



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Διερεύνηση του ρόλου της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης στην
παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου»*

ΤΣΙΛΑΦΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ/ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ, ΝΟΣΗΛΕΥΤΗΣ, M.Sc.

2024

*«Διερεύνηση του ρόλου της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης στην
παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου»*

Creative Commons Αναφορά Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή (CC BY-NC-SA): Η άδεια αυτή επιτρέπει στον χρήστη να χρησιμοποιεί, μοιράζεται και δημιουργεί παράγωγα έργα επί του αδειοδοτούμενου περιεχομένου και να το διαμοιράζεται με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στον δημιουργό (π.χ. συγγραφέα), τον δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και τον φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Του επιτρέπει επίσης να μοιράζεται οποιοδήποτε νέο περιεχόμενο δημιουργεί με βάση το αδειοδοτημένο περιεχόμενο (π.χ. μια διασκευή ή μια μετάφραση) με την ίδια άδεια που έλαβε το αρχικό περιεχόμενο (δηλαδή την Creative Commons Αναφορά Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή). Τελευταία προϋπόθεση είναι να μη χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο ή τα δικά του παράγωγα δημιουργήματα για εμπορικούς σκοπούς.

Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Εμμανουήλ Μαυροειδής (επιβλέπων), Ερευνητής Γ΄ του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αλέξιος Βλάμης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών

Μέλη της Εφταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Εμμανουήλ Μαυροειδής (επιβλέπων), Ερευνητής Γ΄, Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Αικατερίνη Μούτου, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Μπαλατσός, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιορδάνης Μουρούζης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αλέξιος Βλάμης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μαρία Κοντού, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΣΙΛΑΦΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

*«Διερεύνηση του ρόλου της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης στην
παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου»*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, του Κέντρου Βασικής Έρευνας, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά πρώτα από όλους τον επιβλέποντά μου κ Μαυροειδή για την αμέριστη αρωγή, συμπαράσταση και εμπιστοσύνη του όλα αυτά τα χρόνια συνεργασίας μας που ήταν καθοριστικής σημασίας για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου. Για άλλη μια φορά είχα την ευκαιρία να βρίσκομαι στο συγκεκριμένο ερευνητικό εργαστήριο και να ανακαλύψω νέες εμπειρίες και γνώση.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ψαρρά, τον συνδετικό μου κρίκο με το Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την καθοδήγηση και συνδρομή της στην ολοκλήρωση της διατριβής, καθώς ήταν πάντα πρόθυμη να συντρέξει. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ Βλάμη για την αμεσότητα και τη στήριξή του.

Από τα μέλη του εργαστηρίου θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα την κα Κωσταβασίλη Ιωάννα, την τεχνικό του εργαστηρίου για την πολύτιμη καθημερινή προσφορά της και έπειτα την κα Κουκλίνα Ισμήνη για τη συμβολή της στα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, καθώς και τον συνεργάτη μας prof. dr. J.P. (Peter) van Tintelen από την Ολλανδία για την αρωγή του στην κατασκευή των απαραίτητων διαγονιδιακών ποντικών. Επιπλέον, ευχαριστώ την κα Βαρελά Αιμιλία για τη βοήθειά της στην υπερηχογραφία καρδιάς. Ταυτόχρονα, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου, αλλά και τον καθένα ξεχωριστά, για την καθημερινότητα και τις στιγμές που μοιραστήκαμε καθώς και για το γόνιμο κλίμα συνεργατικότητας.

Θερμές ευχαριστίες αποδίδω και στην οικογένειά μου, αλλά και στους φίλους και συνοδοιπόρους μου σε αυτό το εγχείρημα που ήταν παρόντες με τον τρόπο τους ακόμη και νοητά...

ΤΣΙΛΑΦΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, 2024, *Διερεύνηση του ρόλου της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Προκαταρτικές σελίδες: 5

Σελίδες διατριβής: 114

Εικόνες: 58

Πίνακες: 2

Γραφήματα: 10

Βιβλιογραφικές Παραπομπές: 177

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αρρυθμιογενής μυοκαρδιοπάθεια (ACM) είναι μια ηλεκτρική και δομική νόσος του μυοκαρδίου της δεξιάς ή/και αριστερής κοιλίας που χαρακτηρίζεται από κοιλιακές αρρυθμίες, καρδιακή ανεπάρκεια και αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Η δεσμίνη είναι μια μυο-ειδική πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροσκελετού, η οποία πέραν της δομικής υποστήριξης παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση ηλεκτρομηχανικών ερεθισμάτων. Η δομή της, όπως όλων των πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων, είναι τριμερής. Διαθέτει, δηλαδή, μια κεντρική α-ελικοειδή ραβδοειδή περιοχή, περικλειόμενη από τις μη-ελικοειδείς περιοχές, κεφαλή και ουρά. Η συχνότητα εμφάνισης μετάλλαξης στη δεσμίνη σε ασθενείς με ACM είναι περίπου 2%. Μία εκ των μεταλλάξεων, η S13F, εντοπίζεται στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης και έχει συσχετισθεί με δεσμινοπάθεια, περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια και αρρυθμιογενή μυοκαρδιοπάθεια δεξιάς κοιλίας. Ο δομικός ρόλος της κεφαλής, φαίνεται να έγκειται στη σωστή συναρμολόγηση και δημιουργία των τελικά σχηματιζόμενων ενδιάμεσων ινιδίων και κατ' επέκταση της δομικής οργάνωσης και λειτουργίας του ίδιου του μυοκαρδιοκυττάρου.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου, μέσω του χαρακτηρισμού του διαγονιδιακού ζωικού προτύπου που φέρει μόνο τη δεσμίνη με τη σημειακή μετάλλαξη S13F στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης και αποτελεί μοντέλο της ACM.

Πράγματι τα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}TgS13F φέρουν τα περισσότερα γνωρίσματα της αρρυθμιογενούς μυοκαρδιοπάθειας με επακόλουθη καρδιακή ανεπάρκεια, όπως διάταση και εκτεταμένη ίνωση, αποπτωτικό μυοκαρδιοκυτταρικό θάνατο, μειωμένο κλάσμα εξώθησης και καρδιακή δυσλειτουργία, καθώς και ποικίλες δομικές ανωμαλίες. Επίσης, παρατηρείται πρωτεολυτική διάσπαση της μεταλλαγμένης δεσμίνης S13F στην περιοχή κεφαλή και κυτταροπλασματική συσσώρευση της δεσμίνης, όπως έχει παρατηρηθεί και στους ασθενείς με την ίδια μετάλλαξη, αλλά και όχι μόνο. Οι διαταραχές του κυτταροσκελετικού δικτύου των ινιδίων δεσμίνης, καθώς και ότι η δεσμίνη χάνει τον εντοπισμό της από τους Z-δίσκους, με την επακόλουθη αποδιοργάνωση βασικών δομών του μυοκαρδιοκυττάρου (σαρκομερή, T-tubules και σαρκοπλασματικό δίκτυο, εμβόλιμοι δίσκοι) φαίνεται πως συμβάλουν στην εξέλιξη της desmin^{S13F} αρρυθμιογενούς μυοκαρδιοπάθειας, επηρεάζοντας τη συσταλτικότητα, τη συνοχή και τη μεταγωγή μηχανικών και ηλεκτρικών σημάτων. Επιπλέον, παρατηρούνται εκτεταμένες διαταραχές στα μιτοχόνδρια και δομικές μεταβολές στην πυρηνική μεμβράνη των μυοκαρδιοκυττάρων. Παράλληλα, με τη μέθοδο

GST pull-down υποδεικνύεται ότι η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων και των λυσοσωμάτων, τις NDUFS2 και saposinD αντίστοιχα και πιθανόν με αυτό τον τρόπο επιδρά στο επίπεδο της σωστής μεταφοράς των πρωτεϊνών και στη συγκρότηση των διαφόρων εμπλεκόμενων πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Ο περιορισμός της πρωτεολυτικής διάσπασης και της κυτταροπλασματικής συσσώρευσης της δεσμίνης λόγω της μετάλλαξης S13F ή του προτύπου φωσφορυλίωσης που μπορεί να επηρεάζεται, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους, εφόσον μελετηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός ανάπτυξης των επιβλαβών φαινομένων.

ABSTRACT

Arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) is an electrical and structural disease of the right and/ or left ventricular myocardium characterized by ventricular arrhythmias, heart failure and sudden death. Desmin is a muscle-specific intermediate filament protein of the cytoskeleton, which in addition to structural support plays a key role in the transmission of electromechanical signals. Its structure, like all intermediate filament proteins, is tripartite and consists of a central α -helical rod domain, surrounded by the non-helical domains, head and tail. The incidence of desmin mutation in ACM patients is approximately 2%. For example, one of the mutations, S13F, which is located in desmin head domain, has been associated with desminopathy, restrictive cardiomyopathy and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. The structural role of the head domain seems to lie on the correct assembly of the finally formed intermediate filaments and consequently at the structural integrity and function of the cardiomyocyte itself.

Therefore, the purpose of the present study is to investigate the role of desmin head domain in the pathophysiology of cardiomyocytes, through the characterization of a transgenic animal model that carries only the desmin with the S13F point mutation and it'll be used as a model of ACM.

Indeed, Des^{-/-}TgS13F transgenic mice bear most of the features of arrhythmogenic cardiomyopathy with subsequent heart failure, such as cardiac dilation and extended fibrosis, apoptotic cardiomyocyte death, reduced fraction shortening and generally various structural abnormalities. Moreover, we observed that desmin p.S13F cleaved at head domain and aggregates in cytoplasm, such as has been observed in patients with the same mutation. Disruptions of the cytoskeletal network of desmin filaments, as well as that desmin loses its localization from z-discs and also the subsequent disorganization of main cellular structures (like sarcomeres, T-tubules & sarcoplasmic reticulum, intercalated discs), all these seem to contribute to the progression of desmin^{S13F} arrhythmogenic cardiomyopathy, affecting contractility, myocardium coherence and electromechanical signal transduction. At the same time, we indicated by GST pull-down assay that the head domain of desmin is necessary for the interaction with NDUFS2, a mitochondrial protein, and with saposinD, a lysosomal protein. Perhaps in this way desmin participates to proper protein sorting and to the assembly of the various protein complexes involved.

The reduction of proteolytic cleavage and cytoplasmic aggregation of desmin due to S13F mutation or the possible affected phosphorylation pattern could be future therapeutic targets as long as we better understand the mechanisms of the development behind these deleterious effects.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	23
1.1 Ενδιάμεσα ινίδια	24
Δομή	24
1.2 Δεσμίνη.....	27
1.2.1 Ο ρόλος της δεσμίνης.....	30
Σαρκομερή.....	30
Κοσταμερή.....	31
Ζεύγος T-tubules και SR	32
Εμβόλιμοι δίσκοι	33
Πυρήνας	34
Μιτοχόνδρια.....	35
Λυσοσώματα	36
Απουσία δεσμίνης	36
1.2.2 Ο ρόλος της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης.....	37
Δομικός ρόλος	37
Η περιοχή ουρά	43
Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	43
Αλληλεπίδραση με νουκλεϊκά οξέα	44
Αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες	44
3D μοντέλο της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης	46
Μεταλλάξεις	47
1.2.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) της δεσμίνης.....	47
Φωσφορυλίωση, πρωτεολυτική διάσπαση και συσσώρευση μη φυσιολογικών συσσωματωμάτων δεσμίνης.....	47
1.3 Μυοκαρδιοπάθειες	49
Καρδιακή ανεπάρκεια	50
ARVC	50
Ενεργοποίηση φλεγμονώδους αντίδρασης	51
Δεσμινοπάθειες.....	51
Μεταλλάξεις	52
Σκοπός της Διατριβής.....	54
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	55
2.1 Ζωικά πρότυπα.....	56

2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	56
2.3 Ανάλυση γονιδιωματικού DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	57
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	58
2.5 Ιστολογική επεξεργασία & χρώσεις	59
2.5.1 Χρώση τομών με αιματοξυλίνη/εωζίνη	59
2.5.2 Χρώση τομών με Masson's trichrome	59
2.5.3 Μικροσκοπία	60
2.5.4 Αξιολόγηση του "replacement index"	60
2.6 Ανίχνευση αποπτωτικών πυρήνων με τη μέθοδο TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling)	60
2.7 Ανοσοφθορισμός	62
2.8 Συνεστιακή Μικροσκοπία	63
2.9 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία	63
2.10 Υπερηχογραφία καρδιάς ζωικών προτύπων	64
2.11 Μέτρηση αρτηριακής πίεσης	65
2.12 Πρωτόκολλο κολύμβησης/ καμπύλης επιβίωσης	65
2.13 Πρωτόκολλο τεστ κοπώσεως σε διάδρομο	65
2.14 Αλληλεπιδράσεις Δεσμίνης	66
2.15 Πέψεις με Ένζυμα Περιορισμού	67
2.16 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	67
2.17 Σύνδεση των ενθεμάτων στους φορείς	67
2.18 Παρασκευή Θρεπτικών Υλικών	68
2.19 Μετασχηματισμός Βακτηριακών Κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	68
2.20 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA	69
2.21 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	69
2.22 Έκφραση Χιμαιρικών Βακτηριακών Πρωτεϊνών	70
2.23 Καθαρισμός Χιμαιρικών Βακτηριακών Πρωτεϊνών από την ουρία με διαπίδυση	71
2.24 GST pull down assay	72
2.25 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καρδιακό ιστό	73
2.26 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	74
2.27 SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών	74
2.28 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	76
2.29 Στατιστική ανάλυση	77
3. Αποτελέσματα	78

3.1. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών (Des ^{+/+} TgS13F) που φέρουν την S13F μεταλλαγμένη δεσμίνη	79
3.2 Χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών σειρών Des ^{+/+} TgS13F	80
3.3 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών (Des ^{-/-} TgS13F) που φέρουν μόνο την S13F μεταλλαγμένη δεσμίνη	82
3.4 Επιβεβαίωση των γενοτύπων ως προς τη δεσμίνη με PCR	83
3.5 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F ηλικίας 9 μηνών εμφανίζουν διάταση στη δεξιά κοιλία της καρδιάς.....	83
3.6 Ο καρδιοϊστολογικός χαρακτηρισμός στα Des ^{-/-} TgS13F διαγονιδιακά ποντίκια υποδεικνύει προοδευτική αύξηση του ινωτικού ιστού ηλικιακά	84
3.7 Η υπερηχοκαρδιογραφία στα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F ηλικίας 9 μηνών έδειξε διάταση και συστολική δυσλειτουργία	86
3.8 Στα διαγονιδιακά ποντίκια δεν μεταβάλλεται η αρτηριακή πίεση στην ηλικία των 12 μηνών	88
3.9 Η καμπύλη επιβίωσης ύστερα από έντονη άσκηση (κολύμβηση) δεν επηρεάζεται στα Des ^{-/-} TgS13F ποντίκια ηλικίας 6 μηνών	88
3.10 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F υποδεικνύουν μειωμένη απόδοση στο τεστ κοπώσεως στην ηλικία των 12 μηνών.....	89
3.11 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F υπόκειται σε πρωτεολυτική διάσπαση στην περιοχή κεφαλή	90
3.12 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στους z-δίσκους.....	91
3.13 Οι εμβόλιμοι δίσκοι εντοπίζονται πεπλατυσμένοι στα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F, ενώ διαταράσσεται και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της δεσμοπλακίνης.....	92
3.14 Οι εμβόλιμοι δίσκοι εντοπίζονται πεπλατυσμένοι στα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F, ενώ δεν διαταράσσεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πλακογλοβίνης	94
3.15 Στα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F δεν διαταράσσεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός της κοννεξίνης ⁴³ των χασματοσυνδέσμων στους εμβόλιμους δίσκους	95
3.16 Η ακτινίνη εντοπίζεται στις διαταραγμένες δομές των z-δίσκων στα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F.....	96
3.17 Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης DHPR στις μεμβρανικές εγκολπώσεις T-tubules δεν διαταράσσεται στα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F	96
3.18 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des ^{-/-} TgS13F παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης.....	97
3.19 Ανίχνευση των σχετιζόμενων με την αυτοφαγία πρωτεϊνών LC3 και p62 στα διαγονιδιακά ποντίκια, αλλά χωρίς να συνεντοπίζονται με τη μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F	98
3.20 Η περιοχή κεφαλή είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 και τη λυσοσωματική πρωτεΐνη sarosinD.....	100

3.21 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη pS13F διαταράσσει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της NDUF52, επηρεάζοντας την κατανομή των μιτοχονδρίων στα μυοκαρδιοκύτταρα	101
3.22 Πρωτεϊνικό προφίλ.....	102
3.22.1 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών: δεσμοπλακίνη, πλακογλοβίνη, βινκουλίνη, δεσμογλεΐνη, β-κατενίνη, DHPR, NDUF52, VDAC, COX IV, p62, και κασπάση3 δεν μεταβάλλονται σημαντικά στα διαγονιδιακά ποντίκια	102
3.22.2 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης λαμίνης A/C εμφανίζονται αυξημένα στα διαγονιδιακά ποντίκια.....	103
3.22.3 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λυσοσωματικής πρωτεΐνης sarosinD εμφανίζονται αυξημένα στα διαγονιδιακά ποντίκια.....	104
3.22.4 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυτταροπροστατευτικής πρωτεΐνης Bcl2 βρέθηκαν αυξημένα στα διαγονιδιακά ποντίκια.....	105
3.23 Υπερδομική ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε εκτεταμένες δομικές μεταβολές στα σαρκομερή, τα μυοϊνίδια και τις συζευγμένες δομές των T-tubules και SR των μυοκαρδιοκυττάρων στα Des-/-TgS13F ζώα.....	106
3.24 Η υπερδομή των εμβόλιμων δίσκων στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών Des-/-TgS13F ποντικών εμφανίζει εκτεταμένες δομικές μεταβολές.....	108
3.25 Η υπερδομή των μιτοχονδρίων παρουσιάζει εκτεταμένες διαταραχές στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια	109
3.26 Η υπερδομή των πυρήνων των μυοκαρδιοκυττάρων στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζεται διαταραγμένη	111
3.27 Στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F παρατηρείται έντονη λυσοσωματική δράση πλησίον των μιτοχονδρίων και γενικευμένη αυτοφαγική δράση	111
3.28 Στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F εντοπίζονται λιποσταγονίδια πλησίον των μιτοχονδρίων.....	113
4. Συζήτηση	114
4.1 Η πρωτεολυτική διάσπαση της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης pS13F οδηγεί στην απώλεια των ινιδίων δεσμίνης από τους z-δίσκους και στον σχηματισμό συσσωματωμάτων δεσμίνης.....	115
4.2 Οι διαταραχές του κυτταροσκελετικού δικτύου των ινιδίων δεσμίνης με την επακόλουθη αποδιοργάνωση βασικών μεμβρανικών δομών του μυοκαρδιοκυττάρου ως μηχανισμός που συμβάλλει στην εξέλιξη της desmin ^{S13F} αρρυθμογενούς μυοκαρδιοπάθειας επιδρώντας στη σύσπαση της καρδιάς.....	116
4.3 Η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 και τη λυσοσωματική πρωτεΐνη sarosinD και η δεσμίνη pS13F οδηγεί σε μιτοχονδριακές και λυσοσωματικές ανωμαλίες στο μυοκάρδιο πλήττοντας σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες	119
4.4 Οι διαταραχές του κυτταροσκελετικού δικτύου ινιδίων δεσμίνης πλήττουν τον πυρήνα	121

4.5 Η προστασία της δεσμίνης από την πρωτεολυτική διάσπαση ως θεραπευτικός στόχος	121
5. Βιβλιογραφία.....	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας των ενδιάμεσων ινιδίων (για παράδειγμα της βιμεντίνης και των νευροϊνιδίων (neurofilament, NF-H) [Bott and Winckler, 2020].	25
Εικόνα 1.2 Ομολογία των ενδιάμεσων ινιδίων σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση (I-VI), τον κυτταρικό τύπο που εντοπίζονται και τον τρόπο διαμόρφωσής τους [Tsilafakis and Mavroidis, 2024].	26
Εικόνα 1.3 Κατανομή των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων στο ανθρώπινο σώμα, όπου διακρίνεται η ιστοειδική τους έκφραση [Toivola et al., 2005].	27
Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση του καρδιακού κυτταροσκελετικού δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης και οι αλληλεπιδράσεις του με τις διαφορετικές μεμβρανώδεις δομές και οργανίδια. Η μυο-ειδική πρωτεΐνη δεσμίνη (κίτρινο), μαζί με τις σχετιζόμενες με αυτή πρωτεΐνες, δημιουργεί ένα εκτενές ικρίωμα που διασυνδέει ολόκληρη τη συσταλτή συσκευή στους z-δίσκους με τις διάφορες μεμβρανώδεις δομές στα κοσταμερή της σαρκοπλασματικής μεμβράνης και τα δεσμοσώματα των IDs (μεγεθυμένο μπλε πλαίσιο/ κάτω αριστερά) και με τα κυτταρικά οργανίδια (πυρήνα, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα και σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η συσχέτιση ανάμεσα στα ινίδια δεσμίνης και λαμίνης διευκολύνει τη μεταγωγή των μηχανικών ερεθισμάτων από τη σαρκοπλασματική μεμβράνη και τη συσταλτή συσκευή προς τον πυρήνα. Το δίκτυο της δεσμίνης συμβάλλει στη διατήρηση της σωστής εγγύτητας των οργανιδίων γεγονός που συντελεί τόσο στην επιτυχή βιογένεση όσο και στη λειτουργική αλληλεπίδρασή τους όπως συμβαίνει στις θέσεις διασύνδεσης μεταξύ SR και μιτοχονδρίων (MAMs, mitochondria associated membranes) (μεγεθυμένο κόκκινο πλαίσιο/ κάτω δεξιά). Επίσης, απεικονίζεται η πρόσφατη συσχετιζόμενη με τη δεσμίνη πρωτεΐνη, μυοσπρίνη, η οποία φαίνεται να εδράζεται περιφερικά του πυρήνα, στα κοσταμερή και τους IDs, καθώς και στα λυσοσώματα. Το δίκτυο IFs κερατίνης (K8/K18) (κόκκινο) δεν εκφράζεται φυσιολογικά στο μυοκάρδιο και αφορά την εναλλακτική εκτοπική έκφραση του στην περίπτωση του μοντέλου TNF-α καρδιακής ανεπάρκειας ως αντισταθμιστικό μηχανισμό [Papathanasiou et al., 2015]. Οι λιγότερο πολυπληθής μη μυοειδικές πρωτεΐνες synemin, paranemin και syncoilin δεν απεικονίζονται [Carpetanaki et al., 2007; Tsikitis et al., 2018].	29
Εικόνα 1.5 Α) Σχηματική απεικόνιση των σαρκομερών. Β) Η υπερδομή των σαρκομερών υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία. Τα σαρκομερή είναι η συσταλτή μονάδα των μυοκυττάρων. Κάθε σαρκομερές αποτελείται από διαδοχικές σειρές διαπλεκόμενων ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης, ενώ η τιτίνη (titin) εκτείνεται από τους z- δίσκους μέχρι τη μέση των σαρκομερών στη ζώνη M. Γ) Η μυϊκή συστολή οφείλεται στη ταυτόχρονη βράχυνση όλων των σαρκομερών, η οποία προκαλείται από την ολίσθηση των ινιδίων ακτίνης πάνω στα ινίδια μυοσίνης, χωρίς μεταβολή του μήκους των δύο ινιδίων [Crocini and Gotthardt, 2021].	31
Εικόνα 1.6 Α) Σχηματική απεικόνιση των κοσταμερών ως περιμετρικά στοιχεία, τα οποία συνδέουν περιφερικά τα μυοϊνίδια στη σαρκοπλασματική μεμβράνη στο επίπεδο των περιοδικών z-δίσκων [Ervasti, 2003]. Β) Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων των κοσταμερών και των επιμέρους σχετιζόμενων πρωτεϊνών [Ahmed et al., 2022].	32
Εικόνα 1.7 Α) Σχηματική απεικόνιση των ζευγών T-tubule και SR στο επίπεδο των z-δίσκων. Β) Η ενδοκυτταρική ροή του ασβεστίου κατά τη διέγερση-συστολή του μυοκαρδιοκυττάρου, όπου απεικονίζονται τα πιο αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα και οργανίδια που εμπλέκονται στη σύζευξη καρδιακής διέγερσης-συστολής, όπως το ζεύγος των καναλιών	

ασβεστίου των T-tubules με τους υποδοχείς ρυανοδίνης του SR, τα σαρκομερή, τα μιτοχόνδρια, κα [Mahmoodzadeh and Dworatzek, 2019].	33
Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση των βασικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και συστατικών που απαρτίζουν τους εμβόλιμους δίσκους στην καρδιά. Τα δεσμοσώματα συνδέονται με τα ενδιάμεσα ινίδια δεσμίνης και οι σύνδεσμοι προσκόλλησης με τα ινίδια ακτίνης [Sheikh et al., 2009].	34
Εικόνα 1.9 Η 3D δομή διμερών και τετραμερών μορίων βιμεντίνης. Α) Η δομή της σπείρας-1 (coil-1) (με τη σπείρα-1A, τον συνδέτη L1 και τη σπείρα-1B να απεικονίζονται με κίτρινο, πορτοκαλί και πράσινο αντίστοιχα) και η δομή της σπείρας-2 (μπλε), βασίζονται στην υπέρθεση των κρυσταλλικών δομών τους. Ο συνδέτης L12, για τον οποίο δεν υπάρχουν κρυσταλλογραφικά δεδομένα απεικονίζεται με ροζ. Οι εύκαμπτες περιοχές κεφαλή και ουρά, για τις οποίες επίσης δεν υπάρχουν κρυσταλλογραφικές πληροφορίες, δεν απεικονίζονται. Β) Η δομή του τετραμερούς βιμεντίνης αποτελείται από δυο αντιπαράλληλα διμερή, όπως προκύπτει από τη κρυσταλλική δομή (PDB entry 3UF1) [Chernyatina et al., 2012].	38
Εικόνα 1.10 Διαταραχές στη συναρμολόγηση και οργάνωση του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης εξαιτίας μεταλλαγών στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης. Μελέτες επιμόλυνσης με μεταλλαγμένες μορφές δεσμίνης στην περιοχή κεφαλή (S13F και R16C) σε SW13 κύτταρα και σε εμβρυικούς ινοβλάστες μυών $\text{vim}^{-/-}$, όπου και στις δυο κυτταρικές σειρές απουσιάζουν ενδογενώς κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων [Sharma et al., 2009].	38
Εικόνα 1.11 Σχηματισμός διμερούς βιμεντίνης. Αλληλεπίδραση της περιοχής κεφαλής με τη rod περιοχή μεταξύ των αμινοξέων G17 (πράσινο) και Q137 (μωβ), καθώς οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των κεφαλών έρχονται σε στενή επαφή, αναδιπλώνονται και παρατίθενται συμμετρικά στις rod περιοχές, προσδίδοντας τελικά μια ασυμμετρία στο διμερές [Aziz et al., 2010].	39
Εικόνα 1.12 Α) Επιμήκη τετραμερή βιμεντίνης με τις περιοχές κεφαλή και ουρά. Οι περιοχές απεικονίζονται ως εξής: σπείρα-1A με πορτοκαλί, σπείρα-1B με πράσινο και σπείρα-2 με μπλε. Για λόγους σαφήνειας απεικονίζονται οι ακροτελικές περιοχές από ένα μόνο διμερές. Μία εκ των περιοχών κεφαλή (Head1) του μοντέλου αλληλεπιδρά κυρίως με τη σπείρα-1B, ενώ η άλλη (Head2) αλληλεπιδρά κυρίως με τη σπείρα-1A. Β) Τα αμινοτελικά άκρα σύμφωνα με τη μοντελοποίηση AlphaFold. Πάνω φαίνεται η περιοχή κεφαλή με κόκκινο και η αρχή της rod περιοχής (σπείρα-1A και τμήμα της σπείρας-1B) με γκρι. Κάτω φαίνεται με μωβ η περιοχή ουρά με το β-πτυχωτό φύλλο και το τέλος της rod περιοχής (τμήμα της σπείρας-2) με γκρι. [Vermeire et al., 2023].	40
Εικόνα 1.13 Σχηματική αναπαράσταση σύνδεσης μορίων βιμεντίνης. Οχτώ αντιπαράλληλα τετραμερή συνδέονται πλευρικά για να σχηματίσουν τα ULFs. Τα ULFs διαπλέκονται περαιτέρω κατά μήκος κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης. Περιοχές (χρώμα): κεφαλή (πράσινο), rod (μπλε) και ουρά (μωβ). [Nunes Vicente et al., 2022]	40
Εικόνα 1.14 Πιθανός σχηματισμός ώριμων ενδιάμεσων ινιδίων από την οπτική διατομής. Η αρχική σύνδεση 16 διμερών αποδίδει τελικά μια συμπαγή διάταξη αποτελούμενη από 4 οχταμερή πρωτοϊνίδια. Το θετικό και αρνητικό πρόσημο δηλώνει τον προσανατολισμό της κάθε α-έλικας. [Strelkov et al., 2003; Vermeire et al., 2021].	40
Εικόνα 1.15 Μοντέλα διατομής των ενδιάμεσων ινιδίων βιμεντίνης. Α) Τα 5 πρωτοϊνίδια συνδέονται μέσω των περιοχών 1A και κεφαλή (με μπλε και ανοιχτό μπλε αντίστοιχα). Η	

κλίμακα είναι 3nm. Οι περιοχές 1B, 2A, 2B και ουρά απεικονίζονται με πράσινο, κίτρινο, κόκκινο και πορτοκαλί αντίστοιχα. [Eibauer et al., 2021]	B) Τα 5 πρωτοϊνίδια αλληλεπιδρούν πλευρικά με τις περιοχές ουράς (μωβ) και κεντρικά με τις περιοχές κεφαλή (μπλε) των μορίων βιμεντίνης. Τα διμερή των σπειρών-2 ουσιαστικά σχηματίζουν την εξωτερική επιφάνεια των ενδιάμεσων ινιδίων βιμεντίνης, ενώ τα διμερή των σπειρών 1A-1B καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια. Οι έλικες της σπείρας 1 έχουν χρώμα μπλε με ανοιχτό πράσινο και της σπείρας 2 πράσινο με κόκκινο. [Eibauer et al., 2023].....	41
Εικόνα 1.16 Η κρυσταλλική δομή των Ig-like τμημάτων των περιοχών ουράς της λαμίνης A/C σε διμερή διάταξη, δύο πρωτομερών με τον σχηματισμό του β-πτυχωτού φύλλου, το οποίο αποτελείται από 4 πτυχές (strands), δύο από κάθε πρωτομερές [Ahn et al., 2021].	Εικόνα 1.17 Απεικόνιση της μοριακής αλληλεπίδρασης/ διεπαφής της δεσμίνης (πράσινο) με τη NDUF52 (κόκκινο) και με τη sarosinD (θαλασσί), όπου διακρίνεται το κοινό πρότυπο αλληλεπίδρασης [Vlachakis et al., 2024].	43 46
Εικόνα 1.18 Απεικόνιση της δομικής πρόβλεψης της δεσμίνης σύμφωνα με την εφαρμογή AlphaFold. Μπλε: πολύ ισχυρή βεβαιότητα πρόβλεψης (pLDDT>90), θαλασσί: ισχυρή βεβαιότητα πρόβλεψης (90>pLDDT>70), κίτρινο: χαμηλή βεβαιότητα πρόβλεψης (70>pLDDT>50), πορτοκαλί: πολύ χαμηλή βεβαιότητα πρόβλεψης (pLDDT>50) (N: αμινοτελικό άκρο, L12: συνδέτης 12) [Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022; Vlachakis et al., 2024].....	Εικόνα 1.19 Πιθανό μοντέλο δημιουργίας παθο/φυσιολογικών ολιγομερών δεσμίνης. Σχηματική απόδοση του θεωρητικού μονοπατιού φωσφορυλίωσης, διάσπασης και παθολογικής παραγωγής συσσωματωμάτων μορίων δεσμίνης. Η συσσώρευση μονο-φωσφορυλιωμένων μορίων δεσμίνης από μια κοινή πρωτεϊνική κινάση (PKX) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μηχανισμού της πρωτεολυτικής διάσπασης (ίσως από την calpain) στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης και σε αποκλίνων ολιγομερισμό. Αντίθετα, σε φυσιολογικές συνθήκες η GSK3 φωσφορυλώνει επιπλέον τη δεσμίνη και οδηγεί στο σχηματισμό τυπικών IFs. A: GPCR αγωνιστής (όπως αγγειοτενσίνη II ή κατεχολαμίνες), GPCR: G protein-coupled receptor; P: phosphate groups [Agnetti et al., 2014].	46 48
Εικόνα 1.20 Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών στο γονίδιο της δεσμίνης που σχετίζονται με καρδιακές και μυϊκές ασθένειες. Η πλειοψηφία των 73 μεταλλαγών εντοπίζονται στη σπείρα-2B της ραβδοειδούς περιοχής και στην περιοχή ουρά. Οι συνεχείς κόκκινοι κύκλοι (P) αφορούν μεταλλάξεις που επηρεάζουν γνωστές θέσεις φωσφορυλίωσης, ενώ οι διακεκομμένοι κόκκινοι κύκλοι (P) αφορούν μεταλλάξεις σε πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης. Οι δύο γνωστές θέσεις για ADP-ριβοζυλίωση (Arg58 και Arg73) στην περιοχή της κεφαλής υποδηλώνονται με πράσινα τρίγωνα-R. Οι μεταλλαγές που σχετίζονται με καρδιακές διαταραχές εμφανίζονται με χρωματιστές κουκίδες (DCM: μπλε, HCM: πράσινο, RCM: κόκκινο και ARVC: μωβ. Στο σχήμα απεικονίζεται επίσης η επαγόμενη από τον TNF-α, πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης από την κασπάση-6 στη θέση Met263 του συνδέτη L12 [Tsikitis et al., 2018].	Εικόνα 1.21 A) Ανοσοϊστοχημική τομή καρδιακού ιστού ασθενών με τη μετάλλαξη S13F όπου εντοπίζονται συσσωματώματα δεσμίνης. B) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου παρατηρείται η διαταραγμένη δομή των IDs (zig-zag) σε τομή καρδιακού ιστού ασθενών με τη μετάλλαξη S13F [van Tintelen et al., 2009].....	52 53
Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανίχνευσης της απόπτωσης μέσω του kit Click-iT™ Plus TUNEL Assay, Invitrogen.		61

Εικόνα 2.2 Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEX-5X-1, στον οποίο ενθέσαμε τις αλληλουχίες DNA είτε για την πρωτεΐνη NDUF52 (EcoR I- Sma I) είτε για την πρωτεΐνη sarosinD με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.....	68
Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής του ανασυνδυασμένου DNA για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών. Το ανασυνδυασμένο DNA ^{desminS13F} , αρχικά, υποκλωνοποιείται στον πλασμιδιακό φορέα pSK που φέρει τον καρδιοειδικό υποκινητή αMHC. Έπειτα, το ανασυνδυασμένο DNA ^{MHCdesminS13F} εξάγεται από τον πλασμιδιακό φορέα ύστερα από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SacI και HindIII και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών.	79
Εικόνα 3.2 Υπερέκφραση της δεσμίνης στη διαγονιδιακή σειρά γ (θέσεις 7-8) σύμφωνα με την ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της δεσμίνης σε ολικά πρωτεϊνικά καρδιακά εκχυλίσματα. Και στις 3 διαγονιδιακές σειρές παρατηρείται πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης (επιπλέον χαμηλότερη ζώνη). WT, φυσικού τύπου: θέσεις 1-2/ S13Fα, Des+/-TgS13F σειρά α: θέσεις 3-4/ S13Fβ, Des+/-TgS13F σειρά β: θέσεις 5-6/ S13Fγ, Des+/-TgS13F σειρά γ: θέσεις 7-8, DNA marker: θέση 9.	80
Εικόνα 3.3 Η σειρά γ παρουσιάζει έντονη αποδιοργάνωση του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης, καθώς η δεσμίνη χάνει τον εντοπισμό της από τους z-δίσκους και οι εμβόλιμοι δίσκοι εμφανίζονται αποδιαταγμένοι, ύστερα από ανοσοφθορισμό έναντι δεσμίνης σε τομές κρουστού καρδιακού ιστού. (Ο πράσινος φθορισμός αντιστοιχεί στη δεσμίνη, ενώ οι πυρήνες έχουν σημανθεί μπλε με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI).	81
Εικόνα 3.4 Η διαγονιδιακή σειρά γ παρουσιάζει εκτεταμένη ίνωση (Fb, κόκκινα βέλη) και εναπόθεση ασβεστίου (Ca, κίτρινα βέλη) σε σχέση με τις σειρές α και β που παρουσιάζουν πιο ήπια φαινόμενα. Για παράδειγμα η σειρά β παρουσιάζει κυρίως περιαγγειακή ίνωση (κόκκινα τρίγωνα). Χαρακτηριστικές εικόνες από χρώση Masson's trichrome σε τομές παραφίνης καρδιακού ιστού.	81
Εικόνα 3.5 Τα ετερόζυγα ως προς την ενδογενή δεσμίνη διαγονιδιακά ποντίκια Des+/-TgS13F παρουσιάζουν σχεδόν φυσιολογικό δίκτυο IFs δεσμίνης, καθώς εντοπίζονται στις βασικές δομές τόσο των z-δίσκων όσο και των IDs, ύστερα από διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμίνης και ακτινίνης σε τομές κρουστού καρδιακού ιστού. (Ο πράσινος φθορισμός αντιστοιχεί στη δεσμίνη και ο κόκκινος στην ακτινίνη, ενώ οι πυρήνες έχουν σημανθεί μπλε με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI).	82
Εικόνα 3.6 Γενοτύπηση με PCR σε δείγματα απομόνωσης DNA από ουρές ποντικών. Αριστερά PCR για τη δεσμίνη, όπου το αλληλόμορφο φυσικού τύπου της δεσμίνης (WT) δίνει ζώνη μεγέθους 700bp, ενώ το διαγονιδιακό αλληλόμορφο Des-/- δίνει ζώνη μεγέθους 390bp και δεξιά PCR για τη δεσμίνη με τη σημειακή μετάλλαξη S13F, όπου όταν υπάρχει το διαγονιδιακό αλληλόμορφο TgS13F δίνει ζώνη μεγέθους 740bp, ενώ όταν δεν υπάρχει, δεν δίνει ζώνη. Έτσι, προκύπτουν αντίστοιχα τα ποντίκια: A) Des-/-TgS13F, B) WT και C) Des-/- ύστερα από τις δύο PCR.	83
Εικόνα 3.7 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F ηλικίας 9 μηνών εμφανίζουν διάταση στη δεξιά κοιλία της καρδιάς και λέπτυνση του τοιχώματός της. Χαρακτηριστικές εικόνες από καρδιές Des-/-TgS13F και WT ποντικών ηλικίας 9 μηνών με τη χρήση στερεοσκοπίου. (RV δεξιά κοιλία, LV αριστερή κοιλία)	84
Εικόνα 3.8 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F εμφανίζουν ενδιάμεση και περιαγγειακή ίνωση στην ηλικία των 9 μηνών, ενώ παρατηρείται έντονος εκφυλισμός των μυοκαρδιοκυττάρων και αναπλήρωσή τους με ουλώδη ιστό στην ηλικία των 13 μηνών,	

ύστερα από ιστολογική χρώση Masson's trichrome σε τομές παραφίνης καρδιακού ιστού από Des-/-TgS13F και WT ποντίκια ηλικίας 3, 9 και 13 μηνών. Παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες. Στην ηλικία των 3 μηνών δεν εντοπίστηκαν ιδιαίτερα σημαντικές ιστολογικές διαφορές. Η ιστολογική χρώση Masson's trichrome υποδεικνύει την εναπόθεση κολλαγόνου. 85

Εικόνα 3.9 Χαρακτηριστικές εικόνες υπερηχοκαρδιογραφίας από WT και Des-/-TgS13F ποντίκια, όπου διακρίνεται η αύξηση της τελοδιαστολικής και της τελοσυστολικής διαμέτρου στα διαγονιδιακά ποντίκια. 86

Εικόνα 3.10 Η μεταλλαγμένη S13F δεσμίνη παρουσιάζει εμφανώς χαμηλότερη έκφραση στα Des-/-TgS13F ποντίκια και διασπάται στην περιοχή κεφαλή. Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της περιοχής ουρά της δεσμίνης (anti-desmin Y-20, SantaCruz) σε ολικά καρδιακά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από διαφορετικούς γενότυπους καρδιακών ιστών των ποντικών: Des+/-TgS13F (1), Des+/-TgS13F (2), Des-/-TgS13F (3), Des-/-TgS13F (4), WT (5) και des-/- (6). 91

Εικόνα 3.11 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στους z-δίσκους και εντοπίζεται κυρίως στους εμβόλιμους δίσκους, ενώ φαίνεται να δημιουργεί και συσσωματώματα (spots) στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμίνης και ακτινίνης σε τομές κρουοτόμου καρδιακών ιστών από Des+/-TgS13F ποντίκια (πάνω εικόνες) και Des-/-TgS13F ποντίκια (κάτω εικόνες). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο και η ακτινίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 92

Εικόνα 3.12 Οι εμβόλιμοι δίσκοι εντοπίζονται πεπλατυσμένοι στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F σε σχέση με τα WT και ταυτόχρονα η δεσμοπλακίνη συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη κυτταροπλασματικά με τη μορφή συσσωματωμάτων στα διαγονιδιακά ποντίκια (λευκά βέλη). Ενδεικτική ανάλυση εμβόλιμων δίσκων με διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμοπλακίνης και δεσμίνης σε τομές κρουοτόμου καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Έχουν σημειωθεί αντιστοίχως τα προς υπολογισμό πλάτη των εμβόλιμων δίσκων με λευκή γραμμή στη συγκεκριμένη τομή. Η δεσμοπλακίνη αποδίδεται με πράσινο και η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 93

Εικόνα 3.13 Οι εμβόλιμοι δίσκοι στα Des-/-TgS13F ποντίκια παρουσιάζονται διαταραγμένοι και πεπλατυσμένοι, χωρίς όμως η πλακογλοβίνη να χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στα IDs ή τον συνεντοπισμό της με τη δεσμίνη. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την εφαρμογή διπλής ανοσοσήμανσης έναντι πλακογλοβίνης και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Έχουν σημειωθεί αντιστοίχως τα προς υπολογισμό πλάτη των εμβόλιμων δίσκων με λευκή γραμμή στη συγκεκριμένη τομή. Η πλακογλοβίνη αποδίδεται με πράσινο και η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 94

Εικόνα 3.14 Η κοννεξίνη43 δεν χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στους εμβόλιμους δίσκους στα Des-/-TgS13F ποντίκια. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την εφαρμογή διπλής ανοσοσήμανσης έναντι κοννεξίνης43 και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο και η κοννεξίνη43 με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 95

Εικόνα 3.15 Η ακτινίνη εντοπίζεται στις διαταραγμένες δομές των z-δίσκων στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι ακτινίνης και δεσμίνης σε

τομές κρυοτόμου καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η ακτινίνη αποδίδεται με πράσινο, η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 96

Εικόνα 3.16 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F δεν διαταράσσει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης DHPR (z-line pattern). Παρόλα αυτά φαίνεται να χάνεται ο συνεντοπισμός των 2 πρωτεϊνών στα διαγονιδιακά ποντίκια, σε αντίθεση με τα φυσικού τύπου ζώα όπου συνεντοπίζονται. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι DHPR και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η DHPR αποδίδεται με πράσινο, η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). . 97

Εικόνα 3.17 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F παρουσιάζουν αρκετούς θετικούς στην απόπτωση (κατά TUNEL) πυρήνες μυοκαρδιοκυττάρων (connexin43) σε σχέση με τα WT ποντίκια ηλικίας 9 μηνών. Η ποσοτικοποίηση διαφαίνεται στο Γράφημα 3.8. Η connexin43 αποδίδεται με πράσινο, με κόκκινο αποδίδονται οι θετικοί κατά TUNEL πυρήνες και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 98

Εικόνα 3.18 Ανίχνευση στικτών σημείων της σχετιζόμενης με την αυτοφαγία πρωτεΐνης LC3 στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμίνης και LC3 (βέλη) σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο, η LC3 με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 99

Εικόνα 3.19 Ανίχνευση στικτών σημείων της σχετιζόμενης με την αυτοφαγία και την απόπτωση πρωτεΐνης p62 (βέλη) στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμίνης και p62 σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο, η p62 με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). 99

Εικόνα 3.20 Η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 και τη λυσοσωματική πρωτεΐνη sarosinD, ύστερα από την εφαρμογή της μεθόδου GST pull down (beads: GST, GST-sarosinD και GST-NDUF52) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western έναντι της δεσμίνης (input: ολικά πρωτεϊνικά καρδιακά εκχυλίσματα από Des-/-TgS13F, Des-/- και WT ποντίκια). 100

Εικόνα 3.21 Η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 παρουσιάζει διάχυτη κατανομή στα διαγονιδιακά ποντίκια, καθώς χάνει την κατά μήκος κατανομή της στα σαρκομερή, όπως διαφαίνεται στα φυσικού τύπου. Επίσης, παρατηρούνται συσσωματώματα (υποδεικνύονται με βέλη) της NDUF52. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι NDUF52 και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (πάνω) και WT ποντίκια (κάτω). Η NDUF52 αποδίδεται με πράσινο, η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). (Επεξεργασμένη εικόνα με το πρόγραμμα IMARIS για την απόδοση 3D αποκεικόνισης)... 101

Εικόνα 3.22 Τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών: NDUF52, VDAC και COX IV, καθώς και των πρωτεϊνών των IDs: β-κατενίνη και βινκουλίνη δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαγονιδιακών και φυσικού τύπου ζώων. Ανάλυση Western blot (αριστερά) σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η χρώση με Coomassie blue (δεξιά) χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT (n=3-6, p>0.05). 102

Εικόνα 3.23 Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών των IDs: δεσμοπλακίνη, δεσμογλεΐνη, πλακογλοβίνη και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης DHPR δεν παρουσιάζουν στατιστικά

σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαγονιδιακών και φυσικού τύπου ζώων. Ανάλυση Western blot (αριστερά) σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η χρώση με Coomassie blue (δεξιά) χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT (n=3-6, p>0.05). 103

Εικόνα 3.24 Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών: κασπάση3 και p62 δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαγονιδιακών και φυσικού τύπου ζώων. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT (n=3-6, p>0.05). 103

Εικόνα 3.25 Τα επίπεδα έκφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης λαμίνης A/C παρουσιάζουν μια μικρή αύξηση μεταξύ των διαγονιδιακών Des-/-TgS13F και WT ζώων. Ανάλυση Western blot (πάνω) σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η χρώση με Coomassie blue (κάτω) χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT και απεικονίζεται στο Γράφημα 3.10 (n=6, p=0.047). 104

Εικόνα 3.26 Τα επίπεδα έκφρασης της λυσοσωματικής πρωτεΐνης sarosinD παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση μεταξύ των διαγονιδιακών Des-/-TgS13F και WT ζώων. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT και απεικονίζεται στο Γράφημα 3.10 (n=3, p<0.001). 104

Εικόνα 3.27 Τα επίπεδα έκφρασης της κυτταροπροστατευτικής πρωτεΐνης Bcl2 παρουσιάζουν αύξηση μεταξύ των διαγονιδιακών Des-/-TgS13F και WT ζώων. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT και απεικονίζεται στο Γράφημα 3.10 (n=3, p<0.03). 105

Εικόνα 3.28 Η δομή των σαρκομερών εμφανίζεται διαταραγμένη και συγκεχυμένη και τα μυοϊνίδια χάνουν τη χαρακτηριστική ευθυγραμμισμένη τους διαμόρφωση και παρεμβάλλονται από άτακτες μάζες μιτοχονδρίων. Επιπλέον, οι Ι ζώνες (I) εκλείπουν από τη δομή των σαρκομερών στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια. Ταυτόχρονα, οι συζευγμένες μεμβρανικές δομές των T-tubules και του σαρκοπλασματικού δικτύου (SR) (κίτρινα τρίγωνα) εντοπίζονται διογκωμένες και αποδιοργανωμένες. Με αστερίσκο υποδεικνύεται ο κατακερματισμός του πυρήνα. Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια (B), υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών, N: πυρήνας, m: μιτοχόνδρια). 107

Εικόνα 3.29 Οι εμβόλιμοι δίσκοι στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζουν έντονη αναδίπλωση και αυξημένη διάταση, ενώ ταυτόχρονα οι δομές των δεσμοσωμάτων παρουσιάζουν κύρτωση. Επίσης, οι περιοχές της τελικής σύνδεσης των μυοϊνιδίων στους εμβόλιμους δίσκους εντοπίζονται διαταραγμένες και αποδιοργανωμένες, σχηματίζοντας κενά και κυστίδια (αστεράκια). Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια (B), υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3,

ηλικίας 5-7 μηνών, D: δεσμοσώματα, FA: σύνδεσμοι προσκόλλησης, GP: χασματοσύνδεσμοι).	109
Εικόνα 3.30 Τα μιτοχόνδρια (m) στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζονται μη ευθυγραμμισμένα με τα μυοϊνίδια, διογκωμένα, πολυπληθή σε συστάδες και άτακτα κατανεμημένα στο μυοκαρδιοκύτταρο, ενώ σε σημεία παρατηρούνται κατακερματισμένα και εκφυλισμένα μιτοχόνδρια υπό μιτοφαγία (βέλη). Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια (B), υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών, AP: αυτοφαγόσωμα).	110
Εικόνα 3.31 Ο πυρήνας του μυοκαρδιοκυττάρου στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F εμφανίζει διαταραγμένο και ακαθόριστο σχήμα με έντονες μεμβρανικές εγκολπώσεις και διατεταμένο διαμεμβρανικό χώρο (βέλος). Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F (B) υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).	111
Εικόνα 3.32 Περιοχές με έντονη αποικοδομητική δράση που υποδηλώνεται από την πληθώρα ενδοκυτταρικών κυστιδίων και συσσωματωμάτων και τον εντοπισμό αυτοφαγοσωμάτων (AP), λυσοσωμάτων (Ly) και αυτολυσοσωμάτων (AL). Εντός του αυτολυσοσώματος στην εικόνα B εντοπίζουμε μιτοχόνδρια (m) σε αποικοδόμηση. Χαρακτηριστικές εικόνες από τομές καρδιακών ιστών από διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).	112
Εικόνα 3.33 Παρατηρείται σε σημεία έντονη λυσοσωματική δράση ειδικά πλησίον μιτοχονδρίων υποδηλώνοντας μιτοφαγική δράση στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F. Επιπλέον, τα βέλη υποδεικνύουν τον διατεταμένο διαμεμβρανικό πυρηνικό χώρο σε μεγέθυνση. Χαρακτηριστική εικόνα καρδιακών ιστών από διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).	112
Εικόνα 3.34 Εντοπισμός λιποσταγονιδίων (LP) πλησίον μιτοχονδρίων (m) σε τομές καρδιακών ιστών από διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).	113
Εικόνα 4.1 Μοντέλο επίδρασης της μεταλλαγμένης δεσμίνης S13F στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών Des-/-TgS13F στην εξέλιξη της καρδιακής νόσου.	122

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1 Το κλάσμα εξώθησης στη διαγονιδιακή σειρά γ είναι πολύ χαμηλό, σχεδόν 62% χαμηλότερο σε σχέση με τα WT. Δείκτες εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας σύμφωνα με την υπερηχοκαρδιογραφία σε διαγονιδιακά Des+/+TgS13F και WT ποντίκια, ηλικίας 3 μηνών. (ED volume: τελοδιαστολικός όγκος, ES volume: τελοσυστολικός όγκος, Ejection fraction: κλάσμα εξώθησης) (n = 1).	81
Πίνακας 3.2 Δείκτες εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας ύστερα από υπερηχοκαρδιογραφία σε ποντίκια Des-/-TgS13F και WT ηλικίας 9 μηνών. (heart rate: καρδιακός ρυθμός, LVEDD: τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας, LVESD: τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας, PWTd: τελοδιαστολικό πάχος, PWTs: τελοσυστολικό πάχος, FS: κλάσμα βράχυνσης, r/h: ακτίνα/ύψος, σφαιρικότητα καρδιάς). Χαρακτηριστικές εικόνες υπερηχοκαρδιογραφίας από WT και Des-/-TgS13F ποντίκια.	87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 3.1 Ο λόγος βάρους καρδιάς προς βάρος σώματος βρέθηκε αυξημένος κατά 44% στα ποντίκια Des-/-TgS13F (0,0062) σε σχέση με τα WT ποντίκια (0,0043) στην ηλικία των 9 μηνών ($p<0,005$). Το γνώρισμα αυτό υποδεικνύει καρδιακή υπερτροφία.....	84
Γράφημα 3.2 Ο δείκτης βλάβης του καρδιακού ιστού που αντιπροσωπεύει την αντικατάσταση του καρδιακού ιστού με ινωτικό ιστό (Replacement index score) βρέθηκε αυξημένος σχεδόν κατά τρεις φορές στα Des-/-TgS13F (1.74) σε σύγκριση με τα WT (0,47) ποντίκια στην ηλικία των 9 μηνών ($p<0,0001$).	86
Γράφημα 3.3 Τα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζουν επιβαρυσμένη συσταλτική λειτουργία της αριστερής κοιλίας, ύστερα από υπερηχοκαρδιογραφία στην ηλικία των 9 μηνών. Συγκεκριμένα, οι δείκτες εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας εμφανίζουν: ο LVEDD αύξηση κατά 16.5%, ο LVEDS αύξηση σχεδόν 42% και ο FS μείωση κατά 26.5% στα Des-/-TgS13F σε σχέση με τα WT, σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.2.	87
Γράφημα 3.4 Τα διαγονιδιακά ποντίκια δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη διαστολική (Α) ή στη συστολική (Β) αρτηριακή πίεση σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου στην ηλικία των 12 μηνών ($n=5$, $p>0.05$).	88
Γράφημα 3.5 Η καμπύλη επιβίωσης ύστερα από έντονη άσκηση (κολύμβηση) δεν επηρεάζεται στα Des-/-TgS13F ποντίκια, καθώς παρουσιάζουν παρόμοιες απώλειες σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια στην ηλικία των 6 μηνών ($p>0,05$).	89
Γράφημα 3.6 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F ηλικίας 12 μηνών έχουν πολύ μειωμένη απόδοση στο τεστ κοπώσεως, καθώς διανύουν κατά μέσο όρο 90m, δηλαδή υποτριπλάσια μέτρα σε σχέση με τα WT ποντίκια τα οποία διανύουν 280m ($n=6$, $p<0,01$). 90	
Γράφημα 3.7 Το μέσο πλάτος των εμβόλιμων δίσκων βάσει της δεσμοπλακίνης είναι σχεδόν πενταπλάσιο στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F (4.40μm) σε σχέση με τα WT (0.85μm). Το μέσο πλάτος αποδίδεται σε μm όπως προέκυψε από την ανάλυση τομών κρυοτόμου καρδιακού ιστού από διαγονιδιακά Des-/-TgS13F και WT ποντίκια ($n=20$ μετρήσεις από συνολικά 3 ζώα για κάθε γενότυπο, $p<0.00001$).	93
Γράφημα 3.8 Το μέσο πλάτος των εμβόλιμων δίσκων βάσει της πλακογλοβίνης είναι σχεδόν τριπλάσιο στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F (2.15μm) σε σχέση με τα WT (0.66μm). Το μέσο πλάτος αποδίδεται σε μm όπως προέκυψε από την ανάλυση τομών κρυοτόμου καρδιακού ιστού από διαγονιδιακά Des-/-TgS13F και WT ποντίκια ($n=20$ μετρήσεις από συνολικά 3 ζώα για κάθε γενότυπο, $p<0.00001$).	95
Γράφημα 3.9 Οι θετικοί κατά TUNEL πυρήνες μυοκαρδιοκυττάρων στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια είναι σχεδόν τετραπλάσιοι σε σχέση με τους αντίστοιχους στα WT ποντίκια ηλικίας 9 μηνών ($p<0.005$).	98
Γράφημα 3.10 Στον καρδιακό ιστό των Des-/-TgS13F ζώων η πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεϊνών: λαμίνη A/C, sarosinD και Bcl2 παρουσιάζει αύξηση. Συγκεκριμένα, η λαμίνη A/C παρουσιάζει μια μικρή αύξηση της τάξεως του 1.2 ($n=6$, $p=0.047$), η sarosinD παρουσιάζει αύξηση κατά 5.1 φορές ($n=3$, $p<0.001$) και η bcl2 εμφανίζει αύξηση κατά 2.7 φορές ($n=3$, $p<0.03$), σε σχέση με την αντίστοιχη πρωτεϊνική έκφραση στην καρδιά των ζώων φυσικού τύπου. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (μπλε), WT (πράσινο) και Des+/-TgS13F (κίτρινο). Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT.....	105

1. Εισαγωγή

1.1 Ενδιάμεσα ινίδια

Ο κυτταροσκελετός όλων των μεταζώων περιλαμβάνει τρεις τύπους ινιδίων: τα μικροϊνίδια (MFs), τους μικροσωληνίσκους (MTs) και τα ενδιάμεσα ινίδια (IFs). Η διάμετρος των IFs είναι ενδιάμεση της τάξεως των 10-12nm, μεταξύ δηλαδή των μικροϊνιδίων ακτίνης που έχουν διάμετρο 5-8nm και των μικροσωληνίσκων διαμέτρου 25nm. Τα ενδιάμεσα ινίδια ενυπάρχουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών, ενώ η παρουσία τους αμφισβητούνταν μέχρι πρότινος στους μύκητες και τους υπόλοιπους κατώτερους οργανισμούς. Πρόσφατα, όμως, ανακαλύφθηκε ότι τα βακτήρια διαθέτουν μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη, η οποία είναι απαραίτητη για τον καθορισμό του σχήματος στο *Caulobacter crescentus*. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε crescentin και σχηματίζει ενδοκυτταρικά ινίδια, που ομοιάζουν με αυτά των ενδιάμεσων ινιδίων των ευκαρυωτικών κυττάρων [Ausmees et al., 2003].

