTACCGATGCCCTTGGAAATTGACGAGTACGGTGGGTAGGGGGCGCGAGGATCCAGACATGAT
AAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAAGTGAATAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGA
TGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTC
AGGTTACGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATC
CTGCAAGCCTCGTCTGTGGCCGGACACGCTATCTGTGCAAGGTCCCCGGACGCGCGCTCCATGAGCAGAGCGC
CCGCCCGGAGGCAAGACTCGGGCGGGCGCCTGCCCGTCCACCAGGTCAACAGGCGGTAACCGGCCCTTTCATC
GGGAATGCGCGGACCTTCAGCATCGCCGGCATGTCCCTGGCGGACGGGAAGTATCAGCTCGACCAAGCTTGGC
GAGATTTTACAGGAGCTAGGTAAGCGTTAATATCGAATTCGAAGTTCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCA
GGTCTGAAGAGGAGTTTACGTCCAGCCAAGCTAGCTTGGCTGCAGGTCTGCAAAATTCTACCGGGTAGGGGAGGC

GCTTTTCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTG
GCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTTCT
ACTCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAAATGGAAGTAGCA
CGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGCGAGCGGCCAA
TAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGTGGGTCCGGGGCGGGCTCAGGGGCGGG
CTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCGGCATTCTGCACGTTCAAAGCGCACGTCTGCC
GCGCTGTTCTCTCTTCCTCATCTCCGGGCTTTCGACCTGCAGCCTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATC
GGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGGATCGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGG
TTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGC
CGTGTTCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTG
CAGGACGAGGCAGCGCGGTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACT
GAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCC
GAGAAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCAC
CAAGCGAAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGA
AGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG
TCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGG
CCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGA
ATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG
ACGAGTTCTTCTGAGGGGATCGATCCGCTGTAAGTCTGCAGAAAATTGATGATCTATTAACAATAAAGATGTCCA
CTAAAATGGAAGTTTTCTCTGTCATACTTTGTTAAGAAGGGTGAGAACAGAGTACCTACATTTTGAATGGAAGGA
TTGGAGCTACGGGGTGGGGTGGGGTGGGATTAGAATAAATGCCTGCTCTTACTGAAGGCTCTTACTATTGCT
TTATGATAATGTTTCATAGTTGGATATCATAATTTAAACAAGCAAAACCAAATTAAGGGCCAGCTCATTCTCCCA
CTCATGATCTATAGATCTATAGATCTCTCGTGGGATCATTTGTTTTCTTGTGATTCCCACTTTGTGGTTCTAAGTAC
TGTGGTTTTCAAATGTGTGCTAGTTTCATAGCCTGAAGAACGAGATCAGCAGCCTCTGTTCCACATACACTTCATTCT
CAGGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCATCAGAAGCTGACTCTAGCTAGCNCGTAGAAGTTCCTATTCCGAAG
TTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACTTCACCNGGTACCAAAGGCCGCAAAACGTACGAAAAGTCGACAACCTA
AGGCCTTGACTAGATCCATATGACTAGTAGATCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCCCTATAGTGA
GTCGTATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
CGCTCACTGCCCCGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGA
GGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAG
CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
GCAAAACCGCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT
GACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTT
CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGATAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGG
CTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTAC
AGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC

5. Αποσιωποιητής της μεταγραφής (transcriptional terminator)

(Ευγενική χορηγία NJ. Proudfoot)

DEFINITION: Human beta globin region on chromosome 11

LOCUS: HUMHBB 758 bp DNA linear PRI 16-OCT-2008

ACCESSION GenBank: U01317

REGION: 64572..65329

5.1 Αλληλουχία του αποσιωποιητή της μεταγραφής (758bp)

```
1 agtgttacca tcaaccacct taacttcatt ttcttattc aatacctagg taggtagatg
61 ctgattctg gaaataaaat atgagtctca agtggcctt gtcctctctc ccagtcaaat
121 tctgaatcta gttggcaaga ttctgaaatc aaggcatata atcagtaata agtgatgata
181 gaagggtata tagaagaatt ttattatatg agagggtgaa acctaaaatg aaatgaaatc
241 agaccctgt cttacacat aaacaaaaat aaatttgaat gggtaaaga attaaactaa
301 gacctaaaac cataaaaatt ttaaagaaa tcaaaagaag aaaattctaa tattcatggt
361 gcagccgttt ttgaattg atatgagaag caaaggcaac aaaaggaaaa ataaagaagt
421 gaggctacat caaactaaaa aatttcaca caaaaaagaa aacaatgaac aaatgaaagg
481 tgaacctga aatggcatat ttgcaaacca aatatttctt aaatatttg gtaatatcc
541 aaaatatata agaaacacag atgattcaat aacaacaaa aaattaaata taggaaaata
601 aaaaattaa aaagaagaaa atcctgcat ttatgcgaga attgatgaac ctggaggatg
661 taaaactaag aaaaataagc ctgacacaaa aagacaaata ctacacaacc ttgctcatat
721 gtgaaacata aaaaagtcac tctcatggaa acagacag
```


6. 2A ιϊκά πεπτίδια (viral 2A sequences)

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το 2A πεπτίδιο του ιού των εντόμων *Thosea asigna* virus (TaV) (Trichas G et al. 2008; Tang W et al. 2009).



Να σημειωθεί ότι η αλληλουχία των 2A ιϊκών πεπτιδίων παρεμβλήθηκε της 3ARM περιοχή ομολογίας της myospryn και του tTA.

6.1 Αλληλουχία 2A ιϊκών πεπτιδίων

**GGA GAG GGC AGA GGA AGT CTG CTA ACA TGC GGT GAC GTC GAG
GAG AAT CCT▼GGC CCA GCA CCG GGA TCC**

Σημειώνεται με μαύρο βέλος το σημείο υδρόλυσης του εστερικού δεσμού μεταξύ της γλυκίνης (Gly) και της τελευταίας προλίνης (Pro). Τα αμινοξικά κατάλοιπα -APGS, σημειώνονται με κόκκινο χρώμα- προστέθηκαν στην καρβοξυτελική περιοχή του 2A πεπτιδίου για τη δημιουργία ενός πιο σταθερού περιβάλλοντος για την επαναλαμβανόμενη επεξεργασία στο σημείο που πραγματοποιείται το κόψιμο.

7. Φορέας στόχευσης της knock out σειράς

Αλληλουχία του φορέα στόχευσης της knock out σειράς

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTC
CCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTACTCATTAGGCACCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAAGCT
ATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCG
AGCTCG GATCC