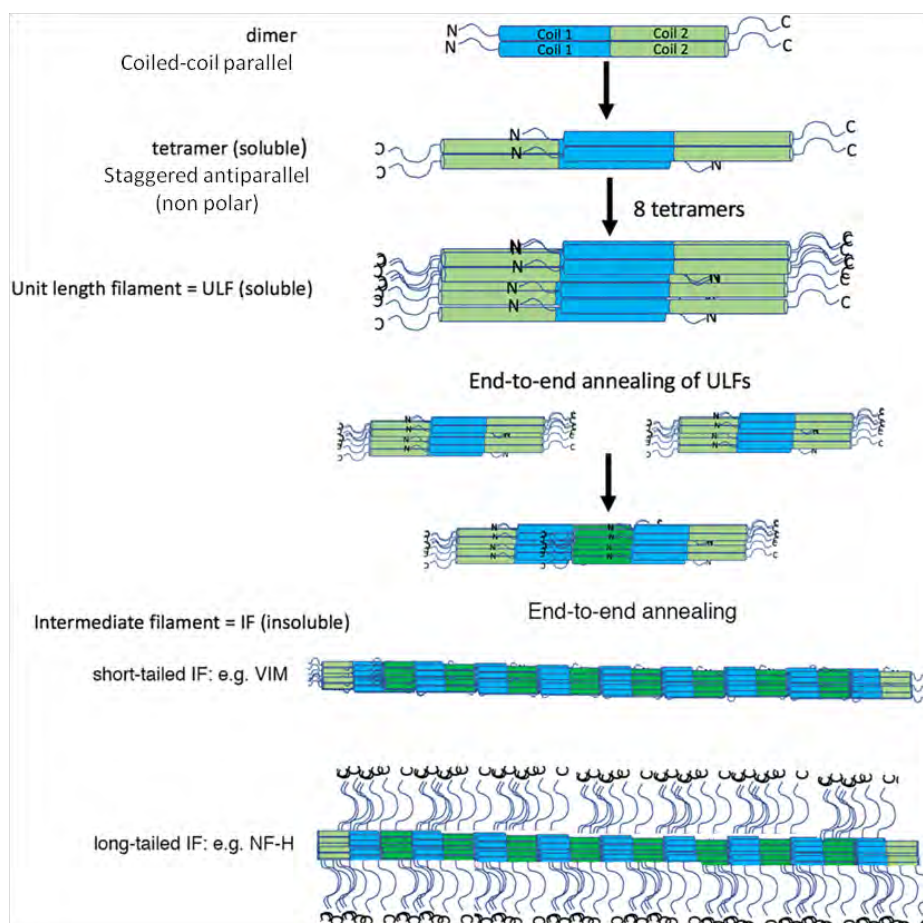
Εξελικτικά, στα ανώτερα μετάρζωα, είναι αξιοσημείωτο ότι μεγάλες οικογένειες γονιδίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων. Από την άλλη, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι διαφορετικές πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, ενώ εμφανίζουν διαφορετική πρωτοταγή δομή και βιοχημικές ιδιότητες, παρόλα αυτά όλες μοιράζονται ένα κοινό δομικό πλαίσιο, διατηρώντας παράλληλα την ιστοειδικότητά τους [Herrmann and Aebi, 2004]. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί και αλληλουχηθεί περίπου 70 γονίδια, καθώς και τα ορθόλογά τους σε διάφορα είδη [Conway and Parry, 1988; Herrmann and Aebi, 1998; Hesse et al., 2001]. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι πρόσφατα δεδομένα ανατρέπουν την υπόθεση ότι στα αρθρόποδα δεν εκφράζονται κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες IFs και υπάρχουν μόνο οι λαμίνες ως πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων που βρίσκονται στον πυρήνα. Καθώς οι ερευνητές ανακάλυψαν σε ένα είδος αρθρόποδου, στο *Isotomurus maculatus*, μια νέα πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων, η οποία βρέθηκε στο κυτταρόπλασμα και την ονόμασαν isomin [Mencarelli et al., 2011]. Επίσης, και στη *Drosophila melanogaster* αναγνωρίστηκε πρόσφατα μια κυτταροπλασματική, μη τυπική τροπομοσίνη (Tm1-I/C) με ιδιότητες αντίστοιχες με μια πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων [Cho et al., 2016].

Δομή

Οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων εμφανίζουν μια κοινή τριμερή δομή, που αποτελείται από μια αμφιπαθή κεντρική περιοχή συσπειρωμένης σπείρας (coiled-coil) α -ελίκων (rod domain) και πλαισιώνεται από τις πιο εύκαμπτες μη α -ελικοειδείς περιοχές, την «κεφαλή» (head domain) (στο αμινοτελικό άκρο) και την «ουρά» (tail domain) (στο καρβοξυτελικό άκρο).

Βασική μονάδα δόμησης των ενδιάμεσων ινιδίων αποτελούν τα διμερή μόρια, τα οποία αποτελούνται από δύο παράλληλες και στη σειρά πρωτεϊνικές αλυσίδες. Ειδικότερα, τέσσερα coiled-coil τμήματα, που διακόπτονται από τρεις κοντούς

συνδέτες (L1, L12 και L2), δημιουργούν 40-45nm μακριά ραβδοειδή διμερή με μέση διάμετρο 2nm [Kreplak et al., 2004; Goldman et al., 1999; Strelkov et al., 2003]. Αντιθέτως, τα τετραμερή δομούνται αντιπαράλληλα από γραμμικές συστοιχίες διαβαθμισμένων διμερών. Στην Εικόνα 1.1 περιγράφεται με λεπτομέρεια σχηματικά η πορεία που ακολουθείται για τη δημιουργία των ενδιάμεσων ινιδίων. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων με τις πυρηνικές έχουν μια βασική διαφορά όσο αφορά τη διαδικασία συγκρότησης και αυτή είναι ότι τα διμερή ενώνονται πρώτα πλευρικά από τις ακροτελικές τους περιοχές, head-to-tail.



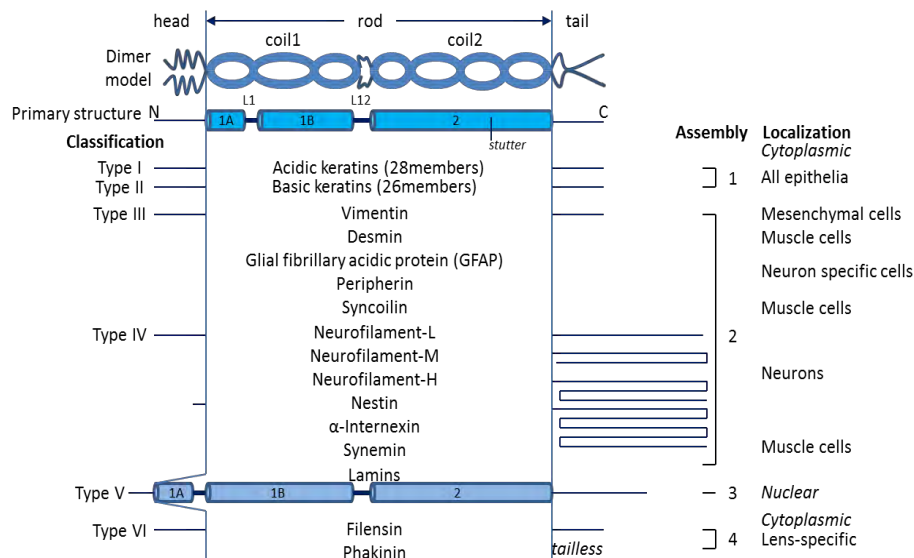
Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας των ενδιάμεσων ινιδίων (για παράδειγμα της βιμεντίνης και των νευροϊνιδίων (neurofilament, NF-H) [Bott and Winckler, 2020].

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκρότηση των IFs είναι μια διαδικασία τριών σταδίων:

1. Αρχικά, τα τετραμερή μόρια πρωτεϊνών IFs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δεσμεύονται πλευρικά σχηματίζοντας μια δομή με διάμετρο περίπου 60nm που ονομάζεται ULF (Unit Length Filaments).
2. Έπειτα, οι δομές των ULFs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, διαμορφώνοντας τα πρώιμα ινίδια με μήκος αρκετών εκατοντάδων nm.
3. Τέλος, οι επιμήκεις δομές των πρώιμων ινιδίων μετατρέπονται με ακτινική συμπίεση, χωρίς μεταβολή του λόγου μάζας/ μήκος, σε ώριμα ενδιάμεσα ινίδια. Συμβαίνει, λοιπόν, μεταβολή της διαμέτρου, η οποία ορίζεται στα

ώριμα IFs περίπου στα 11nm (πχ βιμεντίνη 10nm, δεσμίνη 14nm) [Strelkov et al., 2003].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι rod περιοχές από τους διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων εμφανίζουν πάνω από 90% αλληλουχική ομοιότητα μεταξύ τους (Εικόνα 1.2). Η αλληλουχία/ δομή της rod περιοχής είναι αυτή που ξεχωρίζει τις πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων από τις άλλες πρωτεΐνες που σχηματίζουν συσπειρωμένες σπείρες (coiled coils) και είναι αυτή που καθορίζει τα γνήσια ενδιάμεσα ινίδια. Αντιθέτως, οι περιοχές κεφαλή και ουρά ποικίλουν, καθώς διαφέρουν στο μήκος και την αλληλουχία τους (Εικόνα 1.2). Ωστόσο, οι περιοχές αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην τελική συγκρότηση των ενδιάμεσων ινιδίων όσο και στην αλληλεπίδραση των IFs με άλλες πρωτεΐνες, φαινόμενα τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω. Μάλιστα, πιθανολογείται ότι η αλληλεπίδραση είναι εφικτή καθώς οι ακροτελικές περιοχές προεξέχουν από τα πλήρως σχηματιζόμενα ενδιάμεσα ινίδια, επιτρέποντας έτσι την πρόσβαση σε άλλες πρωτεΐνες [Coulombe et al., 2001; Goldman et al., 1999].

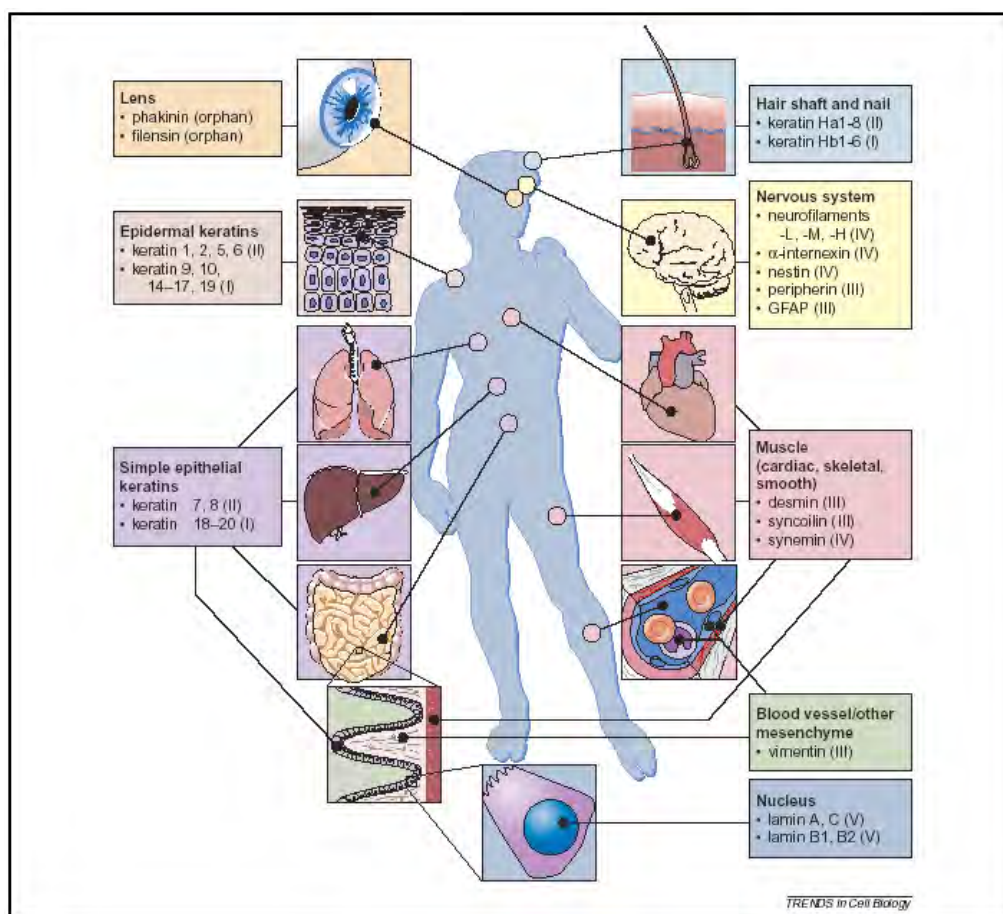


Εικόνα 1.2 Ομολογία των ενδιάμεσων ινιδίων σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση (I-VI), τον κυτταρικό τύπο που εντοπίζονται και τον τρόπο διαμόρφωσής τους [Tsilafakis and Mavroidis, 2024].

Πιθανόν, κατά την εξέλιξη οι περιοχές κεφαλή και ουρά να προσαρμόστηκαν στις ανάγκες του εκάστοτε κυττάρου, ώστε να διαμορφώσουν μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων, κατάλληλη για έναν κυτταρικό τύπο και ακατάλληλη για έναν άλλο. Στην Εικόνα 1.2 παρατηρείται επίσης ο καταμερισμός των πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων στους διαφορετικούς τύπους (I-V), ενώ στην Εικόνα 1.3 απεικονίζεται η ιστοειδική κατανομή αυτών στον άνθρωπο. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι περισσότεροι τύποι των ενδιάμεσων ινιδίων εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ μόνο ο τύπος V, που περιλαμβάνει τις λαμίνες, οριοθετείται εντός του πυρήνα.

Τα ενδιάμεσα ινίδια φαίνεται πως δρουν σε πολλαπλά επίπεδα. Μέσω μηχανικών και μη-μηχανικών επιδράσεων λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών και υποκυτταρικών διαδικασιών, λειτουργώντας ως αισθητήρες στρες ή στην πρωτεϊνική στόχευση [Toivola et al., 2005]. Επιπλέον, *in*

νίνο υποδεικνύεται ότι τα ενδιάμεσα ινίδια αλληλεπιδρούν συνεργατικά με κυτταροσκελετικά συστατικά, όπως είναι κινητικές πρωτεΐνες και τύπου-πλακίνης πρωτεΐνες [Herrmann and Aebi, 2000]. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις στα ενδιάμεσα ινίδια σχετίζονται με περισσότερες από 30 ασθένειες [Toivola et al., 2005].



Εικόνα 1.3 Κατανομή των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων στο ανθρώπινο σώμα, όπου διακρίνεται η ιστοειδική τους έκφραση [Toivola et al., 2005].

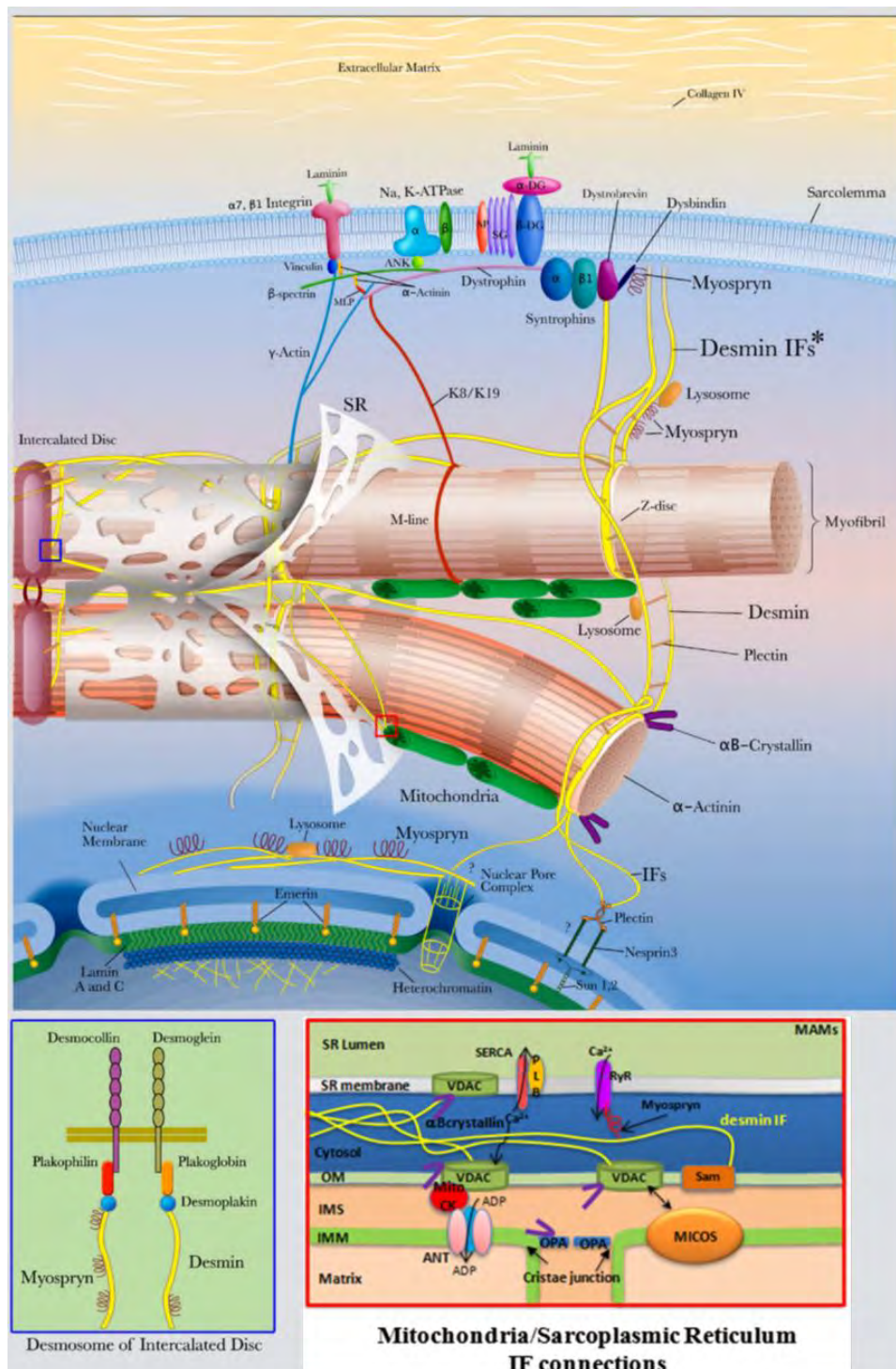
1.2 Δεσμίνη

Η δεσμίνη είναι μία μυο-ειδική πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων, η οποία δημιουργεί ένα κυτταροσκελετικό δίκτυο που εκτείνεται σε όλο το μυοκαρδιοκύτταρο και συνδέει τη συσταλτή συσκευή των σαρκομερών, στο επίπεδο των z-δίσκων, με τα κοσταμερή και τους εμβόλιμους δίσκους (intercalated discs, IDs) στη κυτταροπλασματική μεμβράνη, με τον πυρήνα, αλλά και με άλλα μεμβρανώδη οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, το σαρκοπλασματικό δίκτυο (sarcoplasmic reticulum, SR) και τα λυσοσώματα (Εικόνα 1.4) [Capetanaki et al., 2007]. Η δεσμίνη ανακαλύφθηκε από τους Lazarides και Hubbard το 1976 που της έδωσαν το όνομα «desmin» από την ελληνική λέξη δεσμός, λόγω της πρόσδεσής της με τα σαρκομερή [Lazarides and Hubbard, 1976]. Το γονίδιο της δεσμίνης αποτέλεσε το πρώτο από τα ενδιάμεσα ινίδια που πραγματοποιήθηκε η πλήρης αλληλούχισή του [Capetanaki et

al., 1984] και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 2q35m στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 1 στη ζώνη C3 στο ποντίκι. Το γονίδιο περιλαμβάνει 9 εξόνια και 8 ιντρόνια και κωδικοποιεί ένα 2,1kb mRNA και μία 52kDa πρωτεΐνη (470 αμινοξέα) [Carlsson and Thornell, 2001].

Η δεσμίνη εκφράζεται σε όλους τους τύπους των μυών (καρδιακό, σκελετικό και λείο μυ) ως η κατεξοχήν πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων [Capetanaki et al., 2007]. Για την εύρυθμη λειτουργία του ζωτικής σημασίας καρδιακού μυ απαιτείται συντονισμός υψηλής ακρίβειας από ποικίλα κυτταροπλασματικά και πυρηνικά συστατικά του κυττάρου. Το δίκτυο των IFs δεσμίνης αποτελεί θεμελιώδη δομή των μυοκαρδιοκυττάρων, καθώς έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με πολυάριθμες βασικές κυτταρικές δομές συμβάλλοντας στην ανίχνευση, καθώς και στην ορθή μετάδοση των μηχανικών ερεθισμάτων [Capetanaki et al., 2007, 2015; Tsikitis et al., 2018].

Σε συμφωνία με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, η δεσμίνη παρουσιάζει την κλασική τριμερή δομή. Σχετικά με την ομολογία μεταξύ των ειδών, η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας ανάμεσα στη δεσμίνη από το ποντίκι και στη δεσμίνη από άλλα είδη αποκάλυψε μεγάλη ομοιότητα, με μεγαλύτερη αυτή από το hamster (98,7%), τον άνθρωπο (95,1%) και την όρνιθα (80,2%). Ενώ, η σύγκριση της δεσμίνης με άλλες πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων αποκάλυψε μεγάλη ομολογία με τη βιμεντίνη (61%) [Li et al., 1994].



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση του καρδιακού κυτταροσκελετικού δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης και οι αλληλεπιδράσεις του με τις διαφορετικές μεμβρανώδεις δομές και οργανίδια. Η μυο-ειδική πρωτεΐνη δεσμίνη (κίτρινο), μαζί με τις σχετιζόμενες με αυτή πρωτεΐνες, δημιουργεί ένα εκτενές ικρίωμα που διασυνδέει ολόκληρη τη συσταλή συσκευή στους z-δίσκους με τις διάφορες μεμβρανώδεις δομές στα κοσταμερή της σαρκοπλασματικής μεμβράνης και τα δεσμοσώματα των IDs (μεγεθυμένο μπλε πλαίσιο/ κάτω αριστερά) και με τα κυτταρικά οργανίδια (πυρήνα, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα και σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η συσχέτιση ανάμεσα στα ινίδια δεσμίνης και λαμίνης διευκολύνει τη μεταγωγή των μηχανικών ερεθισμάτων από τη σαρκοπλασματική μεμβράνη και τη συσταλή συσκευή προς τον πυρήνα. Το δίκτυο της δεσμίνης συμβάλλει στη διατήρηση της σωστής εγγύτητας των οργανιδίων γεγονός που συντελεί τόσο στην επιτυχή βιογένεση όσο και στη λειτουργική αλληλεπίδρασή τους όπως συμβαίνει στις θέσεις διασύνδεσης μεταξύ SR και μιτοχονδρίων (MAMs, mitochondria associated membranes) (μεγεθυμένο κόκκινο πλαίσιο/ κάτω δεξιά). Επίσης, απεικονίζεται η πρόσφατη συχετιζόμενη με τη δεσμίνη πρωτεΐνη, μυοσπρίνη, η οποία φαίνεται να εδράζεται περιφερικά του πυρήνα, στα κοσταμερή και τους IDs, καθώς και στα λυσοσώματα. Το

δίκτυο IFs κερατίνης (K8/K18) (κόκκινο) δεν εκφράζεται φυσιολογικά στο μυοκάρδιο και αφορά την εναλλακτική εκτοπική έκφραση του στην περίπτωση του μοντέλου TNF- α καρδιακής ανεπάρκειας ως αντισταθμιστικό μηχανισμό [Parathanasiou et al., 2015]. Οι λιγότερο πολυπληθής μη μυοειδικές πρωτεΐνες synemin, paranemin και syncoilin δεν απεικονίζονται [Capetanaki et al., 2007; Tsikitis et al., 2018].

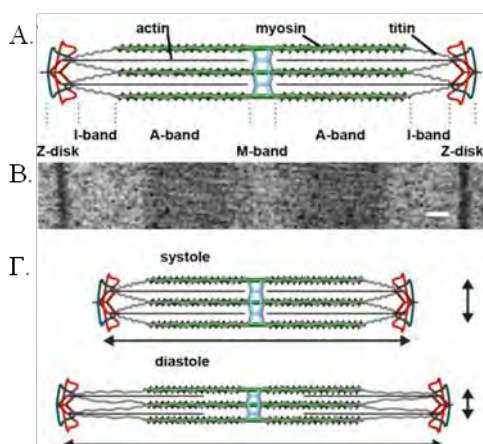
1.2.1 Ο ρόλος της δεσμίνης

Για αρκετά χρόνια, ο μοναδικός ρόλος που αποδίδονταν στη δεσμίνη ήταν καθαρά μηχανικός, μιας και αποτελεί μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού. Πλέον, όμως, έχουν διασαφηνιστεί και αποδειχθεί πολλοί ακόμα ρόλοι της δεσμίνης πέραν της μηχανικής σταθερότητας των μυών. Η δεσμίνη, βάσει του δικτύου της και των διασυνδέσεών της, μπορεί μηχανικά να συγκροτεί όλες τις συσταλτές δομές μιας μυϊκής ίνας. Η λειτουργία αυτή επιτελείται μέσω της ένωσης πλευρικά των μυϊκών ινών στην περιφέρεια των z-δίσκων και μέσω της διασύνδεσης των z-δίσκων με τη σαρκοπλασματική μεμβράνη, την πυρηνική μεμβράνη και άλλα κυτταρικά οργάνδια [Capetanaki et al., 2007]. Το δίκτυο των IFs αποτελεί ένα εύκαμπτο, ελαστικό και με τάση επέκτασης δομικό κυτταρικό συστατικό [Sanghvi-Shah and Weber, 2017], το οποίο μπορεί να αποτελέσει βάση για πολυάριθμες πρωτεΐνες που δρουν είτε ως αισθητήρες (mechanosensors) είτε ως μεταγωγείς (mechanotransducers) του σήματος της μηχανικής τάσης [Pawelzyk et al., 2014]. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ανταποκρίνονται άμεσα στα μηχανικά ερεθίσματα μεταδίδοντας τις δομικές, σηματοδοτικές και λειτουργικές μεταβολές και συνεπώς να επηρεάζουν πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες, καταλήγοντας ορισμένες φορές ίσως και στην αναδιαμόρφωση των μυοϊνιδίων.

Σαρκομερή

Τα σαρκομερή είναι υψηλής οργάνωσης σύμπλοκα πολλαπλών πρωτεϊνών, τα οποία ευθυγραμμίζονται κατά μήκος, ώστε να αποδίδουν τη χαρακτηριστική γραμμωτή διαμόρφωση των κυττάρων του μυοκαρδίου και των σκελετικών μυών (Εικόνα 1.5). Η συγκρότηση και σταθερότητα των σαρκομερών είναι απαραίτητη για τη μυϊκή σύσπαση. Τα σαρκομερή αποτελούνται κυρίως από τα λεπτά ινίδια ακτίνης, τα πυκνά ινίδια μυοσίνης και τα ελαστικά ινίδια τιτίνης. Η ζώνη-A σχηματίζεται από παράλληλα ευθυγραμμισμένα ινίδια μυοσίνης στο κέντρο των σαρκομερών, ενώ η ζώνη-I συντίθεται από ινίδια ακτίνης και τιτίνης μεταξύ της ζώνης-A και των z-δίσκων [Ahmed et al., 2022]. Γενικά, η σύνθεση των σαρκομερών περιλαμβάνει πάνω από 200 πρωτεΐνες, οι οποίες δομούνται συνεχώς, τροποποιούνται και αποικοδομούνται προκειμένου να διατηρήσουν την καρδιακή λειτουργία [Martin and Kirk, 2020]. Η τιτίνη είναι η μεγαλύτερη πρωτεΐνη και εκτείνεται στο μισό σαρκομερές, συνδέεται στους z-δίσκους και στα ινίδια ακτίνης με το αμινοτελικό άκρο της και στα ινίδια μυοσίνης και τη ζώνη-M με το καρβοξυτελικό της άκρο [Ahmed et al., 2022]. Από την άλλη η δεσμίνη συνδέεται με τη νεμπουλετίνη (nebulin) [Hernandez et al., 2016], η οποία σταθεροποιεί τα ινίδια ακτίνης στα καρδιακά σαρκομερή. Η νεμπουλετίνη επίσης αλληλεπιδρά με την τιτίνη και την α -

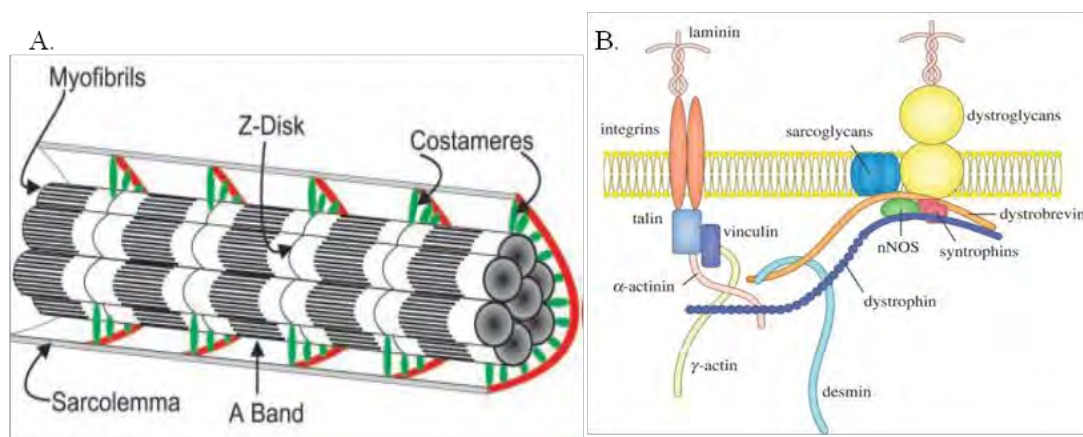
ακτινίνη στους z-δίσκους [Bang and Chen, 2015]. Ένα καλά δομημένο δίκτυο δεσμίνης φαίνεται να είναι απαραίτητο για τη βέλτιστη διαμόρφωση της νεμπουλετίνης στα σαρκομερή, ώστε να προσδέσει την ακτίνη, δρώντας συνεργατικά [Hernandez et al., 2016]. Από την άλλη, στη μυϊκή ατροφία, έχει παρατηρηθεί ότι διαταραχές κατά τον αποπολυμερισμό των ινιδίων δεσμίνης επηρεάζουν τη σταθερότητα των z-δίσκων, επηρεάζοντας έτσι ταυτόχρονα τις άμεσα σχετιζόμενες πρωτεΐνες, όπως είναι τα ινίδια ακτίνης, αλλά και τα αλληλένδετα ινίδια μυοσίνης, οδηγώντας τελικά στην κατάρρευση των μυοϊνιδίων [Volodin et al., 2017].



Εικόνα 1.5 Α) Σχηματική απεικόνιση των σαρκομερών. Β) Η υπερδομή των σαρκομερών υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία. Τα σαρκομερή είναι η συστατική μονάδα των μυοκυττάρων. Κάθε σαρκομερές αποτελείται από διαδοχικές σειρές διαπλεκόμενων ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης, ενώ η τιτίνη (titin) εκτείνεται από τους z-δίσκους μέχρι τη μέση των σαρκομερών στη ζώνη Μ. Γ) Η μυϊκή συστολή οφείλεται στη ταυτόχρονη βράχυνση όλων των σαρκομερών, η οποία προκαλείται από την ολίσθηση των ινιδίων ακτίνης πάνω στα ινίδια μυοσίνης, χωρίς μεταβολή του μήκους των δύο ινιδίων [Crocini and Gotthardt, 2021].

Κοσταμερή

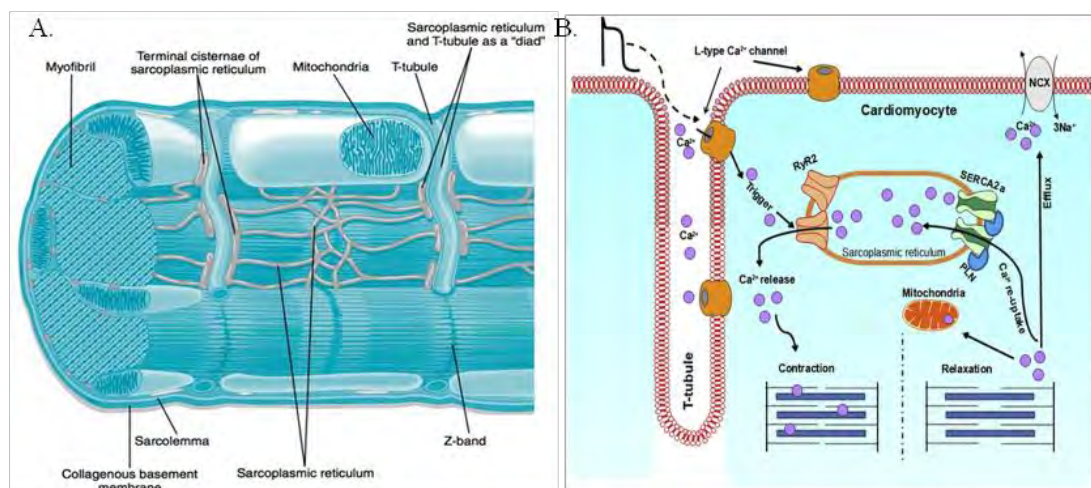
Τα κοσταμερή προσαρτίζουν τους z-δίσκους των μυοϊνιδίων των σαρκομερών στη σαρκοπλασματική μεμβράνη. Τα κοσταμερή είναι διαμεμβρανικές δομές που αποτελούνται από δυο βασικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, το σύμπλοκο δυστροφίνης-γλυκοπρωτεΐνης (dystrophin-glycoprotein complex, DGC) και το σύμπλοκο βινκουλίνης-ταλίνης-ιντεγκρινών (vinculin-talin-integrin complex) (Εικόνα 1.6) [Anastasi et al., 2009]. Η δεσμίνη είναι η πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων που συνδέει τα κοσταμερή στους z-δίσκους [Paulin and Li, 2004] και επίσης συνδέει τους z-δίσκους μεταξύ τους [Milner et al., 2000]. Μέσω των κοσταμερών η δεσμίνη αποτελεί δίαυλο επικοινωνίας, καθώς ενώνει την ενδοκυτταρική συστατική συσκευή των σαρκομερών με το εξωκυττάριο περιβάλλον και την εξωκυττάρια ουσία (Extracellular Matrix, ECM). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να παίζει ρόλο και στη σηματοδότηση μέσω της συσχέτισής της με την ανκυρίνη (ankyrin), η οποία μπορεί να είναι και αμφίδρομη [Martin and Kirk, 2020; Frauen et al., 2015; Ervasti, 2003]. Ενδεικτικά, η δεσμίνη αλληλεπιδρά με τα κοσταμερή μέσω της πλεκτίνης (ισομορφή 1f) [Konieczny et al., 2008] και μέσω της σύνδεσης της συνεμίνης (synemin) με τη δυστροφίνη (dystrophin) [Bhosle et al., 2006] και τη δυστρομπρεβίνη (dystrobrevin) [Mizuno et al., 2001].



Εικόνα 1.6 Α) Σχηματική απεικόνιση των κοσταμερών ως περιμετρικά στοιχεία, τα οποία συνδέουν περιφερικά τα μυοϊνίδια στη σαρκοπλασματική μεμβράνη στο επίπεδο των περιοδικών z-δίσκων [Ervasti, 2003]. Β) Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων των κοσταμερών και των επιμέρους σχετιζόμενων πρωτεϊνών [Ahmed et al., 2022].

Ζεύγος T-tubules και SR

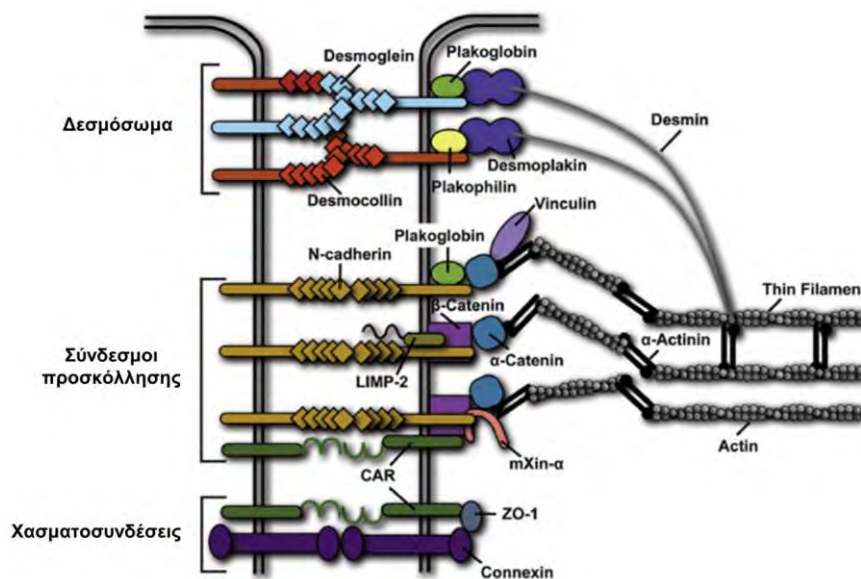
Οι εγκάρσιοι μεμβρανικοί σωλινίσκοι (transverse tubules, T-tubules), οι οποίοι αποτελούν εγκολπώσεις της σαρκοπλασματικής μεμβράνης επιτρέπουν σε κανάλια τάσης ασβεστίου (voltage gated calcium channels) όπως είναι ο υποδοχέας DHPR (dihydropyridine receptor) να έρθουν σε σύζευξη με υποδοχείς ρυανοδίνης (ryanodine receptors) του σαρκοπλασματικού δικτύου [Hong and Shaw, 2017]. Με αυτό τον τρόπο μεταδίδεται το δυναμικό δράσης στο μυοκαρδιοκύτταρο και ενεργοποιείται η σύζευξη διέγερσης-σύσπασης του μυ. Οι T-tubules εντοπίζονται γύρω από τα μυοϊνίδια και προσαρτώνται στους z-δίσκους των σαρκομερών μέσω των κοσταμερών (Εικόνα 1.7) [Hong and Shaw, 2017]. Η δεσμίνη μέσω της σύνδεσής της με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη του σαρκοπλασματικού δικτύου STIM-1 (stromal interaction molecule-1) συμμετέχει στην ομοιόσταση του ασβεστίου και τη συσταλτικότητα του σκελετικού μυ [Zhang et al., 2021]. Η απώλεια και η αναδιαμόρφωση των σύνθετων T-tubules στην καρδιακή ανεπάρκεια, όχι μόνο προκαλεί διαταραχή της συσταλτικής λειτουργίας λόγω των διαταραγμένων συζεύξεων με το SR και της επακόλουθης διατάραξης της διέγερσης-σύσπασης, αλλά διαταράσσει τη συγκέντρωση ιόντων και αυξάνει τη κοιλιακή αρρυθμία [Hong and Shaw, 2017].



Εικόνα 1.7 Α) Σχηματική απεικόνιση των ζευγών T-tubule και SR στο επίπεδο των z-δίσκων. Β) Η ενδοκυτταρική ροή του ασβεστίου κατά τη διέγερση-συστολή του μυοκαρδιοκυττάρου, όπου απεικονίζονται τα πιο αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα και οργανίδια που εμπλέκονται στη σύζευξη καρδιακής διέγερσης-συστολής, όπως το ζεύγος των καναλιών ασβεστίου των T-tubules με τους υποδοχείς ρυανοδίνης του SR, τα σαρκομερή, τα μιτοχόνδρια, κα [Mahmoodzadeh and Dworatzek, 2019].

Εμβόλιμοι δίσκοι

Η δεσμίνη αλληλεπιδρά στους εμβόλιμους δίσκους με τη δεσμοπλακίνη (desmoplakin) των δεσμοσωμάτων (desmosomes) [Lapouge et al., 2006; Sheikh et al., 2009]. Οι εμβόλιμοι δίσκοι αποτελούν σύνθετες δομές της πλασματικής μεμβράνης που εντοπίζονται μόνο στην καρδιά και παρεμβάλλονται μεταξύ παρακείμενων μυοκαρδιοκυττάρων. Παίζουν ρόλο τόσο στη διακυτταρική συνοχή, όσο και στη μετάδοση ηλεκτρικού δυναμικού μεταξύ των κυττάρων. Κάθε εμβόλιμος δίσκος στοιχειοθετείται από πολυάριθμες πρωτεΐνες και αποτελείται από τρεις βασικούς τύπους συνδέσεων: τα δεσμοσώματα, τους συνδέσμους προσκόλλησης (fascia adherens junctions), και τους χασματοσυνδέσμους (gap junctions) (Εικόνα 1.8) [Franke et al., 2006; Li and Radice, 2010; Sheikh et al., 2009]. Τα δεσμοσώματα καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του εμβόλιμου δίσκου και είναι ο βασικότερος κυτταρικός τύπος πρόσδεσης που συνδέει την κυτταρική μεμβράνη με το δίκτυο της δεσμίνης. Είναι θεμελιώδους σημασίας για τη σύζευξη, την προσκόλληση και τη συντονισμένη διέγερση (μεταγωγή του ηλεκτρικού σήματος) μεταξύ των μυοκαρδιοκυττάρων [Franke et al., 2006]. Ως εκ τούτου η διατάραξη της ακεραιότητας αυτών των δομών θέτει σε κίνδυνο αυτές τις λειτουργίες και συχνά εκδηλώνεται με αρρυθμίες και διαταραχές αγωγιμότητας που συνοδεύουν την καρδιακή ανεπάρκεια. Η σταθερότητα της δεσμοπλακίνης (δεσμοσώματα) και της πλακογλοβίνης (plakoglobin) (δεσμοσώματα και σύνδεσμοι προσκόλλησης) στα IDs εξαρτάται κυρίως από το άρτια δομημένο δίκτυο ινιδίων δεσμίνης [Panagopoulou et al., 2008; Papathanasiou et al., 2015; Galata et al., 2018], ενώ η κοννεξίνη-43 (χασματοσυνδέσεις) από την αλληλένδετη σχέση της δεσμίνης-μυοσπρίνης [Tsoupru et al., 2021].



Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση των βασικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και συστατικών που απαρτίζουν τους εμβόλιμους δίσκους στην καρδιά. Τα δεσμοσώματα συνδέονται με τα ενδιάμεσα ινίδια δεσμίνης και οι σύνδεσμοι προσκόλλησης με τα ινίδια ακτίνης [Sheikh et al., 2009].

Πυρήνας

Σπουδαίας σημασίας για το μυοκαρδιοκύτταρο είναι η στενή σχέση μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης και λαμίνης, καθώς φαίνεται ότι λειτουργεί ως ένα πολύ σημαντικό σημείο ολοκλήρωσης της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας μεταφέροντας τα ερεθίσματα από το ECM προς τον πυρήνα (Εικόνα 1.4) [Capetanaki et al., 2015]. Η λειτουργική διασύνδεση ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και το εσωτερικό του πυρήνα επιτελείται εξίσου από τα σύμπλοκα σύνδεσης του πυρηνικού σκελετού με τον κυτταροσκελετό (linkers of nucleoskeleton to cytoskeleton complexes, LINC) όσο και διαμέσου των πυρηνικών πόρων [Capetanaki et al., 2007; Cattin et al., 2013; Georgatos and Blobel, 1987; Lockard and Bloom, 1993]. Η διατήρηση της αρχιτεκτονικής του κυττάρου και της σηματοδότησης εξαρτάται σημαντικά από τη σωστή σύζευξη μεταξύ των κυτταροσκελετικών συστημάτων του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος [Capetanaki et al., 2015; Tsikitis et al., 2018]. Ειδικά, κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής και χαλάρωσης, όπου το σχήμα και η μορφολογία του πυρήνα τροποποιείται. Για παράδειγμα φαίνεται ότι τα ενδιάμεσα ινίδια δεσμίνης «τραβούν» τον πυρηνικό φάκελο, μεταβάλλοντας ενεργά το σχήμα του πυρήνα και ενδεχομένως τη διαμόρφωση της ετεροχρωματίνης. Το δίκτυο της δεσμίνης εκτείνεται από τους περιπυρηνικούς z-δίσκους προς τους πυρηνικούς πόρους, όπου περιστοιχίζονται τα ινίδια λαμίνης Β που αλληλεπιδρούν με την ετεροχρωματίνη [Lockard and Bloom, 1993]. Επιπλέον, παλαιότερες *in vitro* μελέτες υποδεικνύουν ότι η δεσμίνη συνδέεται άμεσα με τη λαμίνη Β μέσω των καρβοξυτελικών περιοχών (tail-tail) [Georgatos et al., 1987], χωρίς όμως αυτή η αλληλεπίδραση να έχει αποδειχθεί *in vivo*. Επίσης, είναι γνωστό ότι η δεσμίνη σχετίζεται άμεσα με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο myoD που παίζει ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των μυών [Li et al., 1994], ο DUX4 που είναι ενεργός κυρίως κατά την εμβρυική ανάπτυξη [Ansseau et al., 2016], ο Ankrd1/CARP (Cardiac Ankyrin

Repeat Protein) που μπορεί να μεταφέρεται εντός και εκτός πυρήνα [Witt et al., 2005], υποδηλώνοντας έτσι ότι η δεσμίνη μπορεί να επιδρά έμμεσα στη γονιδιακή ρύθμιση και μυϊκή διαφοροποίηση. Από την άλλη, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η δεσμίνη μπορεί να ρυθμίζει τη δράση μεταγραφικών παραγόντων (πχ myoD, mef2) και ταυτόχρονα να ρυθμίζεται και η ίδια από εκείνους [Capetanaki et al., 2015]. Αξιοσημείωτο δε είναι το γεγονός ότι η δεσμίνη μπορεί να δεσμεύεται απευθείας στο DNA [Wang et al., 2001], με τρόπο που περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο.