GAGTAGGACGTGTCCCCATAACACCTCGGAGAGAAGGGCCCTGTGTCTACCCTGGTCGGAGAGAACGTTATGAAG
TCCTCGTATCCACCGTGGACGACGTCTAAGAAGAAGACCCTTTCTGaGAACATGCCCTGTAAAGTCTAACTGTAGA
CCTGAACGTAAGGACGGAGTAATGGGACCGACGAACCGAGTGAGAGGCTTGTGTGCGCCACAGGACCTTACC
TTGACGTATCGAGTAGAAGACCCACTGACGAGACTGAACGAGACATTACCCTCGAAAAGACGACGTAACGGCGGA
GTAGTTCCCAGAGGTACACCGGACACCCAAAGAGGAAGGGCCGGTTGTTGAAAACACGACAAGAAGGTCTAAAAAG
AGGGTTTTTGTATCAAAGTCCGAAAGAGGaCTAGAGAGAAAAGACGTTGAGAGTCAACGACACTTAGGAGAAGTGG
TTGACCGAAAAGAAGGTCCGGAACCGGAAGTAAAGAACTCAATGTCaAAGCAGTACTTCTTACAGCAGAAACTC
ATACATGAAGAGTTTTATGTATGGACCAGGTAGTAGTCACAGTCTTACAGCGGAACCCCTTACTACAGAGTCTCAG
GTGTGACAGTGGAAGACTTCGACAAAAGCGGAAGTAAAAAGAGGGGTGgCGGGGAAGTATGTCTAGGAATATCT
TCTTCCTTTCACGACCCCGAGGAGATCGTCGAGTCCCAACTGTTCGGAACCCCCACCACCTTTATAAACAGAAA
AACTATCTTGAGGAAGGAGGTGTAGTTATTTCCGTAGGGTCTCTGGACCTCAGGTGTAGAGATGACTATGGGA
AACCTCGTAAAGACAGTAGACCAAAAACTATCGGTTTCTGAAAACGTAGAGACGTACTCTATTAACGATAGIA
GGAAAAGACCGGtATTTTCGAGAGCAGATTGAAATGATTCAATATAAGTACCAGATCCCGGACAAGTCGACTTG
AAAGACCCTTTCTCAGTCACAAAACCACCGAAGGAGACTTCTAAGGAGTTGTCAACTAAAGACAAAAGGACTCG
GACCCCTCTCCAATATTAGTTAGTTTCATATAAAAAGTTTTATTAGGAGAAGTGGTCTTTGACACCCAACCTATCC
ACACTTTAGTGGGTAAGGACTCAGACACCGATAGAGGAGGAAAACAGAACTCAAAGGAAAACAGAgtAAAAAGGA
AGTCACTACATTAAGGATAGTCTTGAAGATTGAACGAGAAGACgCAAAATACCCTTCGTCGaCGGAAGAAGA
GTAGTACTTGTCTATACGAAAATTTACTTCGAAAAGAGAAGGTTTTATGACATTGAATAGAACGTAAACAAGTGAAA
GAAGGACTAGGTGACTTCCCTACTTCCGTCCCGTACCTATAAGTTATAGAGCGTCGGAAGTCTTTACTACGATTI
CCGTGAGAAGACTAGAAGACTTTCCGGTGCACCGAACGACCAATGACTTTTAAGAAGTAGAAAAGTGTCTCCACGG
AAGTCCGAGGACCCGACCGGAGGGTATCCTCCTTGAGGTAGTCGTGACTAGAGACTACGTGATTCGTATTTGAC
TCaTATCAATGAACGACGACTTCTCCCGCAAGCAAAGACACGTGTAGAAGGTGTCAAGGTTCACTACGAAACT
TTATCTTGTCTGACAAAGTCGTAGAGAAGgCACaICAGAAATCTACAGACCTTTCACACCTGACACCCGGACAGA
CTGGTACAAAAGAACAAGAAGTGACaTACAAGATGTCTTCAAGGATTTTGTCTCAAACACCAAGATGTGACTG
CCGACTCAACCGCCGCAAGGATTTACGAAAACAAGTAGTCAGTACAGACTAiGGGATCGTCGTAGGAATCTATCC
CCAGAACCGACGTGTGAAGGTAGAAGGCGTCGGTGACTTCGTGGTTCCTGTTGAGCCCGTAGTGCTTGGCGGAG
GAAAGGAGAAACTCTAGGTGAGATGAGAGTGGACTGAAAAGGTTGAGGTCTAAAGGAAGGACTCATTCTCTTAC
CGGTAGGCAAAGGAGAGGTACCCCTCTGAGGTGTGCCCTTTGGAACCAAAGAGATGATTTCAAAATGGAAGAA
GGACCCCTACACCAACCCAAAAGACGACGGAAGAGAGGGATTAAGACCCATATGGAGACACTGATATACAAGA
CCAAAAAGTTGTGACCACAACCAATCGGTCGTTACACCAACTCGGAATAGGTTTCTTTGTGACTACGAGGTC
CGTGTCCGTACCGACGTCCCCCATAAGAACGAAGAGAGGAAGACTTTTATGGGTAAGGACGTGAAGGAAAAGA
GAGGATAGGTTTCGTTCTCAGAACGACCCAAAAGGTAAGTCTGAAAAGTCAACCTCTCTACCGCACAAGTTCGGAG
AGTCGTGAAAACCTAAGAAGGTTAAACTTTCCAGCTCTAAGGCCGTAGGAAAACGTTGAGAGGATGACGAAGTAA
AAGGGACTCAAGGTTCCCTCGTACTAAAGAACGAAGAGACGGTCCGGGGAGAAGGGACGGTTCCTTTACTAG
ATCAAAGGGTCCGTAGGAAAGAGGAGACAACCTGCAAGGTGAAGGAGAAGTGTACAAGGTTTCTTACCCAAAA
CCGTAAAGAACAGATTCAGACAGAAGTGGTTCTAGTGAATTTGACGGAAAACCTAAGGTGACCGTCTTAGTAACCTA
CGACCAAGGAGACTCAAGTAGGAACACTTCCGCCTGACCCGACTAAACCCGAAGACACCGTAAGATAGATGATG
CAGTCTACTGCTCTCGGTACAAAAGAACACTAGTGACGAACCGAGAAGGAATGCACGTCTTTATAAGGTGTATCT
GCCTCTCTCTGGAGACCGAAGACCGCAGAAAACCGAGAGTCAATTATACTTCTCTCGGTACAAAACCCGAAGAAG
GTATGGGTGAAAGAGTGGGTATCCCTTGTTCTACTTAAGGTCTACAAAACAGTGGTTGACTTCAATCGATTGAA