Μιτοχόνδρια

Η διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του μυ χρειάζεται μια στενή και αποτελεσματική συσχέτιση ανάμεσα στην παραγωγή και τη ζήτηση ενέργειας. Συνεπώς, η σύζευξη των μιτοχονδρίων με τα σαρκομερή είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση των ενεργειακών απαιτήσεων των μυών. Άλλωστε, οι μιτοχονδριακές διαταραχές είναι ένα πολύ κοινό παθολογικό γνώρισμα των μυοκαρδιοπαθειών που συνδέονται με τη δεσμίνη (δεσμινοπάθειες) και όχι μόνο [Tsikitis et al., 2018].

Η ύπαρξη σε αφθονία της δεσμίνης σε περιοχές πλούσιες σε μιτοχόνδρια, υποστηρίζει την πιθανή επαφή της δεσμίνης με τα μιτοχόνδρια με άμεσο ή έμμεσο τρόπο με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης προσαρμογής (adaptor) [Tokuyasu et al., 1983]. Μελέτες, με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, συνιστούν ότι η συνδετική πρωτεΐνη πλεκτίνη (plectin) πιθανόν συμμετέχει σε αυτή την αλληλεπίδραση [Reipert, 1999]. Η πλεκτίνη διασυνδέει τα τρία συστατικά του κυτταροσκελετού: μικροϊνίδια ακτίνης, ενδιάμεσα ινίδια και μικροσωληνίσκους, καθώς όπως έχει αποδειχθεί αλληλεπιδρά μαζί τους [Wiche, 1998]. Επίσης, υποστηρίζεται ότι η δεσμίνη συμβάλλει όχι μόνο στη σωστή τοπολογία των μιτοχονδρίων και την αναπνευστική λειτουργία στον καρδιακό και σκελετικό μυ [Milner et al., 2000], αλλά και στη λειτουργική αλληλεπίδραση των μιτοχονδρίων με το σαρκοπλασματικό δίκτυο (sarcoplasmic reticulum, SR), καθώς η δεσμίνη εντοπίζεται στις συνδέσεις μεταξύ του SR και των μιτοχονδρίων (mitochondria-associated membranes, MAMs), οι οποίες είναι βασικές δομές για πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών (Εικόνα 1.4) [Diokmetzidou et al., 2016]. Η σύνδεση αυτή πιθανόν διαμεσολαβείται από το τασεο-εξαρτώμενο κανάλι ανιόντων (voltage-dependent anion channel, VDAC) που βρίσκεται τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο SR και φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με τη δεσμίνη. Ο κομβικός ρόλος της δεσμίνης στη λειτουργία των μιτοχονδρίων ενισχύεται και από άλλες αλληλεπιδράσεις, όπως με συστατικά του συμπλέγματος MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) και συγκεκριμένα τις πρωτεΐνες mitofilin, Mic60, Mic19 και Mic27, με την Sam50 στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (outer mitochondrial membrane, OMM) που σχετίζεται με τη μεταφορά πρωτεϊνών, με την OPA1 που λαμβάνει μέρος στη μιτοχονδριακή σύντηξη, καθώς και με τη β υπομονάδα της ATP συνθάσης [Diokmetzidou et al., 2016]. Η σχετική χωροθέτηση του SR και των μιτοχονδρίων παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του ασβεστίου και στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Επιπρόσθετα, στο χαρακτηριστικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας με έλλειψη δεσμίνης Des^{-/-},

στα μυοκαρδιοκύτταρα, τα μιτοχόνδρια εντοπίζονται διογκωμένα και χαρακτηρίζονται από μειωμένη πυκνότητα των δομών cristae της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Η μιτοχονδριακή πρωτεομική ανάλυση σε καρδιές από Des-/- ποντίκια έδειξε μια γενικευμένη ανασύνθεση του πρωτεόματος που μεταβάλλει πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως την απόπτωση, τον μεταβολισμό, την οξείδωση λιπιδίων, το NADH μονοπάτι, τον καταβολισμό αμινοξέων, την αναδιαμόρφωση του αναπνευστικού συμπλόκου που εμπλέκονται στην εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας [Fountoulakis et al., 2005; Capetanaki et al., 2007]. Οι μιτοχονδριακές ανωμαλίες φαίνεται άλλωστε να είναι βασικό χαρακτηριστικό σε πολλά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας με την άμεση ή έμμεση σύνδεση του δικτύου IFs δεσμίνης [Capetanaki et al., 2015; Tsikitis et al., 2018].

Λυσοσώματα

Επιπρόσθετα, η δεσμίνη υποστηρίζεται ότι σχετίζεται και με τα λυσοσώματα, σημαντικά κυτταρικά οργανίδια στην κυτταρική φυσιολογία. Σύμφωνα με δεδομένα του εργαστηρίου υποδεικνύεται ότι απουσία δεσμίνης (Des-/-) τα λυσοσώματα αδυνατούν να κατανεμηθούν ευρέως στο κυτταρόπλασμα, αλλά συγκεντρώνονται περιπυρηνικά [Kouloumenta et al., 2007]. Από την άλλη, η δεσμίνη έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με τη μυοσπρίνη (myosprin) [Kouloumenta et al., 2007], μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τα λυσοσώματα από την αλληλεπίδρασή της με τη dysbindin [Benson et al., 2004]. Επιπλέον, η μυοσπρίνη, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.4, συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη στην κυτταρική μεμβράνη και σε μεμβρανώδη οργανίδια [Kouloumenta et al., 2007; Tsoupry and Capetanaki, 2013]. Για παράδειγμα, η μυοσπρίνη αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο με τον οποίο η δεσμίνη μπορεί να αλληλεπιδρά με το SR στα μυοκαρδιοκύτταρα [Benson et al., 2017]. Συνάμα, η διαδικασία της αυτοφαγίας, η οποία περιλαμβάνει τη σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα, φαίνεται κι αυτή να επηρεάζεται απουσία δεσμίνης, καθώς σε τομές καρδιακού ιστού Des-/- ποντικών υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία παρατηρούνται ασυνήθιστα μεγάλα αυτοφαγοσώματα [Milner et al., 2000].

Απουσία δεσμίνης

Τέλος, η έλλειψη δεσμίνης μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή μεταβίβαση της σηματοδότησης του μηχανικού στρες (συσχέτιση με διαδικασίες ανάπτυξης και διαφοροποίησης του μυός), καθώς και σε διαταραχές του μεταβολισμού προκειμένου να αντισταθμιστεί η αυξημένη απαίτηση σε ενέργεια [Capetanaki and Milner, 1998]. Εντούτοις, η δεσμίνη δύναται να παίζει ρυθμιστικό ρόλο κατά τη διαδικασία της μυογένεσης [Li et al., 1994; Weitzer et al., 1995].

Σε συμφωνία με τα προαναφερθέντα να αναφέρουμε ότι τα knockout ποντίκια για το γονίδιο της δεσμίνης (Des-/-) εμφανίζουν σοβαρές διαταραχές σε όλους τους τύπους μυών (σκελετικό, λείο και καρδιακό) [Milner et al., 1996; Li et al., 1997]. Βεβαίως, οι πιο σοβαρές επιπλοκές ελλείψει δεσμίνης εντοπίζονται στην καρδιά,

όπου η παροδική υπερτροφία ακολουθείται από την ανάπτυξη διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας (DCM) [Milner et al., 2000], με τελικό στάδιο την καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο, ίνωση, φλεγμονή, ασβεστίωση και πολυάριθμες δομικές μεταβολές. Οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν συγκεχυμένη στοίχιση των μυοϊνιδίων, εξαιτίας της απουσίας της δεσμίνης από τους z-δίσκους, αλλαγή του σχήματος, του εντοπισμού και του μεγέθους του πυρήνα, περιοχές κυτταροπλάσματος χωρίς συσταλτή συσκευή και σοβαρές μιτοχονδριακές ανωμαλίες (απώλεια της σωστής κατανομής, του αριθμού, της μορφολογίας και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων) [Capetanaki, 2000]. Παρά ταύτα, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η απουσία δεσμίνης οδηγεί στις παρατηρούμενες μιτοχονδριακές ανωμαλίες και σε κυτταρικό θάνατο δεν έχει ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί.

1.2.2 Ο ρόλος της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης

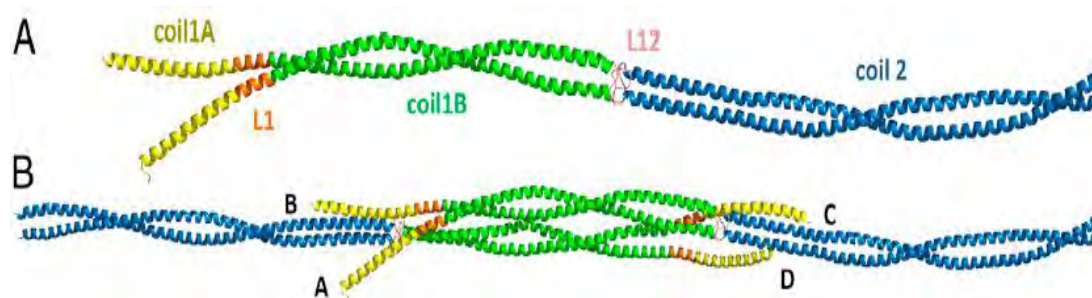
Ο βασικός ρόλος της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης, αλλά και γενικότερα η περιοχή κεφαλή στις πρωτεΐνες IFs, φαίνεται να είναι δομικός και στηρίζεται κυρίως στην ορθή σύνθεση και οργάνωση των τελικά σχηματιζόμενων ενδιάμεσων ινιδίων, οπότε αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω η δομή των IFs.

Δομικός ρόλος

Τα ενδιάμεσα ινίδια λόγω της ιδιαίτερης δομής τους, αποδεικνύεται ότι είναι πιο εύκαμπτα, επεκτάσιμα και ανθεκτικά σε σύγκριση με τα μικροϊνίδια και τους μικροσωληνίσκους [Kreplak and Fudge, 2007]. Σε μεγάλες κυτταρικές παραμορφώσεις, όπου οι δομές των μικροϊνιδίων και των μικροσωληνίσκων σπάνε, τα ενδιάμεσα ινίδια παραμένουν ελαστικά και ανθεκτικά και συγκρατούν τη συνολική δομή του κυττάρου. Η ελαστικότητα αυτή μπορεί να οφείλεται στην εύκαμπτη και επιμήκη βασική δομική μονάδα των ενδιάμεσων ινιδίων που είναι τα τετραμερή. Τα τετραμερή συνυφαίνονται κατά τον πολυμερισμό, περιπλέκοντας τον δομικό χαρακτηρισμό των IFs. Επίσης, σε αντίθεση με τα ινίδια ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους που αποτελούνται από σφαιρικές πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων περιλαμβάνουν, όπως έχει αναφερθεί, τα ευπροσάρμοστα άκρα τους που είναι δομές χαμηλής πολυπλοκότητας αλλά και τους εύκαμπτους συνδέτες που ευνοούν αυτή την ελαστικότητα. Βέβαια, η ιδιαίτερη αυτή δομή των ενδιάμεσων ινιδίων είναι που δυσχεραίνει την απομόνωση και κρυστάλλωση των πρωτεϊνών ή και των επιμέρους δομών αυτών, οπότε τα δομικά αποτελέσματα που έχουν προκύψει είναι τμηματικά.

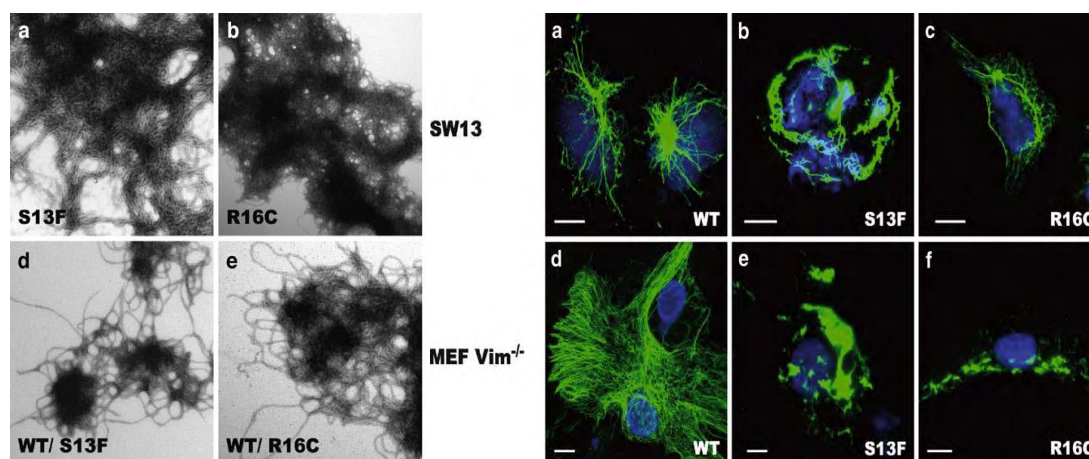
Σημειώνεται ότι το πρόσφατο δομικό μοντέλο της rod περιοχής της δεσμίνης έχει προκύψει από τις δομικές αναλύσεις της πολύ κοντινής βάσει ομολογίας πρωτεΐνης βιμεντίνης (vimentin), που συγκαταλέγεται στον τύπο III των ενδιάμεσων ινιδίων. Σύμφωνα με τα κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα, αξιοσημείωτο είναι

επίσης το γεγονός ότι η δομή της σπείρας-2 στη βιμεντίνη είναι συνεχής ελικοειδής χωρίς τον συνδέτη L2 (Εικόνα 1.9) [Chernyatina et al., 2012].



Εικόνα 1.9 Η 3D δομή διμερών και τετραμερών μορίων βιμεντίνης. Α) Η δομή της σπείρας-1 (coil-1) (με τη σπείρα-1A, τον συνδέτη L1 και τη σπείρα-1B να απεικονίζονται με κίτρινο, πορτοκαλί και πράσινο αντίστοιχα) και η δομή της σπείρας-2 (μπλε), βασίζονται στην υπέρθεση των κρυσταλλικών δομών τους. Ο συνδέτης L12, για τον οποίο δεν υπάρχουν κρυσταλλογραφικά δεδομένα απεικονίζεται με ροζ. Οι εύκαμπτες περιοχές κεφαλή και ουρά, για τις οποίες επίσης δεν υπάρχουν κρυσταλλογραφικές πληροφορίες, δεν απεικονίζονται. Β) Η δομή του τετραμερούς βιμεντίνης αποτελείται από δυο αντιπαράλληλα διμερή, όπως προκύπτει από τη κρυσταλλική δομή (PDB entry 3UF1) [Chernyatina et al., 2012].

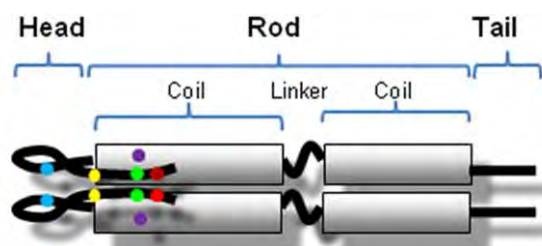
Ο δομικός ρόλος της περιοχής κεφαλή, στηρίζεται κυρίως στη σωστή συναρμολόγηση και δημιουργία των τελικά σχηματιζόμενων ενδιάμεσων ινιδίων ήδη από τα πρώτα στάδια, αφού ανασυνδυασμένα μόρια βιμεντίνης χωρίς την περιοχή κεφαλή από άνθρωπο ή βάτραχο ήταν αδύνατο να σχηματίσουν ινίδια, ακόμα και κάτω από ιδανικές συνθήκες [Herrmann et al., 1996]. Η περιοχή κεφαλή φαίνεται ότι διαδραματίζει κομβικό ρόλο, ήδη από το στάδιο σχηματισμού των τετραμερών, αφού μεταλλαγμένα μόρια βιμεντίνης (εκτεταμένη εξάλειψη του αμινοτελικού άκρου) δε συναρμολογούνταν πέρα από το στάδιο των διμερών [Herrmann et al., 1996]. Ομοίως, μεταλλάξεις στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης επηρέασαν τη συναρμολόγηση και την ανάπτυξη του δικτύου των ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης σε ειδικές κυτταρικές σειρές (Εικόνα 1.10) [Sharma et al., 2009].



Εικόνα 1.10 Διαταραχές στη συναρμολόγηση και οργάνωση του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης εξαιτίας μεταλλαγών στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης. Μελέτες επιμόλυνσης με μεταλλαγμένες μορφές δεσμίνης στην περιοχή κεφαλή (S13F και R16C) σε SW13 κύτταρα και σε εμβρυικούς ινοβλάστες μυών *vim*^{-/-}, όπου και στις δυο κυτταρικές σειρές απουσιάζουν ενδογενώς κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων [Sharma et al., 2009].

Επίσης, η σημαντικότητα της περιοχής κεφαλή ενισχύεται από τις αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένες περιοχές της ραβδοειδούς κεντρικής περιοχής για

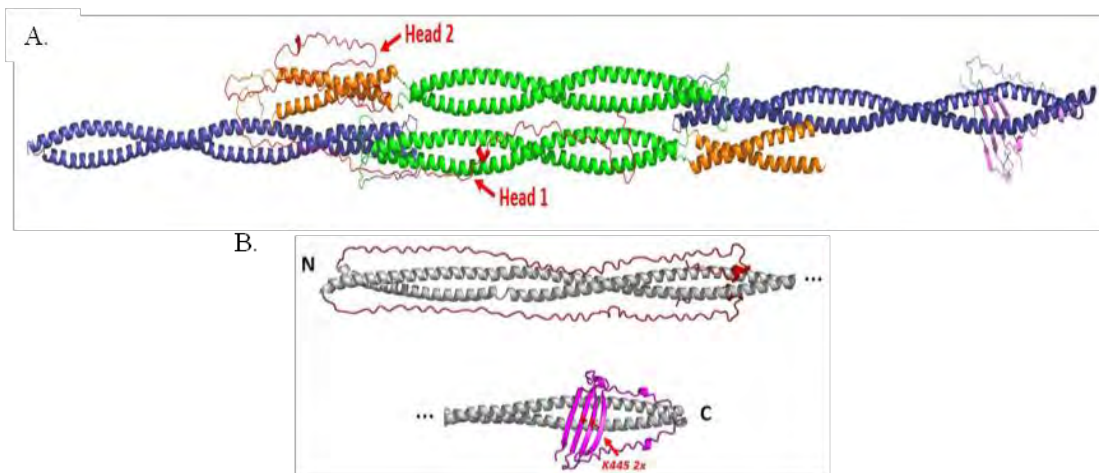
τη δημιουργία των ινιδίων [Strelkov et al., 2003]. Πιο συγκεκριμένα αυτή η αλληλεπίδραση στη βιμεντίνη σύμφωνα με *in vitro* δεδομένα φαίνεται να γίνεται μεταξύ των περιοχών κεφαλής (μεταξύ των αμινοξέων R12, G17, T37 και S83) και της σπείρας-1A μεταξύ των αμινοξέων G17 και Q137 αντίστοιχα, και μάλιστα πολύ νωρίς κατά τη δημιουργία των διμερών (Εικόνα 1.11) [Aziz et al., 2010]. Μια πρόσφατη μελέτη έρχεται να ενισχύσει αυτή την υπόθεση, ότι η αλληλεπίδραση της περιοχής κεφαλής με τη σπείρα-1A είναι σημαντική για τον σχηματισμό των ενδιάμεσων ινιδίων βιμεντίνης, καθώς όταν αυτή παρεμποδίζεται (από N-terminal tags) δημιουργούνται συσσωματώματα [Usman et al., 2022]. Επιπλέον, φαίνεται *in vitro* ότι η φωσφορυλίωση της περιοχής κεφαλής επηρεάζει την αλληλεπίδραση των αμινοξέων 17 στο διμερές [Aziz et al., 2009].



Εικόνα 1.11 Σχηματισμός διμερούς βιμεντίνης. Αλληλεπίδραση της περιοχής κεφαλής με τη rod περιοχή μεταξύ των αμινοξέων G17 (πράσινο) και Q137 (μωβ), καθώς οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των κεφαλών έρχονται σε στενή επαφή, αναδιπλώνονται και παρατίθενται συμμετρικά στις rod περιοχές, προσδίδοντας τελικά μια ασυμμετρία στο διμερές [Aziz et al., 2010].

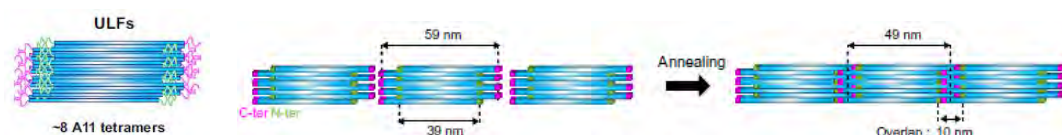
Ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμη το γεγονός ότι το αμινοξύ G17, όπως και οι μεταλλάξεις S13F και R16C, ανήκει στο εξαιρετικά συντηρημένο εννέα-πεπτίδιο motif-1 (“SSYRRTFGG”). Το μοτίβο αυτό φαίνεται πως παίζει σπουδαίο ρόλο στη σύνθεση ινιδίων βιμεντίνης, καθώς θα πρέπει να διατηρηθεί η δομική του σύνθεση, προκειμένου να επιτευχθεί τόσο η συναρμολόγηση των ενδιάμεσων ινιδίων (*in vitro*), όσο και ο σχηματισμός του δικτύου των τελικά διαμορφωμένων ενδιάμεσων ινιδίων (*in vivo*), ενώ απαραίτητη κρίνεται η ύπαρξη ενός εκ των δυο γειτονικών αμινοξέων αργινίνης [Beuttenmüller et al., 1994].

Επιπρόσθετα, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι στο επίπεδο των τετραμερών βιμεντίνης η περιοχή κεφαλής αλληλεπιδρά πέρα από την περιοχή σπείρα-1A και με τη σπείρα-1B, ενώ διαπίστωσαν αλληλεπιδράσεις τόσο εντός του διμερούς όσο και δια-διμερικά [Vermeire et al., 2023]. Πιο συγκεκριμένα, το τετραμερές σταθεροποιείται από τις αλληλεπιδράσεις των ευθυγραμμισμένων σπειρών-1B, τις αλληλεπιδράσεις της σπείρας-1A και του αμινοτελικού τμήματος της σπείρας-2 και των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων περιοχών κεφαλής και rod [Vermeire et al., 2023]. Να σημειωθεί βέβαια ότι η δομή των ακροτελικών άκρων προέκυψε με τη βοήθεια του AlphaFold και ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η περιοχή ουρά περιλαμβάνει ένα μοτίβο β-φουρκέτας και αυτά τα μοτίβα κατά τον διμερισμό σχηματίζουν ένα συνεχές β-φύλλο. Επίσης, η περιοχή ουρά φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη σπείρα-2. Όλες οι αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται στην Εικόνα 1.12 [Vermeire et al., 2023].

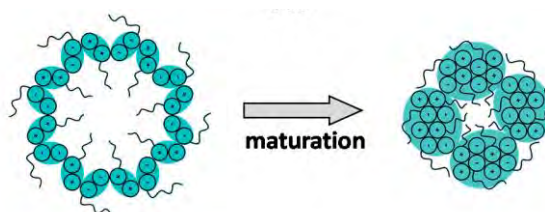


Εικόνα 1.12 A) Επιμήκη τετραμερή βιμεντίνης με τις περιοχές κεφαλή και ουρά. Οι περιοχές απεικονίζονται ως εξής: σπείρα-1A με πορτοκαλί, σπείρα-1B με πράσινο και σπείρα-2 με μπλε. Για λόγους σαφήνειας απεικονίζονται οι ακροτελικές περιοχές από ένα μόνο διμερές. Μία εκ των περιοχών κεφαλή (Head1) του μοντέλου αλληλεπιδρά κυρίως με τη σπείρα-1B, ενώ η άλλη (Head2) αλληλεπιδρά κυρίως με τη σπείρα-1A. B) Τα αμινοτελικά άκρα σύμφωνα με τη μοντελοποίηση AlphaFold. Πάνω φαίνεται η περιοχή κεφαλή με κόκκινο και η αρχή της rod περιοχής (σπείρα-1A και τμήμα της σπείρας-1B) με γκρι. Κάτω φαίνεται με μωβ η περιοχή ουρά με το β-πτυχωτό φύλλο και το τέλος της rod περιοχής (τμήμα της σπείρας-2) με γκρι. [Vermeire et al., 2023].

Στη συνέχεια, τα τετραμερή ενώνονται, ανά οχτώ, μεταξύ τους πλευρικά αμέσως, προκειμένου να σχηματίσουν τα ULFs, τα οποία αποτελούνται από έναν κεντρικό πυρήνα που περιλαμβάνει 32 σπείρες-1 και σε κάθε πλευρά 16 σπείρες-2. Στη φάση της επιμήκυνσης τα ULFs ενώνονται κατά μήκος, οι περιοχές κεφαλή με την ουρά (head-to-tail), μέσω των σπειρών-2 [Herrmann and Aebi, 1998; Georgakopoulou et al., 2009]. Σε κυτταρικό επίπεδο επιβεβαιώνεται ότι τα ULFs αποτελούνται από οχτώ A₁₁ τετραμερή, τα οποία διαπλέκονται κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης των ινιδίων (Εικόνα 1.13) [Nunes Vicente et al., 2022].



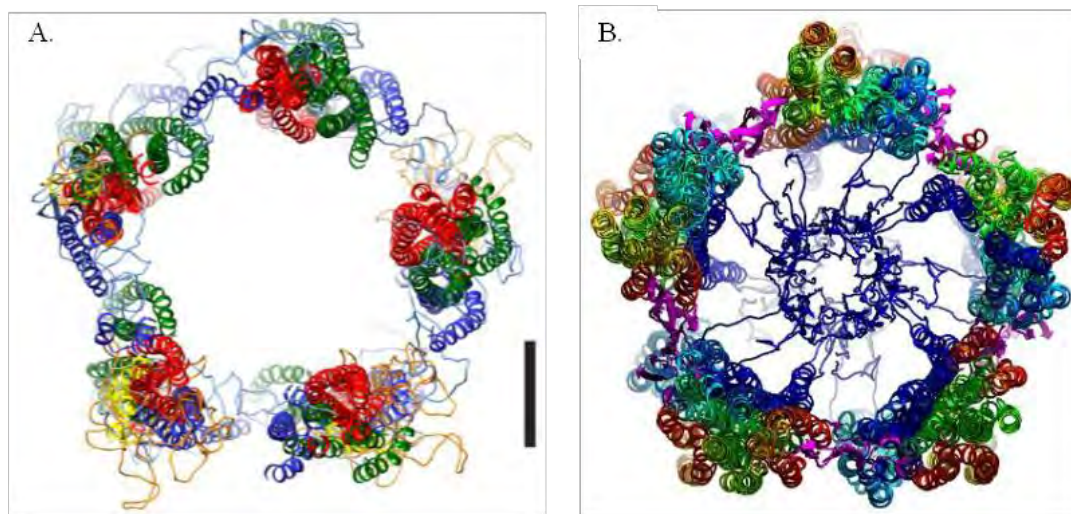
Εικόνα 1.13 Σχηματική αναπαράσταση σύνδεσης μορίων βιμεντίνης. Οχτώ αντιπαράλληλα τετραμερή συνδέονται πλευρικά για να σχηματίσουν τα ULFs. Τα ULFs διαπλέκονται περαιτέρω κατά μήκος κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης. Περιοχές (χρώμα): κεφαλή (πράσινο), rod (μπλε) και ουρά (μωβ). [Nunes Vicente et al., 2022]



Εικόνα 1.14 Πιθανός σχηματισμός ώριμων ενδιάμεσων ινιδίων από την οπτική διατομή. Η αρχική σύνδεση 16 διμερών αποδίδει τελικά μια συμπαγή διάταξη αποτελούμενη από 4 οχταμερή πρωτοϊνίδια. Το θετικό και αρνητικό πρόσημο δηλώνει τον προσανατολισμό της κάθε α-έλικας. [Strelkov et al., 2003; Vermeire et al., 2021]

Πιο συγκεκριμένα, κατά τον σχηματισμό των πρώιμων ULFs ενδιάμεσων ινιδίων, τα πρωτοϊνίδια, οχταμερή μόρια βιμεντίνης (Εικόνα 1.14), φαίνεται να

αλληλεπιδρούν πλευρικά με τις περιοχές ουράς και κεντρικά με τις περιοχές κεφαλή των μορίων βιμεντίνης, όπου τα διμερή των σπειρών-2 σχηματίζουν την εξωτερική επιφάνεια των ενδιάμεσων ινιδίων, ενώ τα διμερή των σπειρών 1A-1B επικαλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια (Εικόνα 1.15) [Eibauer et al., 2023]. Κατ' αυτό τον τρόπο τα ενδιάμεσα ινίδια βιμεντίνης ενσωματώνουν τα χαμηλής πολυπλοκότητας αμινοτελικά άκρα εντός μιας υψηλά δομημένης ελικοειδούς δομής. Δημιουργώντας, έτσι ένα επιπλέον επίπεδο δομικής πολυπλοκότητας και συγκρότησης των ινιδίων, το οποίο βασίζεται σε παροδικές μοριακές αλληλεπιδράσεις [Eibauer et al., 2023]. Η σύνδεση των εύπλαστων ακροτελικών περιοχών ενισχύει τη δόμηση ενός βιοπολυμερούς υψηλής αντοχής και ελαστικότητας [Eibauer et al., 2021, 2023]. Για αυτό ίσως απουσία της περιοχής κεφαλή αδυνατούν να σχηματιστούν ULFs και παρουσιάζεται συσσώρευση εσφαλμένων πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων. Να σημειωθεί βέβαια στο σημείο αυτό, ότι οι δομές των ULFs είναι εξαιρετικά μεταβλητές και διαφέρουν στο πλήθος των μονομερών τους σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος *in vitro* (η διατομή τους αποτελείται από 32, 40 ή 48 μονομερή, δηλαδή 4, 5 ή 6 οχταμερή αντίστοιχα) [Mücke et al., 2018]. Σε κυτταρικό επίπεδο *in situ* με τη βοήθεια τεχνικών cryo-FIB, cryo-ET και cryo-EM, οι μελετητές έδειξαν ότι οι δομικές μονάδες ULFs ενδιάμεσων ινιδίων βιμεντίνης είναι ομοιογενείς ως προς τον αριθμό και αποτελούνται από 5 οχταμερή [Eibauer et al., 2021, 2023]. Παρόλα αυτά, τα ινίδια βιμεντίνης που πολυμερίζονται εντός του κυττάρου φαίνεται να εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό. Πράγματι, για παράδειγμα εντοπίζονται δυο διαμορφώσεις με βασική διαφορά την ύπαρξη ή μη ενός εσωτερικού αυλού αλληλεπίδρασης (Εικόνα 1.15) [Eibauer et al., 2021, 2023]. Παρόλα αυτά οι μελετητές υποστηρίζουν ότι με κάποιο τρόπο οι ακροτελικές περιοχές των ενδιάμεσων ινιδίων παραμένουν προσβάσιμες για τροποποιήσεις και αλληλεπιδράσεις. Βέβαια, η έλλειψη δεδομένων για την ακριβή δομή των ακροτελικών περιοχών αφήνει όλα τα ενδεχόμενα πιθανά ως προς τον τελικό σχηματισμό των ενδιάμεσων ινιδίων.



Εικόνα 1.15 Μοντέλα διατομής των ενδιάμεσων ινιδίων βιμεντίνης. Α) Τα 5 πρωτοϊνίδια συνδέονται μέσω των περιοχών 1A και κεφαλή (με μπλε και ανοιχτό μπλε αντίστοιχα). Η κλίμακα είναι 3nm. Οι περιοχές 1B, 2A, 2B και ουρά απεικονίζονται με πράσινο, κίτρινο, κόκκινο και πορτοκαλί αντίστοιχα. [Eibauer et al., 2021] Β) Τα 5 πρωτοϊνίδια αλληλεπιδρούν πλευρικά με τις περιοχές ουράς (μωβ) και κεντρικά με τις περιοχές κεφαλή (μπλε) των μορίων βιμεντίνης. Τα διμερή των σπειρών-2 ουσιαστικά σχηματίζουν την εξωτερική

επιφάνεια των ενδιάμεσων ινιδίων βιμεντίνης, ενώ τα διμερή των σπειρών 1A-1B καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια. Οι έλικες της σπείρας 1 έχουν χρώμα μπλε με ανοιχτό πράσινο και της σπείρας 2 πράσινο με κόκκινο. [Eibauer et al., 2023]

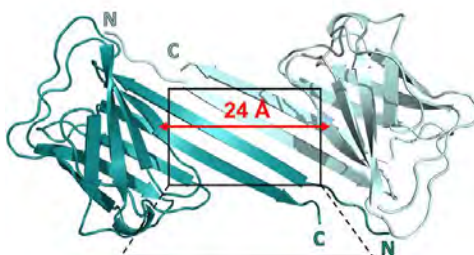
Διακρίνεται, λοιπόν, ότι κατά τη διάρκεια της δυναμικής διαδικασίας της σύνθεσης των ενδιάμεσων ινιδίων, πολλές και διαφορετικές περιοχές καλούνται να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους δεξιοτεχνικά συντονισμένα και βάσει ιεραρχίας. Τα ενδιάμεσα ινίδια, τόσο τα κυτταροπλασματικά όσο και τα πυρηνικά, είναι αποδεδειγμένο ότι εμφανίζουν μεγάλο βαθμό ποικιλομορφίας και μεταβλητότητας που περιλαμβάνει το πλήθος των υπομονάδων, αλλά και το πιο σύνηθες την ποικίλη αρχιτεκτονική τους. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί εξίσου *in vitro* και σε φυσικά γηγενή IFs [Herrmann et al., 2007; Parry and Steinert, 1999; Herrmann and Aebi, 2016]. Επιπλέον, μια άλλη μελέτη που ενισχύει τη θεωρία της δυναμικής διαμόρφωσης των ενδιάμεσων ινιδίων και ειδικά των ακροτελικών περιοχών τους αφορά την περίπτωση της περιοχής ουρά της βιμεντίνης, η οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται να εκβάλλει και να διαμορφώνεται διαφορετικά ανάλογα με την κυτταρική τοποθεσία. Βέβαια, οι διαφορετικές διαμορφώσεις μπορεί να οφείλονται και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμβάλλοντας κατά αυτό τον τρόπο στην ευελιξία της πρωτεΐνης στη λειτουργικότητα και τις αλληλεπιδράσεις [Lois-Bermejo et al., 2022].

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της βιμεντίνης και των σχετιζόμενων βάσει αλληλουχίας IFs πρωτεϊνών, όπως η δεσμίνη και οι πρωτεΐνες νευροϊνιδίων, είναι ότι φέρουν ένα μικρό τμήμα πριν τη σπείρα-1A στην περιοχή κεφαλή, την προ-σπείρας περιοχή pcd (pre-coil domain), η οποία περιλαμβάνει αποκλειστικά αμινοξέα που είναι συμβατά με τον σχηματισμό α-έλικας, χωρίς βέβαια να έχει προσδιοριστεί αυτή η δομή. Αυτό το δομικό μοτίβο φαίνεται να απουσιάζει στις κερατίνες και στις λαμίνες [Geisler, 1982; Herrmann and Aebi, 2004]. Η pcd φαίνεται να αλληλεπιδρά με την rod περιοχή μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, όπως είναι οι δεσμοί-H και μάλιστα διαφορετικά αναλόγως το στάδιο ανάπτυξης των ενδιάμεσων ινιδίων. Μέσω αυτών των παροδικών αλληλεπιδράσεων, η περιοχή κεφαλή ίσως παίζει ουσιαστικό ρόλο αποτρέποντας αλληλεπιδράσεις εκτός του μονοπατιού και καθοδηγώντας τα τετραμερή στην παραγωγική οδό ολιγομερισμού [Premchandrar et al., 2016]. Επιπρόσθετα, η pcd περιοχή περιέχει τις σερίνες S82 και S86, οι οποίες κατά τη μίτωση φωσφορυλιώνονται με αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση των ινιδίων βιμεντίνης [Izawa and Inagaki, 2006]. Μια πρόσφατη μελέτη έρχεται να ενισχύσει το γεγονός ότι η περιοχή κεφαλή πρέπει να παρουσιάζει κάποια δομική τάξη, καθώς έδειξε ότι οι αμινοτελικές περιοχές κεφαλής σχηματίζουν ασταθείς διασταυρούμενες β-πτυχές (δευτεροταγείς δομές), οι οποίες προάγουν την αυτοσύνδεση (self-association) και διευκολύνουν τη συναρμολόγηση τόσο της δεσμίνης όσο και της NFL (neurofilament light) [Zhou et al., 2021, 2023]. Επίσης, η ίδια ομάδα μελέτησε έξι μεταλλάξεις (S2I, S7F, S12F, S13F, S46F και S46Y) στη δεσμίνη που σχετίζονται με φωσφορυλίωση και μυοκαρδιοπάθειες και παρατήρησε την αυξημένη αυτοσύνδεση των περιοχών κεφαλή με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανώριμων πολυμερών, διαταραγμένο δίκτυο IFs και τη δημιουργία συσσωματωμάτων [Zhou et al., 2021]. Συνολικά, λοιπόν, διαφαίνεται ότι τα ακροτελικά άκρα των ενδιάμεσων

ινιδίων εμφανίζουν συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές, διατηρώντας ταυτόχρονα τη δυναμική και την ευελιξία τους [Tsilafakis and Mavroidis, 2024].

Η περιοχή ουρά

Ένα άλλο φαινόμενο άξιο αναφοράς είναι ότι η σύνθεση των κυτταροπλασματικών ινιδίων, όπως της βιμεντίνης και της δεσμίνης, ξεκινά με την πλευρική ένωση των διμερών σε τετραμερή και σταδιακά σε ULFs, τα οποία κατόπιν αρχίζουν να αναδιατάσσονται κατά μήκος, σχηματίζοντας τελικά τα ώριμα ενδιάμεσα ινίδια. Αντιθέτως, η συναρμολόγηση των πυρηνικών λαμινών, ξεκινά με τον head-to-tail πολυμερισμό των διμερών, πριν συμβεί οποιαδήποτε πλευρική σύνδεση, υπογραμμίζοντας τη σημασία των περιοχών αυτών στην τελική διαμόρφωση των IFs λαμίνης [Stuurman et al., 1998]. Επίσης, η περιοχή ουρά των λαμινών περιλαμβάνει στην αλληλουχία της ένα σήμα πυρηνικής τοποθέτησης (nuclear localization signal, NLS) που κρίνεται απαραίτητο για τη μετακίνησή της στον πυρήνα μετά τη σύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα και ένα μοτίβο αναδίπλωσης όμοιο με ανοσοσφαιρίνη (Ig-like fold motif) [Gruenbaum and Foisner, 2015]. Οι Ig-like περιοχές φαίνεται να συνδέονται μεταξύ τους μέσω των β-strand δομών τους με δεσμούς-H στο επίπεδο των διμερών λαμίνης, δημιουργώντας ένα συνεχές β-πτυχωτό φύλλο (Εικόνα 1.16) [Ahn et al., 2021]. Η δομή του β-πτυχωτού φύλλου παρουσιάζεται και κατά τον διμερισμό των περιοχών ουράς στη βιμεντίνη, όπως αναφέρεται προηγουμένως (Εικόνα 1.12). Επίσης, σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη φαίνεται ότι η δομή Ig-like της λαμίνης A/C είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση σε πρωτεΐνες της πυρηνικής μεμβράνης και στη χρωματίνη μέσω της αλληλεπίδρασής της με την αμινοτελική περιοχή της εμερίνης (emerin) και την πρωτεΐνη πρόσδεσης DNA BAF (barrier-to-autointegration factor) και τη δημιουργία ενός τριαδικού συμπλόκου [Samson et al., 2018]. Τα δεδομένα αυτά ανατρέπουν την μέχρι πρότινος υπόθεση ότι τα ακροτελικά άκρα είναι χαμηλής πολυπλοκότητας, άμορφες δομές και ενισχύουν τη σημαντικότητά τους.



Εικόνα 1.16 Η κρυσταλλική δομή των Ig-like τμημάτων των περιοχών ουράς της λαμίνης A/C σε διμερή διάταξη, δύο πρωτομερών με τον σχηματισμό του β-πτυχωτού φύλλου, το οποίο αποτελείται από 4 πτυχές (strands), δύο από κάθε πρωτομερές [Ahn et al., 2021].

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Επιπλέον, οι περιοχές της κεφαλής και της ουράς περιλαμβάνουν αρκετές θέσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως είναι η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να επιδρούν στη δομή των ενδιάμεσων ινιδίων. Παραδείγματος χάρη, η φωσφορυλίωση στην περιοχή κεφαλή της GFAP

(Glial Fibrillary Acidic Protein), μιας άλλης πρωτεΐνης που ανήκει στον τύπο ΙΙΙ των IFs, δύναται να μεταβάλλει τη σταθερότητα των ινιδίων, ενώ από την άλλη μπορεί να έχει προστατευτική δράση στην αναδίπλωση της GFAP, καθώς και να δρα συνεργατικά στο σχηματισμό ινιδίων σε συνδυασμό με μόρια βιμεντίνης [Takemura et al., 2002]. Μια άλλη πρωτεϊνική τροποποίηση είναι η γλυκοζυλίωση, η οποία φαίνεται να συμβαίνει κυρίως στη Ser49 και να συμβάλει στον σχηματισμό διμερών μορίων βιμεντίνης, καθώς διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση είτε των περιοχών κεφαλών των διμερών είτε της περιοχής κεφαλή με τη rod περιοχή. Το συγκεκριμένο αμινοξύ είναι επίσης συντηρημένο και στη δεσμίνη, υποδεικνύοντας ότι η γλυκοζυλίωση μπορεί να είναι ένας ακόμη γενικός τρόπος ρύθμισης της δυναμικής των IFs [Snider et al., 2018]. Ένας άλλος ρόλος που έχει αποδοθεί πρόσφατα στη δεσμίνη είναι ο σχηματισμός αμυλοειδών [Sanbe et al., 2005]. Φαινόμενα τα οποία θα αναπτύξουμε εκτενώς στο επόμενο κεφάλαιο.

Αλληλεπίδραση με νουκλεϊκά οξέα

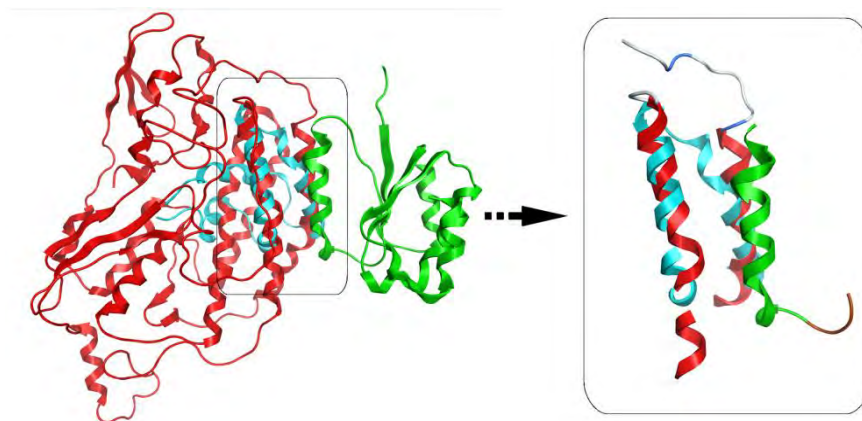
Σύμφωνα με ευρήματα αρκετές πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων προσδένουν νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες αυτές, περιλαμβάνουν τις τύπου Ι και ΙΙ κερατίνες K8, K18 και K19, τις τύπου ΙΙΙ δεσμίνη, GFAP, περιφερίνη και βιμεντίνη και την τύπου ΙV NFL [Wang et al., 2001]. Σε όλες τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν τα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται στην αμινοτελική περιοχή κεφαλή. Βεβαίως, να σημειωθεί ότι, η θέση πρόσδεσης νουκλεϊκών οξέων ακολουθεί κοινό πρότυπο, καθώς έγκειται στο κέντρο της περιοχής κεφαλή, και πιο συγκεκριμένα σε αμινοξέα που εντοπίζονται στη συντηρημένη εννεαπεπτιδική (nonapeptide) περιοχή που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία ινιδίων [Wang et al., 2001]. Ακόμη, σε πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε ανθρώπινους ινοβλάστες παρατηρήθηκαν μεταβολές στον πυρήνα, έπειτα από έγχυση HIV-1 πρωτεάσης. Συγκεκριμένα, τα αμινοτελικά πολυπεπτίδια βιμεντίνης επηρέασαν την αρχιτεκτονική του πυρήνα και κατ' επέκταση οδήγησαν σε διαταραχές στην οργάνωση και την κατανομή της χρωματίνης [Shoeman et al., 2001]. Έτσι, στηριζόμενοι και στις προηγούμενες μελέτες που αναφέρονται στη συσχέτιση της δεσμίνης με τη γονιδιακή ρύθμιση θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε ότι η περιοχή κεφαλή παίζει κομβικό ρόλο στη συγκεκριμένη κυτταρική διαδικασία.

Αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες

Έχει αναφερθεί ότι η δεσμίνη συνδέεται με τη μυοσπρίνη. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι σημαντική και επιτυγχάνεται μέσω της περιοχής κεφαλή [Kouloumenta et al., 2007]. Η μυοσπρίνη εκφράζεται τόσο στον σκελετικό όσο και στον καρδιακό μυ και συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη στην περιφέρεια του πυρήνα σε μυοκαρδιοκύτταρα νεογνών μυών, ενώ σε μυοκαρδιοκύτταρα ενήλικων μυών βρίσκονται μαζί στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή [Kouloumenta et al., 2007]. Η μυοσπρίνη συνδέεται, μέσω της dysbindin, με το σύμπλοκο βιογένεσης των οργανιδίων BLOC-1 (biogenesis of lysosome-related organelles complex-1) που σχετίζεται με τα λυσοσώματα. Το σύμπλοκο αυτό συμμετέχει στη μεταφορά πρωτεϊνών μέσω του ενδοσωμικού – λυσοσωμικού μονοπατιού διακίνησης και στη βιογένεση των

οργανιδίων που σχετίζονται με λυσοσώματα (lysosome-related organelles, LROs) [Li et al., 2003]. Επομένως, είναι πιθανό το δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης μέσω του αμινοτελικού άκρου, σε συνδυασμό με τις σχετιζόμενες πρωτεΐνες, να ρυθμίζει σημαντικές διεργασίες για τη φυσιολογική καρδιακή λειτουργία, όπως είναι η διακίνηση κυστιδίων (μέσω του ελέγχου μονοπατιών ενδοσωμάτων/ λυσοσωμάτων), η βιογένεση και η σωστή κυτταρική κατανομή των λυσοσωμάτων.

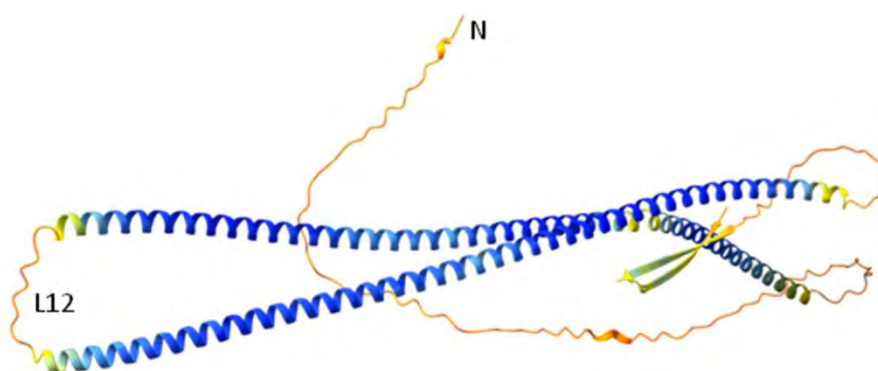
Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κεφαλή της δεσμίνης συνδέεται και με μια άλλη πρωτεΐνη των λυσοσωμάτων, τη saposinD, αλλά και με μια πρωτεΐνη των μιτοχονδρίων, τη NDUFS2 (Εικόνα 1.17) [Vlachakis et al., 2024]. Η πρωτεΐνη NDUFS2 αποτελεί υπομονάδα της NADH αφυδρογονάσης (σύμπλοκο I) της αναπνευστικής αλυσίδας και εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, ενώ η saposinD ανήκει στις saposins (sphingolipid activator proteins, SAPs) μια ομάδα πρωτεϊνών αποτελούμενη από τέσσερις μικρές γλυκοπρωτεΐνες που συμμετέχουν στη λυσοσωμική υδρόλυση αρκετών σφιγγολιπιδίων από συγκεκριμένες λυσοσωμικές υδροξυλάσες και εντοπίζεται στα λυσοσώματα. Οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών saposinD και NDUFS2 με την περιοχή κεφαλή της δεσμίνης αποδείχθηκαν *in vitro* με τη μέθοδο yeast two-hybrid και μελετήθηκαν *in silico* [Vlachakis et al., 2024]. Μάλιστα, η *in silico* ανάλυση υπέδειξε ότι οι αλληλεπιδράσεις ακολουθούν κοινό πρότυπο και επιτυγχάνονται μεταξύ των αμινοξέων 16-32 της δεσμίνης. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώνονται και με τη μέθοδο GST pull-down για ολόκληρη όμως τη δεσμίνη [Vlachakis et al., 2024]. Η δεσμίνη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αλληλεπιδρά και με άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες [Diokmetzidou et al., 2016]. Η άμεση συσχέτιση της δεσμίνης με τα μιτοχόνδρια ενισχύεται και από μια επιπλέον μελέτη, όπου η ανασυνδυασμένη δεσμίνη Des(Y122L), η οποία φτάνει μέχρι το στάδιο των ULFs, δεσμεύεται στα απομονωμένα μιτοχόνδρια ήπατος αρουραίου χωρίς τη μεσολάβηση άλλης πρωτεΐνης και μάλιστα η αλληλεπίδραση επιτυγχάνεται μέσω του αμινοτελικού άκρου [Dayal et al., 2020]. Από την άλλη, η περιοχή κεφαλή της βιμεντίνης φαίνεται να παίζει ρόλο όχι μόνο στην αλληλεπίδραση με τα μιτοχόνδρια, αλλά να ρυθμίζει και το μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων [Chernoivanenko et al., 2015]. Μέσω της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης, λοιπόν, φαίνεται να επιτυγχάνεται η διασύνδεση του δικτύου της δεσμίνης άμεσα ή έμμεσα, μέσω της σωστής μεταφοράς και κυτταρικής διανομής των σχετιζόμενων πρωτεϊνών, στα οργανίδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα.



Εικόνα 1.17 Απεικόνιση της μοριακής αλληλεπίδρασης/ διεπαφής της δεσμίνης (πράσινο) με τη NDUF52 (κόκκινο) και με τη sarosinD (θαλασσί), όπου διακρίνεται το κοινό πρότυπο αλληλεπίδρασης [Vlachakis et al., 2024].

3D μοντέλο της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης

Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι το 3D ομόλογο μοντέλο της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης που χρησιμοποιήθηκε στις *in silico* μελέτες αλληλεπίδρασης, περιλαμβάνει μια σειρά μοτίβων α-ελίκων που περιβάλλουν ένα κεντρικό μοτίβο που αποτελείται από δύο παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα (Εικόνα 1.17) [Vlachakis et al., 2024]. Παρόλα αυτά η δομική πρόβλεψη του AlphaFold για την περιοχή κεφαλή της δεσμίνης φαίνεται να διαφέρει, βέβαια αυτό οφείλεται στα ελλιπή κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τις χαμηλής πολυπλοκότητας περιοχές των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων γενικότερα (Εικόνα 1.18). Το δομικό πρόγραμμα AlphaFold παράγει ένα 3D δομικό μοντέλο που προέρχεται από την εκτίμηση ανά αμινοξύ βάσει μιας βαθμολογίας βεβαιότητας (0-100), που ονομάζεται pLDDT, σύμφωνα με τις δομές που υπάρχουν στη βάση δεδομένων του [Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022]. Επίσης, οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι περιοχές με βαθμολογία pLDDT<50, όπως είναι η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης, μπορεί να είναι είτε χωρίς δομή σε φυσιολογικές συνθήκες ή να αποκτούν δομή ως κομμάτι ενός συμπλόκου. Στη δεύτερη περίπτωση, μπορεί να συμβαίνει κατά τον διμερισμό μορίων δεσμίνης και ουτω καθεξής, ενώ ταυτόχρονα η διαμόρφωση να παρέχει την απαραίτητη ευελιξία σε κάθε στάδιο δόμησης μέχρι τον τελικό σχηματισμό των ενδιάμεσων ινιδίων.



Εικόνα 1.18 Απεικόνιση της δομικής πρόβλεψης της δεσμίνης σύμφωνα με την εφαρμογή AlphaFold. Μπλε: πολύ ισχυρή βεβαιότητα πρόβλεψης (pLDDT>90), θαλασσί: ισχυρή βεβαιότητα πρόβλεψης (90>pLDDT>70),

κίτρινο: χαμηλή βεβαιότητα πρόβλεψης ($70 > \text{pLDDT} > 50$), πορτοκαλί: πολύ χαμηλή βεβαιότητα πρόβλεψης ($\text{pLDDT} > 50$) (N: αμινοτελικό άκρο, L12: συνδέτης 12) [Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022; Vlachakis et al., 2024].

Μεταλλάξεις

Τέλος, μεταλλάξεις στο αμινοτελικό άκρο της δεσμίνης φαίνεται να συσχετίζονται με την καρδιογένεση επεμβαίνοντας στη δράση (down-regulation) σημαντικών καρδιογενετικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι οι brachyury, goosecoid, nkx2.5 και mef2 και μάλιστα οι μεταλλάξεις αφορούν θέσεις φωσφορυλίωσης (S6, S7, S8), υπογραμμίζοντας τον ρυθμιστικό ρόλο της δεσμίνης στην κυτταρική διαφοροποίηση μέσω της περιοχής κεφαλή και των παροδικών μεταφραστικών τροποποιήσεων όχι μόνο στη δομή αλλά και στη λειτουργικότητα [Hofner et al., 2007; Höllrigl et al., 2007]. Μεταλλάξεις στην περιοχή κεφαλή έχουν συσχετιστεί επιπλέον και με μυοκαρδιοπάθειες και περιγράφονται παρακάτω.

1.2.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) της δεσμίνης

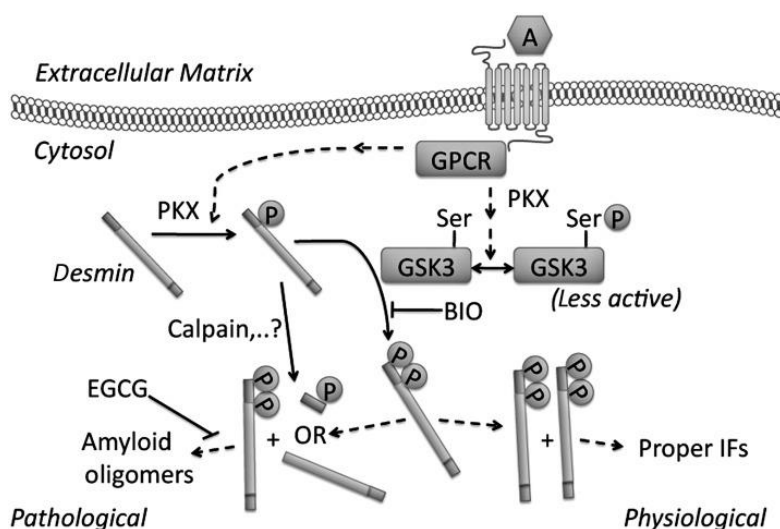
Γενικά, οι PTMs παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της δυναμικής διαδικασίας συναρμολόγησης - αποσυναρμολόγησης του δικτύου των IFs και συμβάλλουν στη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας των IFs, ρυθμίζοντας τη διαλυτότητά τους [Hyder et al., 2008; Sihag et al., 2007; Snider and Omary, 2014; Tsikitis et al., 2018]. Από τη μία, μέσω των PTMs καταλύονται σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των IFs και άλλων κυτταρικών συστατικών και δομών, ενώ από την άλλη μπορούν είτε να σχηματίσουν είτε να περιορίσουν ελαττωματικές πρωτεΐνες των IFs, οι οποίες θα αποτελέσουν την άμεση αιτία ή θα συντελέσουν στην παθογένεια διάφορων ασθενειών [Omary, 2009]. Πιο ειδικά, το εκτενές δίκτυο των ινιδίων δεσμίνης μπορεί να λειτουργήσει ως πλατφόρμα για μόρια σηματοδότησης, όπως είναι κινάσες και φωσφατάσες, ρυθμίζοντας τη δράση τους, αλλά και ταυτόχρονα η ενδημική τους δράση μπορεί να επηρεάσει το ίδιο το δίκτυο ινιδίων της δεσμίνης. Άλλωστε, η δεσμίνη αποτελεί υπόστρωμα για μια μεγάλη ποικιλία PTMs, όπως φωσφορυλίωση [Caron and Chapon, 1999] ADP-ριβοζυλίωση, ουβικουιτινίωση, γλυκοζυλίωση, οξειδωση και νιτροζυλίωση [Capetanaki et al., 2015; Janué et al., 2007; Winter et al., 2014]. Οι περισσότερες PTMs συμβαίνουν κυρίως στην περιοχή κεφαλή των IFs και οδηγούν σε αποδιάταξη του δικτύου της δεσμίνης, εκτός από την ουβικουιτινίωση που οδηγεί στην αποικοδόμησή του.

Φωσφορυλίωση, πρωτεολυτική διάσπαση και συσσώρευση μη φυσιολογικών συσσωματωμάτων δεσμίνης

Η συναρμολόγηση – αποσυναρμολόγηση του δικτύου της δεσμίνης είναι μια δυναμική διαδικασία και ελέγχεται από τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της δεσμίνης, ενώ μέσω της φωσφορυλίωσης ενδεχομένως να ρυθμίζονται και οι αλληλεπιδράσεις της δεσμίνης με άλλες πρωτεΐνες [Winter et al., 2014]. Έτσι, η διατάραξη των επιπέδων φωσφορυλίωσης της δεσμίνης μπορεί να λειτουργήσει σαν ένας μηχανισμός αποδιάταξης των ινιδίων της δεσμίνης και συσσώρευσης αυτών σε μη φυσιολογικά συσσωματώματα, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις καρδιολογικών ασθενειών [Agnetti et al., 2014; Caron and Chapon, 1999; Panagopoulou et al., 2008; Rainer et al., 2018;

Winter et al., 2014]. Η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης υποστηρίζεται ότι φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση A στα αμινοξέα S45 και S60, την πρωτεϊνική κινάση C στις S13, S48 και S68 και από την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση (CDK) στις S7, S32 και T76 [Winter et al., 2014].

Πρόσφατα, μια ακόμα κινάση, η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3B (glycogen synthase kinase, GSK-3B), βρέθηκε να φωσφορυλιώνει τη δεσμίνη και να παίζει ρόλο τόσο στην αποδιάταξη των ινιδίων δεσμίνης όσο και στον σχηματισμό προαμυλοειδών ολιγομερών (pre-amyloid oligomers, PAOs), συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας [Rainer et al., 2018]. Άλλωστε, η συσσώρευση και η συσσωμάτωση πρωτεϊνών με λανθασμένη διαμόρφωση είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της αμυλοείδωσης. Για την ακρίβεια, όπως προέκυψε από την έρευνα, η μονο-φωσφορυλιωμένη μορφή της δεσμίνης, και όχι η διπλά φωσφορυλιωμένη δεσμίνη, έχει την τάση να σχηματίζει μη φυσιολογικά συσσωματώματα με τοξική επίδραση στη φυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου, εξαιτίας είτε μειωμένων επιπέδων ενεργοποίησης είτε αναστολής του ενζύμου της GSK-3B, φαινόμενα που παρατηρούνται και σε ορισμένες περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας [Agnetti et al., 2014; Rainer et al., 2018]. Τα συσσωματώματα αυτά δημιουργούνται ύστερα από την πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης και μάλιστα η διάσπαση αυτή συμβαίνει στην περιοχή κεφαλή, ενώ οι υπεύθυνες θέσεις φωσφορυλίωσης (S28 και S32) βρίσκονται κι αυτές στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης (Εικόνα 1.19) [Agnetti et al., 2014; Rainer et al., 2018].



Εικόνα 1.19 Πιθανό μοντέλο δημιουργίας παθο/φυσιολογικών ολιγομερών δεσμίνης. Σχηματική απόδοση του θεωρητικού μονοπατιού φωσφορυλίωσης, διάσπασης και παθολογικής παραγωγής συσσωματωμάτων μορίων δεσμίνης. Η συσσώρευση μονο-φωσφορυλιωμένων μορίων δεσμίνης από μια κοινή πρωτεϊνική κινάση (PKX) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μηχανισμού της πρωτεολυτικής διάσπασης (ίσως από την calpain) στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης και σε αποκλίνων ολιγομερισμό. Αντίθετα, σε φυσιολογικές συνθήκες η GSK3 φωσφορυλιώνει επιπλέον τη δεσμίνη και οδηγεί στο σχηματισμό τυπικών IFs. A: GPCR αγωγιωστής (όπως αγγειοτενσίνη II ή κατεχολαμίνες), GPCR: G protein-coupled receptor; P: phosphate groups [Agnetti et al., 2014].

Μελετώντας περαιτέρω το φαινόμενο στο μυϊκό σύστημα φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση από τη GSK-3B προηγείται της ουβικουτινίωσης από την Trim-32 [Cohen et al., 2012; Volodin et al., 2017] και προάγει τη διάσπαση και τον αποπολυμερισμό της δεσμίνης από την ασβεστιο-εξαρτώμενη πρωτεάση calpain-1 σε ατροφικούς ύστερα από απονεύρωση σκελετικού μύες σε ποντίκια φυσικού τύπου [Aweida et al., 2018]. Επομένως, η διάσπαση και η επακόλουθη απώλεια ινιδίων

δεσμίνης προηγείται και διευκολύνει την αποδόμηση των μυοϊνιδίων και προάγει την μυϊκή ατροφία.

Επίσης, η απώλεια του δικτύου δεσμίνης κατά την ατροφία σχετίζεται με διαταραχές στις μεμβρανικές δομές, όπως είναι το σύμπλοκο δυστροφίνης/γλυκοπρωτεϊνών (dystrophin–glycoprotein complex, DGC) που εντοπίζεται στα κοσταμερή και προσδένεται στο δίκτυο IFs δεσμίνης στη σαρκοπλασματική μεμβράνη του σκελετικού μυ, προάγοντας κατά αυτό τον τρόπο την κατάρρευση των μυοϊνιδίων [Eid Mutlak et al., 2020; Volodin et al., 2017]. Σε συστηματικές καταβολικές καταστάσεις η ακεραιότητα του DGC φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα του υποδοχέα ινσουλίνης και της αντίστοιχης σηματοδότησης μέσω του PI3K-Akt μονοπατιού, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της GSK-3B με τις επακόλουθες επιπτώσεις στη δεσμίνη και τα μυοϊνίδια [Eid Mutlak et al., 2020]. Επιπλέον, εξαιτίας αυτών των φαινομένων τόσο στην καρδιά όσο και στους σκελετικούς μύες παρατηρούνται περαιτέρω διαταραχές στην πρωτεϊνική ομοιοστάση και στη μιτοχονδριακή λειτουργία [Agnetti et al., 2022]. Από την άλλη, μια *in vitro* μελέτη υποδεικνύει ότι τα συσσωματώματα δεσμίνης μπορούν να προκαλέσουν περαιτέρω λανθασμένη αναδίπλωση της δεσμίνης υπό τη μορφή prion [Kedia et al., 2019].

Ακόμη, είναι πιθανόν τα συσσωματώματα δεσμίνης να επηρεάζουν τη σύζευξη του SR με τα μιτοχόνδρια διαταράσσοντας τα επίπεδα ασβεστίου και επιδρώντας κατά αυτό τον τρόπο αρνητικά στα μιτοχόνδρια [Smolina et al., 2014]. Σημειώνεται δε, ότι στο ζωικό μοντέλο R120G cryAB που εντοπίζονται αυξημένα τοξικά αμυλοειδή δεσμίνης στην καρδιά [Sanbe et al., 2004], παρουσιάζονται επίσης και μεταβολές στη διάνοξη του μιτοχονδριακού πόρου μεταβολής της διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) [Diokmetzidou et al., 2016]. Το άνοιγμα του πόρου μπορεί να οδηγήσει σε διόγκωση των μιτοχονδρίων και κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης.

Επιπρόσθετα, η πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις. Για παράδειγμα, η μεταλλαγή I451M στη περιοχή ουρά της δεσμίνης έχει βρεθεί *in vivo* να οδηγεί σε πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης, η οποία συμβαίνει επίσης στην περιοχή κεφαλή με αποτέλεσμα να διαταράσσεται ο φυσιολογικός κυτταρικός εντοπισμός της δεσμίνης και να απουσιάζει από τους z-δίσκους [Mavroidis et al., 2008].

Βάσει των παραπάνω υποδεικνύεται πόσο σημαντική είναι η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης, καθώς αποτελεί κύριο αποδέκτη PTMs και κυρίως φωσφορυλίωσης, αλλά και πρωτεολυτικής διάσπασης με τις συνεπακόλουθες επιπτώσεις, όπως διαταραχές του δικτύου IFs δεσμίνης και των σχετιζόμενων πρωτεϊνών και δομών, την παραγωγή επιβλαβών συσσωματωμάτων και προαμυλοειδών ολιγομερών, ακόμα και μιτοχονδριακές και μεταβολικές διαταραχές.

1.3 Μυοκαρδιοπάθειες

Οι μυοκαρδιοπάθειες ανήκουν σε μια ετερογενή ομάδα ασθενειών του μυοκαρδίου, οι οποίες σχετίζονται με μηχανικές ή/ και ηλεκτρικές δυσλειτουργίες και συχνά οδηγούν στην εμφάνιση μη φυσιολογικών φαινομένων κοιλιακής υπερτροφίας ή διάτασης. Οι αιτίες αν και ποικίλλουν, συνήθως οφείλονται κυρίως σε γενετικούς

παράγοντες [Braunwald, 2017; Yacoub, 2014]. Υπάρχουν πέντε βασικοί τύποι μυοκαρδιοπαθειών: η διατατική μυοκαρδιοπάθεια (dilated cardiomyopathy, DCM), η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια (hypertrophic cardiomyopathy, HCM), η αρρυθμογενής μυοκαρδιοπάθεια της δεξιάς κοιλίας (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC), η περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια (restrictive cardiomyopathy, RCM) και το μη-συμπαγές μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας (left ventricular non-compaction cardiomyopathy, LVNC). Η διατατική μυοκαρδιοπάθεια αποτελεί το βασικότερο αίτιο εκδήλωσης καρδιακής ανεπάρκειας (heart failure, HF) μετά την περίπτωση ισχαιμικής καρδιοπάθειας [Luk et al., 2009].

Καρδιακή ανεπάρκεια

Η καρδιακή ανεπάρκεια συνιστά ένα από τα σπουδαιότερα ζητήματα υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς εμφανίζει σημαντικά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας στον γενικό πληθυσμό [Towbin and Bowles, 2006]. Στην Ευρώπη μόνο υπάρχουν σχεδόν 15 εκατομμύρια ασθενείς [McDonagh et al., 2011]. Η καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών παθολογικών καταστάσεων. Τα ισχαιμικά επεισόδια ευθύνονται σχεδόν για τις μισές περιπτώσεις εκδήλωσης HF, ενώ το 36% των περιπτώσεων οφείλεται σε μη-ισχαιμικά αίτια, όπως DCM [Ziaieian and Fonarow, 2016]. Η θεραπευτική προσέγγιση για την καρδιακή ανεπάρκεια περιλαμβάνει κυρίως τη χορήγηση β-αγωνιστών, αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης και ανταγωνιστών των αλατοκορτικοειδών (mineralocorticoids). Βασικό γνώρισμα των μυοκαρδιοπαθειών και της HF είναι ο εκτεταμένος και προοδευτικός θάνατος των μυοκαρδιοκυττάρων. Μολονότι, λοιπόν, η βασική έρευνα έχει υποδείξει ότι πρωτεΐνες των σαρκομερών, του κυτταροσκελετικού ή των δεσμοσωμάτων ευθύνονται αντιστοίχως στις περιπτώσεις των οικογενών μορφών της HCM, DCM και ARVC, κρίνεται απαραίτητη η βαθύτερη κατανόηση για τους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της καρδιακής παθολογίας, προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος μιας πιο αποτελεσματικής θεραπείας.

ARVC

Η ARVC χαρακτηρίζεται από σταδιακή αντικατάσταση του μυοκαρδίου κυρίως της δεξιάς κοιλίας από ινωτικό και λιπώδη ιστό, η οποία προδιαθέτει την εμφάνιση απειλητικών για τη ζωή κοιλιακών αρρυθμιών και οδηγεί συνήθως σε αργά εξελισσόμενη κοιλιακή δυσλειτουργία [Marcus et al., 1982]. Η νόσος προσβάλλει κυρίως τη δεξιά κοιλία της καρδιάς, δηλαδή την κοιλότητα που προωθεί το αίμα προς τους πνεύμονες, όμως πολύ συχνά προσβάλλεται σε μικρότερη έκταση και η αριστερή κοιλία, η κοιλότητα που προωθεί το οξυγονωμένο αίμα προς τα υπόλοιπα όργανα, για αυτό και τελευταία χρησιμοποιείται ο συμπεριληπτικός όρος αρρυθμογενής μυοκαρδιοπάθεια (arrhythmogenic cardiomyopathy, ACM). Άλλωστε, η ARVC στο 60% έχει αμφικοιλιακό εντοπισμό. Πάνω από το 50% των περιπτώσεων έχει βρεθεί ότι είναι οικογενής, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι είναι μια γενετικά προκαθορισμένη μυοκαρδιοπάθεια. Πρώτη φορά που εντοπίστηκε σε ασθενείς με ACM μετάλλαξη σε πρωτεΐνη των δεσμοσωμάτων, ήταν στην plakoglobin, το 2000 [McKoy et al., 2000]. Στη συνέχεια βρέθηκαν μεταλλάξεις και σε άλλες πρωτεΐνες των δεσμοσωμάτων: desmoplakin, plakophilin-2, desmoglein-2 και desmocollin-2. Από την άλλη, όμως, έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις και σε πρωτεΐνες εκτός δεσμοσωμάτων που συνδέονται με ACM, όπως στις πρωτεΐνες phospholamban, laminA/C, titin, δεσμίνη, κα. Ο παθολογικός φαινότυπος στην

καρδιά σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στα προαναφερθέντα γονίδια επιβεβαιώνουν κλινικά την ACM [Murray, 2012]. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα, ενώ εμφανίζει ατελή διεισδυτικότητα αλλά και φαινοτυπική ετερογένεια ακόμη και σε άτομα που φέρουν την ίδια μετάλλαξη [Watkins et al., 2011]. Τα άτομα που πάσχουν από ACM, ήδη από την τρίτη δεκαετία της ζωής τους μπορεί να παρουσιάσουν τα πρώτα συμπτώματα όπως αίσθημα παλμών, ζαλάδες ή συγκοπή εξαιτίας των συχνών κοιλιακών αρρυθμιών που προκαλούνται από τη δεξιά κοιλία. Πιο συγκεκριμένα, οι αρρυθμίες προκαλούνται καθώς τα μυοκαρδιοκύτταρα απομακρύνονται μεταξύ τους εξαιτίας δομικών μεταβολών στους εμβόλιμους δίσκους που συγκρατούν τα κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι τη συντονισμένη διάδοση του ηλεκτρικού σήματος στο μυοκάρδιο και κατ' επέκταση τη συντονισμένη καρδιακή σύσπαση με αποτέλεσμα τα μυοκαρδιοκύτταρα να οδηγούνται σε απόπτωση και στη θέση τους εναποτίθεται ινώδης και ινολιπώδης ιστός. Η ACM προκαλεί προοδευτικά καρδιακή ανεπάρκεια με μείωση του κλάσματος εξωθήσεως της καρδιάς. Από την άλλη, φαινόμενα αιφνίδιου θανάτου σε εφήβους και νεαρούς ενήλικες, ιδιαίτερα αθλητές, αποτελούν την πρώτη εκδήλωση της νόσου με το ποσοστό θνητότητας να φτάνει 3-8% ετησίως [Braunwald, 2017; Te Riele and Hauer, 2015]. Η επίπτωση της ACM στο γενικό πληθυσμό κυμαίνεται από 1/1000 έως 1/2000, ενώ η συχνότητα εμφάνισης μετάλλαξης στη δεσμίνη σε ασθενείς με ACM είναι περίπου 2% [Stevens et al., 2020].

Ενεργοποίηση φλεγμονώδους αντίδρασης

Επιπρόσθετα, ένα άλλο παθολογικό χαρακτηριστικό της ARVC είναι η διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων σε ποσοστό περίπου 60-80% των ασθενών. Η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ARVC, καθώς η απώλεια ή η παρεμπόδιση του υποδοχέα του παράγοντα του συμπληρώματος C5a (C5aR) μείωσε σημαντικά την επιβλαβή αναδόμηση του μυοκαρδίου σε Des-/- ποντίκια και μείωσε τα περισσότερα παθολογικά χαρακτηριστικά της ARVC [Mavroidis et al., 2015]. Στα Des-/- ποντίκια διάφορα συστατικά του συμπληρώματος βρίσκονται ενεργά σε πληθώρα και ειδικά στις περιοχές νεκρωτικού ιστού και διήθησης φλεγμονωδών κυττάρων [Mavroidis et al., 2015]. Επιπλέον, η αλληλένδετη συσχέτιση του συστήματος πήξεως και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω εναλλακτικού μονοπατιού προάγει την καρδιακή δυσλειτουργία στην ARVC [Ren et al., 2021]. Η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος επιβεβαιώνεται και σε περιπτώσεις ασθενών με ACM [Mavroidis et al., 2015; Ren et al., 2021]. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν τη διαμόρφωση του συστήματος του συμπληρώματος θεραπευτικό στόχο. Πράγματι η χορήγηση ενός αναστολέα του υποδοχέα C5aR (Spiegelmer NOX-D19) βελτίωσε την παθολογία των Des-/- ποντικών [Mavroidis et al., 2015].

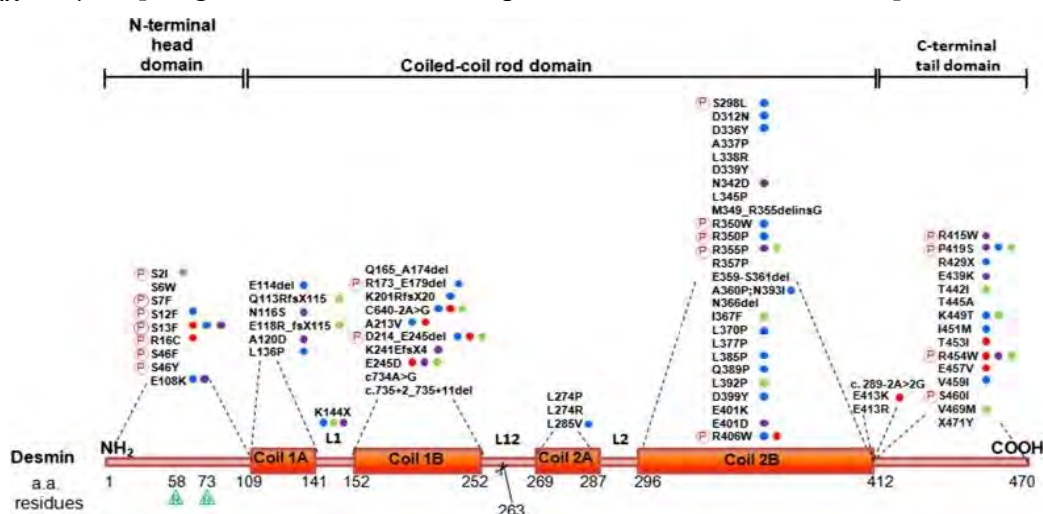
Δεσμινοπάθειες

Οι μυοπάθειες και μυοκαρδιοπάθειες που σχετίζονται με τη δεσμίνη (desmin related myopathies, DRMs) ορίζονται διαφορετικά ως δεσμινοπάθειες. Αφορούν κληρονομικές ασθένειες με ευρύ φάσμα από κλινικά και παθολογικά συμπτώματα και προκαλούνται από διαταραχές στο δίκτυο της δεσμίνης. Κύριο γνώρισμα στις δεσμινοπάθειες είναι η ύπαρξη μη φυσιολογικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τα οποία είναι θετικά στη δεσμίνη. Παρομοίως, εντοπίζονται συσσωματώματα και σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια (ισχαιμική ή μη). Οι διαταραχές αυτές στη δεσμίνη μπορεί να οφείλονται, είτε σε μεταλλάξεις στο γονίδιο, είτε σε μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη [Capetanaki et al., 2015; Clemen et al., 2013; Dalakas et al., 2000; McLendon and Robbins, 2011; Tsikitis et al., 2018; van Spaendonck-Zwarts et al., 2011; Wang and Robbins, 2006; Rainer et al., 2018].

Μεταλλάξεις

Στο γονίδιο της δεσμίνης (DES) έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 70 μεταλλάξεις (Εικόνα 1.20), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση δεσμινοπάθειας στον άνθρωπο. Η πλειοψηφία των DES μεταλλάξεων αφορά παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλάξεις της κεντρικής ραβδοειδούς περιοχής που οδηγούν στον σχηματισμό συσσωματωμάτων [Brodehl et al., 2012], ενώ περιστατικά ανερμηνεύσιμων (nonsense) μεταλλαγών, ενθέσεων (insertions) ή ελλείψεων (deletions) εντοπίζονται σπανιότερα [Tsikitis et al., 2018]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης για τη συσχέτιση φαινοτύπου – γονοτύπου υποδεικνύεται ότι οι ασθενείς με μεταλλαγές στη σπείρα-2B της δεσμίνης εκδηλώνουν κυρίως καρδιακές και σκελετικές διαταραχές, ενώ στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς με μεμονωμένα καρδιολογικά συμπτώματα έφεραν κάποια μεταλλαγή στις περιοχές κεφαλή ή ουρά [van Spaendonck-Zwarts et al., 2011]. Οι μεταλλάξεις στη δεσμίνη ακολουθούν κατά κύριο λόγο αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομικότητας. Παρόλα αυτά, παρατηρούνται φαινόμενα ατελούς, ηλικιο-εξαρτώμενης και φυλο-εξαρτώμενης διεισδυτικότητας, αλλά και φαινοτυπικής ετερογένειας, ακόμη και σε άτομα της ίδιας οικογένειας, πιθανότατα λόγω της δράσης τροποποιητικών γονιδίων ή επιγενετικών μηχανισμών [Bergman et al., 2007; van Spaendonck-Zwarts et al., 2011].

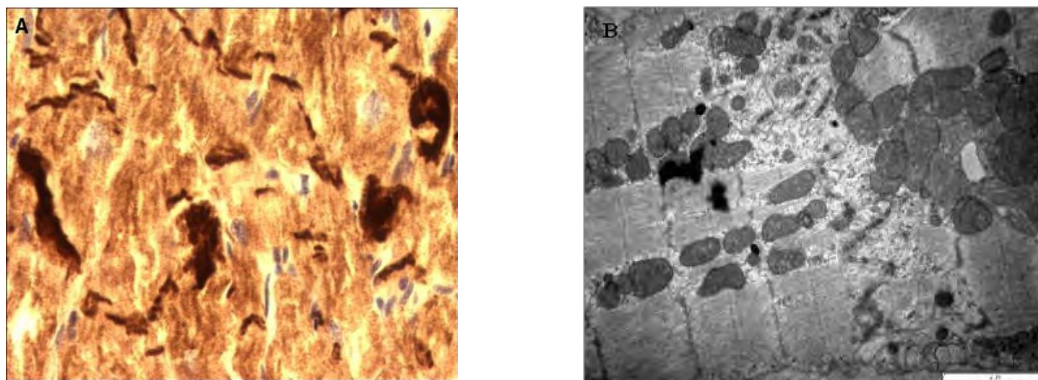


Εικόνα 1.20 Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών στο γονίδιο της δεσμίνης που σχετίζονται με καρδιακές και μυϊκές ασθένειες. Η πλειοψηφία των 73 μεταλλαγών εντοπίζονται στη σπείρα-2B της ραβδοειδούς περιοχής και στην περιοχή ουρά. Οι συνεχείς κόκκινοι κύκλοι (P) αφορούν μεταλλάξεις που επηρεάζουν γνωστές θέσεις φωσφορυλίωσης, ενώ οι διακεκομμένοι κόκκινοι κύκλοι (P) αφορούν μεταλλάξεις σε πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης. Οι δύο γνωστές θέσεις για ADP-ριβοζυλίωση (Arg58 και Arg73) στην περιοχή της κεφαλής υποδηλώνονται με πράσινα τρίγωνα-R. Οι μεταλλαγές που σχετίζονται με καρδιακές διαταραχές εμφανίζονται με χρωματιστές κουκίδες (DCM: μπλε, HCM: πράσινο, RCM: κόκκινο και ARVC: μωβ. Στο σχήμα απεικονίζεται επίσης η επαγόμενη από τον TNF-α, πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης από την κασπάση-6 στη θέση Met263 του συνδέτη L12 [Tsikitis et al., 2018].

Η πιο κοινή μετάλλαξη στη δεσμίνη στον άνθρωπο είναι η R350P. Η αντίστοιχη στο ποντίκι είναι η μετάλλαξη R349P και οδηγεί σε μυοσκελετική αδυναμία, διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και καρδιακές αρρυθμίες [Winter et al., 2016]. Και σε αυτή την περίπτωση, τα συσσωματώματα της μεταλλαγμένης δεσμίνης μεταβάλλουν το δίκτυο ινιδίων, τη διαδικασία αποδόμησης, την αλληλεπίδραση με τις σχετιζόμενες

πρωτεΐνες και προκαλούν ανωμαλίες στο σχήμα και τον αριθμό των μιτοχονδρίων. Ειδικά τα μιτοχονδριακά σύμπλοκα I, III και IV εντοπίζονται μειωμένα ποσοτικά. Βέβαια ο φαινότυπος στον άνθρωπο από την έκφραση της R350P δεσμίνης είναι διαφορετικός καθώς η απώλεια μυών είναι εξουθενωτική [Winter et al., 2016].

Αρκετές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί και στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης στον άνθρωπο και έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών. Όπως για παράδειγμα η S13F μετάλλαξη σχετίζεται με την εκδήλωση δεσμινοπάθειας, καρδιακού αποκλεισμού [Pica et al., 2008] και αρρυθμιογενούς μυοκαρδιοπάθειας δεξιάς κοιλίας [van Tintelen et al., 2009]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη S13F παρουσιάζουν ποικίλη κλινική εικόνα με βασικό όμως γνώρισμα την ανάπτυξη ARVC και ταχυκαρδίες, ενώ υποδεικνύεται και φυλετική διαφοροποίηση καθώς οι άντρες εκδήλωσαν την ασθένεια σε μικρότερη ηλικία από τις γυναίκες [van Tintelen et al., 2009]. Συμπληρωματικά, άλλες μεταλλάξεις στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης είναι η R16C, η οποία σχετίζεται με την εκδήλωση περιοριστικής μυοκαρδιοπάθειας και κολποκοιλιακού αποκλεισμού [Arbustini et al., 2006] και η S46F με την εμφάνιση μυοϊνιδιακής μυοπάθειας [Selcen et al., 2004]. Έτσι, μέσω των μεταλλάξεων η περιοχή κεφαλή συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση ασθενειών στον άνθρωπο τόσο καρδιολογικής σημασίας όσο και μυοσκελετικής. Αξίζει δε να αναφερθεί ότι στην περίπτωση της S13F μετάλλαξης σε κυτταρικό επίπεδο εντοπίζονται συσσωματώματα δεσμίνης και διαταραχές στη δομή των IDs (zig-zag formation) αλλά όχι των z-δίσκων (Εικόνα 1.21) [van Tintelen et al., 2009]. Παρομοίως, παρατηρείται εναπόθεση συσσωματωμάτων δεσμίνης στο μυοκάρδιο σε ασθενείς με τη μετάλλαξη R16C [Arbustini et al., 2006]. Ενώ διαταραχές στους z-δίσκους εντοπίζονται στους ασθενείς με τη μετάλλαξη S46F, πέραν του σχηματισμού συσσωματωμάτων [Selcen et al., 2004].



Εικόνα 1.21 Α) Ανοσοϊστοχημική τομή καρδιακού ιστού ασθενών με τη μετάλλαξη S13F όπου εντοπίζονται συσσωματώματα δεσμίνης. Β) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου παρατηρείται η διαταραγμένη δομή των IDs (zig-zag) σε τομή καρδιακού ιστού ασθενών με τη μετάλλαξη S13F [van Tintelen et al., 2009].

Σκοπός της Διατριβής

Στην παρούσα διατριβή, στόχος ήταν η μελέτη του ρόλου της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου και στην εξέλιξη της καρδιακής νόσου, καθώς φαίνεται με τα τελευταία δεδομένα ότι είναι κομβικής σημασίας τόσο δομικά όσο και λειτουργικά μέσω των αλληλεπιδράσεων της. Επίσης, η μετάλλαξη S13F στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης έχει βρεθεί σε ασθενείς με αρρυθμιογενή μυοκαρδιοπάθεια δεξιάς κοιλίας [van Tintelen et al, 2009].

Έτσι, η μελέτη του ρόλου της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης έγινε μέσω της κατασκευής, του χαρακτηρισμού και της περαιτέρω ανάλυσης του διαγονιδιακού ζωικού προτύπου που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη S13F στο αμινοτελικό άκρο.

Πιο ειδικά, η ανάλυση αφορά τη διερεύνηση των πιθανών τρόπων επίδρασης της μετάλλαξης στο εκτεταμένο κυτταροσκελετικό δίκτυο των ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης και των πιθανών επιπτώσεων στις διαπλεκόμενες πρωτεΐνες, δομές και οργανίδια εξαιτίας της μετάλλαξης S13F στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης και η συσχέτισή τους στην ανάπτυξη και εξέλιξη σε καρδιακή ανεπάρκεια.

Εν προκειμένω, η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην καρδιακή δυσλειτουργία θα βοηθήσει στην ανάπτυξη πιο στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Ζωικά πρότυπα

Τα πειραματόζωα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω μελέτη ήταν ποντίκια αρσενικά α) φυσικού τύπου (wild type, WT), β) ποντίκια που δεν εκφράζουν δεσμίνη (desmin knock out, Des-/-) τα οποία έχουν κατασκευασθεί από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Καπετανάκη [Milner et al., 1996] και γ) ποντίκια τα οποία φέρουν μόνο τη μεταλλαγμένη δεσμίνη με τη σημειακή μετάλλαξη S13F (Des-/- Tg^{MHCdesminS13F}, εν συντομία Des-/-TgS13F). Τα τελευταία ποντίκια παρήχθησαν ύστερα από συνεχείς διασταυρώσεις μεταξύ διαγονιδιακών ποντικών τύπου Des-/- και WT-Tg^{MHCdesminS13F}. Τα διαγονιδιακά ποντίκια WT-Tg^{MHCdesminS13F} φέρουν πέραν της δεσμίνης φυσικού τύπου (WT) στο γονιδιώμα τους και τη δεσμίνη με τη σημειακή μετάλλαξη S13F υπό τον έλεγχο του καρδιο-ειδικού υποκινητή myosin heavy chain (MHC) και τα οποία μας χορηγήθηκαν από τον συνεργάτη μας prof. dr. J.P. (Peter) van Tintelen (UMC, Utrecht).

Τα πειραματόζωα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω μελέτη φυλάσσονται σε κλωβούς σε ειδικά διαμορφωμένο περιβάλλοντα χώρο, ελεύθερο παθογόνων (specific pathogen free, SPF), σύμφωνα με τα σύγχρονα διεθνή πρότυπα [Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) και Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA), βλ. www.bioacademy.gr/lab/lab.php?lb=25].

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια διαφόρων ηλικιών, όπως 3, 6, 9 και 12 μηνών, ώστε να μελετηθεί καλύτερα η εξέλιξη της νόσου σε διαφορετικά στάδια.

2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί ο γενότυπος των διαγονιδιακών ποντικών χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώνεται από δείγμα ουράς του ζωικού προτύπου. Αρχικά, ο ιστός επώαζεται στους 55°C σε διάλυμα πρωτεΐνάσης K (Sigma-Aldrich) (0,6mg/ml σε 50mM Tris HCl pH 7.5, 100mM EDTA και 0.5% SDS) για τουλάχιστον 8 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διπλός καθαρισμός σε ίσο όγκο φαινόλης (pH 8) και ομοίως σε ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Ακολουθείται κατακρήμνιση με προσθήκη οξικού νατρίου pH 6.0 σε τελική συγκέντρωση 300mM και διπλάσιου όγκου αιθανόλης 100% (-20°C). Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (5mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) και φυλάσσεται στους 4°C.

2.3 Ανάλυση γονιδιωματικού DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται συνήθως για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, η οποία βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο εναρκτήριες αλληλουχίες ως εναρκτήρια μόρια για μία σειρά από συνθετικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από μία DNA πολυμεράση, την Taq πολυμεράση, η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η κάθε εναρκτήρια αλληλουχία είναι συμπληρωματική με τη μία, εκ των δύο, αλυσίδα της μήτρας DNA. Αρχικά, πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας DNA με θέρμανση. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία επανασύνδεσης, η οποία επιτρέπει την υβριδοποίηση των εναρκτήριων μορίων με τις συμπληρωματικές αλυσίδες και τέλος, πραγματοποιείται επιμήκυνση των αναδιαταγμένων μορίων 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.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μέθοδος εφαρμόζεται για τον έλεγχο του γενοτύπου των διαγονιδιακών ποντικών. Ο έλεγχος γίνεται με απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα προς εξέταση ποντίκια, με τον τρόπο που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

- Για τον έλεγχο της γονιδιακής απενεργοποίησης της δεσμίνης ακολουθείται ένα καθορισμένο πρωτόκολλο [Milner et al., 1996]. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση της QIAGEN, dNTPs και οι ακόλουθοι εκκινητές:



Οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών είναι 0,4μM, 0,2μM και 0,03μM αντίστοιχα. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλαμβάνουν: 10' στους 96°C, 35 επαναλήψεις του κύκλου: 1' στους 94°C, 2' στους 60°C και 3' στους 72°C, τέλος 5' στους 72°C και 15' στους 4°C. Το αλληλόμορφο της δεσμίνης φυσικού τύπου Des^{+/+} δημιουργεί ζώνη μεγέθους 700bp, ενώ το διαγονιδιακό αλληλόμορφο Des^{-/-} δημιουργεί ζώνη μεγέθους 390bp. Η αντίδραση του πρόσθιου εκκινητή DesnullF με τον ανάστροφο DesnullR δίνει ένα προϊόν μήκους ~700bp όταν υπάρχει το φυσικό γονίδιο δεσμίνης (WT), ενώ η αντίδραση του πρόσθιου εκκινητή DesnullF με τον ανάστροφο neo δίνει ένα προϊόν μήκους ~390bp και ανιχνεύει το απενεργοποιημένο γονίδιο της δεσμίνης (Des^{-/-}), καθώς φέρει την ένθεση του γονιδίου νεομυκίνης.

- Για τον έλεγχο της γονιδιακής μετάλλαξης S13F χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση της QIAGEN, dNTPs και το ακόλουθο ζευγάρι εκκινητών:

ACLF 5' GCACCCTTACCCCACATAGA 3'
adesR 5' TATCAGGTTGTCACGCTCCA 3'

Η τελική συγκέντρωση όλων των εκκινητών είναι 10μM. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλαμβάνουν: 3' στους 94°C, 39 επαναλήψεις του κύκλου: 45'' στους 94°C, 45'' στους 60°C και 1' στους 72°C, και τελευταία τα βήματα 10' στους 72°C και 20' στους 4 °C. Το διαγονιδιακό αλληλόμορφο S13F δημιουργεί ζώνη μεγέθους περίπου 740bp.

Ο πρόσθιος εκκινητής ACLF αναγνωρίζει τον καρδιο-ειδικό υποκινητή (promoter) της α βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (α MHC) που έχουμε συζεύξει με το γονίδιο της δεσμίνης p.S13F και έτσι ο ανάστροφος adesR εκκινητής αναγνωρίζει το γονίδιο της δεσμίνης p.S13F. Συνεπώς, όταν υπάρχει το διαγονίδιο της δεσμίνης p.S13F με τον υποκινητή α MHC η αντίδραση αυτή δίνει ένα προϊόν συνολικού μήκους περίπου 740 bp, ενώ όταν αυτό απουσιάζει δεν παρατηρείται κανένα προϊόν.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση όλων των PCR προϊόντων πραγματοποιείται σε πήκτωμα αγαρόζης. Μόρια DNA, μεγέθους 200b-50kb, 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 λογαρίθμου ($\log_{10}$) του μοριακού βάρους του. Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα επηρεάζει επιπλέον την κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει την αντιστοιχία μεταξύ της αναλογίας αγαρόζης στο πήκτωμα και του μεγέθους των τμημάτων του DNA.

Ποσοστό αγαρόζης (%)	Μέγεθος DNA (kb)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

Σε 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE (0.04M Tris-acetate, 0,001M EDTA) διαλύεται με θέρμανση στους 100°C η αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης. Στη συνέχεια, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 1 μ g/ml και το

διάλυμα στερεοποιείται σε κατάλληλο υποδοχέα-μήτρα (διαστάσεων 15x22cm). Τα δείγματα του DNA αναλύονται σε οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης, υπό σταθερή τάση 45-70V.

2.5 Ιστολογική επεξεργασία & χρώσεις

Οι καρδιακοί ιστοί που χρησιμοποιούνται για τις ιστολογικές χρώσεις προέρχονται από πειραματόζωα που έχουν θυσιαστεί με αυχενική μετατόπιση, μετά από αναισθησία με αιθέρα. Μονιμοποιούνται σε διάλυμα φορμαλίνης 10% ή παραφορμαλδεϋδης 4% για τουλάχιστον 8 ώρες και στη συνέχεια επωάζονται σε διάλυμα σουκρόζης 30% σε PBS για 3-4 ώρες. Η αφυδάτωση των ιστών επιτυγχάνεται με τη χρήση σειράς διαλυμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση αιθανόλης (70%, 80%, 90%, 95% και 100%). Ο αφυδατωμένος ιστός επωάζεται στη συνέχεια δύο φορές σε 100% ξυλόλη για 20'. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα ξυλόλης/παραφίνης (1:1) στους 65°C για 45'. Τέλος, ο ιστός εμβαπτίζεται σε 100% παραφίνη στους 65°C, εγκλείεται σε παραφίνη και φυλάσσεται στους 4°C. Από τα μπλοκ παραφίνης κόβονται τομές πάχους 5μm με μικροτόμο, οι οποίες φυλάσσονται σε δροσερό μέρος (25 °C).

Έπειτα, οι τομές πριν την εφαρμογή οποιασδήποτε χρώσης υπόκεινται σε αποπαραφινολοποίηση και ενυδάτωση, προκειμένου να διαπεράσει η υδατοδιαλυτή χρωστική τον ιστό προσδίδοντας το αντίστοιχο χρώμα.

2.5.1 Χρώση τομών με αιματοξυλίνη/εωζίνη

Η αιματοξυλίνη αποδίδει τους πυρήνες ιώδεις, ενώ η εωζίνη αποδίδει το κυτταρόπλασμα ροζ. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- Επώαση σε διάλυμα αιματοξυλίνης (hematoxylin) για 1' σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
- 3 εκπλύσεις με αποσταγμένο νερό
- Επώαση σε διάλυμα εωζίνης (eosin Y 0,5% w/v) για 1' σε RT
- 3 εκπλύσεις με αποσταγμένο νερό

Έπειτα από τη χρώση οι τομές αφυδατώνονται, όπως περιγράφηκε, και εγκλείονται με τη χρήση υλικού έγκλεισης Depex (mounting medium, Serva) και καλυπτρίδα.

2.5.2 Χρώση τομών με Masson's trichrome

Η τριχρωμία Masson's προσδίδει τους πυρήνες καφέ χρώση, στο κυτταρόπλασμα ροζ χρώση και στο κολλαγόνο ιώδες/μπλε χρώση. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται ως εξής:

- Επώαση σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1' σε RT

- Επώαση σε διάλυμα "ερυθρό του Mallory" (Fuscin acid 0,5%, glacial acetic acid 0,5%) για 1' σε RT
- Επώαση σε διάλυμα φωσφομολυβδικού οξέος 1%, για 2' σε RT
- Επώαση σε διάλυμα μεθυλικού μπλε (methyl blue), για 1' σε RT

Έπειτα από τη χρώση οι τομές αφυδατώνονται, όπως περιγράφηκε, και εγκλείονται με τη χρήση υλικού έγκλεισης Depex (mounting medium, Serva) και καλυπτρίδα.

2.5.3 Μικροσκοπία

Οι ιστολογικές χρώσεις των τομών υπό H/E και Masson's trichrome, παρατηρούνται και αναλύονται σε οπτικό φωτονικό μικροσκόπιο της εταιρείας Zeiss, μοντέλο Axiophot (Zeiss-Axiophot οπτικό φωτομικροσκόπιο), ενώ η λήψη των εικόνων γίνεται με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας της εταιρείας Leica, μοντέλο DC-500. Στη συνέχεια, η ανάλυση των εικόνων αυτών γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού ανάλυσης εικόνας IM50 της εταιρείας Leica.

2.5.4 Αξιολόγηση του "replacement index"

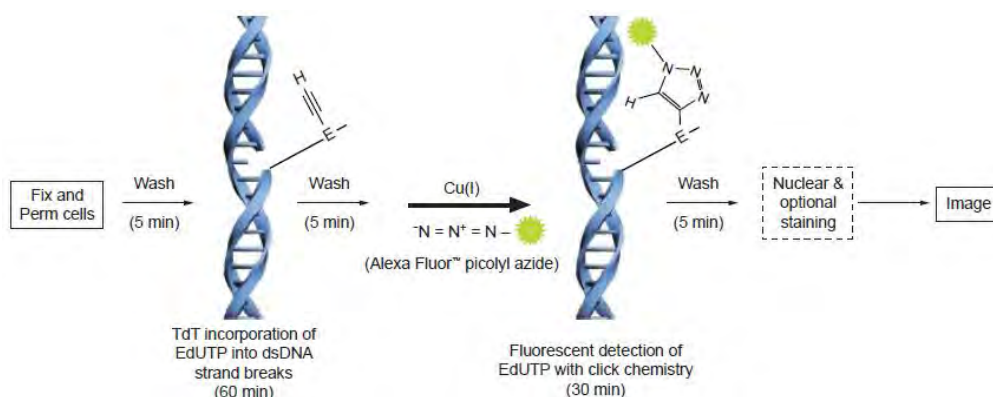
Το "replacement index" είναι ένας δείκτης βλάβης του καρδιακού ιστού και αντιπροσωπεύει την αντικατάσταση του καρδιακού ιστού με ινωτικό ιστό και/ή ασβεστίωση και/ή διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων. Το εύρος της κλίμακας είναι 0 έως 4, όπου με 0 ορίζονται οι φυσιολογικές καρδιές, με 1 οι καρδιές με μία ή δύο εστίες περιορισμένης αντικατάστασης, συνήθως εντοπίζονται στη δεξιά κοιλία, με 2 οι καρδιές με δύο ή τρεις εστίες σε δύο διαφορετικές περιοχές του καρδιακού ιστού, με 3 οι καρδιές με πολλαπλές εστίες εκτεταμένης αντικατάστασης, συνήθως σε όλα τα κοιλιακά διαμερίσματα (δεξιά και αριστερά κοιλιακά ελεύθερα τοιχώματα και διάφραγμα) και με 4 οι καρδιές με πολλαπλές εστίες εκτεταμένης και διάχυτης ίνωσης που καταλαμβάνει περισσότερο από το 50% της επιφάνειας του μυοκαρδίου στη συγκεκριμένη τομή.

Για τη μέτρηση του "replacement index" οι καρδιές τεμαχίζονται στα δυο κατά το διαμήκη άξονα και εγκλείονται σε παραφίνη. Αναλύονται τουλάχιστον οχτώ τομές ανά καρδιά για κάθε ζώο (από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές). Στις τομές παραφίνης υπάρχουν όλα τα τμήματα της καρδιάς (δεξιά και αριστερή κοιλία και κόλποι).

2.6 Ανίχνευση αποπτωτικών πυρήνων με τη μέθοδο TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTPNick End Labeling)

Από την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου TUNEL το 1992 [Gavrieli et al., 1992], πλέον χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της απόπτωσης. Η μέθοδος βασίζεται

στην ενσωμάτωση τροποποιημένων dUTPs από το ένζυμο TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) στα 3'-OH άκρα του κατακερματισμένου DNA, το οποίο αποτελεί σήμα κατατεθέν για τον προσδιορισμό της απόπτωσης (Εικόνα 2.1). Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το kit Click-iT™ Plus TUNEL Assay, Invitrogen.



Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανίχνευσης της απόπτωσης μέσω του kit Click-iT™ Plus TUNEL Assay, Invitrogen.