AGCGGGTAAGGAAGACTCTTCGGACCGTCAAGGAAGACGGGTATCAAAGTCTCAATCTGAATCCAACGAAATT
TTGCAGAAGCAAACATTTTTACTCTCAAAAAGAAATTCAGAAGTGAATACGACCTAAATTGACTTTGCGGAAA
CCCAGAGAGcCGGTCAAATTGACACTGGAGTCCATTACTTACTTGGCGACCGAAGAGCCGATATAATTGGAGTCCG
TCCTTGACATGGAAATCCGAGATACCGTCCATGACGAAAGAGATGTCTCCCTGGACCTGTCTCAAAGATCTAGAAG
CAACAGTCTCTGGAATGATAGACCTTACGAACTAGGTTTGTATTGATCTGTAGGTAATAATTTCTACTTTAC
GGAAAAGAAAGGGAAGAGACGTCTTCTGGAAACGAGTCACTGCTCACTGAAGAGTCTACCGAAAAACACAGTGGAG
ACCCAGAGACCTCAAACCTCACACCGAAAACGAAAGTGTCTGCTTAAATGAAACCCACTCATGAAGGTG
CAACGGTCTCCGATCGAAAGAGGGAAGGAGTCTTAGTAGATGTCGGAAACTGACTTGGGAAGACCCAAGGACTC
TATCGAAGAGTGGTCTGTGACCACGAAACGAAACAAAGAACCAAAAGACCAAAAGTCTACACACTAGACATAGGTCA
CcTCGTCGGGGTTCAAAGAGACTGTAGTCTAGTACGAGAGTCTCCTGAGGTGACGGGTCAAGGACCAAAAGAT
AGAAGTACGACTAACTGATTCGGTAGACCGAAAAGGTCTGAGGTCAACAACAGGAAACCTCTTACTCTGAGAGA
AAGTGAACACTAGGACATTGTGACCGTGCAGTCAACAGTGTACCGAACCAACGAGGTTTAAAGAGGAAGAA
GAGACGGTTAACAAATTTGGGGTGCAGACCGAATAGACGTCTTCTCGACGAGAGTAGTCCGTGGAGTTGTGCAAC
CGGGAGTACTTCCCAGGCAAATCCGAGAAAAACGAGTTACCCCTCCAGTTTCTTCTCGTACAGAGATTACCTCGACTC
CGTCCGTGCTCTCGAAGGACAAAAGAAGAACAAGAAAAGGAGAAGAGACTTCGAGTGCCTCCCGGAAAAGATT
CTATCTTCCGGGACCAAGGCAAGGCTACCCAAAATGACCAAGATATGGATTCTTAGATAGAGATAGAGATGATA
GTTACTCAAGACTGGGTGCTCAACCATGAAGACTATTGACAAAACGAAAGTCCGAGACCCCCCTCGAAATATT
CGAGAACGAGAGGACTGTCTTTGAGGGGCCGTGACCTCTTCTACAGAGGAGACGAACGGACAAGTAGAGTACA
GACTcCCGGTCATTACAACCTCGATTTAGTAGACTTTGATgTAAAAGTCTTAGTCCTCTGGAACAATAGAGGAGCA
CAAACAGTAAACCGTGGCACCCAAACCTACACCCACTGTGAACGTTACCTCCACCGAGCAACAGAAGAGAGAGA
TGGAGTTGGGGACTCAACTGTCCTTCAAACCCAAGTCCGGAATTGTGGAGACTCcTCTGTACGACCCGTTCCGT
TTGGTGACGGATTGAGCGAGAAGGGATgAGGGAAATTCGGACCCACAAGGTGTCCGACCGTTCTTACCTAGAC
AGTCTGAAGTAGGGACGGATTAATCAACTTAACTTAGTTCGAATCAATGACCGTGACACCACCGTCTTCTCG
ACCGAAGACACAGAAAGGGGtAGAGAAGGtAGTTACGACCTTACGTCCACCacGTCCACCTGACACAAGaCGAGG
GGAGAGAGAGGGGCTACTTCGGCGTCTTCAAGGGACCAATAAACCTGAGGACAAAGTGAAGGCAAAAGTGAC
GTCTATTTTGAATCCAGGTCTTATCTACAAAGGAGACCTCCACTCACACCAAAACGGTGAAGTCCGAGTAAGA
AACTGTTGTAAGAGACAAGATCAAGTCTTCAAGTGTCAACCTCGA