Με την εφαρμογή της μεθόδου οι αποπτωτικοί πυρήνες σημαίνονται με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική. Προκειμένου να γίνει διάκριση εάν τα αποπτωτικά κύτταρα είναι καρδιομυοκύτταρα ή άλλα κύτταρα του μυοκαρδίου (π.χ. κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος), πριν από τη χρώση των πυρήνων, πραγματοποιείται σήμανση της connexin43 (ειδική πρωτεΐνη των καρδιομυοκυττάρων) με πράσινη φθορίζουσα χρωστική, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθεί.

Η σήμανση γίνεται σε τομές παραφίνης. Επομένως, οι τομές πριν εφαρμοστεί κάποιου είδους χρώση υπόκεινται σε αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση. Έπειτα, ακολουθεί η διαδικασία ανάκτησης αντιγόνου όπου τα πλακάκια (slides) με τις τομές επωάζονται με το διάλυμα (10mM Tris pH=9, 5mM EDTA, 0.05% Tween-20) για 5 λεπτά στους 96°C και ακολουθεί έκπλυση με PBS T-20-0.1% για 2 λεπτά. Επώαση με γλυκίνη 0.1M για 30 λεπτά και έκπλυση με PBS T-20-0.1% για 2 λεπτά. Οι ιστοί κατόπιν επωάζονται με PBS-50mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να δεσμευτούν από την αλβουμίνη οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων πάνω στις τομές. Έτσι, στη συνέχεια, επωάζεται το πρώτο αντίσωμα anti-connexin-43 (Rabbit 43120, Sigma) σε αραιώση 1:600 σε υδροποιημένο περιβάλλον στους 4°C για 12-16 ώρες (over-night) και ακολουθείται έκπλυση σε PBS-Tween-20 0.1% (x3) για 5 λεπτά. Ακολουθεί επώαση με το δεύτερο αντίσωμα anti-Rabbit Alexa-488 (A211034, Molecular Probes) σε αραιώση 1:1000, σε διάλυμα 10mg/ml BSA/PBS-Tween-20 0.1% σε υδροποιημένο περιβάλλον, στο σκοτάδι για 2 ώρες σε RT και ακολουθεί έκπλυση με PBS-Tween-20 0.1% (x3) για 5 λεπτά. Έπειτα, γίνεται επώαση των τομών με Equilibration Buffer για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εφαρμόζονται 50μl διαλύματος Reaction mix σε κάθε τομή για 45 λεπτά στους 37°C. Ακολουθεί έκπλυση των τομών με PBS-Tween-20 0.1% για 5 λεπτά και έκπλυση με PBS για 2 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιείται η χρώση με DAPI σε αραιώση 1:1000 με PBS για 1 λεπτό, προκειμένου να σημειωθεί το πυρηνικό υλικό και έκπλυση με PBS για 2 λεπτά. Τα

πλακάκια επικαλύπτονται με ειδικό υλικό (DAKO fluorescent mounting medium, IMM ibidi No:50001), τοποθετούνται οι καλυπτρίδες και αφότου στεγνώσουν παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού. Ακολουθεί αναλυτικά η περιγραφή των Equilibration Buffer και του διαλύματος Reaction mix.

Equilibration Buffer (1x, 60μl)

12μl 5X Terminal Transferase buffer
3.3μl 25 mM CoCl₂ (comes with TdT kit)
44.7μl H₂O

Reaction Mix (1x, 50μl)

36μl H₂O
10μl 5X Terminal Transferase buffer
3 μl 25 mM CoCl₂ (comes with TdT)
0.12 μl 2mM dATP (final: 50 mM)
0.08 μl 1mM Alexa 595 dUTP Molecular Probes
0.1μl 20U/μl TdT Enzyme

2.7 Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ιστούς ή κύτταρα. Οι τομές των καρδιακών ιστών προέρχονται από τα ζωικά πρότυπα που αναφέραμε προηγουμένως και τα οποία θυσιάζονται με αυχενική μετατόπιση μετά από αναισθησία με αιθέρα. Έπειτα, αφαιρείται ο καρδιακός ιστός και αφού καλύπτεται με το μέσο OCT (optimum cutting temperature), αποθηκεύεται στους -80°C. Τέλος, με τη βοήθεια κρυομικροτόμου, τοποθετούνται οι επιθυμητές τομές σε κατάλληλα πλακάκια, τα οποία επίσης αποθηκεύονται στους -80 °C.

Διαδικασία

1. Οι τομές μονιμοποιούνται με απόλυτη ακετόνη για 25 λεπτά στους -20 °C
2. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις σε PBS, για 2 λεπτά σε RT και υπό ελαφριά ανάδευση.
3. Οι ιστοί κατόπιν επωάζονται με 5% αλβουμίνη από ορό βοός (Bovine Serum Albumin) σε PBS-0.05% Tween-20 για 40 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C, ώστε να δεσμευτούν από την αλβουμίνη οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων πάνω στις τομές.
4. Επίδραση με διάλυμα πρώτων αντισωμάτων στις κατάλληλες αραιώσεις. Τα αντισώματα προστίθενται σε 2.5% BSA σε PBS-0.05%Tween-20. Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό ανάδευση στους 4°C για 16-18 ώρες, ή σε RT για 3-4 ώρες.
5. Εκπλύσεις με PBS-0.01% Tween-20 (3 x 5').

6. Ακολουθεί επώαση με το ανάλογο δευτερογενές αντίσωμα (έναντι της Fc περιοχής του πρώτου) το οποίο είναι συνδεδεμένο με κατάλληλη φθορίζουσα ουσία. Η επώαση αυτή διαρκεί συνήθως 1.5 ώρες σε RT και στον ίδιο διαλύτη επώασης με των πρωτογενών αντισωμάτων.
7. Εκπλύσεις με PBS-0.01% Tween-20 (3 x 5') και με PBS (1 x 5').
8. Ακολουθεί χρώση με DAPI (1:1000) για να σημειωθεί το πυρηνικό υλικό, 3 λεπτά σε RT, σε σκοτεινό χώρο.
9. Έκπλυση του ιστού με PBS (1 x 5').
10. Οι τομές που έχουν επωαστεί με αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες επικαλύπτονται με ειδικό υλικό (mounting medium, Dako), το οποίο διατηρεί την ένταση του φθορισμού σε υψηλά επίπεδα και για μεγάλο χρονικό διάστημα, υπό την προϋπόθεση ότι οι τομές διατηρούνται στο σκοτάδι και στους 4 °C.
11. Αφού οι τομές στεγνώσουν στο σκοτάδι για 10 λεπτά περίπου, παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα φίλτρα.

2.8 Συνεστιακή Μικροσκοπία

Η παρατήρηση, καθώς και η ανάλυση των τομών ανοσοφθορισμού, πραγματοποιείται σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού της εταιρείας Leica, μοντέλο TCS SP5, DMI6000 microscope (ανάστροφο, software LAS-AF, 23-24°C, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Η ποσοτικοποίηση του πλάτους των εμβόλιμων δίσκων από την ανοσοσήμανση καρδιακών τομών έναντι δεσμοπλακίνης και πλακογλοβίνης έγινε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

2.9 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία εφαρμόστηκε σε κατάλληλες τομές από καρδιακό ιστό των ζωικών προτύπων για την εν τω βάθει ανάλυση της υπερδομής διαφόρων δομών των μυοκαρδιοκυττάρων.

- Τα ποντίκια θυσιάζονται με αυχενική μετατόπιση 30 λεπτά αφού έχει προηγηθεί ένεση ηπαρίνης: 5U/gr σωματικού βάρους.
- Στη συνέχεια διάλυμα μονιμοποίησης [2,5% γλουταραλδεϋδη σε 0.1M διαλύματος φωσφορικών pH 7.4 (Phosphate Buffer, PB)] εγχέεται στην αριστερή κοιλία με βελόνα διαμέτρου 25gauge.
- Η καρδιά στη συνέχεια τέμνεται σε τεμάχια 1-2 mm τα οποία επωάζονται στο διάλυμα μονιμοποίησης για 12 ώρες, στους 4°C.

- Μετά την έκπλυση με 0.1M PB ακολουθείται μονιμοποίηση με 1% τετροξείδιο του οσμίου για 1 ώρα στους 4°C.
- Τα δείγματα στη συνέχεια αφυδατώνονται σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (50%, 70%, 80%, 90%, 2 x 95% και 3 x 100%).
- Ακολουθεί σταδιακή ενσωμάτωση των ιστών σε μίγμα ρητίνης [αιθανόλη: οξείδιο του προπυλενίου (1:1), οξείδιο του προπυλενίου: ρητίνη (2:1), οξείδιο του προπυλενίου: ρητίνη (1:1), ρητίνη]
- Ο τελικός εγκλεισμός των δειγμάτων στη ρητίνη γίνεται σε ειδική μήτρα, στους 60°C για 24h.

Οι τομές λαμβάνονται με τη χρήση της υπερμικροτόμου Leica EM UC7 (Leica) και συλλέγονται σε πλέγματα νικελίου (300 mesh nickel grids). Αφού οι τομές επιχρωματιστούν με uranyl acetate και κιτρικό μόλυβδο, εξετάζονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Philips 420 με τάση επιτάχυνσης 40kV. Οι εικόνες λαμβάνονται με την κάμερα Megaview G2 CCD (Olympus-SIS).

2.10 Υπερηχογραφία καρδιάς ζωικών προτύπων

Τα ποντίκια αναισθητοποιούνται με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 100mg/kg κεταμίνης και τοποθετούνται σε ύπτια θέση σε θερμαινόμενο στρώμα. Με τη λήψη δισδιάστατης απεικόνισης M-mode υπολογίζονται παράμετροι, όπως η τελική διαστολική διάσταση της αριστερής κοιλίας (left ventricle end diastolic dimension, LVEDD), η τελική συστολική διάσταση της αριστερής κοιλίας (left ventricle end systolic dimension, LVESD), το πάχος του οπισθίου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή (LV posterior wall thickness at diastole, LVPWTD), το πάχος του οπισθίου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη συστολή (LV posterior wall thickness at systole, LVPWTS) και ο καρδιακός ρυθμός (heart rate, HR). Η τελική διαστολή προσδιορίζεται ως η μεγίστη διαστολική διάσταση και η τελική συστολή λαμβάνεται στην κορυφή της κίνησης του οπίσθιου τοιχώματος.

Επιπλέον, υπολογίζεται ο λόγος της ακτίνας LV προς PWT (r/h) και το ποσοστό κλασματικής βράχυνσης (fractional shortening, FS) της αριστερής κοιλίας ($FS [\%] = [(EDD - ESD) / EDD] \times 100$), όπως έχει ήδη περιγραφεί [Papathanasiou et al., 2015].

Υπολογίζονται, επίσης, τρεις σφίξεις, ώστε να προκύψει ο μέσος όρος για κάθε μέτρηση. Η υπερηχοκαρδιογραφική ανάλυση επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής ενός συστήματος υπερήχων (Vivid 7, General Electric Healthcare) με ένα 13-MHz γραμμικό μετατροπέα. Οι εικόνες ηχοκαρδιογραφίας μελετώνται με τη χρήση του λογισμικού Echopac PC SW 3.1.3 (General Electric Healthcare).

2.11 Μέτρηση αρτηριακής πίεσης

Για τη μέτρηση της αρτηριακής πίεσης στα ποντίκια χρησιμοποιείται το μη επεμβατικό σύστημα καταγραφής της αρτηριακής πίεσης CODA 8 (Kent Scientific, Torrington, CT) όπου η περιχειρίδα εφαρμόζεται στην ουρά (tail-cuff system). Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί VPR (Volume Pressure Recording) προκειμένου να ανιχνεύσει την αρτηριακή πίεση βασιζόμενο στις εναλλαγές της πίεσης στην ουρά. Η καταμέτρηση διεξάγεται σε ήσυχο περιβάλλον, με σταθερή θερμοκρασία ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) και αφού τα ποντίκια έχουν εγκλιματιστεί για μια ώρα πριν την έναρξη της διαδικασίας. Η περιχειρίδα απόφραξης (occlusion cuff) τοποθετείται στην ουρά και δίπλα της η περιχειρίδα του αισθητήρα VPR. Τα θερμαντικά επιθέματα, που παρέχονται ως μέρος του συστήματος CODA 8, προθερμαίνονται στους $33\text{--}35^{\circ}\text{C}$ και εφαρμόζονται στα ποντίκια για 5 λεπτά πριν και κατά τη διάρκεια της καταγραφής της αρτηριακής πίεσης. Κατά τη διαδικασία της μέτρησης, η περιχειρίδα απόφραξης γεμίζει στα 250mmHg και αδειάζει σε 20sec. Ο αισθητήρας VPR ανιχνεύει τις αλλαγές στον όγκο της ουράς καθώς το αίμα επιστρέφει στην ουρά κατά το άδειασμα της περιχειρίδας απόφραξης. Η ελάχιστη αλλαγή όγκου ορίζεται στα 15μl. Κάθε διαδικασία εγγραφής αποτελείται από 15 έως 25 κύκλους γεμίσματος-αδειάσματος ανά σετ, από τους οποίους οι πρώτοι 5 κύκλοι θεωρούνται κύκλοι εγκλιματισμού και δεν χρησιμοποιούνται στην ανάλυση. Να αναφέρουμε, τέλος, ότι τα ποντίκια εξοικειώνονται με τον χώρο και τη διαδικασία για τουλάχιστον 5 συνεχόμενες ημέρες πριν από τις βασικές μετρήσεις της αρτηριακής πίεσης.

2.12 Πρωτόκολλο κολύμβησης/ καμπύλης επιβίωσης

Τα ποντίκια υποβάλλονται σε άσκηση κολύμβησης σύμφωνα με το καθορισμένο πρωτόκολλο δυο φορές την ημέρα. Το πρόγραμμα κολύμβησης ξεκινάει με 10 λεπτά την πρώτη μέρα και αυξάνεται ανά 10 λεπτά τη μέρα μέχρι τη μία ώρα. Η διπλή άσκηση 1 ώρας συνεχίζεται για 3 ημέρες και στη συνέχεια αυξάνεται στα 90 λεπτά. Η διπλή άσκηση των 90 λεπτών συνεχίζεται για 5 μέρες. Συνολικά η άσκηση κολύμβησης έχει διάρκεια 15 ημέρες. Καθ' όλη τη διάρκεια εφαρμογής του πρωτοκόλλου καταγράφονται οι αποθανόντες και έτσι στο τέλος προκύπτει η καμπύλη επιβίωσης.

2.13 Πρωτόκολλο τεστ κοπώσεως σε διάδρομο

Το ποντίκια σε αυτή την περίπτωση υποβάλλονται σε μια δοκιμή προοδευτικής μέγιστης άσκησης σε διάδρομο (Treadmill progressive maximal exercise test).

Πρώτη μέρα: Εγκλιματισμός των ζώων στον διάδρομο, ο οποίος περιλαμβάνει:

Τοποθέτηση των ζώων στον διάδρομο χωρίς κίνηση για 3min.

Ενεργοποίηση του ηλεκτρικού πλέγματος κραδασμών (1mA).

Ενεργοποίηση του διαδρόμου σε μια ταχύτητα 10cm/sec για 5 λεπτά.

Αύξηση ταχύτητας στα 13cm/sec για 2 λεπτά.

Αύξηση ταχύτητας στα 16cm/sec για 2 λεπτά.

Αύξηση ταχύτητας στα 20cm/sec μέχρι τα 12min.

Δεύτερη-τρίτη μέρα: Επαναλαμβάνεται ο εγκλιματισμός των ζώων.

Τέταρτη-πέμπτη μέρα: Τα ποντίκια ξεκουράζονται για 48 ώρες πριν την εφαρμογή του τεστ προοδευτικής μέγιστης άσκησης σε διάδρομο.

Έκτη μέρα: Τεστ προοδευτικής μέγιστης άσκησης σε διάδρομο

Αρχικά ακολουθούνται τα βήματα του εγκλιματισμού.

Αύξηση ταχύτητας στα 30cm/sec για 8min

Αύξηση ταχύτητας στα 40cm/sec μέχρι το ποντίκι να κουραστεί (ενώ παραμένει συνεχόμενα υπό ενεργό πλέγμα κραδασμών για 4-5sec)

Απενεργοποιείται το πλέγμα κραδασμών και τον διάδρομο

Απομακρύνεται το ποντίκι και έπειτα ο διάδρομος καθαρίζεται, αρχικά με νερό και μετά με EtOH 70%.

Καταγραφή της απόστασης που διήνυσαν τα ζωικά πρότυπα.

2.14 Αλληλεπιδράσεις Δεσμίνης

Προκειμένου να εξακριβωθεί η αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τις NDUF52 και saposinD *in vitro* με τη μέθοδο GST pull down. Η αλληλουχία DNA για την πρωτεΐνη NDUF52 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein2, 49kDa, yeast two hybrid κλώνος H111.9, 504bp-2059bp) (EcoRI – SmaI, οι θέσεις αναγνώρισης των ενζυμάτων περιορισμού) ενθέτεται στον φορέα pGEX5x.1, εκφράζεται και στη συνέχεια απομονώνεται από τα μετασχηματισμένα βακτήρια ως χιμαιρική πρωτεΐνη GST-NDUF52. Αντιστοίχως, για την πρωτεΐνη saposinD χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pGEX5x.1-saposinD (yeast two hybrid κλώνος H145.1, 1337bp-2839bp). Επιπλέον, χρησιμοποιείται ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από καρδιακό ιστό από Des-/-TgS13F (μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F), Des-/- (αρνητικό control) και WT (θετικό control) ποντίκια ως πηγές δεσμίνης. Η επιβεβαίωση ή μη της αλληλεπίδρασης γίνεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της δεσμίνης με ειδικό αντίσωμα. Οι ερευνητικές διαδικασίες περιγράφονται στη συνέχεια.

2.15 Πέψεις με Ένζυμα Περιορισμού

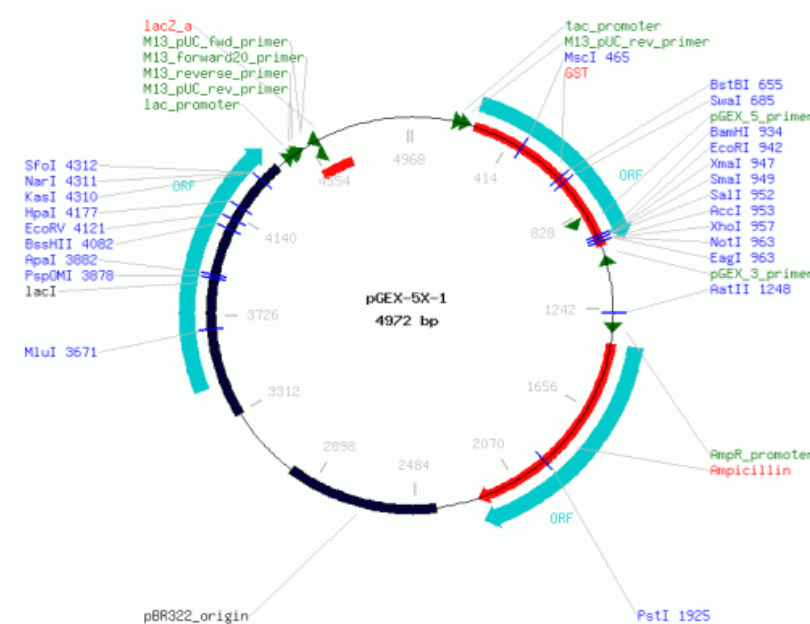
Τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις πέψεις και την ένθεση των αλληλουχιών DNA ήταν από την εταιρεία New England Biolabs και η συγκέντρωσή τους σε κάθε αντίδραση ήταν 20U ενζύμου/2μg πλασμιδιακού DNA. Οι πέψεις επωάζονται για περίπου 3 ώρες στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης τα ένζυμα απενεργοποιούνται με θέρμανση στους 60°C για 10 λεπτά.

2.16 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης έγινε με τη βοήθεια του Nucleospin Extract II (#740609.50, www.mn-net.com) της Macherey-Nagel και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην πρόσδεση του DNA υπό την παρουσία χαοτροπικών αλάτων σε μια μεμβράνη πυριτίου. Οι προσμίξεις όπως άλατα και υδατοδιαλυτά μακρομόρια απομακρύνονται με έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης. Το καθαρό DNA εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύς με το ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα NE (5mM Tris-HCl, pH 8.5) ή με απιονισμένο νερό.

2.17 Σύνδεση των ενθεμάτων στους φορείς

Για τη σύνδεση του ενθέματος στο φορέα (pGEX5x.1, Εικόνα 2.2), το ένθεμα και ο φορέας χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 3:1. Η αντίδραση της σύνδεσης επωάζεται στους 16°C για 16-18 ώρες. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνδεση είναι η λιγάση της New England Biolabs (#M0202L) σε συγκέντρωση 20U/αντίδραση.



Εικόνα 2.2 Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEX-5X-1, στον οποίο ενθέσαμε τις αλληλουχίες DNA είτε για την πρωτεΐνη NDUF52 (EcoR I- Sma I) είτε για την πρωτεΐνη sarosinD με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

2.18 Παρασκευή Θρεπτικών Υλικών

LB Θρεπτικό Μέσο	10g/L bacto-tryptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl	Ρύθμιση pH=7.0 → Αποστείρωση
LB-agar Τρυβλία	10g/L bacto-tryptone, 5g/L yeast extract, 10g/L NaCl	Ρύθμιση pH=7.0 → + 20g/L agar → Αποστείρωση → + κατάλληλο αντιβιοτικό → Τρυβλία
2X YTA	16g/L tryptone, 10g/L yeast extract, 5g/L NaCl	Ρύθμιση pH=7.0 → Αποστείρωση

2.19 Μετασχηματισμός Βακτηριακών Κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

1. Προσθήκη σε σωληνάκια των 1,5ml 10μl από την αντίδραση σύνδεσης (όπως περιγράφεται παραπάνω) και 50μl Library Efficiency DH5a Competent Cells (Invitrogen #18263-012).
2. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Επώαση για 45sec στους 42 °C.
4. Μεταφορά σε πάγο για 2 λεπτά.
5. Μεταφορά σε σωληνάκια 15ml και προσθήκη 950μl LB θρεπτικό μέσο.

6. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C και υπό ανάδευση (200rpm).
7. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 2500rpm.
8. Απορρίψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση των κυττάρων στο εναπομένον διάλυμα.
9. Επίστρωση των κυττάρων στα τρυβλία με το αντιβιοτικό επιλογής.
10. Επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες για την ανάπτυξη των αποικιών.

2.20 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA

❖ Μεγάλης Κλίμακας Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η μεγάλης κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA γίνεται με τη βοήθεια του Plasmid MidiKit της Qiagen (#12143, www.qiagen.com) και σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στο φυλλάδιο της εταιρείας. Η απομόνωση γίνεται από 50ml βακτηριακή καλλιέργεια με αλκαλική λύση των κυττάρων, η οποία περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Birnboim και Doly το 1979 [Sambrook et al., 1989], σε συνδυασμό με χρωματογραφία ιοντανταλλαγής. Η έκλυση του DNA από την κολώνα γίνεται με διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος (QF: 50mM Tris-HCl με pH=8,5, 1.25M NaCl, 15% isopropanol). Ακολουθείται κατακρήμνιση του DNA με 0,75 όγκους ισοπροπανόλης και επαναδιάλυση σε 500μl H₂O. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA κυμαίνεται από 0,3-0,6 mg/ml.

❖ Μικρής Κλίμακας Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA γίνεται με τη βοήθεια του Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel (#740588.250, www.mn-net.com) και σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στο φυλλάδιο της εταιρείας. Η απομόνωση γίνεται από 5ml βακτηριακή καλλιέργεια με αλκαλική λύση των κυττάρων σε συνδυασμό με πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA σε μεμβράνη silica. Το καθαρό πλασμιδιακό DNA εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος με 50μl ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα (AE: 5mM Tris-HCl pH=8,5). Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA κυμαίνεται από 0,05-0,2 mg/ml.

2.21 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Τα δείγματα πλασμιδιακού DNA που απομονώνονται, αποστέλλονται εν συνεχεία στην εταιρεία MacroGen για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η επιβεβαίωση/ έλεγχος των αλληλουχιών πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.22 Έκφραση Χιμαιρικών Βακτηριακών Πρωτεϊνών

Glutathione S-Transferase (GST) Gene Fusion System

Το GST Gene Fusion System είναι ένα σύστημα για έκφραση, καθαρισμό και ανίχνευση χιμαιρικών πρωτεϊνών που παράγονται σε *E. coli*. Το σύστημα βασίζεται στην επαγωγή και σε υψηλά επίπεδα έκφραση γονιδίων ή γονιδιακών τμημάτων μετά από σύντηξη με την GST του *Schistosoma japonicum*. Η έκφραση σε *E. coli* παράγει τις χιμαιρικές πρωτεΐνες με την GST ομάδα στο αμινοτελικό άκρο και την πρωτεΐνη στο καρβοξυτελικό άκρο. Η GST είναι μία 26kDa πρωτεΐνη που μπορεί να εκφραστεί σε *E. coli* με πλήρη ενζυμική δραστηριότητα. Οι GST χιμαιρικές πρωτεΐνες καθαρίζονται από τα βακτηριακά εκχυλίσματα με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση ακινητοποιημένης γλουταθειόνης. Οι GST χιμαιρικές πρωτεΐνες «αιχμαλωτίζονται» από το μέσο συγγένειας και οι προσμίξεις απομακρύνονται με εκπλύσεις. Η διαδικασία καθαρισμού διατηρεί την αντιγονικότητα και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση χρωματομετρικών ή ανοσολογικών μεθόδων. Οι GST χιμαιρικές πρωτεΐνες κατασκευάζονται μέσω ένθεσης ενός γονιδίου ή γονιδιακού τμήματος στην κατάλληλη περιοχή του pGEX φορέα. Η έκφραση είναι υπό τον έλεγχο του tac promoter, ο οποίος επάγεται από το ανάλογο της λακτόζης, το isopropyl β-D thiogalactoside (IPTG). Όλοι οι pGEX φορείς διαθέτουν το lacIa γονίδιο, το προϊόν του οποίου είναι μια πρωτεΐνη καταστολέας που προσδένεται στην περιοχή χειριστή του tac promoter, εμποδίζοντας την έκφραση μέχρι αυτή να επαχθεί από το IPTG. Έτσι, διατηρείται αυστηρός έλεγχος στην έκφραση του ενθέματος. Αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν πληθώρα *E. coli* δεκτικών στελεχών για κλωνοποίηση και έκφραση με τους pGEX φορείς, έγινε η χρήση των *E. coli* BL21 στελεχών. Τα στελέχη αυτά είναι ελαττωματικά στην παραγωγή πρωτεασών OmpT και Lon και έχειδειχθεί ότι εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τις GST χιμαιρικές πρωτεΐνες.

Υλικά και Διαλύματα

Διάλυμα Α'	0,5% Triton X-100, 5mM DTT, 5mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH=8,8, 5% γλυκερόλη, αναστολείς πρωτεασών (PIC, TPCK, leupeptin)
Διάλυμα 6M ουρίας	6M ουρία, 5mM Tris-HCl pH=6,8, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10mM AcNA pH=6,3

Διαδικασία

1. Ανάπτυξη μετασχηματισμένων BL21 βακτηρίων που φέρουν τα πλασμίδια με τα επιθυμητά ενθέματα (pGEX+ένθεμα, pET+ένθεμα) σε LB τρυβλία με το αντιβιοτικό επιλογής μετά από επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες.
2. Μεταφορά μοναδικής αποικίας από τα μετασχηματισμένα βακτήρια σε 500μl 2X YTA θρεπτικό μέσο.

3. Επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες υπό ανάδευση.
4. Μεταφορά 250μl από τις καλλιέργειες σε 40ml 2X YTA.
5. Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση, έως ότου OD600nm= 0,4-0,6 (περίπου 3 ώρες).
6. Προσθήκη 1mM IPTG.
7. Επώαση στους 37°C για 2½ ώρες υπό ανάδευση.
8. Φυγοκέντρηση στα 5000g για 5 λεπτά.
-Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
9. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml Διάλυμα Α΄.
-Μεταφορά σε σωληνάκια των 12ml.
10. Εφαρμογή υπερήχων: 3 φορές από 3 λεπτά.
-Ενδιάμεσα επώαση στον πάγο για 1 λεπτό.
11. Ανάδευση στους 4°C για 20 λεπτά.
12. Φυγοκέντρηση στα 5000g για 15 λεπτά στους 4°C.
-Αποθήκευση υπερκείμενων.
13. Προσθήκη στο ίζημα 2ml διάλυμα 6M ουρίας + αναστολείς πρωτεασών + 0,5% Triton-X.
14. Εφαρμογή υπερήχων 2 φορές για 3 λεπτά.
-Ενδιάμεσα επώαση στον πάγο για 1 λεπτό.
15. Ανάδευση στους 4°C για 20 λεπτά.
16. Τέλος, ακολουθεί SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση των χιμαιρικών βακτηριακών πρωτεϊνών σε 12% πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου.

2.23 Καθαρισμός Χιμαιρικών Βακτηριακών Πρωτεϊνών από την ουρία με διαπίδυση

Υλικά και Διαλύματα

Μεμβράνες Διαπίδυσης	Dialysis Tubing Benzoylated 32mm (Sigma-Aldrich)
Διάλυμα Β	10mM Tris-HCl pH=8, 5mM EDTA, 0,1% NP-40, 0,1% DOC, 2mM DTT, 5% γλυκερόλη, 20mM NaCl, 1M ουρία, αναστολείς πρωτεασών (PIC, TPCK, leupeptin, 1mM pefablock)
Διάλυμα Β΄	10mM Tris-HCl pH=8, 5mM EDTA, 0,1% NP-40, 0,1% DOC, 2mM DTT, 5% γλυκερόλη, 20mM NaCl, αναστολείς πρωτεασών (PIC, TPCK, leupeptin)

Διαδικασία

1. Τοποθέτηση των βακτηριακών πρωτεϊνών (περίπου 2ml) σε μεμβράνη διαπίδυσης και ύστερα γίνεται διαπίδυση έναντι 1L Διάλυμα Β για 18 ώρες στους 4°C
2. Μεταφορά των μεμβρανών διαπίδυσης σε 1L Διάλυμα Β'.
3. Επώαση υπό ανάδευση στους 4°C για 24 ώρες.
4. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε σωληνάκια.
-Φυγοκέντρωση στα 10.000rpm για 5 λεπτά.
5. Μεταφορά των υπερκείμενων σε νέα σωληνάκια και επαναδιάλυση των ιζημάτων σε 600μl διάλυμα 6M ουρίας.
6. Τέλος, ακολουθεί SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με δείγματα τα υπερκείμενα και τα ιζήματα σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

2.24 GST pull down assay

Υλικά και Διαλύματα

Glutathione Sepharose 4B beads (Amersham Bioscience)	
Σωληνάκια LPB (Low Protein Binding) 1,5ml με μικρή πρόσδεση πρωτεϊνών στα τοιχώματα	
Διάλυμα C	10mM Tris-HCl pH=8,8, 5mM EDTA, 0,1% NP-40, 0,1% DOC, αναστολείς πρωτεασών (PIC Sigma)
Διάλυμα C'	10mM Tris-HCl pH=7,4, 5mM EDTA, 0,1% TritonX-100, 1mM DTT, αναστολείς πρωτεασών (PIC Sigma)

Διαδικασία

1. Τοποθέτηση 40μl Glutathione Sepharose 4B beads σε σωληνάκια των 1,5ml LPB.
2. Προσθήκη 1000μl 1X sterile PBS.
- Φυγοκέντρωση στα 3000g για 5 λεπτά.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου.
3. Επανάληψη του βήματος 2 στο ίζημα δύο φορές.
4. Προσθήκη 1000μl διάλυμα C' στο ίζημα.
- Φυγοκέντρωση στα 3000g για 5 λεπτά.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου.
5. Στα ιζήματα προστίθενται κατάλληλες ποσότητες GST-NDUFS2 ή GST-saposinD και GST κατ' αναλογία σε περιεκτικότητα πρωτεΐνης αντιστοίχως, καθώς και διάλυμα C' έως τελικό όγκο 280μl.

6. Επώαση με περιστροφή για 5 ώρες στους 4°C και 1 ώρα σε RT.
 7. Φυγοκέντρηση στα 3000g για 5min.
 - Αποθήκευση υπερκείμενων.
 8. Εκπλύσεις των ιζημάτων με 600μl διάλυμα C'.
 - Επώαση με περιστροφή για 3 λεπτά σε RT.
 - Φυγοκέντρηση στα 3000g για 5 λεπτά.
 - Αποθήκευση των πρώτων υπερκειμένων.
- Επανάληψη των εκπλύσεων (βήμα 8) άλλες 3 φορές.
- Απομάκρυνση υπερκείμενων.
9. Στα ιζήματα Glutathione Sepharose 4B beads/ GST-fusion προσθέτουμε 200μl ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ως πηγή δεσμίνης, μέχρι τελικό όγκο 250μl με διάλυμα C'.
 - Επώαση με περιστροφή O/N (over night) στους 4°C.
 - Φυγοκέντρηση στα 3000g για 5 λεπτά.
 - Αποθήκευση υπερκείμενων.
 10. Έκπλυση με 1000μl διαλύματος C.
 - Επώαση με περιστροφή για 3 λεπτά σε RT.
 - Φυγοκέντρηση στα 3000g για 5 λεπτά.
 - Αποθήκευση των πρώτων υπερκειμένων.
 - Επανάληψη των εκπλύσεων άλλες 4 φορές.
 - Απομάκρυνση υπερκείμενων.
 11. Προσθήκη στα ιζήματα 80μl 1X SDS sample buffer με 10mM DTT.
 12. Η πιστοποίηση της δεσμίνης στη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-NDUFS2 ή GST-saposinD γίνεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της δεσμίνης.

2.25 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καρδιακό ιστό

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης	1X PBS, 2mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), 0,1% Tween-20, 1mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), 0,2mM Na ₂ VO ₃ , 1mM NaF
Αναστολείς πρωτεασών	protease inhibitors cocktail (PIC, Sigma) και Pefablock

Αρχικά τα ποντίκια θυσιάζονται υπό αναισθησία με αιθέρα και στη συνέχεια η καρδιά αφού διηθηθεί με 10ml φυσιολογικού ορού (PBS) αφαιρείται και βυθίζεται σε

υγρό άζωτο για να επιτευχθεί άμεση ψύξη. Κατόπιν, ο ιστός μεταφέρεται σε ιγδίο όπου και λειοτριβείται με τη χρήση υγρού άζωτου. Οι κονιορτοποιημένοι ιστοί μπορούν να φυλαχτούν σε υπερ-καταψύκτη (-80°C) ή να προχωρήσουν απευθείας σε διαδικασία εκχύλισης.

Στον κονιορτοποιημένο καρδιακό ιστό προστίθεται κρύο (4°C) ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer) και αναστολείς πρωτεασών. Έτσι, το μίγμα ομογενοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτρικού ομογενοποιητή τύπου polytron και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων για 30sec και 1 λεπτό στον πάγο επί 3 φορές. Εν συνεχεία, το ομογενοποίημα επάάζεται σε ανακινητή τύπου rocker για 15 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10min στα 13000xg, στους 4°C. Τέλος, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80°C και αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο. Επίσης, τα δείγματα επιμερίζονται σε κλάσματα (aliquots) έτσι ώστε να αποψύχονται μία φορά.

2.26 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Με τη μέθοδο Bradford προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Η δέσμευση της χρωστικής coomassie brilliant blue στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών αποτελεί τη βασική αρχή της μεθόδου. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470nm στα 595nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μία ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Σε 10μl πρωτεϊνικού δείγματος προστίθενται 70μl H₂O. Έπειτα, το δείγμα αναδεύεται και προστίθενται 720μl Bradford Reagent (Sigma). Η ανάδευση επαναλαμβάνεται και ύστερα το διάλυμα αφήνεται για επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Η απορρόφηση 0,2ml του δείγματος μετράται στα 595nm χρησιμοποιώντας μετρητή ELISA plate SpectraMax 190, ο οποίος διαθέτει το πρόγραμμα Soft Max Pro (Molecular Devices). Με τη βοήθεια διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων 0,02-2mg/ml, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη. Όλες οι μετρήσεις γίνονται εις διπλούν.

2.27 SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Κατά τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου σχηματίζονται αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου, στις οποίες ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια N-N-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου (bis). Τα μόρια bis μπορούν να ενσωματώνονται σε δύο διαφορετικές αλυσίδες, ώστε να δημιουργείται ένα πλέγμα. Ο πολυμερισμός του

ακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται με το TEMED (τετραμεθυλοδιαμίνη), το οποίο για να δράσει χρειάζεται η παρουσία υπερθεικών ιόντων. Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το ιοντικό απορρυπαντικό θεικό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate, SDS) και η διθειοθρεϊτόλη (DTT). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4gr SDS/ gr πρωτεΐνης) προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο, ανάλογο του μεγέθους τους. Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 85°C για 15 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό, τα πολυπεπτίδια τα οποία αναλύονται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση αποκτούν αρνητικό φορτίο και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι σχετική με το μοριακό βάρος [Lodish, 2000].

Υλικά και Διαλύματα

30% acrylamide mix (BIO-RAD Laboratories)	
TEMED (Promega)	
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης	25mM Tris base, 250mM Glycine pH=8,3, 0,1% SDS
4X SDS Sample Buffer	200mM Tris-HCL pH=6,8, 400mM DTT, 8% SDS, 0,4% bromophenol blue, 40% glycerol
1M DTT	3,09gr DTT σε 20ml H ₂ O → Αποστείρωση με φιλτράρισμα
Διάλυμα χρωστικής coomassie	0,25g coomassie brilliant blue R250, 45ml H ₂ O, 45ml MeOH, 10ml glacial acetic acid
Διάλυμα αποχρωματισμού	45% MeOH / 5% acetic acid
Συσκευή Ηλεκτροφόρησης (Biorad-Mini Protein) Τζάμια (10cm x 8cm x 1,5cm)	
BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen) SeaBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)	

Διαδικασία

1. Σύνθεση της συσκευής.
2. Κατασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού (8-15% πολυακρυλαμίδιο/Bis 30:1, 1.5M Tris pH=8.8, 10% SDS, 10% APS, 8%TEMED).
3. Αναμονή πήξης του πηκτώματος, αφού τοποθετηθεί ένα στρώμα H₂O στην κορυφή.
4. Κατασκευή του πηκτώματος επιστοιβαξης (5% πολυακρυλαμίδιο/Bis 30:1, 1M Tris pH=6.8, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate (APS) , 10%TEMED).
5. Προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων με προσθήκη 1X SDS sample buffer τελική συγκέντρωση και θέρμανση στους 85°C για 15 λεπτά.
6. Τα πρωτεϊνικά δείγματα χορηγούνται στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοιβαξης.

7. Ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης με 30mA για περίπου 2 ώρες.
8. Χρωματισμός του πηκτώματος με διάλυμα coomassie για 1 ώρα.
9. Εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με το διάλυμα αποχρωματισμού.

2.28 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στις μεμβράνες, δεσμεύονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, διατηρώντας τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Ακολούθως, η επώαση της μεμβράνης γίνεται με το κατάλληλο αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής του πρώτου αντισώματος. Στο δεύτερο αντίσωμα βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης, ώστε με χημειοφωταύγεια να πάρουμε σήμα στο σημείο όπου βρίσκεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος [Lodish, 2000].

Υλικά και Διαλύματα

Μεμβράνη PVDF Biorad Immune Blot™ PVDF membrane for protein blotting 0,2μm (26cm x 3.3m)	
Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς	39mM Glycine-pH=8,3, 48mM Tris base, 0,037% SDS, 20% MeOH
10X PBS	1,4M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ , 18mM K ₂ HPO ₄ , H ₂ O, pH=7,4
1M DTT	3,09gr DTT σε 20ml H ₂ O → Αποστείρωση με φιλτράρισμα
Διάλυμα μπλόκαρισματος	5% πρωτεΐνη γάλακτος (Applichem) σε PBS
SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate (Pierce) Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences)	

Διαδικασία

Μεταφορά Πρωτεϊνών σε Μεμβράνη:

1. Εμποτισμός της PVDF μεμβράνης με μεθανόλη.
2. Ακολούθως τόσο η μεμβράνη, όσο και τα Whatmann και τα σφουγγαράκια εμποτίζονται σε transfer buffer.

Σφουγγάρι + 2 Whatmann + Πήκτωμα + PVDF + 2 Whatmann + Σφουγγάρι

3. Το πήκτωμα τοποθετείται στον αρνητικό πόλο και η μεμβράνη στο θετικό πόλο.
4. Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Η μεταφορά γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς με ένα γινόμενο χρόνος-ένταση ρεύματος περίπου 220 mA·h.

Μετά τη μεταφορά:

1. Επιχρωματισμός της μεμβράνης με coomassie και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με διάλυμα αποχρωματισμού.
2. Έκπλυση της μεμβράνης σε PBS.
3. Επώαση σε blocking buffer υπό συνεχή ανάδευση σε RT.
4. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα.
5. Εκπλύσεις 3 x 5 λεπτά με PBS-0,02%Tween 20.
6. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα.
7. Εκπλύσεις 3 x 10 λεπτά με PBS-0,02%Tween 20.

Εμφάνιση της μεμβράνης:

1. Ανάμιξη ίσων όγκων από τα διαλύματα Peroxidase Solution και Luminol/Enhancer Solution.
2. Επώαση της μεμβράνης στο παραπάνω διάλυμα για 5 λεπτά.
3. Τοποθέτηση φιλμ πάνω από τη μεμβράνη.
4. Εμφάνιση φιλμ μετά από 2-20 λεπτά.

Στα φιλμ αυτοραδιογραφίας γίνεται ανάλυση της εικόνας με το ειδικό λογισμικό επεξεργασίας Quantity One (BioRad) και με τη χρήση του βαθμονομημένου πυκνόμετρου (Calibrated Densitometer) GS-800 (BioRad). Με τη βοήθεια του λογισμικού προκύπτει και η ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών από τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.29 Στατιστική ανάλυση

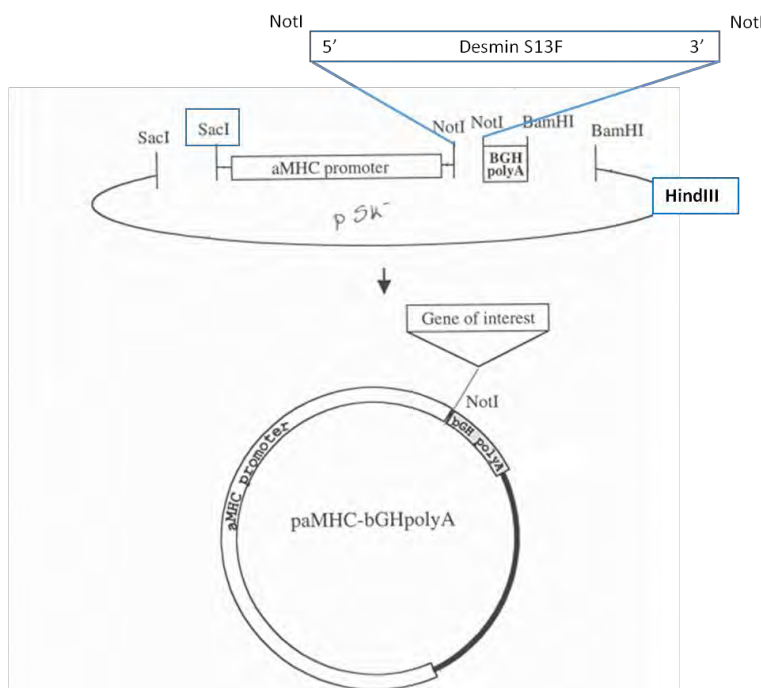
Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα για συνεχείς μεταβλητές. Οι στατιστικές συγκρίσεις γίνονται με την εφαρμογή (unpaired) Student's t-test. Μια τιμή θεωρείται στατιστικά σημαντική για $p < 0,05$.

3. Αποτελέσματα

3.1. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών (Des^{+/+}TgS13F) που φέρουν την S13F μεταλλαγμένη δεσμίνη

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της σημειακής μετάλλαξης S13F της δεσμίνης στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδίου ήταν απαραίτητη η κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA του γονιδίου της δεσμίνης που φέρει στο 13ο αμινοξύ τη φαινυλαλανίνη αντί για τη σερίνη (Desmin p.S13F), με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών.

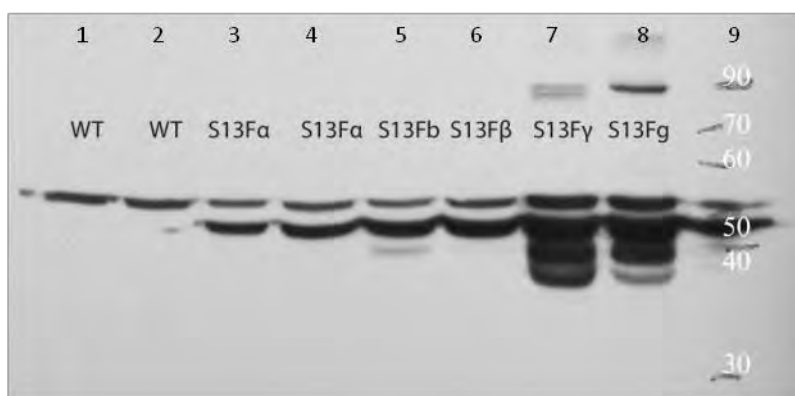
Στη συνέχεια, το ανασυνδυασμένο DNA^{desminS13F} υποκλωνοποιείται στην NotI περιοριστική θέση του πλασμιδιακού φορέα pSK (Εικόνα 3.1), έτσι ώστε να φέρει τον καρδιοειδικό υποκινητή α -myosin heavy chain (α MHC, 5.5-kb genomic fragment, GenBank #U71441) στο 5' άκρο της και την polyA⁺ αλληλουχία της αυξητικής ορμόνης των βοοειδών (bovine Growth Hormone, bGH) στο 3' άκρο. Ο υποκινητής α -MHC διασφαλίζει ιστοειδική έκφραση μόνο στα μυοκαρδιοκύτταρα. Το τελικά σχηματισμένο ανασυνδυασμένο DNA εξάγεται από τον πλασμιδιακό φορέα, με διπλή πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (SacI, HindIII). Κατόπιν, το DNA^{MHCdesminS13F} αυτό δόθηκε στον συνεργάτη μας prof. dr. J.P. (Peter) van Tintelen (UMC, Utrecht) και χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών μετά από ένεση σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων στελέχους C57BL/6J, χρησιμοποιώντας τις συνήθεις τεχνικές όπως περιγράφονται σε προηγούμενες εργασίες [Weisleder et al., 2004; Mavroidis et al., 2008].



Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής του ανασυνδυασμένου DNA για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών. Το ανασυνδυασμένο DNA^{desminS13F}, αρχικά, υποκλωνοποιείται στον πλασμιδιακό φορέα pSK που φέρει τον καρδιοειδικό υποκινητή α MHC. Έπειτα, το ανασυνδυασμένο DNA^{MHCdesminS13F} εξάγεται από τον πλασμιδιακό φορέα ύστερα από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SacI και HindIII και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών.

3.2 Χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών σειρών Des^{+/+}TgS13F

Το ανασυνδυασμένο DNA εγχέεται στους προπυρήνες των γονιμοποιημένων ωαρίων για τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων. Από τη διαδικασία προκύπτουν 3 πρωταρχικά διαγονιδιακά ποντίκια (founders) από τα οποία ακολούθησαν οι αντίστοιχες διαγονιδιακές σειρές: α , β και γ . Η ανάλυση πρωτεϊνικών καρδιακών εκχυλισμάτων με Western για δεσμίνη (Εικόνα 3.2) έδειξε ότι η σειρά γ υπερεκφράζει υπερβολικά τη μεταλλαγμένη δεσμίνη, και επίσης τα ζώα αυτής της σειράς εμφανίζουν πολύ αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας που αγγίζουν το 90% στην ηλικία των 2.5 μηνών. Από την άλλη, οι σειρές α και β εκφράζουν παρόμοια ποσά δεσμίνης στο μυοκάρδιο τους και είναι συγκρίσιμα με αυτά των ζώων φυσικού τύπου (Εικόνα 3.2). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και στις 3 διαγονιδιακές σειρές παρατηρείται πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης, σύμφωνα με την ανοσοαποτύπωση κατά Western, η οποία και μελετάται περαιτέρω στη συνέχεια.

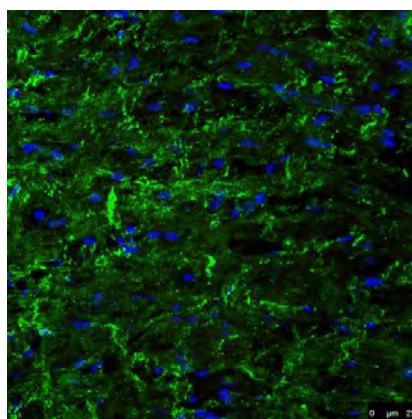


Εικόνα 3.2 Υπερέκφραση της δεσμίνης στη διαγονιδιακή σειρά γ (θέσεις 7-8) σύμφωνα με την ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της δεσμίνης σε ολικά πρωτεϊνικά καρδιακά εκχυλίσματα. Και στις 3 διαγονιδιακές σειρές παρατηρείται πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης (επιπλέον χαμηλότερη ζώνη). WT, φυσικού τύπου: θέσεις 1-2/ S13Fa, Des^{+/+}TgS13F σειρά α : θέσεις 3-4/ S13Fb, Des^{+/+}TgS13F σειρά β : θέσεις 5-6/ S13Fγ, Des^{+/+}TgS13F σειρά γ : θέσεις 7-8, DNA marker: θέση 9.

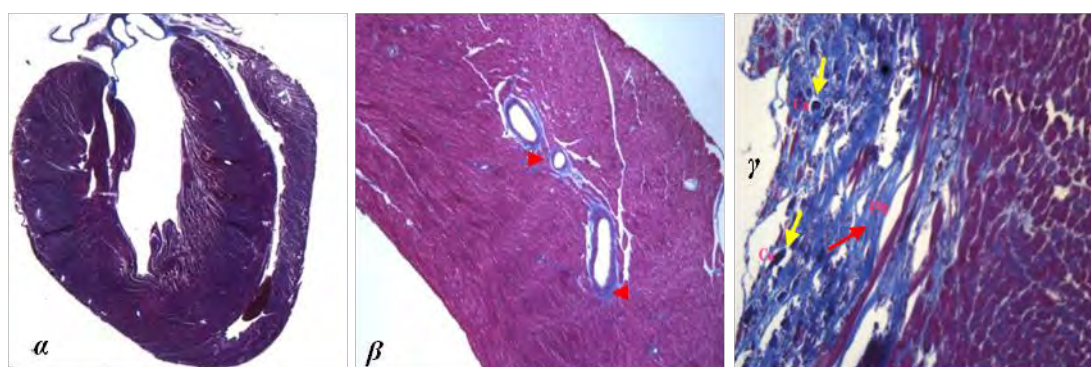
Αναφορικά με τη σειρά γ , παρατηρήθηκε έντονη καρδιακή ανεπάρκεια όπως έδειξε η ανάλυση της καρδιακής λειτουργίας με υπέρηχο, όπου το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας ήταν πολύ χαμηλό 25.2% σε σύγκριση με τα φυσικού τύπου ζώα που είναι 65.7% (Πίνακας 3.1). Επίσης, η ανοσοοσμήμανση τομών καρδιακού ιστού έναντι της δεσμίνης έδειξε έντονη αποδιοργάνωση του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης και συσσωματώματα (Εικόνα 3.3), ενώ εντοπίστηκε και εκτεταμένη ίνωση σύμφωνα με τη χρώση Masson's trichrome (Εικόνα 3.4). Για λόγους ευζωίας έπαυσε η αναπαραγωγή της σειράς γ και η ανάλυση/ χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών ζώων συνεχίστηκε με τη σειρά β που έδειξε παρόμοια χαρακτηριστικά με τη σειρά α .