GC GGCCGC

TGTCGATACTGGTACTAATGCGGTTTCGAGATTATGCTGAGTGATATCCCTTTCGAACGTACGGACGTCCAGTGAG
ATCTCCTAGATGATCAGTATACCTAGATCAGTTCGGGAATTCAACAGCTGAAAGCATGCAAACCGGCCGGAACC
ATGNNCACTTCAAGGATATGAAAGATCTCTTATCCTTGAAGCCTTATCCTTGAAGATGCNCCGATCGATCTCAGT
CGAAGACTACCTAATCTTGAACCGTTTTGTTATGGACTCTTACTTCACATACACCTTGTCTCCGACGACTAGAGC
AAGAAGTCCGATACTTTGACTGTGTAACCTTTGGTGTGATGAATCTTGGTGTTCACCCTTAGTCTCTTTTGT
ACTAGGGTGTCTCTAGATATCTAGATATCTAGTACTACCCTCCTTACTCGACCGGAATTAACCAAAAACGAAC
AAATTTAATACTAATAAgacagacaaggtactctactgaaaaatacaaggtatactctgtccaacacataaacaagaaacacagtcgaataaaaaaatca
aaatgtaggaggccaagtagttaagacgtattaccgtcctaaaagaagaaataaaaaataaaaggataaaaataaaaaacaataacttagtagacacaagaatataaa
acctataattggtttataaattttataaaccagtttatacggtaaaagtaccaagtggaagtaacaagaataaaacacaccttaaaaaatcaactacatcggagtgaa
gaaataaaaaggaaacaacggaacgaagatagtttaagttttgcccagctgtactataatctaaagaagaaactaaagaaattttaaaaataccaaatccagaatcaaat
agaaattggtaagtttaataaaaaacaataaccacattctgtcccagactaaagtaaaatcaaaagtgaggagatatttttaagaagatatgggaagatagtagtaaat
gactaafatacgaactaaagcttagaacggtgatcaagcttaactgacctctctctgtctgtgaactctgagtataaaataaaggcttagatcgtagatggatgatcataact
tattcttttactcaattccaccaactaccattgtgTTAGGGCGCCGTTACTAGGTTGATACTTTGTAATAGTATTTTCGTTATCATTCTC
GGAAGTCATTTCTCGTCCGTAATAAGATTAGGGTGGGGTGGGGGCATCGAGGTTAGGAAGGTAAGTTT
TACATCCATGAGACAAGAGTGGGAAGAATTGTTTACTACTGTCCTTTTTGAAGGTAAAATCACCTGTAGAAATAA
CAAATTATCTAGTAGTTAAAGACGTCTGAATGTCGCTAGCTAGGGGAGTCTTCTTGAGCAGTCTTCCGCTATCT
TCCGCTACGCGACGCTTAGCCCTCGCCGCTATGGCATTTCGTGCTCCTTCGCCAGTCCGGTAAAGCGGGGTTCCGAG
AAGTCGTTATAGTGCCATCGGTTGCGATACAGGACTATCGCCAGGCGGTGTGGGTGCGCCGGTGTGAGTACTT
AGGTCTTTTCGCCGGTAAAAGGTGGTACTATAAGCCGTTTCGTCCGTAGCGGTACCCAGTGTCTGCTCTAGGAGCGG
CAGCCCGTACGCGCGAACTCGGACCGCTGTCAAGCCGACCGCTCGGGGACTACGAGAAGCAGGTCTAGTA
GGACTAGCTGTTCTGGCCGAAGGTAGGCTCATGCACGAGCGAGTACGCTACAAAAGCAACCACAGCTTACCCG