	WT	Transgenic Des ^{+/+} TgS13F (γ)
ED volume	62.55 ul	73.42 ul
ES volume	42.73 ul	54.92 ul
Ejection fraction	65.70 %	25.20 %

Πίνακας 3.1 Το κλάσμα εξώθησης στη διαγονιδιακή σειρά γ είναι πολύ χαμηλό, σχεδόν 62% χαμηλότερο σε σχέση με τα WT. Δείκτες εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας σύμφωνα με την υπερηχοκαρδιογραφία σε διαγονιδιακά Des^{+/+}TgS13F και WT ποντίκια, ηλικίας 3 μηνών. (ED volume: τελοδιαστολικός όγκος, ES volume: τελοσυστολικός όγκος, Ejection fraction: κλάσμα εξώθησης) (n = 1).



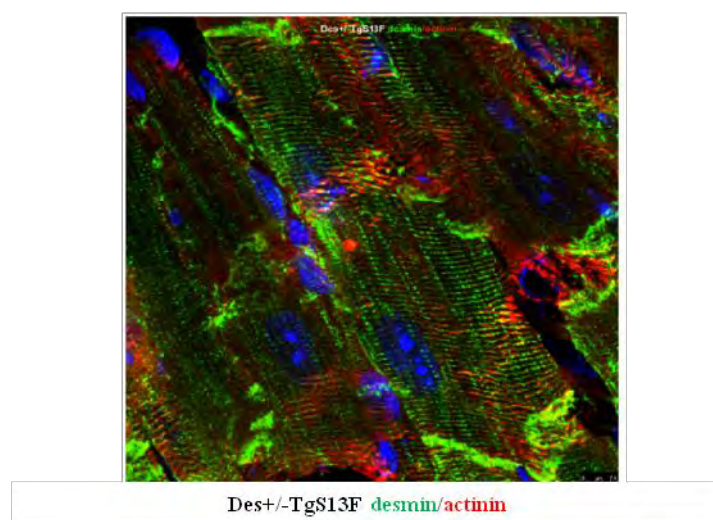
Εικόνα 3.3 Η σειρά γ παρουσιάζει έντονη αποδιοργάνωση του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης, καθώς η δεσμίνη χάνει τον εντοπισμό της από τους z-δίσκους και οι εμβόλιμοι δίσκοι εμφανίζονται αποδιαταγμένοι, ύστερα από ανοσοφθορισμό έναντι δεσμίνης σε τομές κρουστού καρδιακού ιστού. (Ο πράσινος φθορισμός αντιστοιχεί στη δεσμίνη, ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί μπλε με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI).



Εικόνα 3.4 Η διαγονιδιακή σειρά γ παρουσιάζει εκτεταμένη ίνωση (Fb, κόκκινα βέλη) και εναπόθεση ασβεστίου (Ca, κίτρινα βέλη) σε σχέση με τις σειρές α και β που παρουσιάζουν πιο ήπια φαινόμενα. Για παράδειγμα η σειρά β παρουσιάζει κυρίως περιαγγειακή ίνωση (κόκκινα τρίγωνα). Χαρακτηριστικές εικόνες από χρώση Masson's trichrome σε τομές παραφίνης καρδιακού ιστού.

3.3 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών (Des^{-/-}-TgS13F) που φέρουν μόνο την S13F μεταλλαγμένη δεσμίνη

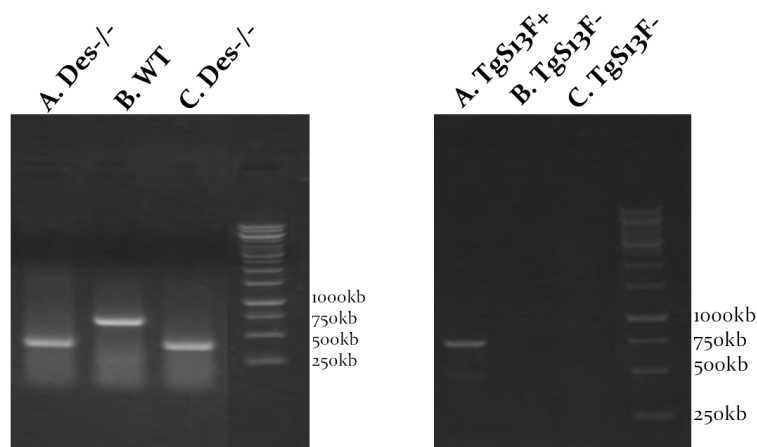
Η ιστολογική και υπερηχοκαρδιογραφική ανάλυση της σειράς β των διαγονιδιακών ποντικών Des^{+/+}TgS13F δεν έδειξε διαφορές στην καρδιακή δομή και λειτουργία σε σύγκριση με τα φυσικού τύπου ζώα (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), δηλαδή η μετάλλαξη S13F στη δεσμίνη σε αυτή την σειρά διαγονιδιακών ποντικών συμπεριφέρεται ως υποτελής. Για τον λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η κατασκευή διαγονιδιακών ζώων που να εκφράζουν στον καρδιακό ιστό μόνο τη μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F. Αυτό έγινε δυνατό διασταυρώνοντας Des^{+/+}TgS13F ζώα με Des^{-/-}, έτσι ώστε στην πρώτη γενιά να δημιουργηθούν ποντίκια που να είναι ετερόζυγα (Des^{+/-}) ως προς την παρουσία της ενδογενούς δεσμίνης, ενώ στη δεύτερη γενιά το 25% των απογόνων να είναι ομόζυγοι ως προς την έλλειψη της ενδογενούς δεσμίνης (Des^{-/-}) αλλά να φέρουν ταυτόχρονα τη μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών Des^{-/-}-Tg^{MHCdesminS13F}, τα οποία φέρουν μόνο την ανασυνδυασμένη δεσμίνη p.S13F (εν συντομία Des^{-/-}-TgS13F). Να αναφέρουμε στο σημείο αυτό, ότι τα ετερόζυγα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{+/-}-TgS13F δεν παρουσίασαν ιδιαίτερα παθολογικό φαινότυπο, καθώς όπως φαίνεται η ύπαρξη και μόνο ενός αλληλόμορφου φυσιολογικής δεσμίνης υποστηρίζει την καρδιακή λειτουργία. Ενδεικτικά παρουσιάζεται ότι ο συγκεκριμένος γενότυπος προστατεύει τη δημιουργία του σύνθετου δικτύου IFs δεσμίνης, καθώς εντοπίζεται υποκυτταρικά στους z-δίσκους και IDs σε τομές καρδιακού ιστού με ανοσοσήμευση για δεσμίνη (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Τα ετερόζυγα ως προς την ενδογενή δεσμίνη διαγονιδιακά ποντίκια Des^{+/-}-TgS13F παρουσιάζουν σχεδόν φυσιολογικό δίκτυο IFs δεσμίνης, καθώς εντοπίζονται στις βασικές δομές τόσο των z-δίσκων όσο και των IDs, ύστερα από διπλή ανοσοσήμευση έναντι δεσμίνης και ακτινίνης σε τομές κρυοτόμου καρδιακού ιστού. (Ο πράσινος φθορισμός αντιστοιχεί στη δεσμίνη και ο κόκκινος στην ακτινίνη, ενώ οι πυρήνες έχουν σημειωθεί μπλε με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI).

3.4 Επιβεβαίωση των γενοτύπων ως προς τη δεσμίνη με PCR

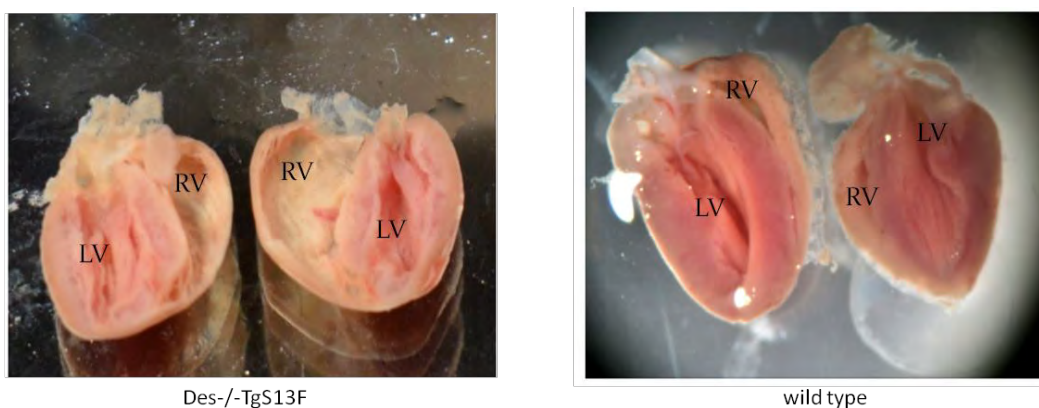
Στην εν λόγω μελέτη, όπως έχουμε αναφέρει, χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο καρδιακοί ιστοί από ποντίκια τριών γενοτύπων, ο οποίος και επιβεβαιώνεται κάθε φορά με την αντίστοιχη μέθοδο PCR για τη φυσιολογική, την ελλειπτική και τη μεταλλαγμένη μορφή της δεσμίνης pS13F (βλ Υλικά και Μέθοδοι). Στην Εικόνα 3.6 αποτυπώνονται χαρακτηριστικά οι ζώνες που προκύπτουν από τους αντίστοιχους γενοτύπους: A) Des^{-/-}-TgS13F, B) WT και C) Des^{-/-}.



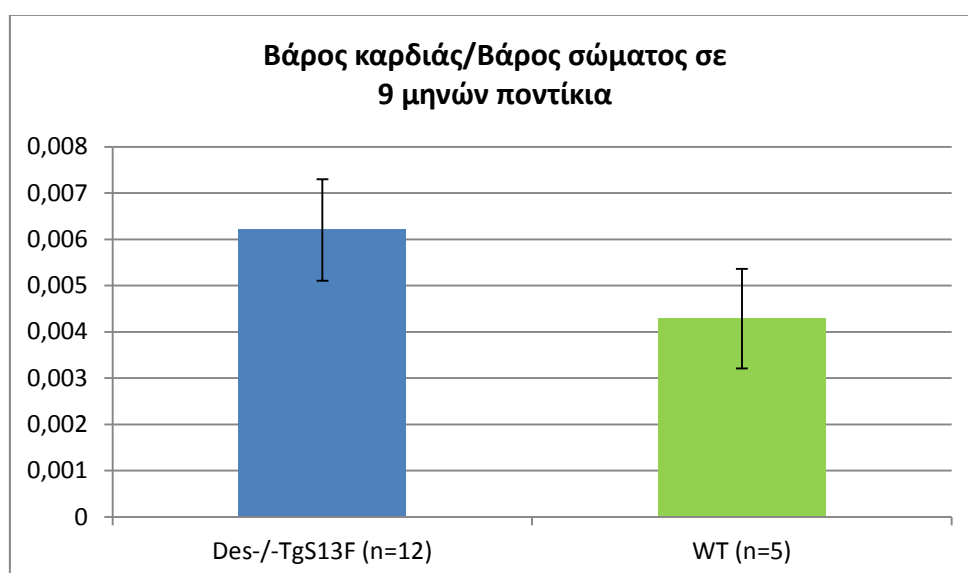
Εικόνα 3.6 Γενοτύπηση με PCR σε δείγματα απομόνωσης DNA από ουρές ποντικών. Αριστερά PCR για τη δεσμίνη, όπου το αλληλόμορφο φυσικού τύπου της δεσμίνης (WT) δίνει ζώνη μεγέθους 700bp, ενώ το διαγονιδιακό αλληλόμορφο Des^{-/-} δίνει ζώνη μεγέθους 390bp και δεξιά PCR για τη δεσμίνη με τη σημειακή μετάλλαξη S13F, όπου όταν υπάρχει το διαγονιδιακό αλληλόμορφο TgS13F δίνει ζώνη μεγέθους 740bp, ενώ όταν δεν υπάρχει, δεν δίνει ζώνη. Έτσι, προκύπτουν αντίστοιχα τα ποντίκια: A) Des^{-/-}-TgS13F, B) WT και C) Des^{-/-} ύστερα από τις δύο PCR.

3.5 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}-TgS13F ηλικίας 9 μηνών εμφανίζουν διάταση στη δεξιά κοιλία της καρδιάς

Η μακροσκοπική παρατήρηση των καρδιών από διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν μόνο τη μεταλλαγμένη δεσμίνη (Des^{-/-}-TgS13F) σε στερεοσκόπιο έδειξε ότι τα ζώα αυτά εμφανίζουν παθολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η δεξιά κοιλία της καρδιάς στα Des^{-/-}-TgS13F ποντίκια μεγάλης ηλικίας (9 μηνών) είναι εμφανώς διατεταμένη και επίσης παρατηρείται λέπτυνση του τοιχώματος της δεξιάς κοιλίας (Εικόνα 3.7) σε ένα ποσοστό 20% των ζώων που αναλύθηκαν. Η ανάλυση του λόγου βάρους καρδιάς προς το βάρος σώματος έδειξε αύξηση κατά 44% στα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}-TgS13F (0,0062) σε σχέση με τον λόγο στα WT ποντίκια (0,0043) (Γράφημα 3.1). Γεγονός που υποδεικνύει καρδιακή υπερτροφία στα διαγονιδιακά ποντίκια.



Εικόνα 3.7 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F ηλικίας 9 μηνών εμφανίζουν διάταση στη δεξιά κοιλία της καρδιάς και λεπύτνωση του τοιχώματός της. Χαρακτηριστικές εικόνες από καρδιές Des-/-TgS13F και WT ποντικών ηλικίας 9 μηνών με τη χρήση στερεοσκοπίου. (RV δεξιά κοιλία, LV αριστερή κοιλία)

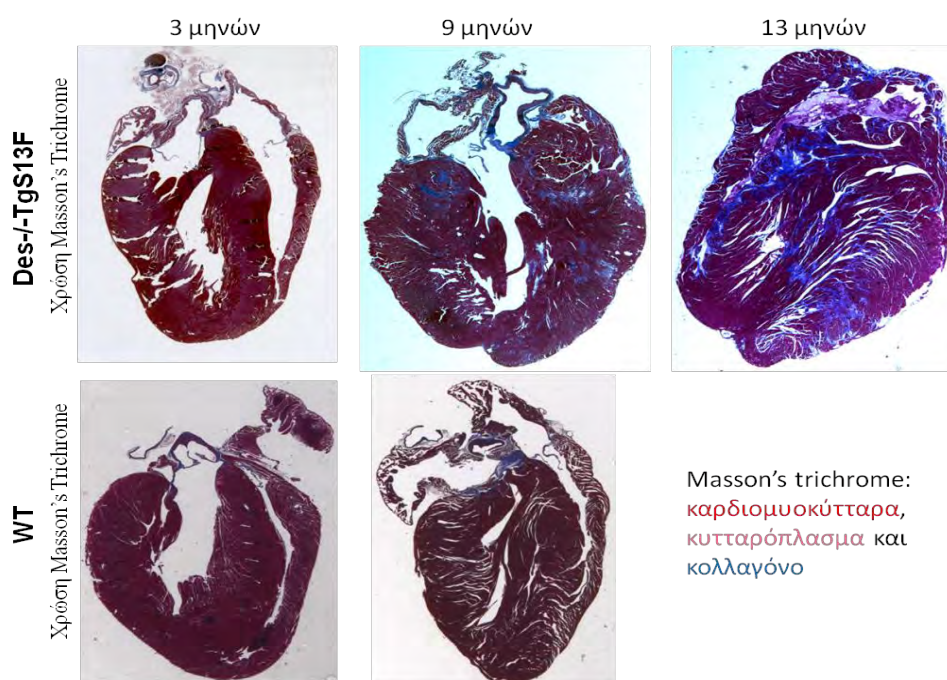


Γράφημα 3.1 Ο λόγος βάρους καρδιάς προς βάρος σώματος βρέθηκε αυξημένος κατά 44% στα ποντίκια Des-/-TgS13F (0,0062) σε σχέση με τα WT ποντίκια (0,0043) στην ηλικία των 9 μηνών ($p < 0,005$). Το γνώρισμα αυτό υποδεικνύει καρδιακή υπερτροφία.

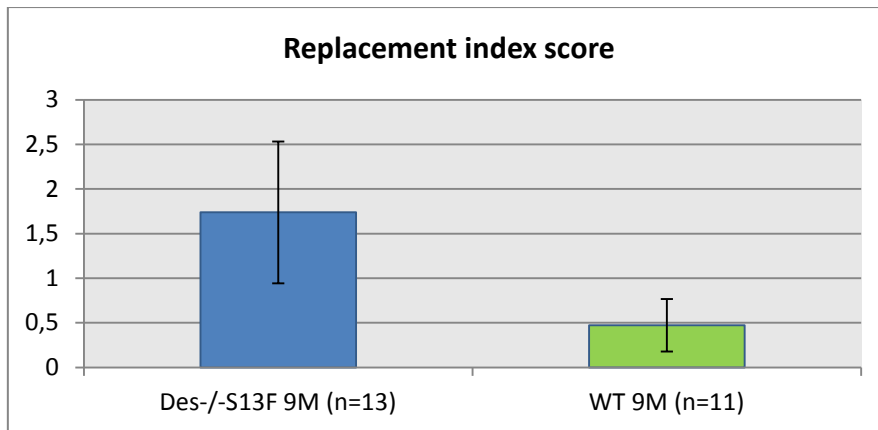
3.6 Ο καρδιοϊστολογικός χαρακτηρισμός στα Des-/-TgS13F διαγονιδιακά ποντίκια υποδεικνύει προοδευτική αύξηση του ινωτικού ιστού ηλικιακά

Προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω οι επιπτώσεις της έκφρασης της μεταλλαγμένης δεσμίνης S13F στο μυοκάρδιο, όπως είναι η καρδιακή ίνωση και η εξέλιξή της στην πάροδο του χρόνου, ακολούθησε η ιστοπαθολογική ανάλυση καρδιακών τομών παραφίνης με χρώση Masson's trichrome, όπου απεικονίζεται η εναπόθεση κολλαγόνου, σε τρεις ηλικιακές ομάδες 3, 9 και 13 μηνών (Εικόνα 3.8). Αρχικά, στην ηλικία των 3 μηνών δεν εντοπίζονται ιδιαίτερα σημαντικές ιστολογικές διαφορές στον καρδιακό ιστό Des-/-TgS13F ποντικών σε σχέση με τα WT. Αντίθετα

στην ηλικία των 9 μηνών διαπιστώνεται ότι η καρδιά στα διαγονιδιακά ποντίκια εμφανίζει ενδιάμεση και περιαγγειακή ίνωση. Επίσης, στην ηλικία των 9 μηνών, ο δείκτης βλάβης του καρδιακού ιστού που αντιπροσωπεύει την αντικατάσταση του καρδιακού ιστού με ινωτικό ιστό (Replacement index score) και ο οποίος προκύπτει όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι 2.5.4, βρέθηκε αυξημένος σχεδόν κατά τρεις φορές στα Des-/-TgS13F ποντίκια (1.74 score) σε σχέση με τα WT ποντίκια (0.47 score) (Γράφημα 3.2). Επιπλέον, στην μεγαλύτερη ηλικία των 13 μηνών οι συνέπειες είναι ακόμα μεγαλύτερες, καθώς στα διαγονιδιακά ποντίκια εντοπίζεται έντονος εκφυλισμός των μυοκαρδιοκυττάρων και αναπλήρωσή τους με ουλώδη ιστό. Σημειώνεται δε, ότι η χρώση με H&E έδειξε παρόμοια αποτελέσματα (δεν παρουσιάζονται).



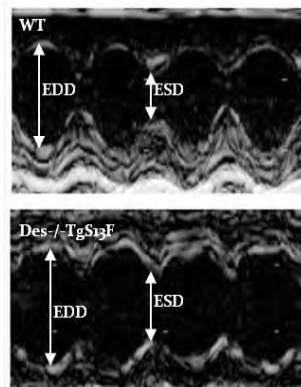
Εικόνα 3.8 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F εμφανίζουν ενδιάμεση και περιαγγειακή ίνωση στην ηλικία των 9 μηνών, ενώ παρατηρείται έντονος εκφυλισμός των μυοκαρδιοκυττάρων και αναπλήρωσή τους με ουλώδη ιστό στην ηλικία των 13 μηνών, ύστερα από ιστολογική χρώση Masson's trichrome σε τομές παραφίνης καρδιακού ιστού από Des-/-TgS13F και WT ποντίκια ηλικίας 3, 9 και 13 μηνών. Παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες. Στην ηλικία των 3 μηνών δεν εντοπίστηκαν ιδιαίτερα σημαντικές ιστολογικές διαφορές. Η ιστολογική χρώση Masson's trichrome υποδεικνύει την εναπόθεση κολλαγόνου.



Γράφημα 3.2 Ο δείκτης βλάβης του καρδιακού ιστού που αντιπροσωπεύει την αντικατάσταση του καρδιακού ιστού με ινωτικό ιστό (Replacement index score) βρέθηκε αυξημένος σχεδόν κατά τρεις φορές στα Des-/-TgS13F (1.74) σε σύγκριση με τα WT (0,47) ποντίκια στην ηλικία των 9 μηνών ($p < 0,0001$).

3.7 Η υπερηχοκαρδιογραφία στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F ηλικίας 9 μηνών έδειξε διάταση και συστολική δυσλειτουργία

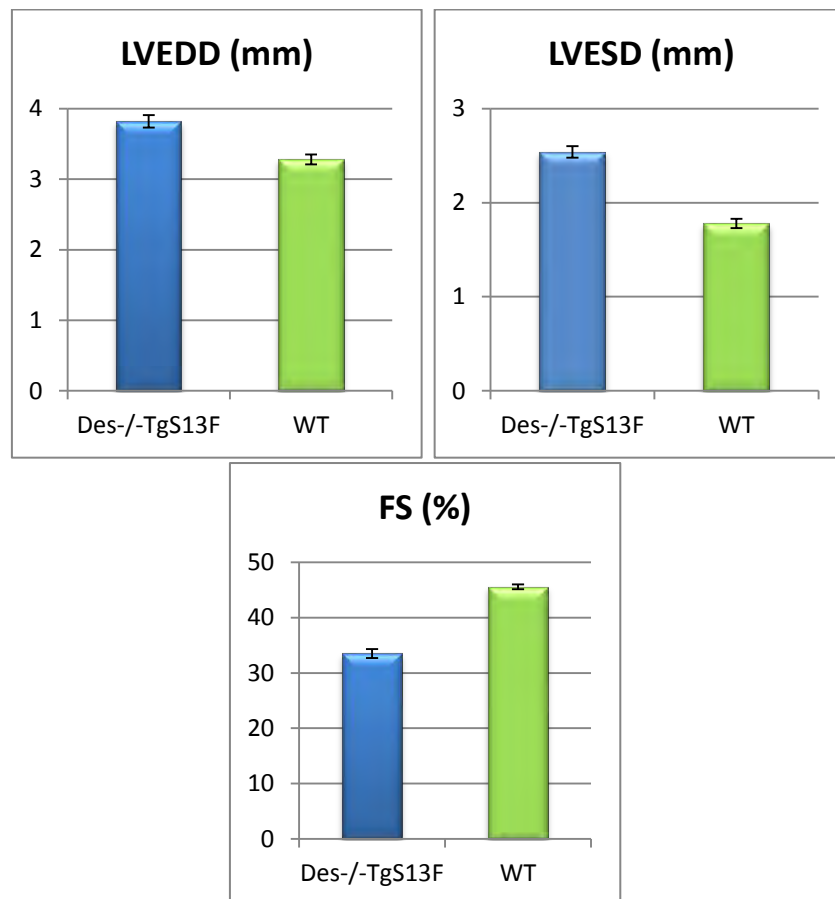
Αφού μελετήθηκε η καρδιά ιστοπαθολογικά, η ανάλυση συνέχισε με την επίπτωση της διαγονιδιακής S13F δεσμίνης στην καρδιακή λειτουργία. Τα ποντίκια υποβάλλονται σε δισδιάστατη υπερηχοκαρδιογραφία απεικόνισης M-mode στην ηλικία των 9 μηνών (Εικόνα 3.9), όπου και εντοπίστηκε η καρδιακή ίνωση στα διαγονιδιακά ποντίκια. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν, όπως φαίνεται και από τα στοιχεία του Πίνακα 3.2, αύξηση κατά 16.5% της τελοδιαστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVEDD), αύξηση σχεδόν 42% της τελοσυστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVESD) και μείωση κατά 26.5% του κλάσματος βράχυνσης (FS) στα Des-/-TgS13F ποντίκια συγκριτικά με τα φυσικού τύπου (Γράφημα 3.3). Οι τρεις παράμετροι αποτελούν δείκτες εκτίμησης της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας και δείχνουν διάταση, συστολική δυσλειτουργία και καρδιακή δυσλειτουργία αντίστοιχα, στην καρδιά του Des-/-TgS13F πειραματικού μοντέλου.



Εικόνα 3.9 Χαρακτηριστικές εικόνες υπερηχοκαρδιογραφίας από WT και Des-/-TgS13F ποντίκια, όπου διακρίνεται η αύξηση της τελοδιαστολικής και της τελοσυστολικής διαμέτρου στα διαγονιδιακά ποντίκια.

	Des-/-TgS13F	wt	p-value
9 μηνών	n=10	n=7	
Heart Rate	614.33±15.74	627.19±8.77	0.5369
LVEDD(mm)	3.82±0.09	3.28±0.07	0.0009
LVESD(mm)	2.54±0.06	1.78±0.05	<.0001
PWTd (mm)	0.72±0.01	0.80±0.01	0.0002
PWTs (mm)	1.17±0.01	1.29±0.01	<.0001
FS (%)	33.51±0.82	45.56±0.43	<.0001
r/h	2.67±0.10	2.04±0.04	0.0001

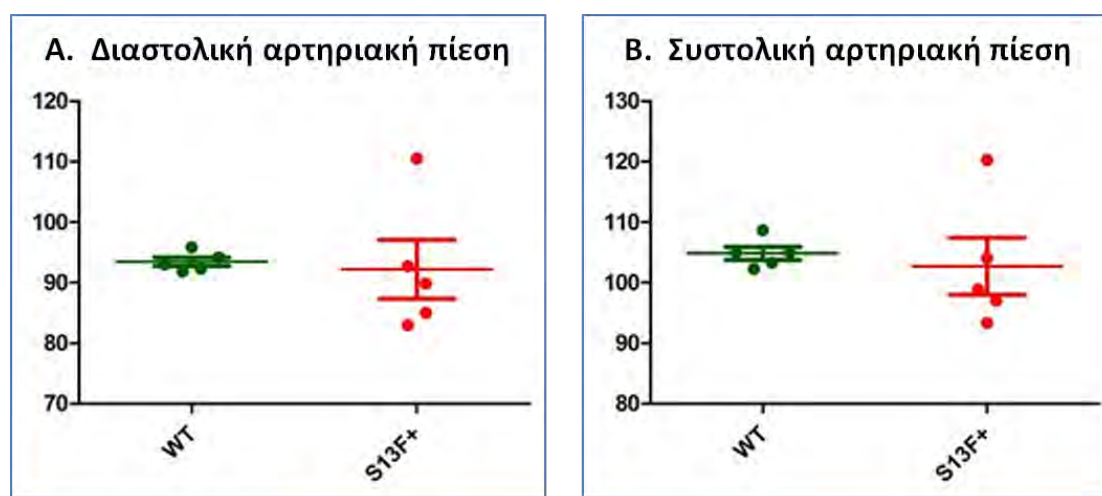
Πίνακας 3.2 Δείκτες εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας ύστερα από υπερηχοκαρδιογραφία σε ποντίκια Des-/-TgS13F και WT ηλικίας 9 μηνών. (heart rate: καρδιακός ρυθμός, LVEDD: τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας, LVESD: τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας, PWTd: τελοδιαστολικό πάχος, PWTs: τελοσυστολικό πάχος, FS: κλάσμα βράχυνσης, r/h: ακτίνα/ύψος, σφαιρικότητα καρδιάς). Χαρακτηριστικές εικόνες υπερηχοκαρδιογραφίας από WT και Des-/-TgS13F ποντίκια.



Γράφημα 3.3 Τα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζουν επιβαρυσμένη συσταλτική λειτουργία της αριστερής κοιλίας, ύστερα από υπερηχοκαρδιογραφία στην ηλικία των 9 μηνών. Συγκεκριμένα, οι δείκτες εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας εμφανίζουν: ο LVEDD αύξηση κατά 16.5%, ο LVESD αύξηση σχεδόν 42% και ο FS μείωση κατά 26.5% στα Des-/-TgS13F σε σχέση με τα WT, σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 3.2.

3.8 Στα διαγονιδιακά ποντίκια δεν μεταβάλλεται η αρτηριακή πίεση στην ηλικία των 12 μηνών

Σε συνέχεια της εκτίμησης της καρδιακής λειτουργίας, προσδιορίστηκε η αρτηριακή πίεση μη επεμβατικά μέσω ειδικού συστήματος μέτρησης της πίεσης, όπου η περιχειρίδα εφαρμόζεται στην ουρά (non-invasive pressure tail-cuff system). Σύμφωνα με τις μετρήσεις, τα διαγονιδιακά ποντίκια δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ούτε στη συστολική (systolic blood pressure, SBP) ούτε στη διαστολική αρτηριακή πίεση (diastolic blood pressure, DBP) σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου στην ηλικία των 12 μηνών, όπως διαφαίνεται στο Γράφημα 3.4.

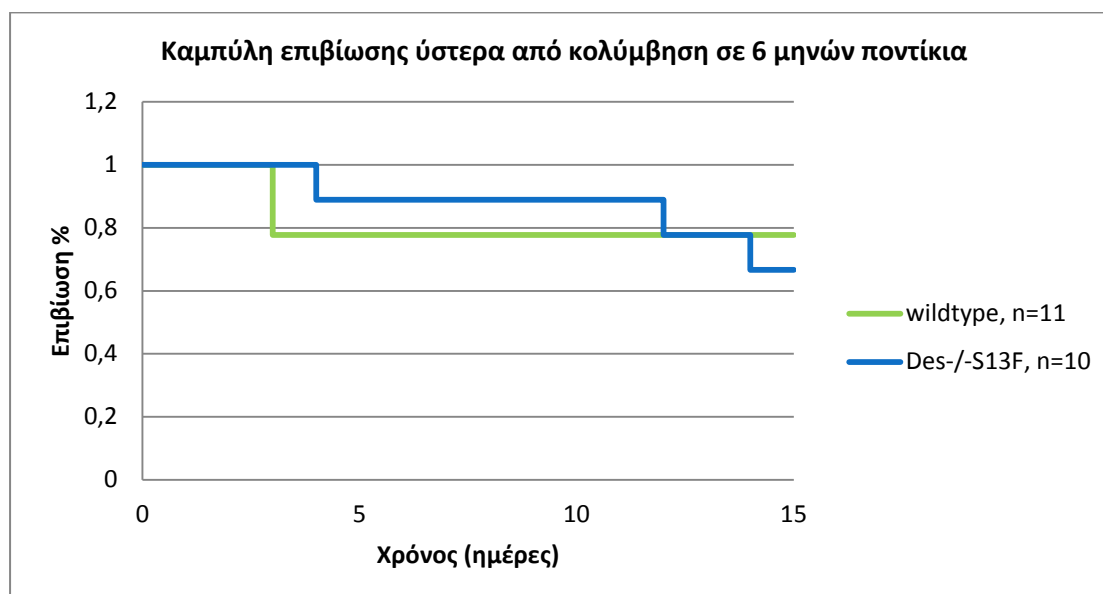


Γράφημα 3.4 Τα διαγονιδιακά ποντίκια δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη διαστολική (Α) ή στη συστολική (Β) αρτηριακή πίεση σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου στην ηλικία των 12 μηνών (n=5, p>0.05).

3.9 Η καμπύλη επιβίωσης ύστερα από έντονη άσκηση (κολύμβηση) δεν επηρεάζεται στα Des-/-TgS13F ποντίκια ηλικίας 6 μηνών

Όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή ένα από τα χαρακτηριστικά της αρρυθμιογενούς μυοκαρδιοπάθειας είναι ο ξαφνικός θάνατος σε αθλητές. Έτσι εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο επιβίωσης ύστερα από έντονη άσκηση μέσω της κολύμβησης σε ποντίκια ηλικίας 6 μηνών, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.12. Συγκεκριμένα, σε χρονικό διάστημα 15 ημερών τα ποντίκια υποβάλλονται σε σταδιακή καθημερινή άθληση, ξεκινώντας από 10 λεπτά τη μέρα έως 60 λεπτά και ου τω καθεξής, με στόχο την καταγραφή των αποθανόντων ζώων κατά τη διαδικασία της άθλησης. Με την διαδικασία της έντονης άσκησης με κολύμβηση, στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές απώλειες επιβίωσης (3 συνολικά αποθανόντα ζώα) σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια (2 συνολικά αποθανόντα ζώα) στην ηλικία των 6 μηνών (Γράφημα 3.5). Αντίστοιχα

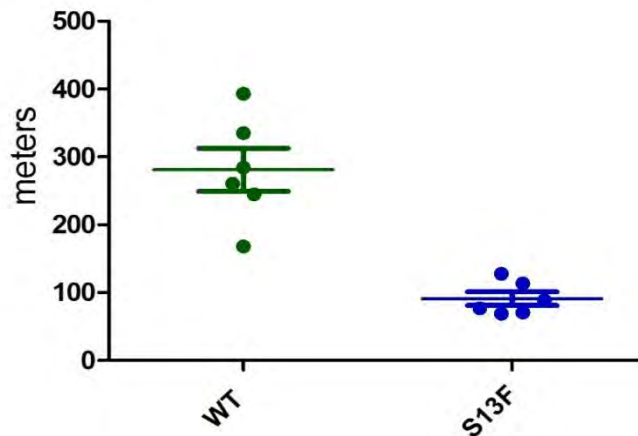
πειράματα επιβίωσης σε Des-/- ζώα έχουν δείξει 50% μείωση της επιβίωσης μετά από κολύμβηση [Mavroidis et al., 2008].



Γράφημα 3.5 Η καμπύλη επιβίωσης ύστερα από έντονη άσκηση (κολύμβηση) δεν επηρεάζεται στα Des-/-TgS13F ποντίκια, καθώς παρουσιάζουν παρόμοιες απώλειες σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια στην ηλικία των 6 μηνών ($p>0,05$).

3.10 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F υποδεικνύουν μειωμένη απόδοση στο τεστ κοπώσεως στην ηλικία των 12 μηνών

Στη συνέχεια, ακολούθησε περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της μεταλλαγμένης δεσμίνης στη συνολική απόδοση του ζωικού μοντέλου, όταν αυτό υποβάλλεται σε άσκηση, αλλά αυτή τη φορά στην ηλικία των 12 μηνών, όπου η καρδιά είναι ακόμη πιο επιβαρυνμένη, όπως υποδεικνύεται από ιστολογικές και περιορισμένες αναλύσεις με υπέρηχο. Έτσι, προκειμένου να εκτιμηθεί η μυϊκή και η καρδιακή απόδοση των διαγονιδιακών ζώων, εφαρμόζεται ένα τεστ κοπώσεως σε κυλιόμενο διάδρομο, υπολογίζοντας τη συνολική απόσταση που διανύουν τα υπό μελέτη πειραματόζωα. Τα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια διήνυσαν κατά μέσο όρο 90 μέτρα, ενώ τα WT διήνυσαν 280 μέτρα, δηλαδή σχεδόν υποτριπλάσια απόσταση (Γράφημα 3.6), υποδεικνύοντας σοβαρή ανεπάρκεια να ανταπεξέλθουν στο τεστ κοπώσεως.

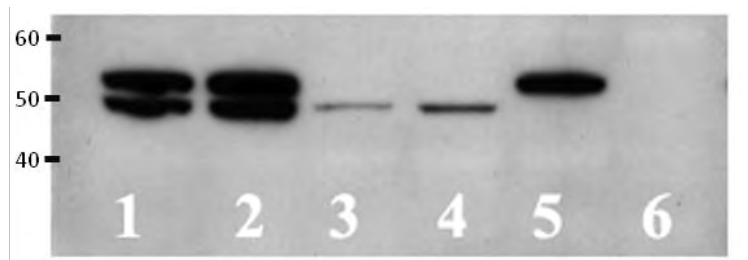


Γράφημα 3.6 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}TgS13F ηλικίας 12 μηνών έχουν πολύ μειωμένη απόδοση στο τεστ κοπώσεως, καθώς διανύουν κατά μέσο όρο 90m, δηλαδή υποτρύγασια μέτρα σε σχέση με τα WT ποντίκια τα οποία διανύουν 280m (n=6, p<0,01).

3.11 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F υπόκειται σε πρωτεολυτική διάσπαση στην περιοχή κεφαλή

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, στην ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της δεσμίνης σε καρδιακά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και στις 3 διαγονιδιακές σειρές Des^{+/+}TgS13F παρατηρείται ότι η δεσμίνη εμφανίζει μια ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους σε σχέση με τη φυσιολογική δεσμίνη 52kDa (Εικόνα 3.2). Γεγονός που υποδεικνύει πρωτεολυτική διάσπαση. Μέσω, λοιπόν, της διαφορικής ανοσοαποτύπωσης κατά Western έναντι της δεσμίνης θα εξεταστεί με διαφορετικά αντισώματα ποιο τμήμα της δεσμίνης είναι αυτό που αποκόπτεται.

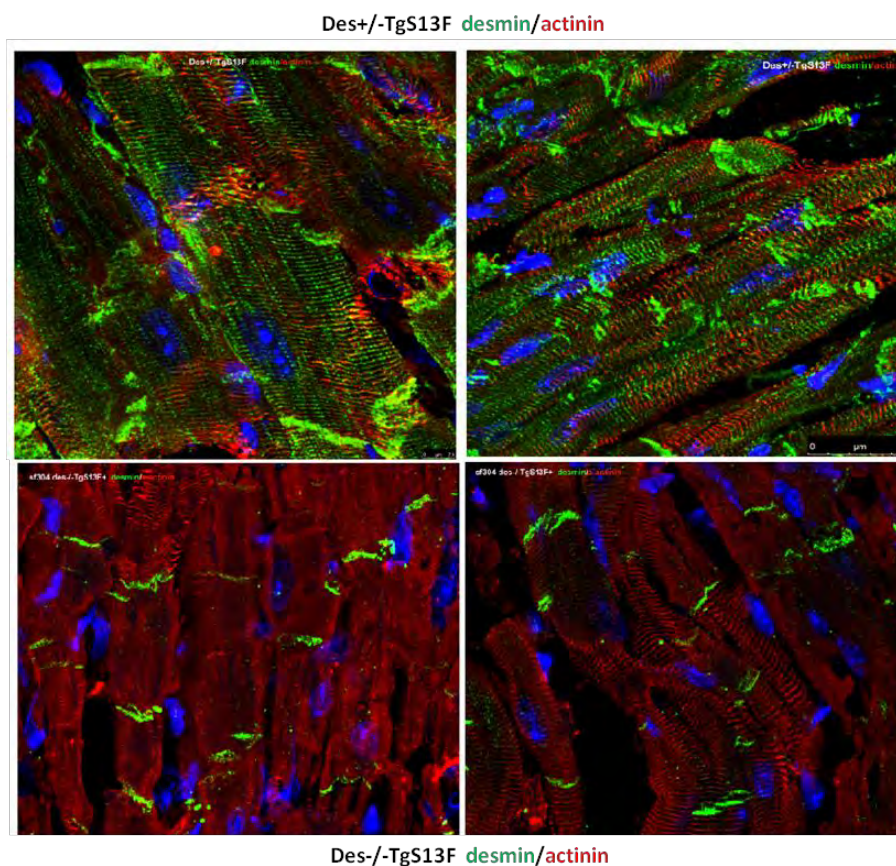
Η μεταλλαγμένη S13F δεσμίνη, όπως προκύπτει από την ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της περιοχής ουρά της δεσμίνης (anti-desmin Y-20, SantaCruz) σε ολικά καρδιακά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από Des^{-/-}TgS13F ποντίκια, παρουσιάζει όχι μόνο εμφανώς μειωμένη έκφραση, αλλά και υποδεικνύει ότι η διάσπαση συμβαίνει στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης, καθώς στα ετερόζυγα ποντίκια παρατηρείται η αντίστοιχη χαμηλότερη ζώνη (~48kDa) πέρα από τη φυσιολογική δεσμίνη (52kDa) (Εικόνα 3.10). Να αναφερθεί σε αυτό το σημείο, ότι η ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης (anti-desmin H-76, SantaCruz) δεν αποδίδει δεύτερη ζώνη, γεγονός που υποδεικνύει αδυναμία δέσμευσης του αντισώματος, εφόσον τμήμα της περιοχής κεφαλής έχει αποκοπεί (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 3.10 Η μεταλλαγμένη S13F δεσμίνη παρουσιάζει εμφανώς χαμηλότερη έκφραση στα Des-/-TgS13F ποντίκια και διασπάται στην περιοχή κεφαλή. Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της περιοχής ουρά της δεσμίνης (anti-desmin Y-20, SantaCruz) σε ολικά καρδιακά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από διαφορετικούς γενότυπους καρδιακών ιστών των ποντικών: Des+/-TgS13F (1), Des+/+TgS13F (2), Des-/-TgS13F (3), Des-/-TgS13F (4), WT (5) και des-/- (6).

3.12 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στους z-δίσκους

Μετά τη διαπίστωση της πρωτεολυτικής διάσπασης στην περιοχή κεφαλή της μεταλλαγμένης δεσμίνης S13F στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F, η μελέτη προχώρησε στη διερεύνηση της επίπτωσης του υποκυτταρικού εντοπισμού της στο μυοκαρδιοκύτταρο. Έτσι, με την εφαρμογή ανοσοσήμανσης σε τομές καρδιακού ιστού από Des-/-TgS13F ποντίκια έναντι της δεσμίνης, παρατηρείται ότι η μεταλλαγμένη p.S13F δεσμίνη χάνει τον εντοπισμό της στους z-δίσκους και εντοπίζεται κυρίως στους εμβόλιμους δίσκους (Εικόνα 3.11). Επιπλέον, εντοπίζονται συσσωματώματα δεσμίνης στο εσωτερικό των μυοκαρδιοκυττάρων στα διαγονιδιακά ποντίκια. Σε αντιπαράβολή, να επισημάνουμε, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ότι στα ετερόζυγα ποντίκια Des+/-TgS13F η ύπαρξη ακόμη και ενός φυσικού αλληλόμορφου δεσμίνης διατηρεί επαρκώς τη φυσιολογική συμπαγή δομή των μυών, καθώς η δεσμίνη σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να εντοπίζεται τόσο στους z-δίσκους όσο και στους εμβόλιμους δίσκους των μυοκαρδιοκυττάρων (Εικόνα 3.11).



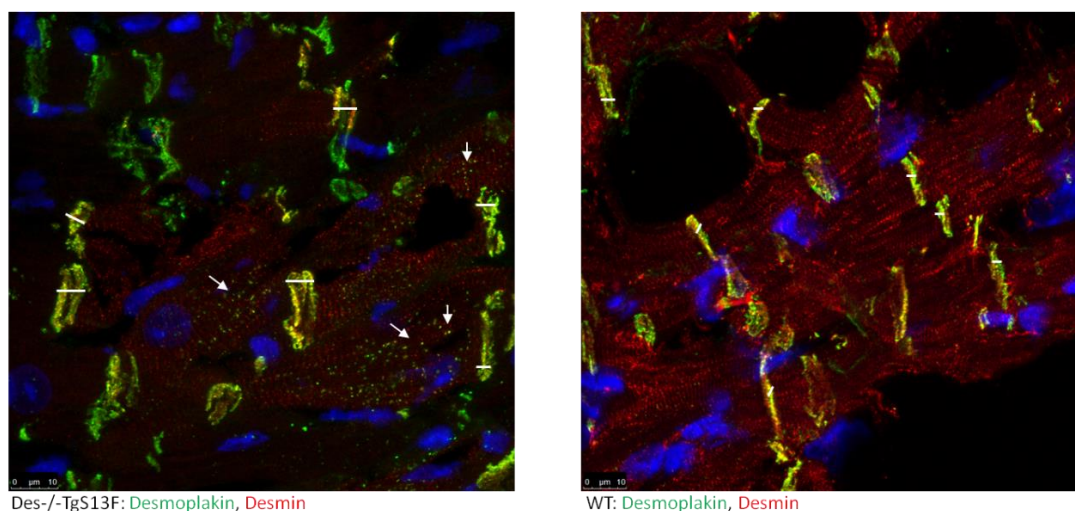
Εικόνα 3.11 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στους z-δίσκους και εντοπίζεται κυρίως στους εμβόλιμους δίσκους, ενώ φαίνεται να δημιουργεί και συσσωματώματα (spots) στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από διπλή ανοσοσθήμανση έναντι δεσμίνης και ακτινίνης σε τομές κρουστού καρδιακών ιστών από Des+/-TgS13F ποντίκια (πάνω εικόνες) και Des-/-TgS13F ποντίκια (κάτω εικόνες). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο και η ακτινίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).

3.13 Οι εμβόλιμοι δίσκοι εντοπίζονται πεπλατυσμένοι στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F, ενώ διαταράσσεται και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της δεσμοπλακίνης

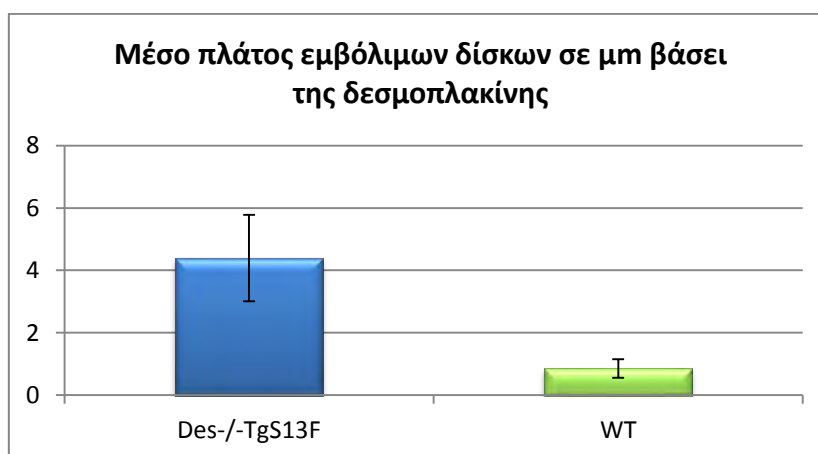
Ένα άλλο χαρακτηριστικό της ACM είναι οι διαταραχές στη συντονισμένη διάδοση του ηλεκτρικού σήματος στο μυοκάρδιο με αποτέλεσμα την πρόκληση αρρυθμιών. Μια από τις αιτίες είναι δομικές μεταβολές στους εμβόλιμους δίσκους που είναι υπεύθυνοι για τη μετάδοση του σήματος μεταξύ των μυοκαρδιοκυττάρων. Πράγματι, στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F (6 μηνών) μελετώντας τη δεσμοπλακίνη, μια βασική πρωτεΐνη των δεσμοσωμάτων που ανήκουν στους εμβόλιμους δίσκους, παρατηρείται η απομάκρυνση των εμβόλιμων δίσκων μεταξύ των μυοκαρδιοκυττάρων με εμφανή μεταβολή του πλάτους τους σε τομές καρδιακού ιστού υπό συνεστιακή μικροσκοπία (Εικόνα 3.12). Αντιθέτως, οι εμβόλιμοι δίσκοι παρουσιάζουν το αναμενόμενο πλάτος στις τομές καρδιακού ιστού από ποντίκια φυσικού τύπου. Η ποσοτική ανάλυση του πλάτους των εμβόλιμων δίσκων έδειξε ότι

το πλάτος στα διαγονιδιακά ποντίκια είναι σχεδόν πενταπλάσιο σε σύγκριση με τα WT, καθώς τα Des^{-/-}-TgS13F έχουν μέσο πλάτος 4.40μm, ενώ τα WT έχουν 0.85μm (Γράφημα 3.7).

Όπως είναι γνωστό, τόσο η δεσμίνη όσο και η δεσμοπλακίνη συνεντοπίζονται φυσιολογικά στους εμβόλιμους δίσκους, καθώς συνδέονται μεταξύ τους. Παρόλα αυτά στα Des^{-/-}-TgS13F μυοκαρδιοκύτταρα η δεσμοπλακίνη εντοπίζεται επιπλέον διάστικτα στο κυτταρόπλασμα και σε μερικές περιπτώσεις συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη υπό τη μορφή πιθανώς κοινών συσσωματωμάτων (Εικόνα 3.12, λευκά βέλη). Επομένως, η αδυναμία δημιουργίας ενός δομημένου δικτύου IFs δεσμίνης πιθανόν επηρεάζει τη σωστή δόμηση των IDs και συγκεκριμένα των δεσμοσωμάτων.



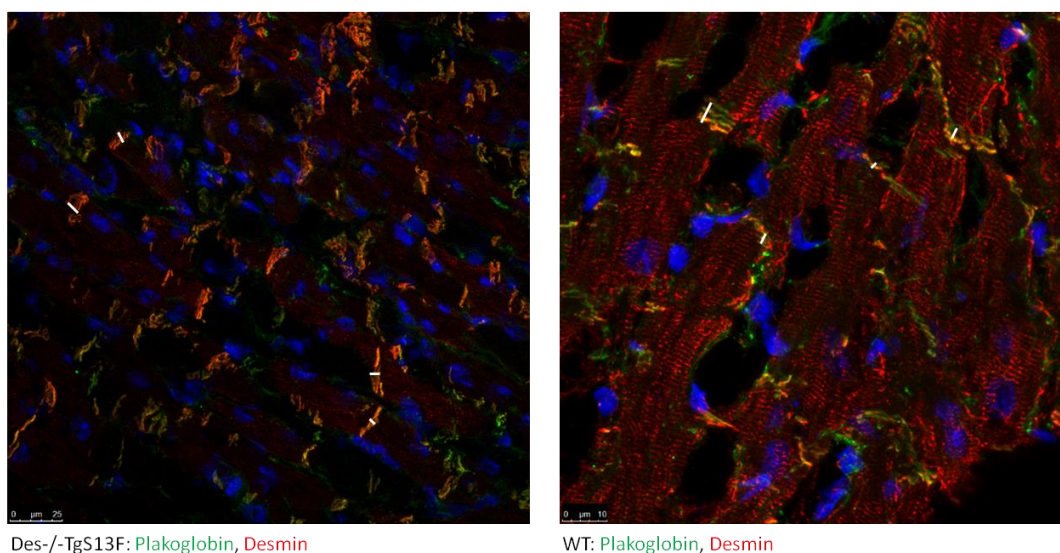
Εικόνα 3.12 Οι εμβόλιμοι δίσκοι εντοπίζονται πεπλατυσμένοι στα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}-TgS13F σε σχέση με τα WT και ταυτόχρονα η δεσμοπλακίνη συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη κυτταροπλασματικά με τη μορφή συσσωματωμάτων στα διαγονιδιακά ποντίκια (λευκά βέλη). Ενδεικτική ανάλυση εμβόλιμων δίσκων με διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμοπλακίνης και δεσμίνης σε τομές κρουστούμου καρδιακών ιστών από Des^{-/-}-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Έχουν σημειωθεί αντιστοίχως τα προς υπολογισμό πλάτη των εμβόλιμων δίσκων με λευκή γραμμή στη συγκεκριμένη τομή. Η δεσμοπλακίνη αποδίδεται με πράσινο και η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).



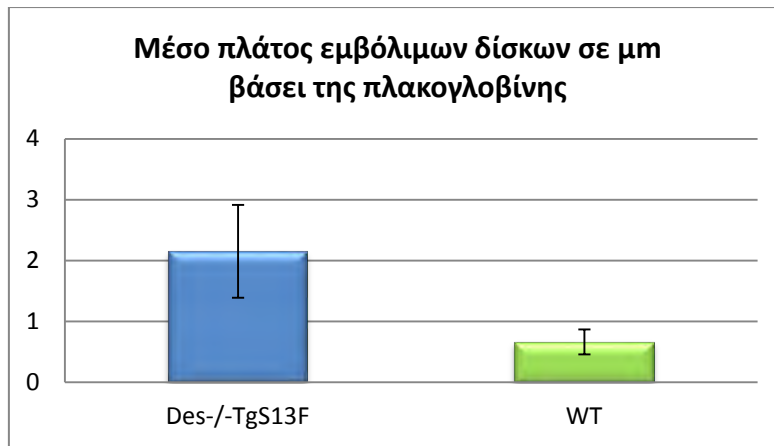
Γράφημα 3.7 Το μέσο πλάτος των εμβόλιμων δίσκων βάσει της δεσμοπλακίνης είναι σχεδόν πενταπλάσιο στα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}-TgS13F (4.40μm) σε σχέση με τα WT (0.85μm). Το μέσο πλάτος αποδίδεται σε μm όπως προέκυψε από την ανάλυση τομών κρουστούμου καρδιακού ιστού από διαγονιδιακά Des^{-/-}-TgS13F και WT ποντίκια (n=20 μετρήσεις από συνολικά 3 ζώα για κάθε γενότυπο, p<0.00001).

3.14 Οι εμβόλιμοι δίσκοι εντοπίζονται πεπλατυσμένοι στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F, ενώ δεν διαταράσσεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πλακογλοβίνης

Ο συνδυασμός δεσμοσωμάτων και συνδέσμων προσκόλλησης στο επίπεδο των εμβόλιμων δίσκων ονομάζεται «area composita» [Franke et al., 2006; Sheikh et al., 2009; Vite and Radice, 2014]. Η μελέτη της επίδραση της μεταλλαγμένης δεσμίνης p.S13F στους IDs μέσω της δεσμοπλακίνης των δεσμοσωμάτων, οδήγησε στη μελέτη της πλακογλοβίνης ως βασικό συστατικό τόσο των δεσμοσωμάτων όσο και των συνδέσμων προσκόλλησης (adherent junctions) [Vite and Radice, 2014], δομών ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα των μυοκαρδιοκυττάρων και της καρδιακής λειτουργίας που υπόκειται σε συνεχές μηχανικό φορτίο. Και σε αυτή την περίπτωση στα διαγονιδιακά ποντίκια η δομή των IDs φαίνεται διαταραγμένη και πεπλατυσμένη, αλλά η πλακογλοβίνη δεν φαίνεται να χάνει τον βασικό υποκυτταρικό εντοπισμό της στα IDs, ούτε τον συνεντοπισμό της με τη δεσμίνη όπως παρατηρείται στα φυσικού τύπου ποντίκια (Εικόνα 3.13). Αντίστοιχα, όπως περιγράφηκε για τη δεσμοπλακίνη, έτσι και για τη πλακογλοβίνη, η ποσοτική ανάλυση του πλάτους των εμβόλιμων δίσκων έδειξε ότι το πλάτος στα διαγονιδιακά ποντίκια είναι σχεδόν τριπλάσιο σε σύγκριση με τα WT. Συγκεκριμένα, τα Des-/-TgS13F έχουν μέσο πλάτος 2.15μm, ενώ τα WT έχουν 0.66μm (Γράφημα 3.8). Τα ζώα ήταν ηλικίας 6 μηνών.



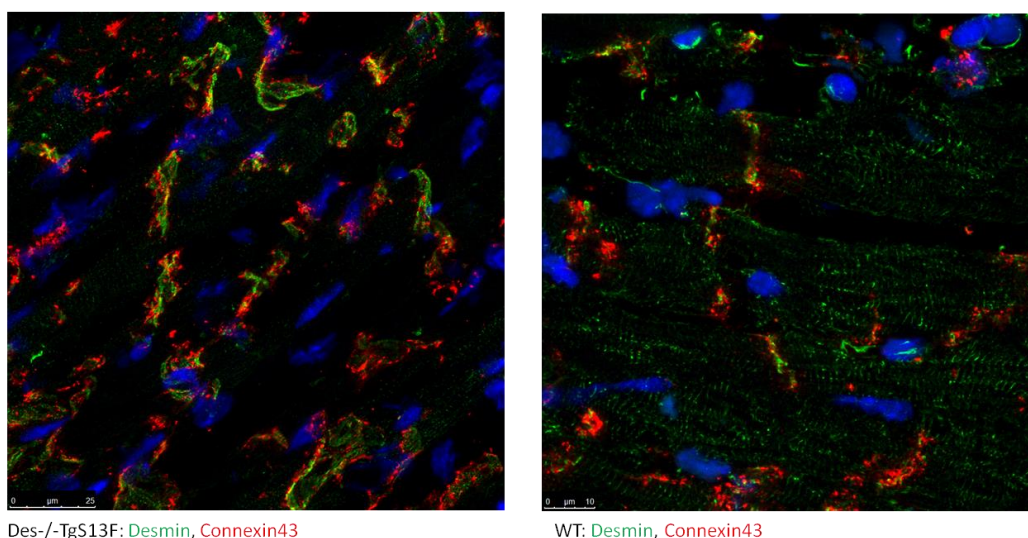
Εικόνα 3.13 Οι εμβόλιμοι δίσκοι στα Des-/-TgS13F ποντίκια παρουσιάζονται διαταραγμένοι και πεπλατυσμένοι, χωρίς όμως η πλακογλοβίνη να χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στα IDs ή τον συνεντοπισμό της με τη δεσμίνη. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την εφαρμογή διπλής ανοσοσήμανσης έναντι πλακογλοβίνης και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Έχουν σημειωθεί αντιστοίχως τα προς υπολογισμό πλάτη των εμβόλιμων δίσκων με λευκή γραμμή στη συγκεκριμένη τομή. Η πλακογλοβίνη αποδίδεται με πράσινο και η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).



Γράφημα 3.8 Το μέσο πλάτος των εμβόλιμων δίσκων βάσει της πλακογλοβίνης είναι σχεδόν τριπλάσιο στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F (2.15 μm) σε σχέση με τα WT (0.66 μm). Το μέσο πλάτος αποδίδεται σε μm όπως προέκυψε από την ανάλυση τομών κρουοτόμου καρδιακού ιστού από διαγονιδιακά Des-/-TgS13F και WT ποντίκια (n=20 μετρήσεις από συνολικά 3 ζώα για κάθε γενότυπο, $p < 0.00001$).

3.15 Στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F δεν διαταράσσεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός της κοννεξίνης43 των χασματοσυνδέσμων στους εμβόλιμους δίσκους

Μια άλλη δομή των εμβόλιμων δίσκων είναι αυτή των χασματοσυνδέσμων, οι οποίοι είναι διαμεμβρανικοί διάυλοι μεταφοράς ιόντων και παίζουν επίσης ρόλο στη συστολή του μυοκαρδιοκυττάρου. Η μελέτη των δομών των χασματοσυνδέσμων με ανοσοσθήμανση έναντι της βασικής πρωτεΐνης κοννεξίνης43 (connexin43) δεν υπέδειξε ιδιαίτερες μεταβολές στον υποκυτταρικό εντοπισμό της στα Des-/-TgS13F ποντικών, καθώς εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους όπως και στο φυσιολογικό μυοκάρδιο (Εικόνα 3.14).

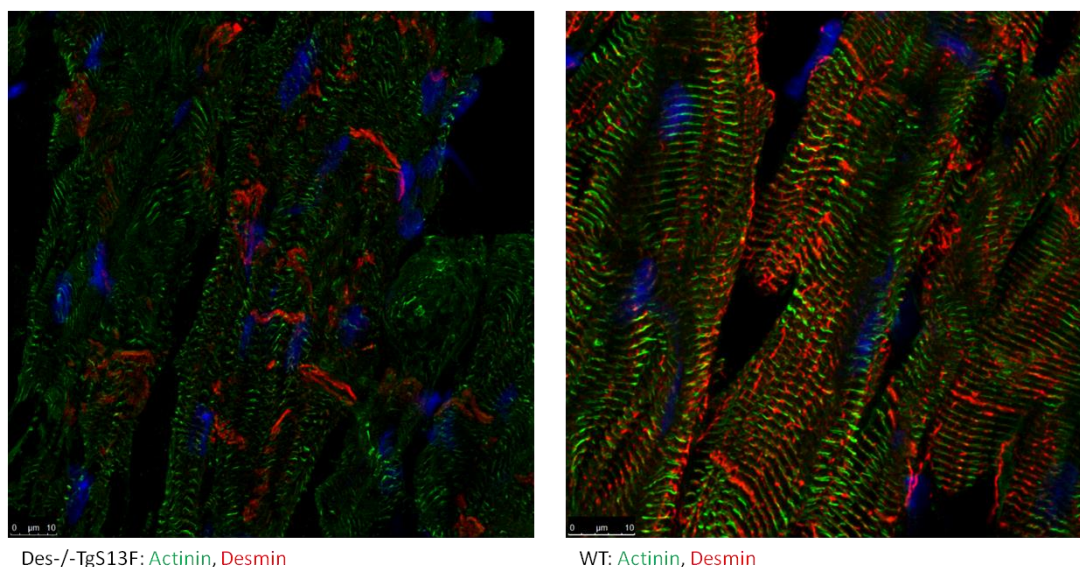


Εικόνα 3.14 Η κοννεξίνη43 δεν χάνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στους εμβόλιμους δίσκους στα Des-/-TgS13F ποντίκια. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την εφαρμογή διπλής ανοσοσθήμανσης έναντι κοννεξίνης43

και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο και η κοννεξίνη43 με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).

3.16 Η ακτινίνη εντοπίζεται στις διαταραγμένες δομές των z-δίσκων στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F

Η ανάλυση τομών καρδιακού ιστού με συνεστιακή μικροσκοπία έδειξε ότι η ακτινίνη εντοπίζεται στις διαταραγμένες δομές των z-δίσκων στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F, ανεξάρτητα από την απουσία της δεσμίνης στις συγκεκριμένες δομές (Εικόνα 3.15). Στα φυσικού τύπου ποντίκια παρατηρούμε τις περιοδικές διακριτές δομές των z-δίσκων, όπου συνεντοπίζονται η φυσιολογική δεσμίνη και η ακτινίνη, και επιπλέον η δεσμίνη εντοπίζεται και στα IDs.

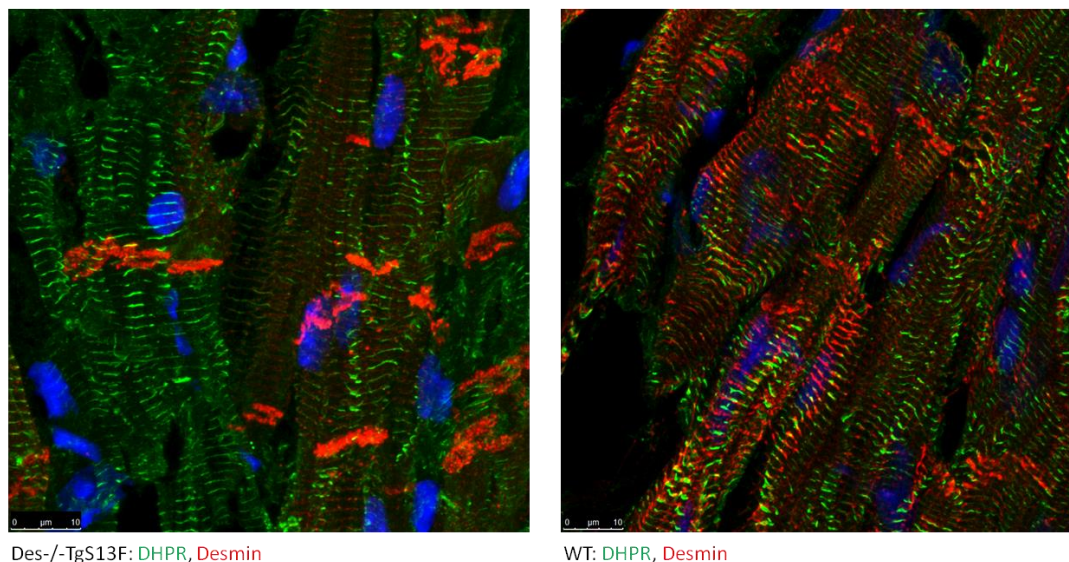


Εικόνα 3.15 Η ακτινίνη εντοπίζεται στις διαταραγμένες δομές των z-δίσκων στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F. Διπλή ανοσοσθήμανση έναντι ακτινίνης και δεσμίνης σε τομές κρυοτόμου καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η ακτινίνη αποδίδεται με πράσινο, η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).

3.17 Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης DHPR στις μεμβρανικές εγκολπώσεις T-tubules δεν διαταράσσεται στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F

Ο DHPR (dihydropyridine receptor) είναι ένας τασεο-εξαρτώμενος διαμεμβρανικός υποδοχέας ασβεστίου που εντοπίζεται στις μεμβρανικές εγκολπώσεις της σαρκοπλασματικής μεμβράνης T-tubules και σε συνδυασμό με το σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR) συμμετέχει στην ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης ασβεστίου στο μυοκαρδιοκύτταρο που είναι απαραίτητη για τη σύζευξη της διαδικασίας διέγερσης-συστολής (excitation-contraction coupling) [Hong

and Shaw, 2017]. Η ανάλυση τομών καρδιακού ιστού από διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}-TgS13F με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία έδειξε ότι η μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F δεν επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του DHPR στη σαρκοπλασματική μεμβράνη (z-line pattern). Παρόλα αυτά, όμως, φαίνεται να χάνεται ο συνεντοπισμός της μεταλλαγμένης δεσμίνης p.S13F με τον DHPR στα διαγονιδιακά ποντίκια. Αντίθετα, οι δυο πρωτεΐνες φαίνεται να συνεντοπίζονται στο μυοκάρδιο των ζώων φυσικού τύπου (Εικόνα 3.16).

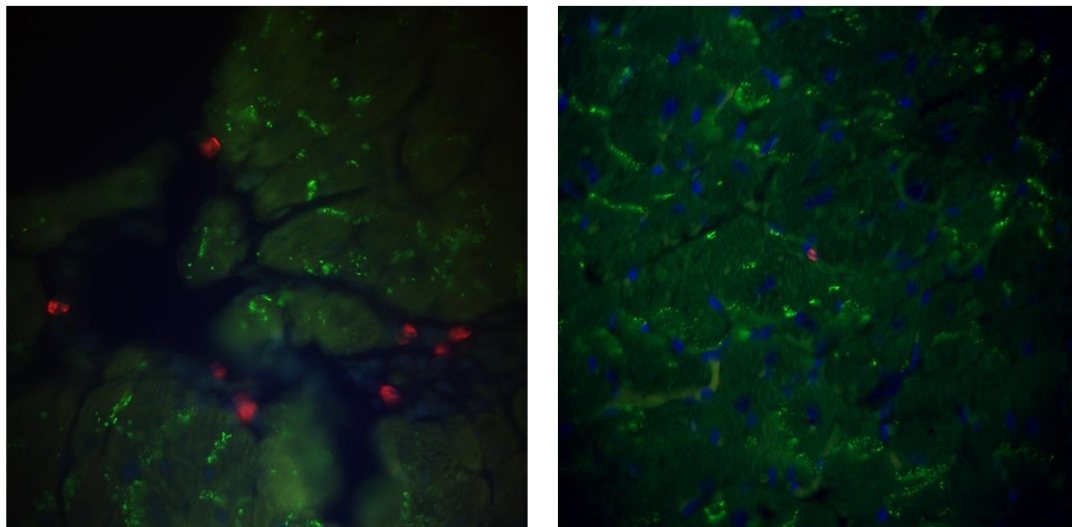


Εικόνα 3.16 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F δεν διαταράσσει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης DHPR (z-line pattern). Παρόλα αυτά φαίνεται να χάνεται ο συνεντοπισμός των 2 πρωτεϊνών στα διαγονιδιακά ποντίκια, σε αντίθεση με τα φυσικού τύπου ζώα όπου συνεντοπίζονται. Διπλή ανοσοσθήμανση έναντι DHPR και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des^{-/-}-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η DHPR αποδίδεται με πράσινο, η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).

3.18 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}-TgS13F παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης

Οι δομικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στον καρδιακό ιστό στην ACM συχνά συνδέονται με την αυξημένη απόπτωση των μυοκαρδιοκυττάρων και τη λέπτυνση του τοιχώματος των κοιλιών που παρατηρείται σε αυτές τις περιπτώσεις. Έτσι, λοιπόν, τα επίπεδα απόπτωσης στην καρδιά μελετήθηκαν με την εφαρμογή της μεθόδου TUNEL στα διαγονιδιακά και στα φυσικού τύπου ποντίκια. Πράγματι, εντοπίζονται αρκετοί θετικοί κατά TUNEL πυρήνες μυοκαρδιοκυττάρων σε τομές καρδιακού ιστού από Des^{-/-}-TgS13F ποντικών σε σχέση με τα φυσικού τύπου (Εικόνα 3.17). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα απόπτωσης μυοκαρδιοκυττάρων είναι σχεδόν τετραπλάσια στα διαγονιδιακά ποντίκια (2.17 θετικοί πυρήνες/ mm^2) σε σχέση με τα φυσικού τύπου (0.56 θετικοί πυρήνες/ mm^2), όπως προκύπτει από την ποσοτικοποίηση των θετικών πυρήνων/ mm^2 στα αντίστοιχα ζωικά πρότυπα (Γράφημα 3.9). Τα ευρήματα συνάδουν με τα ιστολογικά αποτελέσματα από τη

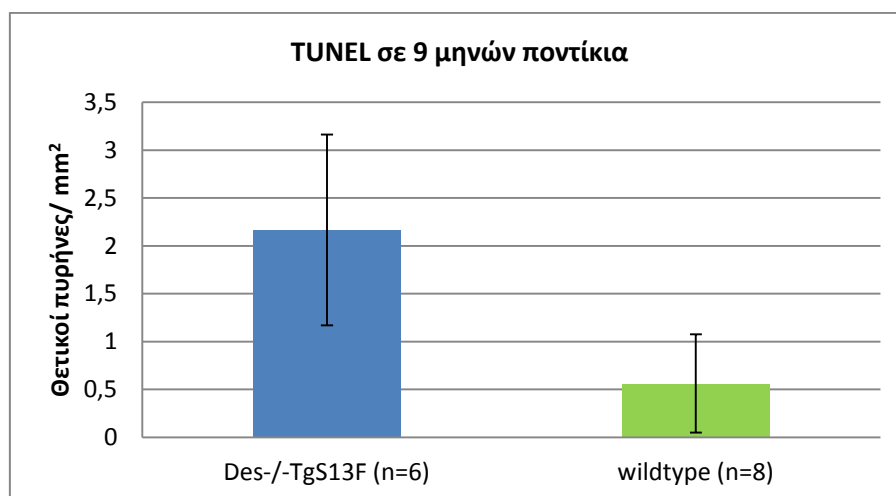
χρώση Masson's trichrome, αφού τα αποπτωτικά κύτταρα συνήθως αντικαθίστανται από ινώδη ιστό. Το φαινόμενο αποτελεί γνώρισμα της ACM και της καρδιακής ανεπάρκειας και επιβαρύνει την καρδιακή λειτουργία.



Des-/-TgS13F: Connexin43, TUNEL positive nuclei

WT Connexin43, TUNEL positive nuclei

Εικόνα 3.17 Τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F παρουσιάζουν αρκετούς θετικούς στην απόπτωση (κατά TUNEL) πυρήνες μυοκαρδιοκυττάρων (connexin43) σε σχέση με τα WT ποντίκια ηλικίας 9 μηνών. Η ποσοτικοποίηση διαφαίνεται στο Γράφημα 3.8. Η κοννεξίνη43 αποδίδεται με πράσινο, με κόκκινο αποδίδονται οι θετικοί κατά TUNEL πυρήνες και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).

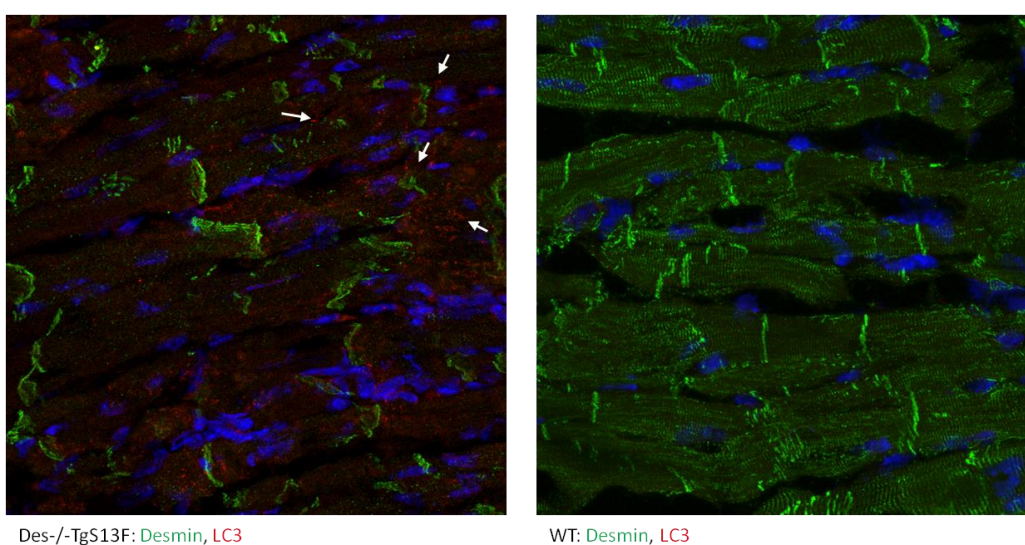


Γράφημα 3.9 Οι θετικοί κατά TUNEL πυρήνες μυοκαρδιοκυττάρων στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια είναι σχεδόν τετραπλάσιοι σε σχέση με τους αντίστοιχους στα WT ποντίκια ηλικίας 9 μηνών ($p < 0.005$).

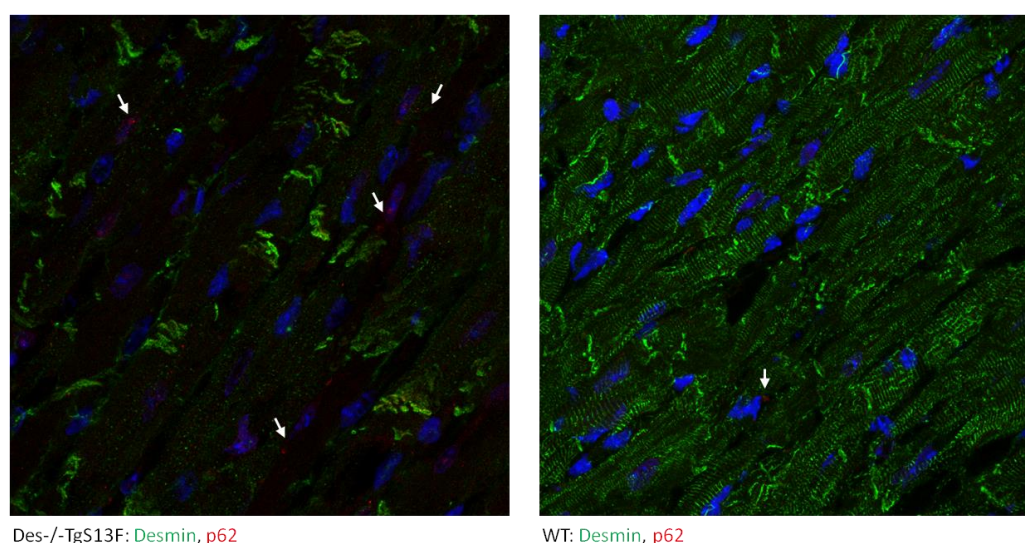
3.19 Ανίχνευση των σχετιζόμενων με την αυτοφαγία πρωτεϊνών LC3 και p62 στα διαγονιδιακά ποντίκια, αλλά χωρίς να συνεντοπίζονται με τη μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F

Με αφορμή τις ενδείξεις ότι η μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F, επειδή διασπάται στην περιοχή κεφαλή, φαίνεται να δημιουργεί συσσωματώματα και δεν

αποικοδομείται, θελήσαμε να μελετήσουμε τη διαδικασία της αυτοφαγίας. Οι LC3 και p62 πρωτεΐνες, σχετίζονται με τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος και της φυσιολογικής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών [Aki et al., 2018; Liu et al., 2016]. Στα διαγονιδιακά ποντίκια, ενώ ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες LC3 και p62 στο κυτταρόπλασμα των μυοκαρδιοκυττάρων, δεν παρατηρείται ο συνεντοπισμός τους με τη μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F (Εικόνες 3.18 και 3.19), γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι η ελλειμματική μορφή της δεσμίνης συσσωρεύεται κυτταροπλασματικά και δεν αποικοδομείται. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι η διαδικασία της αυτοφαγίας είναι ενεργή στα διαγονιδιακά ποντίκια. Επίσης, η p62 είναι και δείκτης απόπτωσης, γεγονός που συνάδει με τα θετικά αποτελέσματα από τη μέθοδο TUNEL. Να αναφέρουμε δε, ότι και στις δυο περιπτώσεις δεν εντοπίζονται ευρήματα στα ποντίκια φυσικού τύπου.



Εικόνα 3.18 Ανίχνευση στικτών σημείων της σχετιζόμενης με την αυτοφαγία πρωτεΐνης LC3 στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμίνης και LC3 (βέλη) σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο, η LC3 με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).



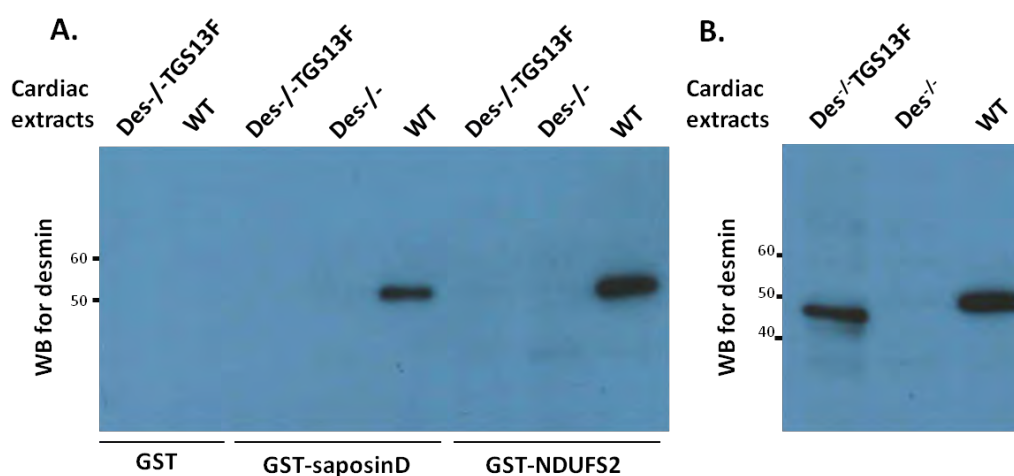
Εικόνα 3.19 Ανίχνευση στικτών σημείων της σχετιζόμενης με την αυτοφαγία και την απόπτωση πρωτεΐνης p62 (βέλη) στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι δεσμίνης και

p62 σε τομές καρδιακών ιστών από Des-/-TgS13F ποντίκια (αριστερά) και WT ποντίκια (δεξιά). Η δεσμίνη αποδίδεται με πράσινο, η p62 με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI).

3.20 Η περιοχή κεφαλή είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 και τη λυσοσωματική πρωτεΐνη saposinD

Όπως έχει αναφερθεί και στην Εισαγωγή, έχει δειχτεί ότι, *in vitro* με τη μέθοδο GST pull down, η δεσμίνη αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 και με τη λυσοσωματική πρωτεΐνη saposinD. Πιο ειδικά, *in silico* έχει μελετηθεί η στερεοδομή των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών με την περιοχή κεφαλή της δεσμίνης, όπως είχε προκύψει σύμφωνα με τη μέθοδο yeast two hybrid. Έτσι, καθώς η μεταλλαγμένη p.S13F δεσμίνη που εντοπίζεται στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F φαίνεται ότι διασπάται στο αμινοτελικό της άκρο, κρίθηκε σημαντικό να μελετηθεί αν αυτές οι αλληλεπιδράσεις διατηρούνται ή όχι, με τη μέθοδο GST pull down.

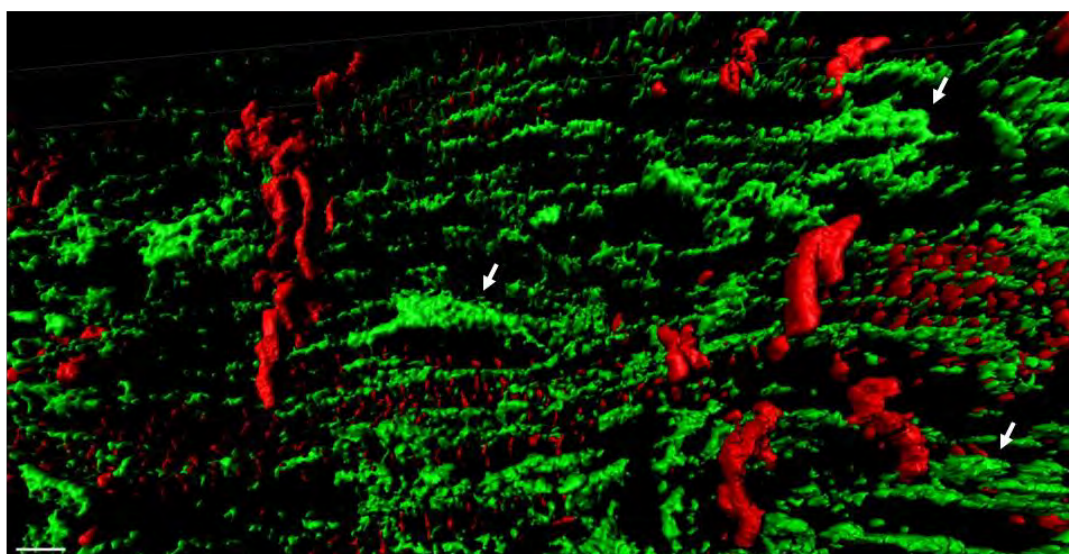
Οι πρωτεΐνες NDUF52 και saposinD έχουν εκφραστεί ώστε να είναι σε σύζευξη με την GST και έτσι να προσδένονται στα κατάλληλα Glutathione Sepharose 4B beads. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα ποντίκια Des-/-TgS13F (απουσιάζει τμήμα του αμινοτελικού άκρου της δεσμίνης), Des-/- (απουσιάζει ολόκληρη η δεσμίνη, αρνητικό control) και WT (φυσιολογική δεσμίνη, θετικό control) αποτελούν πηγές δεσμίνης. Πράγματι, διαπιστώσαμε ότι οι αλληλεπιδράσεις χάνονται απουσία του αρχικού αμινοτελικού άκρου στην περιοχή κεφαλή της δεσμίνης στη μεταλλαγμένη δεσμίνη p.S13F, και με τις δύο πρωτεΐνες, τόσο τη NDUF52 όσο και τη saposinD, σε αντίθεση με τη φυσικού τύπου δεσμίνη που επιτυγχάνει και τις δύο αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 3.20).



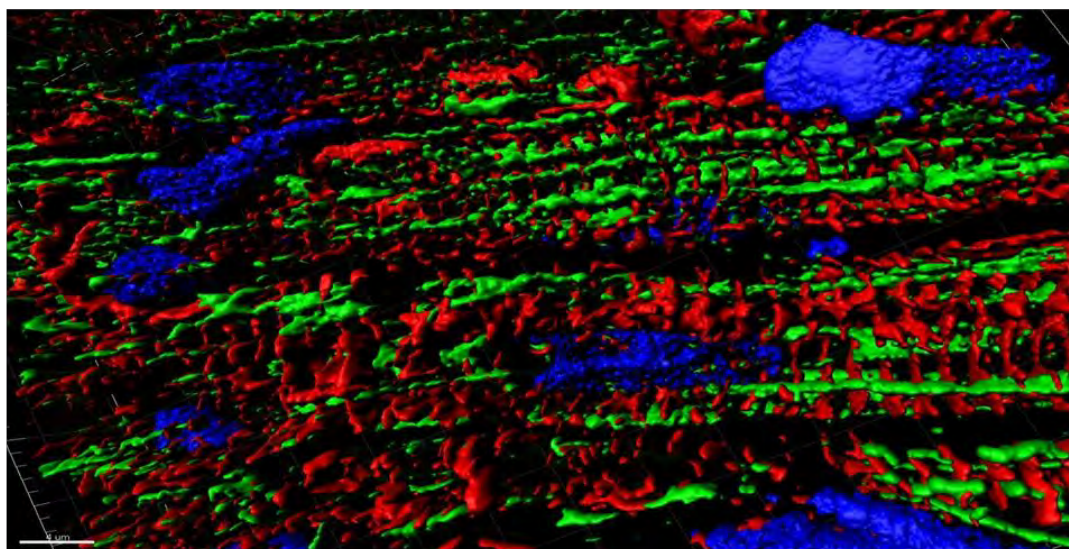
Εικόνα 3.20 Η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 και τη λυσοσωματική πρωτεΐνη saposinD, ύστερα από την εφαρμογή της μεθόδου GST pull down (beads: GST, GST-saposinD και GST-NDUF52) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western έναντι της δεσμίνης (input: ολικά πρωτεϊνικά καρδιακά εκχυλίσματα από Des-/-TgS13F, Des-/- και WT ποντίκια).

3.21 Η μεταλλαγμένη δεσμίνη pS13F διαταράσσει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της NDUF52, επηρεάζοντας την κατανομή των μιτοχονδρίων στα μυοκαρδιοκύτταρα

Έχοντας ως δεδομένο ότι η δεσμίνη αλληλεπιδρά με τη NDUF52 (Εικόνα 3.20), ακολούθησε η μελέτη της αλληλεπίδρασης σε κυτταρικό επίπεδο σε τομές καρδιακού ιστού από Des^{-/-}TgS13F και WT ποντίκια. Πράγματι, η σωστή κυτταρική κατανομή των μιτοχονδρίων κατά μήκος των σαρκομερών φαίνεται να διαταράσσεται στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ζώων, καθώς παρατηρείται διάχυτη και σε συσσωματώματα κατανομή των μιτοχονδρίων (Εικόνα 3.21).



Des^{-/-}TgS13F: NDUF52, Desmin



WT: NDUF52, Desmin

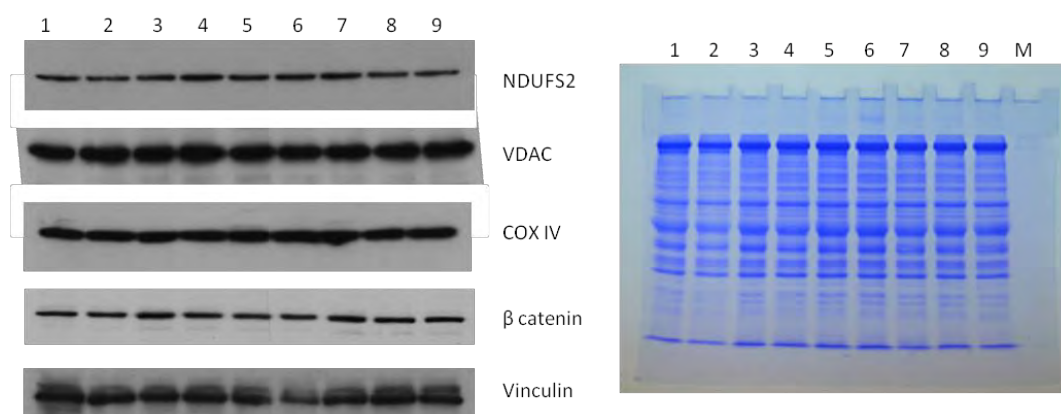
Εικόνα 3.21 Η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 παρουσιάζει διάχυτη κατανομή στα διαγονιδιακά ποντίκια, καθώς χάνει την κατά μήκος κατανομή της στα σαρκομερή, όπως διαφαίνεται στα φυσικού τύπου. Επίσης, παρατηρούνται συσσωματώματα (υποδεικνύονται με βέλη) της NDUF52. Διπλή ανοσοσήμανση έναντι NDUF52 και δεσμίνης σε τομές καρδιακών ιστών από Des^{-/-}TgS13F ποντίκια (πάνω) και WT ποντίκια (κάτω). Η NDUF52 αποδίδεται με πράσινο, η δεσμίνη με κόκκινο και με μπλε οι κυτταρικοί πυρήνες (DAPI). (Επεξεργασμένη εικόνα με το πρόγραμμα IMARIS για την απόδοση 3D αποεικόνισης)

3.22 Πρωτεϊνικό προφίλ

Εν συνεχεία, μετά την υποκυτταρική ανάλυση, εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έναντι της εκάστοτε προς ανάλυση πρωτεΐνης σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από καρδιακό ιστό από διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}-TgS13F και Des^{+/-}-TgS13F, και ποντίκια φυσικού τύπου. Προκειμένου να διερευνηθούν περαιτέρω οι σχετιζόμενες πρωτεΐνες και σε πρωτεϊνικό επίπεδο έκφρασης.

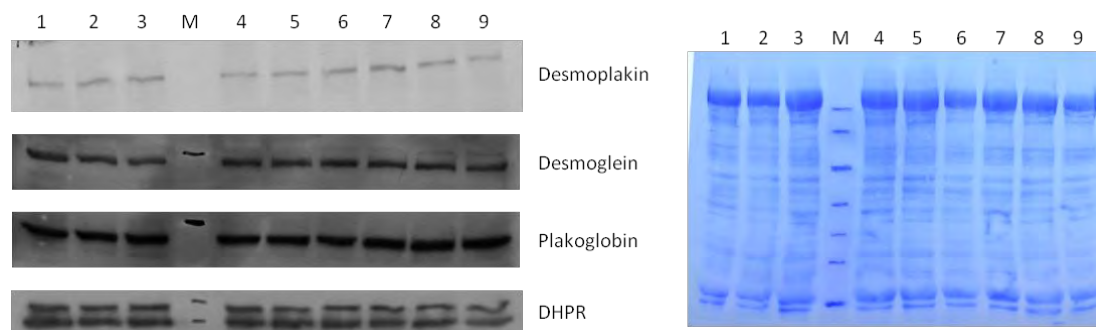
3.22.1 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών: δεσμοπλακίνη, πλακογλοβίνη, βινκουλίνη, δεσμογλεΐνη, β-κατενίνη, DHPR, NDUFS2, VDAC, COX IV, p62, και κασπάση3 δεν μεταβάλλονται σημαντικά στα διαγονιδιακά ποντίκια

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στις προηγούμενες ενότητες σε κυτταρικό επίπεδο: δεσμοπλακίνη, πλακογλοβίνη, βινκουλίνη, DHPR, NDUFS2 και p62 δεν μεταβάλλονται σημαντικά στα διαγονιδιακά ποντίκια σε σχέση με τα φυσικού τύπου ποντίκια, παρά τις υποκυτταρικές μεταβολές που εντοπίστηκαν. Εξίσου, βέβαια, μελετώντας την πρωτεϊνική έκφραση επιπλέον μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, όπως είναι οι VDAC και COX IV, δεν εντοπίζονται σημαντικές ποσοτικές διαφορές μεταξύ των γενοτύπων. Παρόμοια αποτελέσματα, στατιστικά μη σημαντικά, παρατηρούνται και σε άλλες δυο πρωτεΐνες των IDs, τη δεσμογλεΐνη (desmoglein) των δεσμοσωμάτων και τη β-κατενίνη των συνδέσμων προσκόλλησης. Επίσης, ούτε η πρωτεϊνική ανάλυση της κασπάσης3 στα διαγονιδιακά ποντίκια είχε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα φυσικού τύπου. Τα αποτελέσματα (Εικόνες 3.22-24) υποδεικνύουν ότι η μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F μπορεί σε κάποιες από αυτές να παίζει ρόλο στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους στο μυοκαρδιοκύτταρο, χωρίς όμως παράλληλα να διαταράσσει τα επίπεδα έκφρασής τους.

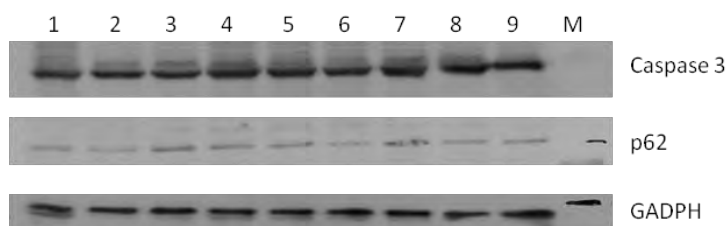


Εικόνα 3.22 Τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών: NDUFS2, VDAC και COX IV, καθώς και των πρωτεϊνών των IDs: β-κατενίνη και βινκουλίνη δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ

των διαγονιδιακών και φυσικού τύπου ζώων. Ανάλυση Western blot (αριστερά) σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des^{-/-}TgS13F (θέσεις 1-3), Des^{+/-}TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η χρώση με Coomassie blue (δεξιά) χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT (n=3-6, p>0.05).



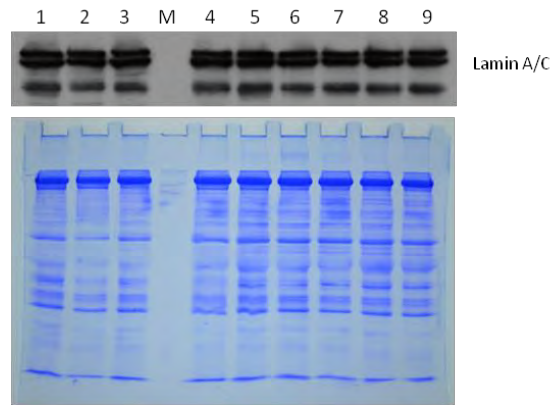
Εικόνα 3.23 Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών των IDs: δεσμοπλακίνη, δεσμογλεΐνη, πλακογλοβίνη και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης DHPR δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαγονιδιακών και φυσικού τύπου ζώων. Ανάλυση Western blot (αριστερά) σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des^{-/-}TgS13F (θέσεις 1-3), Des^{+/-}TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η χρώση με Coomassie blue (δεξιά) χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT (n=3-6, p>0.05).



Εικόνα 3.24 Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών: κασπάση3 και p62 δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαγονιδιακών και φυσικού τύπου ζώων. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des^{-/-}TgS13F (θέσεις 1-3), Des^{+/-}TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT (n=3-6, p>0.05).

3.22.2 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης λαμίνης A/C εμφανίζονται αυξημένα στα διαγονιδιακά ποντίκια

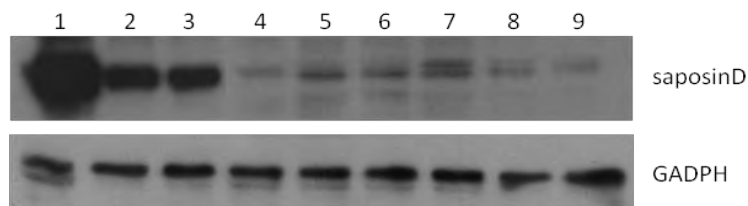
Από την άλλη, η πυρηνική πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων λαμίνης A/C βρέθηκε αυξημένη κατά 20% στα διαγονιδιακά ποντίκια Des^{-/-}TgS13F, συγκριτικά με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης στα φυσικού τύπου ποντίκια (Εικόνα 3.25 και Γράφημα 3.10).



Εικόνα 3.25 Τα επίπεδα έκφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης λαμίνης A/C παρουσιάζουν μια μικρή αύξηση μεταξύ των διαγονιδιακών Des-/-TgS13F και WT ζώων. Ανάλυση Western blot (πάνω) σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η χρώση με Coomassie blue (κάτω) χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT και απεικονίζεται στο Γράφημα 3.10 (n=6, p=0.047).

3.22.3 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λυσοσωματικής πρωτεΐνης saposinD εμφανίζονται αυξημένα στα διαγονιδιακά ποντίκια

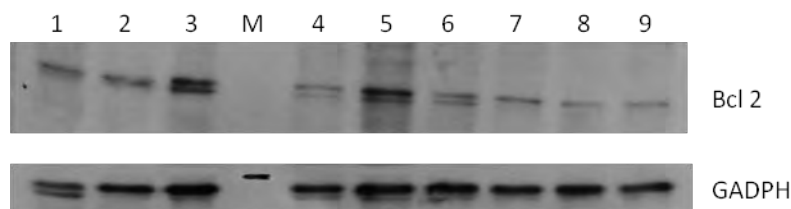
Σε αντίθεση με τις μιτοχondριακές πρωτεΐνες, η λυσοσωματική πρωτεΐνη saposinD βρέθηκε αρκετά αυξημένη, σχεδόν κατά 5 φορές, στα Des-/-TgS13F ποντίκια σε σχέση με τα WT (Εικόνα 3.26 και Γράφημα 3.10). Γεγονός που έρχεται σε συνάφεια με την ανίχνευση με ανοσοσήμευση των σχετιζόμενων με την αυτοφαγία πρωτεϊνών LC3 και p62 στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών, καθώς κατά τη διαδικασία της αποικοδόμησης είναι απαραίτητη η σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα για τον σχηματισμό των αυτολυσοσωμάτων όπου τα ενδοαυτοφαγοσωματικά συστατικά αποικοδομούνται από τα λυσοσωματικά ένζυμα [Wang and Robbins, 2014].



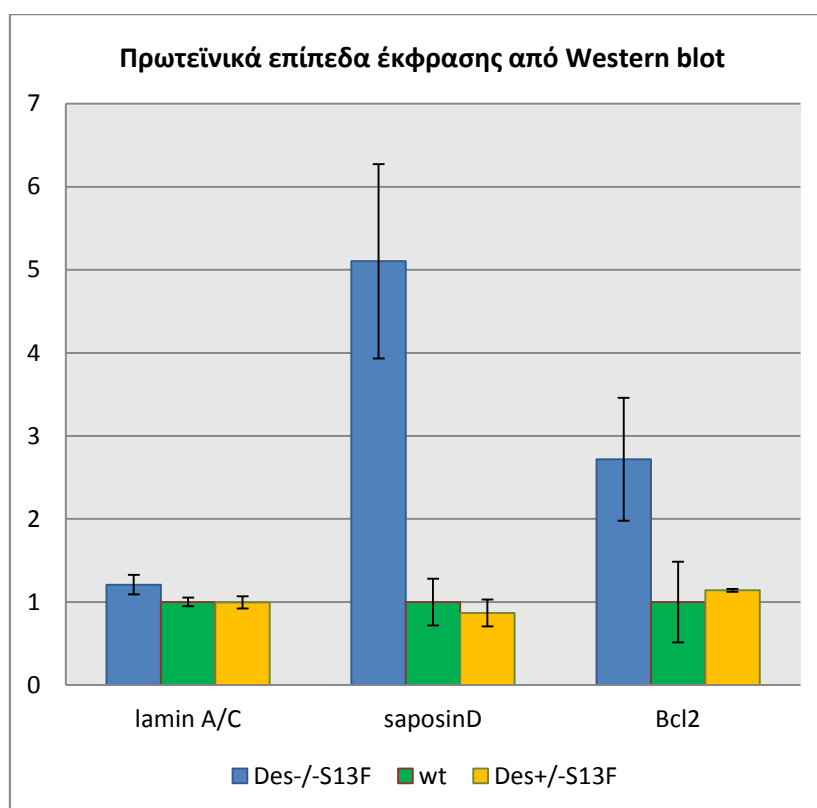
Εικόνα 3.26 Τα επίπεδα έκφρασης της λυσοσωματικής πρωτεΐνης saposinD παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση μεταξύ των διαγονιδιακών Des-/-TgS13F και WT ζώων. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT και απεικονίζεται στο Γράφημα 3.10 (n=3, p<0.001).

3.22.4 Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυτταροπροστατευτικής πρωτεΐνης Bcl2 βρέθηκαν αυξημένα στα διαγονιδιακά ποντίκια

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η κυτταροπροστατευτική πρωτεΐνη Bcl2 βρέθηκε αυξημένη, σχεδόν κατά 2.5 φορές, στα Des-/-TgS13F ποντίκια σε σχέση με τα φυσικού τύπου (Εικόνα 3.27 και Γράφημα 3.10).



Εικόνα 3.27 Τα επίπεδα έκφρασης της κυτταροπροστατευτικής πρωτεΐνης Bcl2 παρουσιάζουν αύξηση μεταξύ των διαγονιδιακών Des-/-TgS13F και WT ζώων. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (θέσεις 1-3), Des+/-TgS13F (θέσεις 4-6) και WT (θέσεις 7-9). Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT και απεικονίζεται στο Γράφημα 3.10 (n=3, p<0.03).