TCCATCGGCCTAGTTTCGCATACGTCGGCGGCCTAACGTAGTCGGTACTACCTATGAAAGAGCCGTCCTCGTTCCAC
TCTACTGTCTCTAGGACGGGGCCGTGAAGCGGGTTATCGTCGGTCAGGGAAGGGCGAAGTCACTGTTGCAGCTC
GTGTGCAGCGGTTCTTTCGGGGCAGCACCGGTCGGTGTATCGGCGCGACGGAGCAGGACGTC AAGTAAGTCCCG
TGGCCTGTCCAGCCAGAAGTGTTTTTCTTGGCCCCGGGGACGCGACTGTGCGCCTTGTGCCGCCGTAGTCTCGTC
GGCTAACAGACAACACGGGTCAGTATCGGCTTATCGGAGAGGTGGGTTCCGCCGGCTCTTGGACGCACGTTAGGT
AGAACAAGTTACCGGCTAGGGTACCAAATCAAGGAGTGGAACAGCATAATATGATACGGCTATATGATACGGCT
ACTAATTAACAGTTGTCCGACGTCCAGCTTCCGGGCTCTACTCCTTCTCTCTTGTGCGGCCGTCTGCACGCGAA
AACTTCGCACGTCTTACGGCCCGGAGGCTCCTGGAAGCCCGGGGCGGGGCGGGGACTCGGGCGGGGACTCGG
GCGGGGGCTGGGTGGGGAAGGGTCGGAGACTCGGGTCTTTCGCTTCTCTCGTTTCGACGATAACCGGCGACGGGG
TTTCCGGATGGGCGAAGGTAACGAGTCGCCACGACAGGTAGACGTGCTCTGATCACTCTGCACGATGAAGGTA
CAGTGCAGGACGTGCTGCGCTCGACGCCCGCCCCCTTGAAGGACTGATCCCTCCTCATCTTCCACCGCGCTT
CCCCGGTGGTTTCTTGCCTCGGCCAACC CGGATGGCCACCTACACCTTACACACGCTCCGGTCTCCGGTGAACAC
ATCGCGGTTACGGGTCGCCCGACGATTTCCGCTACGAGGTCTGACGGAACCCCTTTTCGCGGAGGGGATGGGCC
ATCTTAAAGCTGCTGGACGTCCGTTTCGATCGAACCGACCTGCATTGAGGAGAAGTCTGGACTTCAAGGATATGA
AAGATCTCTTATCCTTGAAGCCTTAAGCTATAATTGCGAATGGATCCGAGGACTTTTAGAGCGGTTCAAGCAGCT
CGACTATGAAGGGCAGGCGGTCCCCTGTACGGCCGCTACGACTTCCAGCGCGCGTAAGGGCTACTTCTCCGGCCA
ATGGCGGACAAGTGGACCACCTGCCCGTCCCGCGGGGCTCAGAACGGAGCCCGCCCGGAGACGAGTAC
CTCGCGCGCAGGCCCTGGAACGTGTCTATCGCACAGGCCGGTCTGCTGCTCCGAACGTCTTAGTATTAGTCGGT
ATGGTGTAACATCTCCAAAATGAACGAAATTTTTGGAGGGTGTGGAGGGGACTTGGACTTTGTATTTTACTTA
CGTTAAACAACA AATGAACAAATAACGTCGAATATTACCAATGTTTATTTTCGTTATCGTAGTGTAAAGTGT
TATTTTCGTA AAAAAAGTGACGTAAGATCAACACCAAACAGTTTGTAGTAGTTACATAGAATAGTACAGACCTAGG
AGCGCGGGGATGGGTGGCATGAGCAGTTAAGGTTCCCGTAGCCATTTGTAGACGAGTTTGTAGCTTACGCCGTA
TAGGTCTCGCGCATCCCCCGCTCAGCACCCCATTTAGGGCTGGGCCCGCAGGGGGTTGTACAGGTCTAGC
TTTAGCAGATCGCGCAGCCGTACGCGGTAGCGGTGCAGGAGCGGCAGATTCACCTCGAGCAGGGGGTCCGACTGT
AGCCAGCCCCCGCAGCTGTCAGACGCGCACACAGGGCGCCCTCTTCTGTCCGCGCTCGGCGGTGGGG
CGGAGAAGCCCCCGCAGCAGCAGGCCCTTAGCTCGTCCGGGAGCTACCATCTGGGCATTAACAAAAAGCATGC
GCGCGCCGACATGCGCCTGGGTGAAAGTGAAATTCACAAAAAGATTAGGCGTATACTAGTTAAGTTCGGGCT
ATTCTTCCGACCGAGACGTGGAACCACTAGTTTATTAAGCTATCGAACAGCATTATTACCGCCGTATGATAGTCAT
CATCCACAAAGGGAAAGAAGAAATCGCTGAACTACGAGAAGTGAAGGTTATGCGTTGGATTTCAATTTACGGGG
TGTCGCGACTCACGTATATTACGTAAGAGATCACTTTTTGGAACAACCGTATTTTCCGATTAACATAAAGCTCTC
AAAGTATGACAAAAAGACATCCGGCACATGGATTTACATGAAAACGAGGTAGCGCTACTGAATCATTTCGTGTAG
ATTTTGA AATCGCAATAATGCATTTTTTAGAACGGTCGAAAGGGGAAGATTCCCGTTTTCACTCATAACACGGA
TAGATTGTAGAGTTACCGATTCCGCAGCTCGTTTCGGGCGAATAAAAAATGTACGGTTATGTTACATCCGACGAG
ATGTGGATCGAAGACCCGCTCAAATGCCCAACAATTTGGAAGCTAAGGCTGGAGTAATTCGTGAGATTACGCGA
CAATTAGTGA AATGAAATAGATTAGATCTGTACCTAGGGCCACGACCCGGTCTTAAGAGGAGCTGCAGTGGCGT
ACAATCGTCTGAAGGAGACGGGAGAGG

CTCGAG

gataccactgttatgctcattaatataatataatcattatttttaataataataatctgttcatttacattttatacttcagtcagtagtagtgagggttacacccactataatattttcaaa
ttttcaatttttagctatagtcacgtcattcttggggtccggtcttaacaggtcatcggtcgaattcggctctcttcgactttaagtaaaagtgaggaaggataagaccaacgggagga
ccagaggggcacaaggggtcagtcctccgagggaagagagtggtcctggtgtacactgggaccgtagacacgagaaacaaggggtcctcctggggttgatcgatccaaaacacc
tgggtggtaggttagcgaagatagactggctcctggactgaggacggagaataaccggaccagaccgggaaagataaaaggaaggttagaccgaaaggggtcgtagggtaacgt
aaggagtacctctcttagagttattgagaagaatgaatgtttatcctgttaggaaccgaggttaaggaagactaaaataaagggttcagcagcagggggtgaggatgtcctaaaga
gaagattgatgtgacacacggggtctaccataaaccattgacacctggcgtatctggcgtaccagatcccttaatctcacctcgacaccgaaggaacacatcacagtgatca
gtagtattgtatgatcactaactactggaacactactacgctccttttagggatgacataaaggcaacgtattttcgtattgagtagttcgtgtatttcacatttacgaactattactac
acggtacaatgatacaatgatgtatgtaaatcaaacctgacgattactgecttttgacacctaactaagggtcttggatctctttcaataacatctgtatagggccgtaccataggt
cgacgacagaagagactcggagtgaatcgactaggtctgctggtatccgccaactggaatgtagattacactcatgtacgatgctacgagtgcttttaactagtgattggttagct
aaagaatctgtagcgggtatcaatcacatagagtagtagtataaagaccacgcaatattgtttcttcagtggtcagagagtagaaaggttagacatcttattctattat
aactatgtaatactcaactacctctcaatccatcatgtattgtcttacgattcttggtaggacctatataaccacgagttatttacgataaacggaacgtaaaaggtataggaaactga
actataatctgagcaaaagtcaccatgtgtgtaaacctcccgaaccggacaggggtgtacgggagactctgtctccgagtcaggggacgtacacggtagctgggtgagtcgca

gataccgtgagtgagagagtgagaagaacaaaaaaaaaggaaaaggagggaacaaaacgacaaggaaacttgacgaaggagggtgatgggtggagaacac
ggatagggtgagatagatagtagtccgtataaattctaaagacgacctgataagaccgactaaattcgtcgggtacaacataaccggtgacaagaattttgatcgcacataaattc
tgggtcctcagaaaagagatccttatattgatataaactccataaaattttgacgattaaccggataacatgagaaaaatgctgtctctttttttgatcccaattcacattataattcgt
ttcatgaaaaaaattttcttctgtatgttttaagtctcgggaataatcgaagttttgagtaacagagacgaagcttctgaccaagattcagacctatgaaattttggacgtcctcggaaat
tctttatgacgggtggtgggtacggagagacgggtggtgtgagaccataatgacaacctgtctgaaacctgaaacgatataaaaacgaaaatttcgcatccctcgaagttacacgtgtgc
ctcaactctcgggaacggactgtttggatggagacttgcacaactcgtgtgagtgctcgaacgaacgagactggggaaggaccatgggacgtgatcccgtcttgaatcacgata
ccgacacgatctgatgagacgattttagtcggaggacctcagatgacgtctcccacgtttagtcgttagggacctcagatgacgtctcccacgtttagtcgtggggacctcagatg
acgtctacacgggtcgaaaataaaggagtcacgggtgtgtcaccccgtagacggagaagggtcagatgacgtctttcattggttcaagacgtctgtcgaatccatttccctgaccttc
ttcggccctcttaagtacagagggaaggatcatcgaacggagaagaatgacaaaaccataatcgggtgacttgaatfaatccttagttaaaccagagatgacttaaggaaaaaaa
aggtttgagaaaatgatagataaattccaataaggagttttacaagttgagtagcagataaagaagagacggtaaatggtattcatcctacctaatttttttcttcaatagtggtttgtact
ctcaatcataaccttcggacactcgtcatcgtaatattttcgttaacttttaagttaactcgaagaataactaacatttaagtcacatgagttcgtc

CTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCA

CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACAT
CCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTA
TACGTACGGCAGTTAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGACCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGT
GATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGTCTGATGATAAAGTC
TCCCGTGAACTTTACCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGT
GTGCCGCTCCTCGTTATCGGGGAAGAAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGACATCAAAAACGCCATT
AACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTTC
ACGTAGAAAAGCCAGTCCGCAGAAAACGGTGTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGG
GAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTT
TTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTA
AACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGA
GGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGTGAGAGGCTATTC
GGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGC
CCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCG
TGGCTGGCCACGACGGGCTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGGCTG
CTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGTCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATG
GCTGATGCAATCGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCACCACCAAGCGAAAACATCGC
ATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGG
CTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCAT
GGCGATGCCTGCTTGCCTGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTG
GGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
GCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTT
GACGAGTTCCTTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGT
ATTTACACCGCATAACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAA
TACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGAGGAGGG
CCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGTCTACCGCGCGCAGCTCGCCGGAGCGGTGCGAGTTCT
GGACCGACCGGCTCGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGA
CCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGGCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCC
TGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCCGAGGTCGTGTCACGAACTTCGGGACGCCTCCGGGCCGCCATGA
CCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGGCGGAGTTCCGCCCTGCGCACCCGGCCGCAACTGCGTGCACCTTCG
TGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT
TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAA
TCAAAGGATCTTCTTGAATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTAC
CAGCGGTGGTTTTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACAGCGC
AGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA
CATACCTCGTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGG
ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCT
TGGAGCGAACGACCTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG

GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT
CGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGC
CTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

Σημείωση: Με κυανό πλαίσιο επισημαίνεται η **5ARM** περιοχή ομολογίας της myospryn, με κίτρινο πλαίσιο επισημαίνεται η περιοχή της **κασέτας** (cassette) (έχει υπογραμμιστεί η αλληλουχία των 2A ιϊκών πεπτιδίων) και με γκρι πλαίσιο η **3ARM** περιοχή ομολογίας της myospryn.

Θ. Αναρτημένες Παρουσιάσεις

1. **Elsa Tsoupri**, Stella Tournaviti and Yassemi Capetanaki, 2011, Desmin deficiency is linked to abnormal β -adrenergic receptor signaling, 7th European Conference on Intermediate Filaments in Health and Diseases, Mykonos, Greece
2. **Elsa Tsoupri**, Stella Tournaviti and Yassemi Capetanaki, 2011, Potential role of desmin cytoskeletal network in β -adrenergic receptor signaling, Επιστημονική Διήμερη Συνάντηση στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), Αθήνα
3. **Elsa Tsoupri**, Stella Tournaviti and Yassemi Capetanaki, 2013, Desmin deficiency is linked to abnormal β -adrenergic receptor signaling, 2013, 64ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα
4. **Elsa Tsoupri**, Ismini Kloukina, Eleni Vasilaki, Constantinos H. Davos, Emilia Varela and Yassemi Capetanaki, 2015, Myospryn heterozygous mice display mitochondrial ultrastructural defects and impaired cardiac function, ASCB Annual Meeting in Cell Biology, San Diego, California, USA

I. Δημοσιεύσεις

1. **Tsoupri Elsa** and Capetanaki Yassemi, Myospryn: a multifunctional desmin-associated protein, *Histochem Cell Biol.* 2013 Jul;140(1):55-63
2. Antigoni Diokmetzidou, Mary Tsikitis, Sofia Nikouli, Ismini Kloukina, **Elsa Tsoupri**, Stamatis Papathanasiou, Stelios Psarras, Manolis Mavroidis and Yassemi Capetanaki, Strategies to Study Desmin in Cardiac Muscle and Culture Systems, *Methods Enzymol.* 2016;568:427-59
3. **Elsa Tsoupri**, Ioanna Kostavasili, Ismini Kloukina, Eleni Vasilaki, Aimilia Varela, Constantinos Davos and Yassemi Capetanaki. Impaired cardiac function and severe ultrastructural defects in myospryn deficient mice. (manuscript in preparation)