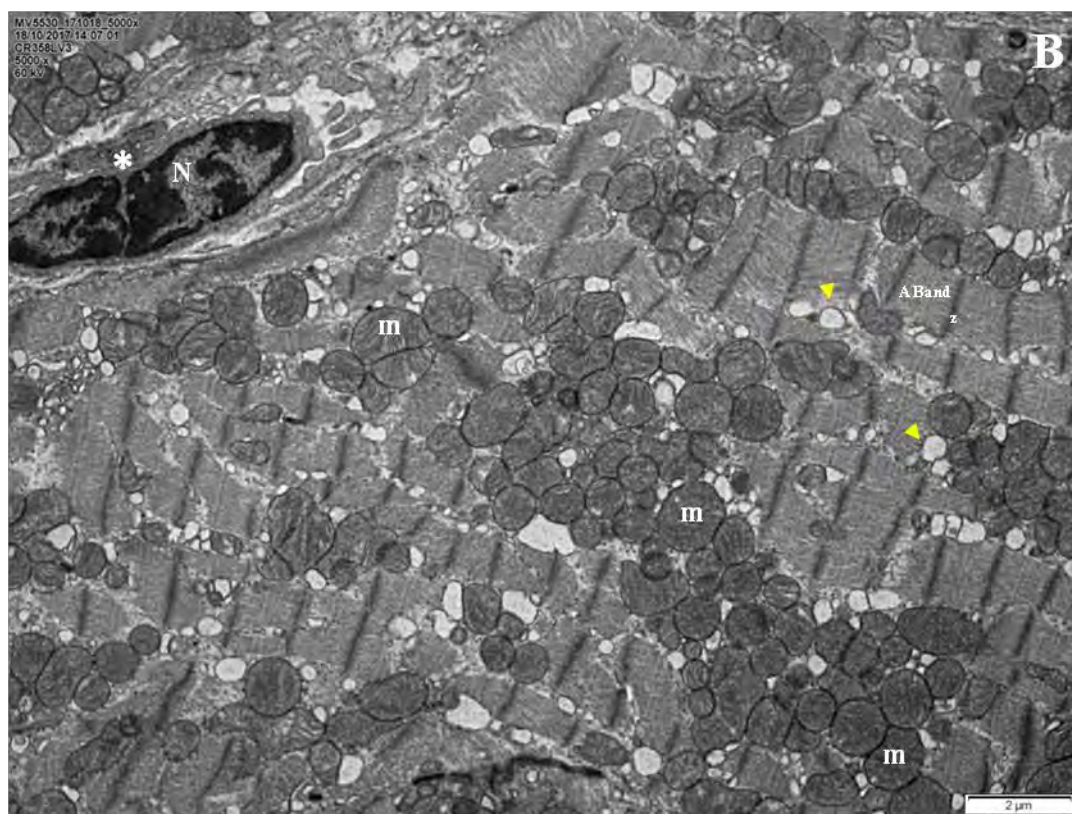
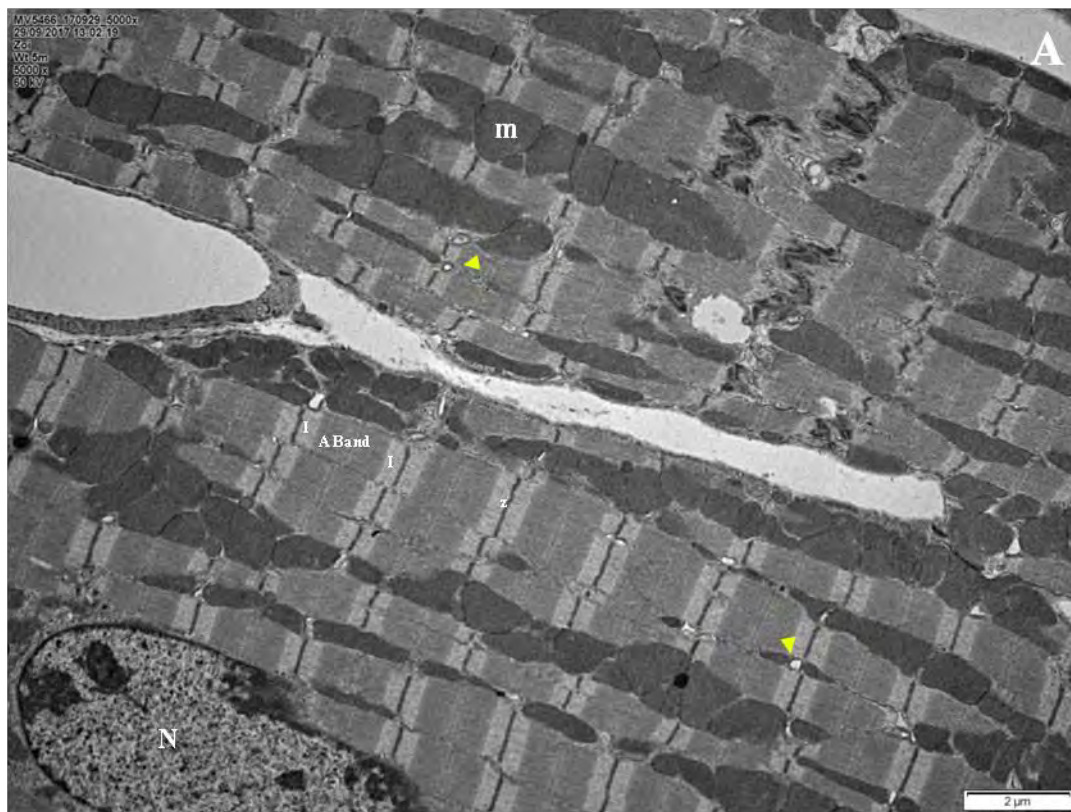


Γράφημα 3.10 Στον καρδιακό ιστό των Des-/-TgS13F ζώων η πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεϊνών: λαμίνη A/C, saposinD και Bcl2 παρουσιάζει αύξηση. Συγκεκριμένα, η λαμίνη A/C παρουσιάζει μια μικρή αύξηση της τάξεως του 1.2 (n=6, p=0.047), η saposinD παρουσιάζει αύξηση κατά 5.1 φορές (n=3, p<0.001) και η bcl2 εμφανίζει αύξηση κατά 2.7 φορές (n=3, p<0.03), σε σχέση με την αντίστοιχη πρωτεϊνική έκφραση στην καρδιά των ζώων φυσικού τύπου. Ανάλυση Western blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιές Des-/-TgS13F (μπλε), WT (πράσινο) και Des+/-TgS13F (κίτρινο). Η ποσοτικοποίηση έγινε με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης στα WT.

3.23 Υπερδομική ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε εκτεταμένες δομικές μεταβολές στα σαρκομερή, τα μυοϊνίδια και τις συζευγμένες δομές των T-tubules και SR των μυοκαρδιοκυττάρων στα Des-/-TgS13F ζώα.

Η ανάλυση των καρδιακών μυών από Des-/-TgS13F ποντίκια με ηλεκτρονική μικροσκοπία υποδεικνύει τις δομικές μεταβολές που προκαλεί η μεταλλαγμένη δεσμίνη S13F στα σαρκομερή, καθώς φαίνεται να απουσιάζει από τους z-δίσκους. Πιο συγκεκριμένα, η δομή των σαρκομερών εμφανίζεται διαταραγμένη και συγκεχυμένη, ενώ τα μυοϊνίδια δεν εμφανίζουν τη χαρακτηριστική ευθυγραμμισμένη τους διαμόρφωση και παρεμβάλλονται από άτακτες μάζες μιτοχονδρίων (Εικόνα 3.28B). Επιπλέον, παρατηρείται ότι οι χαρακτηριστικές διαβαθμίσεις των I ζωνών (I bands) απουσιάζουν από τα σαρκομερή των διαγονιδιακών ποντικών (Εικόνα 3.28B). Βασικό συστατικό των I ζωνών είναι τα ινίδια ακτίνης και τιτίνης που δεσμεύονται στους z-δίσκους [Ahmed et al., 2022]. Η συγκροτημένη δομή των σαρκομερών και των μυοϊνιδίων είναι απαραίτητη για τη συντονισμένη σύσπαση του καρδιακού μυ.

Επιπρόσθετα, πιθανότατα λόγω της διαταραγμένης δομής των σαρκομερών, οι μεμβρανικές εγκολπώσεις T-tubules σε συνδυασμό με τις συζευγμένες δομές του σαρκοπλασματικού δικτύου, εντοπίζονται διογκωμένες και αποδιοργανωμένες στα μυοκαρδιοκύτταρα από Des-/-TgS13F ποντίκια (Εικόνα 3.28B). Οι δομές T-tubules εντοπίζονται φυσιολογικά γύρω από τα μυοϊνίδια και προσαρτώνται στους z-δίσκους των σαρκομερών μέσω των κοσταμερών [Hong and Shaw, 2017] (Εικόνα 3.28A). Οι συζευγμένες δομές T-tubules και σαρκοπλασματικού δικτύου μέσω της λειτουργικής συνεργασίας τους (ανίχνευση διαφοράς δυναμικού, απελευθέρωση ασβεστίου, μυϊκή σύσπαση) συντελούν στην ορθή καρδιακή λειτουργία. Η δεσμίνη σχετίζεται με τους z-δίσκους και το SR και επομένως η διαταραχή του δικτύου της επιδρά και σε αυτές τις δομές.

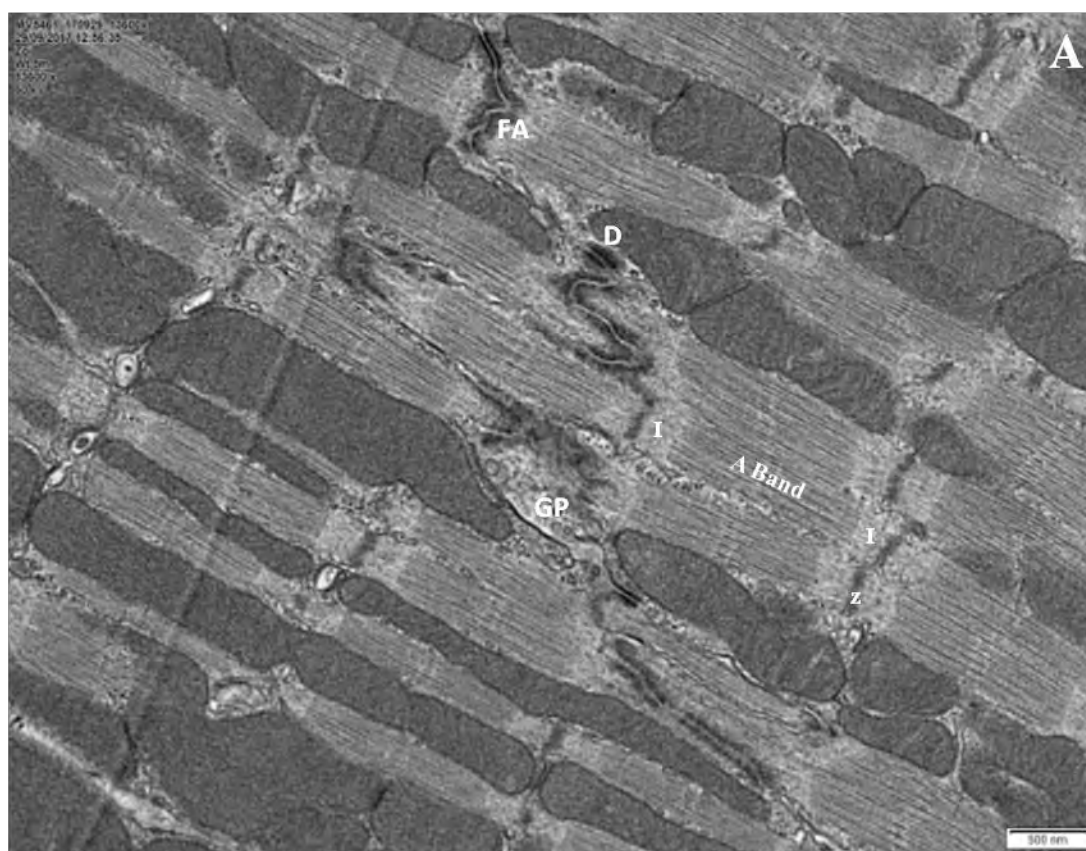


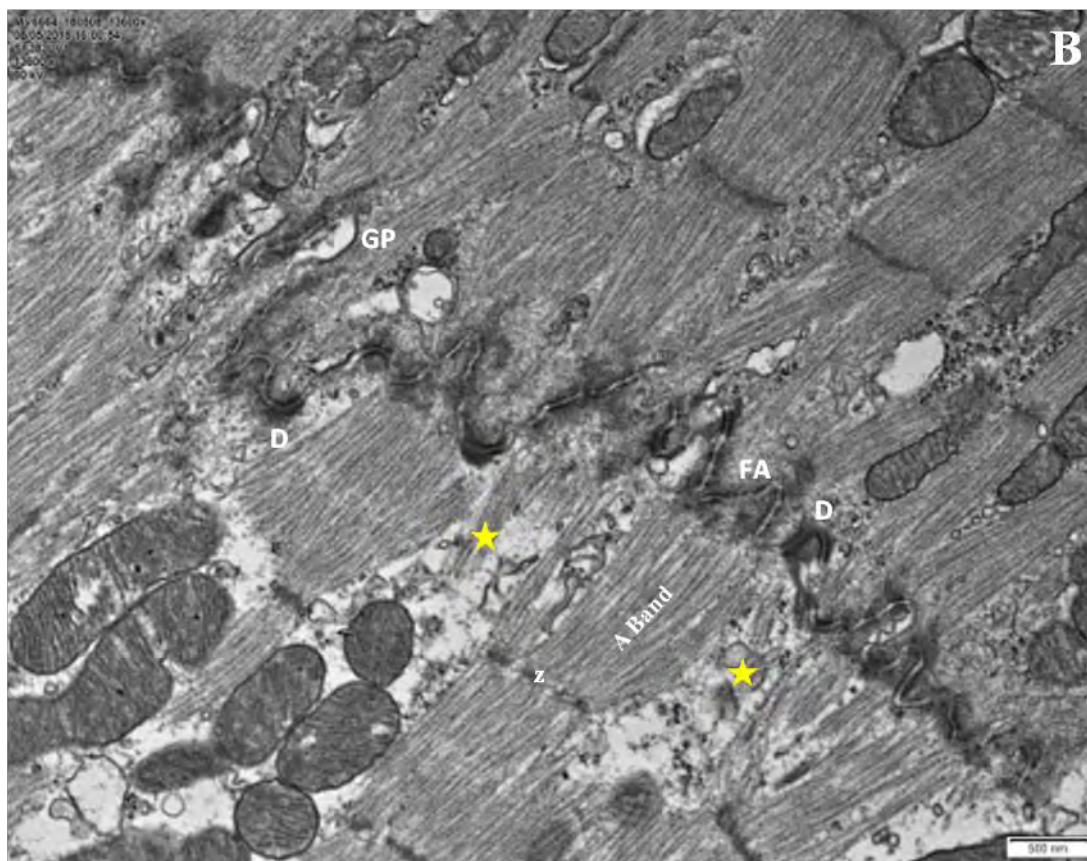
Εικόνα 3.28 Η δομή των σαρκομερών εμφανίζεται διαταραγμένη και συγκεχυμένη και τα μυοϊνίδια χάνουν τη χαρακτηριστική ευθυγραμμισμένη τους διαμόρφωση και παρεμβάλλονται από άτακτες μάζες μιτοχονδρίων. Επιπλέον, οι I ζώνες (I) εκλείπουν από τη δομή των σαρκομερών στα διαγονιδιακά Des-/TgS13F ποντίκια. Ταυτόχρονα, οι συζευγμένες μεμβρανικές δομές των T-tubules και του σαρκοπλασματικού δικτύου (SR) (κίτρινα τρίγωνα) εντοπίζονται διογκωμένες και αποδιοργανωμένες. Με αστερίσκο υποδεικνύεται ο

κατακερματισμός του πυρήνα. Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά Des^{-/-}-TgS13F ποντίκια (B), υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών, N: πυρήνας, m: μιτοχόνδρια).

3.24 Η υπερδομή των εμβόλιμων δίσκων στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών Des^{-/-}-TgS13F ποντικών εμφανίζει εκτεταμένες δομικές μεταβολές

Από την ηλεκτρονική μικροσκοπία επιβεβαιώνεται επιπρόσθετα η διαταραγμένη δομή των εμβόλιμων δίσκων στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών Des^{-/-}-TgS13F ποντικών, οι οποίοι παρουσιάζουν έντονη αναδίπλωση και αυξημένη διάταση. Επίσης, παρατηρείται ότι εν απουσία των ζωνών I (ινίδια ακτίνης) στους εμβόλιμους δίσκους των μυοκαρδιοκυττάρων των διαγονιδιακών ζώων, αυτοί εφάπτονται απευθείας με τη ζώνη A (ινίδια μυοσίνης). Αντιθέτως, οι ζώνες I συνδέονται φυσιολογικά στους εμβόλιμους δίσκους των μυοκαρδιοκυττάρων φυσικού τύπου (Εικόνα 3.29A). Επιπλέον, στα σημεία αυτά παρατηρούμε ότι οι περιοχές της τελικής σύνδεσης των μυοϊνιδίων στους εμβόλιμους δίσκους εντοπίζονται διαταραγμένες και αποδιοργανωμένες, σχηματίζοντας κενά και κυστίδια (Εικόνα 3.29B).

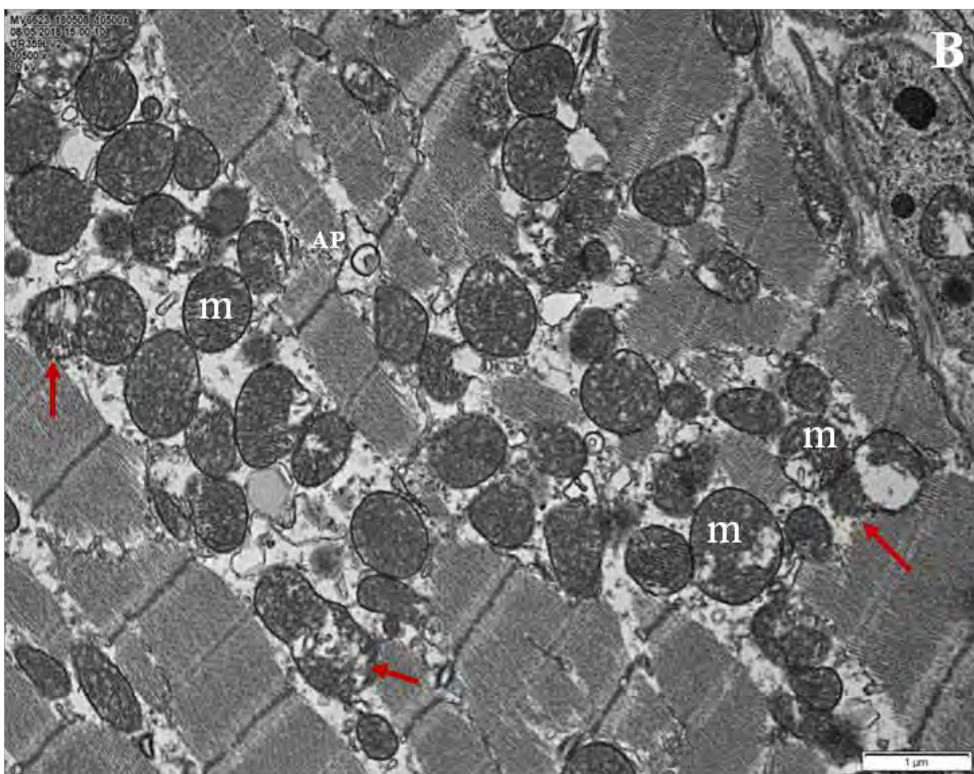
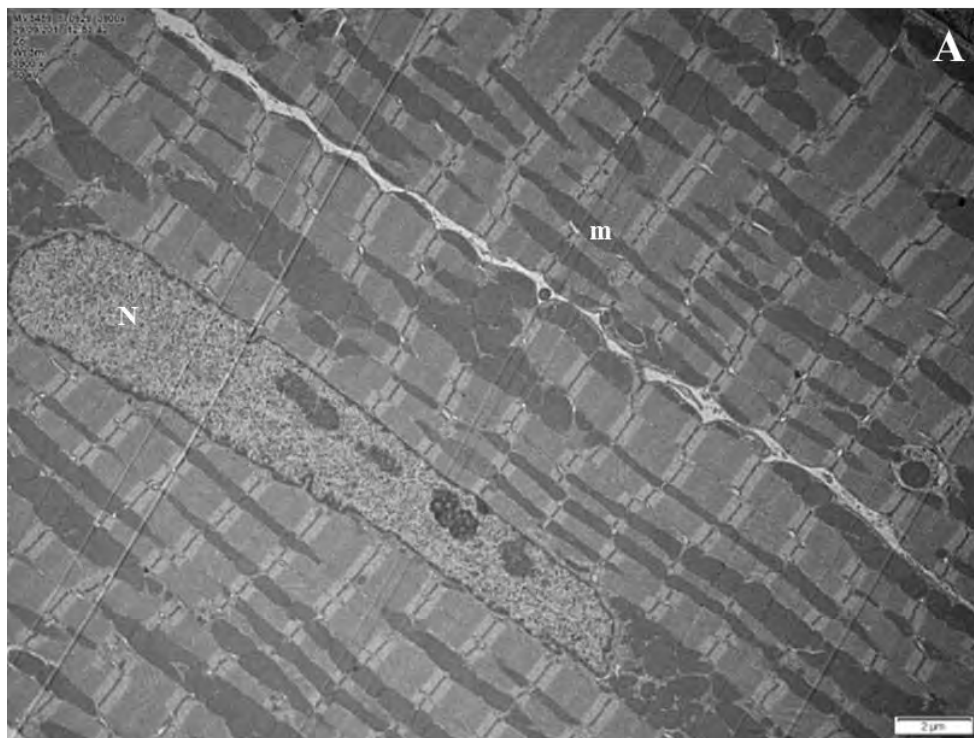




Εικόνα 3.29 Οι εμβόλιμοι δίσκοι στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζουν έντονη αναδίπλωση και αυξημένη διάταση, ενώ ταυτόχρονα οι δομές των δεσμοσωμάτων παρουσιάζουν κύρτωση. Επίσης, οι περιοχές της τελικής σύνδεσης των μυοϊνιδίων στους εμβόλιμους δίσκους εντοπίζονται διαταραγμένες και αποδιοργανωμένες, σχηματίζοντας κενά και κυστιδία (αστεράκια). Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια (B), υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών, D: δεσμοσώματα, FA: σύνδεσμοι προσκόλλησης, GP: χασματοσύνδεσμοι).

3.25 Η υπερδομή των μιτοχονδρίων παρουσιάζει εκτεταμένες διαταραχές στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια

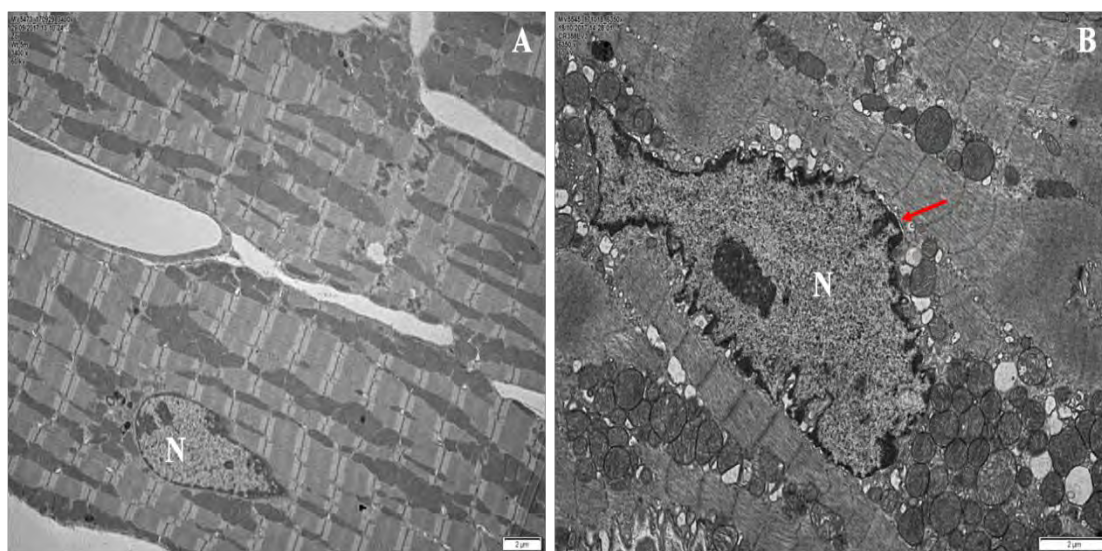
Η ηλεκτρονική μικροσκοπία από καρδιακό ιστό διαγονιδιακών Des-/-TgS13F ποντικών υποδεικνύει ποικίλες μιτοχονδριακές ανωμαλίες, όπως μη φυσιολογικό σχήμα, μέγεθος και υποκυτταρική κατανομή, εκφύλιση (μιτοφαγία) υπό την καταστροφή των μιτοχονδριακών πτυχώσεων (cristae), καθώς και κατακερματισμό και μη φυσιολογική συσσώρευση σε περιοχές με εκτενή σχηματισμό ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων και κυστιδίων (Εικόνες 3.30B). Οι διαταραχές στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση στις λειτουργίες που επιτελούν έχουν συσχετιστεί πολλάκις με την καρδιακή δυσλειτουργία [Capetanaki et al., 2015].



Εικόνα 3.30 Τα μιτοχόνδρια (m) στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζονται μη ευθυγραμμισμένα με τα μυοϊνίδια, διογκωμένα, πολυπληθή σε συστάδες και άτακτα κατανεμημένα στο μυοκαρδιοκύτταρο, ενώ σε σημεία παρατηρούνται κατακερματισμένα και εκφυλισμένα μιτοχόνδρια υπό μιτοφαγία (βέλη). Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια (B), υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών, AP: αυτοφαγόσωμα).

3.26 Η υπερδομή των πυρήνων των μυοκαρδιοκυττάρων στα διαγονιδιακά Des-/-TgS13F ποντίκια εμφανίζεται διαταραγμένη

Η υπερδομή των πυρήνων των μυοκαρδιοκυττάρων στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F εμφανίζεται διαταραγμένη, καθώς το σχήμα εμφανίζεται ακαθόριστο με έντονες μεμβρανικές εγκολπώσεις (Εικόνα 3.31B). Επίσης, σε σημεία παρατηρείται ότι ο διαμεμβρανικός χώρος του πυρήνα εντοπίζεται διατεταμένος (Εικόνα 3.31B και Εικόνα 3.33, όπου επισημαίνεται με βέλος), ενώ σε άλλες περιπτώσεις ο πυρήνας εντοπίζεται κατακερματισμένος (Εικόνα 3.28B, όπου επισημαίνεται με αστερίσκο).

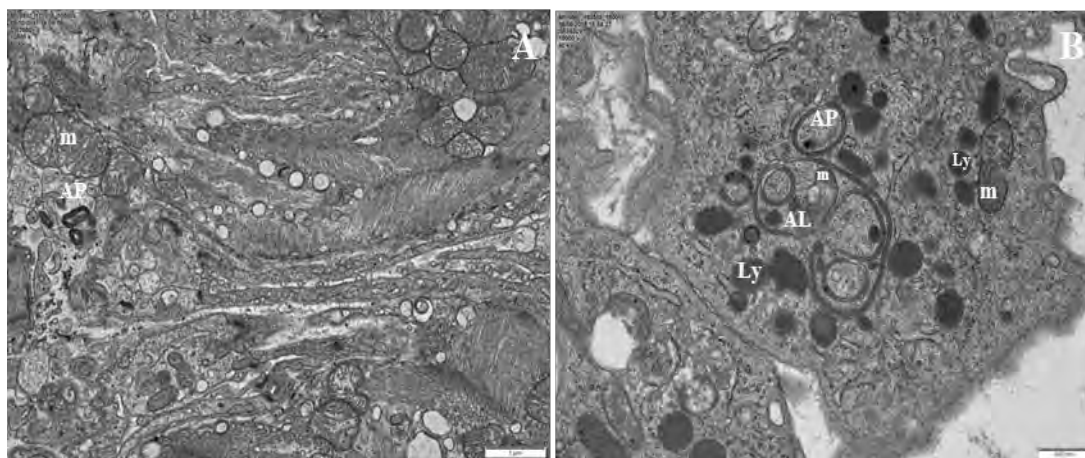


Εικόνα 3.31 Ο πυρήνας του μυοκαρδιοκυττάρου στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F εμφανίζει διαταραγμένο και ακαθόριστο σχήμα με έντονες μεμβρανικές εγκολπώσεις και διατεταμένο διαμεμβρανικό χώρο (βέλος). Χαρακτηριστικές εικόνες καρδιακών ιστών από φυσικού τύπου (A) και διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F (B) υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).

3.27 Στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F παρατηρείται έντονη λυσοσωματική δράση πλησίον των μιτοχονδρίων και γενικευμένη αυτοφαγική δράση

Η ανάλυση του καρδιακού ιστού των διαγονιδιακών ποντικών Des-/-TgS13F υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία υποδεικνύει μια γενικευμένη εικόνα έντονου και εκτενούς σχηματισμού ενδοκυτταρικών σωματιδίων σε συσσωματώματα, χαρακτηριστικό γνώρισμα της αυτοφαγίας (Εικόνα 3.32). Επίσης, σε σημεία παρατηρείται πλήθος λυσοσωμάτων και αυτοφαγοσωμάτων που υποδηλώνουν την έντονη αποικοδομητική δραστηριότητα που ανταποκρίνεται στην εκτεταμένη προσπάθεια αναδιαμόρφωσης των μυοκαρδιοκυττάρων. Τα λυσοσώματα, τα οποία

φαίνεται να γειτνιάζουν με μιτοχόνδρια, ίσως υποδηλώνουν μιτοφαγική δράση (Εικόνα 3.33).



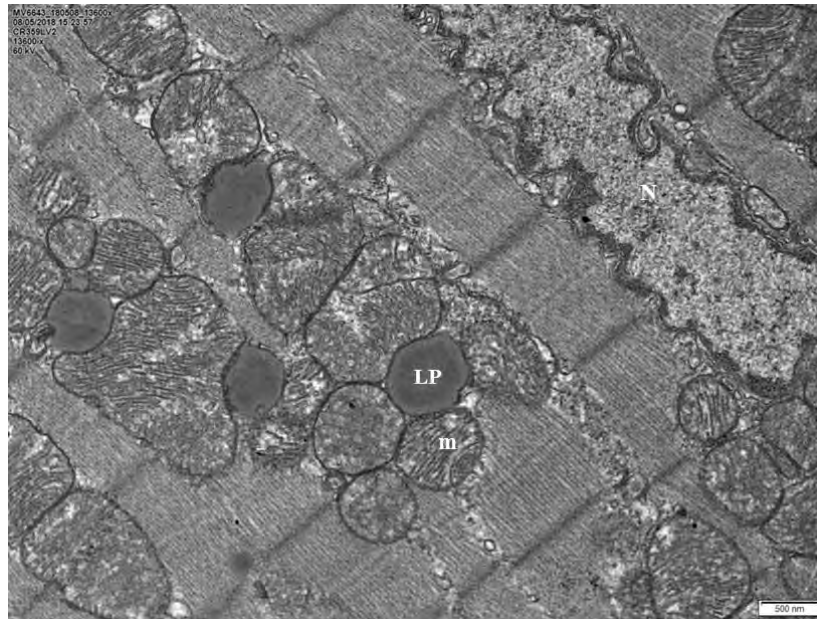
Εικόνα 3.32 Περιοχές με έντονη αποικοδομητική δράση που υποδηλώνεται από την πληθώρα ενδοκυτταρικών κυστιδίων και συσσωματωμάτων και τον εντοπισμό αυτοφαγοσωμάτων (AP), λυσοσωμάτων (Ly) και αυτολυσοσωμάτων (AL). Εντός του αυτολυσοσωμάτος στην εικόνα Β εντοπίζουμε μιτοχόνδρια (m) σε αποικοδόμηση. Χαρακτηριστικές εικόνες από τομές καρδιακών ιστών από διαγονιδιακά ποντίκια Des-/- TgS13F υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).



Εικόνα 3.33 Παρατηρείται σε σημεία έντονη λυσοσωματική δράση ειδικά πλησίον μιτοχονδρίων υποδηλώνοντας μιτοφαγική δράση στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F. Επιπλέον, τα βέλη υποδεικνύουν τον διατεταμένο διαμεμβρανικό πυρηνικό χώρο σε μεγέθυνση. Χαρακτηριστική εικόνα καρδιακών ιστών από διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).

3.28 Στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F εντοπίζονται λιποσταγονίδια πλησίον των μιτοχονδρίων

Ένα ενδιαφέρον εύρημα από την ανάλυση του καρδιακού ιστού υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι ο εντοπισμός λιποσταγονιδίων (lipid droplets) στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών Des-/-TgS13F, τα οποία μάλιστα φαίνεται να γειτνιάζουν στα μιτοχόνδρια, υποδηλώνοντας πιθανή συσχέτιση και μεταβολικές διαταραχές (Εικόνα 3.34).



Εικόνα 3.34 Εντοπισμός λιποσταγονιδίων (LP) πλησίον μιτοχονδρίων (m) σε τομές καρδιακών ιστών από διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F υπό ηλεκτρονική μικροσκοπία (n=3, ηλικίας 5-7 μηνών).

4. Συζήτηση

4.1 Η πρωτεολυτική διάσπαση της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης pS13F οδηγεί στην απώλεια των ινιδίων δεσμίνης από τους z-δίσκους και στον σχηματισμό συσσωματωμάτων δεσμίνης

Με αφορμή τη μελέτη της σημασίας της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία ενός ζωικού μοντέλου το οποίο θα εκφράζει τη δεσμίνη με τη σημειακή μετάλλαξη S13F, καθώς αυτή έχει βρεθεί σε ασθενείς με αρρυθμογενή μυοκαρδιοπάθεια [van Tintelen et al., 2009]. Πράγματι, τα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F φέρουν τα περισσότερα γνωρίσματα της αρρυθμογενούς μυοκαρδιοπάθειας με επακόλουθη καρδιακή ανεπάρκεια, όπως διάταση και εκτεταμένη ίνωση, αποπτωτικό μυοκαρδιοκυτταρικό θάνατο, μειωμένο κλάσμα εξώθησης και καρδιακή δυσλειτουργία, καθώς και ποικίλες δοκιμές ανωμαλίες, με εξαίρεση ίσως την απουσία αιφνίδιου θανάτου ύστερα από έντονη άσκηση (κολύμβηση), παρά τη μειωμένη απόδοση στο τεστ κοπώσεως. Βέβαια, να σημειωθεί ότι, για την ανάπτυξη και μελέτη του φαινοτύπου στα διαγονιδιακά ζώα ήταν απαραίτητη η ύπαρξη και των δυο αλληλόμορφων της μεταλλαγμένης δεσμίνης, σε αντίθεση με τον άνθρωπο που αρκεί η ύπαρξη της μεταλλαγής S13F σε ένα αλληλόμορφο του γονιδίου της δεσμίνης προκειμένου να νοσήσει.

Οι πρώτες παρατηρήσεις στα διαγονιδιακά ποντίκια που σχετίζονται με τον παθολογικό μηχανισμό ανάπτυξης της καρδιακής νόσου αφορούν την πρωτεολυτική διάσπαση της μεταλλαγμένης δεσμίνης S13F και μάλιστα στην περιοχή κεφαλή, την υποκυτταρική απουσία της από τους z-δίσκους και την κυτταροπλασματική συσσώρευση/ δημιουργία συσσωματωμάτων δεσμίνης. Η συσχέτιση πρωτεολυτικής διάσπασης της κεφαλής της δεσμίνης, οφειλόμενη σε διαταραχές φωσφορυλίωσης, με τον σχηματισμό συσσωματωμάτων έχει παρατηρηθεί και σε άλλα μοντέλα και ασθενείς καρδιακής ανεπάρκειας [Agnetti et al., 2014; Rainer et al., 2018]. Ενώ ο συσχετισμός της διάσπασης της κεφαλής της δεσμίνης με την απουσία της από τους z-δίσκους, έχει παρατηρηθεί επίσης στη μελέτη της μετάλλαξης I451M στην περιοχή ουρά της δεσμίνης [Mavroidis et al., 2008]. Γενικά, η πρωτεολυτική τροποποίηση της δεσμίνης και η δημιουργία συσσωματωμάτων με σχετική διαταραχή των επιπέδων φωσφορυλίωσης έχει βρεθεί ακόμη στο επαγόμενο από τον TNF- α μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας [Panagopoulou et al., 2008] και στο μοντέλο Lmna^{H222P/H222P} μυοκαρδιοπάθειας [Galata et al., 2018]. Σημαντικό ρόλο, λοιπόν, στην πρωτεολυτική διάσπαση της κεφαλής της δεσμίνης και τον επακόλουθο σχηματισμό συσσωματωμάτων, φαίνεται να παίζουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της δεσμίνης είτε είναι αυξημένα [Panagopoulou et al., 2008; Galata et al., 2018], είτε είναι μειωμένα [Agnetti et al., 2014; Rainer et al., 2018], όπως περιγράφονται εκτενώς στην Εισαγωγή. Άλλωστε, τα φυσιολογικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της δεσμίνης φαίνεται να ελέγχουν τη δυναμική της συναρμολόγησης/ αποσυναρμολόγησης του δικτύου ινιδίων δεσμίνης και ίσως επηρεάζουν και τις αλληλεπιδράσεις της δεσμίνης με άλλες πρωτεΐνες [Winter et al., 2014]. Συγκεκριμένα, η σερίνη στη θέση 13 της δεσμίνης αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης της PKC [Winter et al., 2014], οπότε η

μεταλλαγή σε φαινυλαλανίνη μεταβάλλει το πρότυπο φωσφορυλίωσης της δεσμίνης και επομένως μπορεί να οδηγεί στα φαινόμενα της πρωτεολυτικής διάσπασης της περιοχής κεφαλή και τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Πράγματι, σύμφωνα με *in vitro* αποτελέσματα η μεταλλαγή S13F στη δεσμίνη οδήγησε σε αυξημένη αυτοσύνδεση των περιοχών κεφαλή με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανώριμων πολυμερών, διαταραγμένο δίκτυο IFs και τη δημιουργία συσσωματωμάτων [Zhou et al., 2021]. Επιπρόσθετα, φαινόμενα σχηματισμού συσσωματωμάτων εμφανίζουν και οι ασθενείς με τη μεταλλαγή S13F στη δεσμίνη [van Tintelen et al., 2009].

4.2 Οι διαταραχές του κυτταροσκελετικού δικτύου των ινιδίων δεσμίνης με την επακόλουθη αποδιοργάνωση βασικών μεμβρανικών δομών του μυοκαρδιοκυττάρου ως μηχανισμός που συμβάλλει στην εξέλιξη της $\text{desmin}^{\text{S13F}}$ αρρυθμογενούς μυοκαρδιοπάθειας επιδρώντας στη σύσπαση της καρδιάς

Από την άλλη, η μεταλλαγή S13F συμβαίνει σε ένα εξαιρετικά συντηρημένο μοτίβο στην περιοχή κεφαλή που είναι ουσιώδους σημασίας για τη συγκρότηση των τελικά σχηματιζόμενων ινιδίων δεσμίνης ήδη από τα αρχικά στάδια του πολυμερισμού των ινιδίων [Sharma et al., 2009]. Η μεταλλαγή της σερίνης, ενός μικρού πολικού αμινοξέος, σε φαινυλαλανίνη που είναι μεγάλο, μη πολικό, με αρωματικό δακτύλιο αμινοξύ, πιθανώς να αλλάζει τη στερεοδιάταξη του μορίου της δεσμίνης, με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνθεσης των ώριμων ινιδίων δεσμίνης και πιθανής συσώρευσης των ολιγομερών δεσμίνης με μη φυσιολογική διαμόρφωση (misfolded proteins).

Ανεξαρτήτως υπαιτιότητας της πρωτεολυτικής διάσπασης και του σχηματισμού συσσωματωμάτων, η δεσμίνη pS13F φαίνεται να χάνει τον φυσιολογικό εντοπισμό της στους Z-δίσκους και ανιχνεύεται μόνο στους εμβόλιμους δίσκους, γεγονός που υποδηλώνει έναν διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης της δεσμίνης σε αυτά τα υποκυτταρικά σημεία. Η διαταραχή στο δίκτυο της δεσμίνης, όπως ήταν αναμενόμενο, επιφέρει ποικίλες μεταβολές και διαταραχές σε όλες τις δομές με τις οποίες συσχετίζεται. Ακόμα και η δομή των εμβόλιμων δίσκων, στους οποίους εντοπίζεται, εμφανίζεται διαταραγμένη και πεπλατυσμένη, χαρακτηριστικό της ACM, επηρεάζοντας τη δεσμοπλακίνη που είναι και η άμεση διασύνδεση της δεσμίνης στους IDs. Είναι γνωστό ότι η δεσμίνη αλληλεπιδρά άμεσα, μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου, με τη δεσμοπλακίνη, η οποία είναι βασική πρωτεΐνη της ενδοκυτταρικής πλευράς των δεσμοσωμάτων [Meng et al., 1997; Lapouge et al., 2006]. Επομένως, δεν χάνεται η διασύνδεσή τους από τη μεταλλαγή S13F και την πρωτεολυτική διάσπαση της κεφαλής της δεσμίνης, αλλά ίσως λόγω της σύνδεσής τους να συνεντοπίζονται σε συσσωματώματα κυτταροπλασματικά, επηρεάζοντας έτσι τη δόμηση των δεσμοσωμάτων και των IDs. Η σωστή οργάνωση των εμβόλιμων δίσκων είναι σημαντική τόσο για την καρδιακή ανάπτυξη όσο και στην

παθοφυσιολογία μυοκαρδιοπαθειών (υπερτροφική ή διατατική), καθώς συμβάλλουν στη συντονισμένη μηχανική και ηλεκτρική σύζευξη μέσω της διακυτταρικής επικοινωνίας [Manring et al., 2018].

Πράγματι, η ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε ότι στα διαγονιδιακά ποντίκια οι εμβόλιμοι δίσκοι παρουσιάζουν αλλαγές στην οργάνωσή τους, όπως περισσότερες αναδιπλώσεις και μεταβολές στη σύστασή τους, ίσως σε μια προσπάθεια των μυοκαρδιοκυττάρων να διατηρήσουν τη συνδεσιμότητά τους. Επομένως, η δεσμίνη παίζει ρόλο σταθερότητας των δομών των εμβόλιμων δίσκων και όχι σύνθεσης, πλήττοντας όμως έτσι τη συνολική αρχιτεκτονική τους. Διαταραχές στους εμβόλιμους δίσκους παρουσιάζουν επίσης και άλλα μοντέλα μυοκαρδιοπάθειας [Panagoulou et al., 2008; Galata et al., 2018].

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε επίσης ότι η απουσία της δεσμίνης από τους z-δίσκους μεταβάλλει δραστικά τη δομή των σαρκομερών, καθώς η ζώνη I στα διαγονιδιακά ποντίκια δεν είναι διακριτή, επηρεάζοντας πιθανώς τα ινίδια ακτίνης και τιτίνης. Σε συνάφεια, η απώλεια της δεσμίνης από τους z-δίσκους, λόγω της μεταλλαγής E245D, οδήγησε επίσης σε διαταραχή της αρχιτεκτονικής των ινιδίων ακτίνης [Conover et al., 2009]. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στη συσχέτιση της δεσμίνης με τις πρωτεΐνες σταθεροποίησης των ινιδίων ακτίνης στα σαρκομερή, *nebulin* [Conover and Gregorio, 2011] και *nebulin* [Hernandez et al., 2016]. Επιπλέον, στη μυϊκή ατροφία ο αποπολυμερισμός των ινιδίων δεσμίνης φαίνεται να αποσταθεροποιεί τις δομές της συσταλτής συσκευής των σαρκομερών στο επίπεδο των z-δίσκων, επιδρώντας άμεσα στις σχετιζόμενες πρωτεΐνες, όπως είναι τα ινίδια ακτίνης, οδηγώντας τελικά στην κατάρρευση των μυοϊνιδίων [Volodin et al., 2017]. Η διαταραχή των σαρκομερών στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/TgS13F φαίνεται να οδηγεί σε περαιτέρω δομική διατάραξη στο επίπεδο των μυοϊνιδίων, καθώς τα μυοϊνίδια δεν εμφανίζουν τη χαρακτηριστική ευθυγραμμισμένη τους διαμόρφωση και παρεμβάλλονται από άτακτες μάζες μιτοχονδρίων. Η συγκροτημένη δομή των σαρκομερών και των μυοϊνιδίων είναι απαραίτητη για τη συντονισμένη σύσπαση του καρδιακού μυ.

Μια άλλη δομή που επηρεάζεται στα διαγονιδιακά ποντίκια και παίζει σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη σύσπαση του μυοκαρδίου, είναι οι συζευγμένες δομές των T-tubules και SR, που εντοπίζονται διογκωμένες και αποδιοργανωμένες στα μυοκαρδιοκύτταρα, σύμφωνα με την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η συνεργασία τασσοεξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου, όπως ο DHPR στην αναγνώριση της διαφοράς δυναμικού από την πλευρά των T-tubules, με τον RyR από την πλευρά του σαρκοπλασματικού δικτύου και την επακόλουθη ενδοκυτταρική απελευθέρωση ασβεστίου, είναι σημαντική για τη διαδικασία της διέγερσης-συστολής του μυοκαρδιοκυττάρου. Τα ινίδια ακτίνης φαίνεται να συμβάλλουν στην οργάνωση και διατήρηση της δομής και λειτουργίας των T-tubules [Hong and Shaw, 2017]. Επομένως, η ακεραιότητα των ινιδίων ακτίνης είναι εξίσου σημαντική και η οποία φαίνεται να διαταράσσεται από το δίκτυο της μεταλλαγμένης δεσμίνης p.S13F. Ταυτόχρονα, βέβαια, η δεσμίνη έχει βρεθεί ότι σχετίζεται άμεσα με το

σαρκοπλασματικό δίκτυο, καθώς έχει εντοπιστεί στις συνδέσεις μεταξύ του SR και των μιτοχονδρίων (MAMs), οι οποίες είναι βασικές δομές για πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες [Diokmetzidou et al., 2016]. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν την έμμεση συσχέτιση μεταξύ της RyR2a και της δεσμίνης μέσω της μυοσπρίνης [Benson et al., 2017].

Τα κοσταμερή είναι δομές της σαρκοπλασματικής μεμβράνης που εντοπίζονται υπερκείμενα των z-δίσκων και αποτελούνται από ένα σύμπλεγμα κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, όπως η βινκουλίνη, η ακτινίνη και η δεσμίνη, και σηματοδοτικών κινασών [Samarel, 2005]. Μέσω των κοσταμερών η δεσμίνη συνδέει την ενδοκυτταρική συσταλτή συσκευή με την εξωκυττάρια ουσία (ECM) και διάφορα σηματοδοτικά μόρια, συμβάλλοντας στην ανίχνευση της μηχανικής τάσης και της μεταγωγής σήματος [Tsikitis et al., 2018]. Στα διαγονιδιακά ποντίκια το πρότυπο κατανομής της βινκουλίνης δεν αποδίδει ξεκάθαρη εικόνα, ειδικά στη σαρκοπλασματική μεμβράνη στο επίπεδο των κοσταμερών και των z-δίσκων (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Ίσως και σε αυτή την περίπτωση να επηρεάζεται η ακεραιότητα των δομών των κοσταμερών με τις ανάλογες συνέπειες. Το δίκτυο της βινκουλίνης συμβάλλει με τη σειρά του στη σταθερότητα των σαρκοπλασματικών δομών και συνδέεται με τα ινίδια ακτίνης, συμμετέχοντας έτσι σε ποικίλες σχετικές διεργασίες, όπως το σχήμα του κυττάρου, τη μεταγωγή τάσης-σήματος, αλλά και την κυτταροσκελετική αναδόμηση [Kaushik et al., 2015]. Βέβαια, να σημειωθεί ότι, το πρότυπο κατανομής της ακτινίνης, που αποτελεί επίσης βασικό συστατικό των z-δίσκων, δεν φαίνεται να επηρεάζεται στα διαγονιδιακά ποντίκια.

Επιπρόσθετα, οι χασματοσύνδεσμοι που αποτελούν δομές των εμβόλιμων δίσκων δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το διαταραγμένο δίκτυο δεσμίνης στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F. Μέσω της κοννεξίνης43, τόσο η κατανομή όσο και η λειτουργία των χασματοσυνδέσμων φαίνεται να εξαρτάται από τη μηχανική σταθερότητα των IDs, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της ακεραιότητας των δεσμοσωμάτων ή/ και των συνδέσμων προσκόλλησης [Oxford et al., 2007; Gard et al., 2005]. Οι χασματοσύνδεσμοι φαίνεται να εξαρτώνται περισσότερο από το δίκτυο των μικροσωληνίσκων. Από την άλλη, βέβαια, κατά την καρδιακή ανεπάρκεια ο αριθμός των χασματοσυνδέσμων μειώνεται, ενώ μερίδα αυτών πιθανόν αναδομούνται και εγκλωβίζονται στο εσωτερικό των εμβόλιμων δίσκων, ή συμμετέχουν στο σχηματισμό κυστιδίων, χάνοντας όμως έτσι τη λειτουργικότητά τους, που είναι κυρίως η μετάδοση ηλεκτρικών και χημικών ερεθισμάτων μεταξύ των μυοκαρδιοκυττάρων [Pinali et al., 2015].

Τέλος, τα ενδιάμεσα ινίδια λόγω της ιδιαίτερης δομής τους είναι πιο εύκαμπτα, επεκτάσιμα και ανθεκτικά σε σχέση με άλλα κυτταροσκελετικά δίκτυα, όπως τα μικροϊνίδια και οι μικροσωληνίσκοι [Kreplak and Fudge, 2007]. Σε μεγάλες κυτταρικές παραμορφώσεις, όπου οι δύσκαμπτες δομές των μικροϊνιδίων και των μικροσωληνίσκων σπάνε, τα ενδιάμεσα ινίδια παραμένουν ελαστικά και ανθεκτικά και συγκρατούν τη συνολική δομή του κυττάρου. Επομένως, η απώλεια του κυτταροσκελετικού δικτύου των ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης στην περίπτωση της

p.S13F, εξαιτίας της πρωτεολυτικής διάσπασης της περιοχής κεφαλή, μπορεί να επιφέρει επιπλέον σοβαρές δομικές μεταβολές, λόγω των αυξανόμενων επιπτώσεων της συνεχούς μηχανικής τάσης από τη σύσπαση του μυοκαρδίου. Άλλωστε, η σωστή καρδιακή λειτουργία απαιτεί τη συγχρονισμένη μηχανική και ηλεκτρική σύζευξη των μυοκαρδιοκυττάρων που εξαρτάται από την ακεραιότητα μιας πλειάδας πρωτεϊνικών συμπλόκων και δομών που με τη σειρά τους σχετίζονται μεταξύ τους.

4.3 Η περιοχή κεφαλή της δεσμίνης είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις με τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52 και τη λυσοσωματική πρωτεΐνη saposinD και η δεσμίνη pS13F οδηγεί σε μιτοχονδριακές και λυσοσωματικές ανωμαλίες στο μυοκάρδιο πλήττοντας σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες

Το διαταραγμένο δίκτυο της μεταλλαγμένης δεσμίνης S13F φαίνεται να επιφέρει ποικίλες μιτοχονδριακές ανωμαλίες, όπως μη φυσιολογικό σχήμα, μέγεθος και υποκυτταρική κατανομή, σύμφωνα με την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Ακόμη παρατηρείται μιτοφαγία με την εκφύλιση των μιτοχονδρίων υπό την καταστροφή των μιτοχονδριακών πτυχώσεων, κατακερματισμός και μη φυσιολογική συσσώρευση μιτοχονδρίων σε περιοχές με εκτενή σχηματισμό ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων. Παρόμοιες μιτοχονδριακές ανωμαλίες παρατηρούνται και σε άλλα μοντέλα μυοκαρδιοπάθειας που απουσιάζει ή διαταράσσεται το δίκτυο δεσμίνης [Capetanaki et al., 2015; Tsikitis et al., 2018]. Οι μιτοχονδριακές διαταραχές συνήθως ακολουθούνται από κυτταρικό θάνατο, φλεγμονή, ίνωση, ασβεστίωση και οδηγούν σε εκτεταμένο μυοκαρδιακό εκφυλισμό, διατατική μυοκαρδιοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια [Tsikitis et al., 2018]. Επιπλέον, η παρουσία της δεσμίνης παίζει ρόλο στη δομή των cristae των μιτοχονδρίων, την αναπνευστική λειτουργία, τη διαπερατότητα του μιτοχονδριακού πόρου (mPTP), την ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες και στο κατάλληλο μιτοχονδριακό δυναμικό ($\Delta\psi$ m) [Diokmetzidou et al., 2016].

Επίσης, όπως έχει αναφερθεί, η δεσμίνη εντοπίζεται στις συνδέσεις μεταξύ του SR και των μιτοχονδρίων και φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες VDAC, Sam50, OPA1, β υπομονάδα της ATP συνθάσης, καθώς και με συστατικά του συμπλέγματος MICOS [Diokmetzidou et al., 2016]. Σε αυτές προστίθενται η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη NDUF52, συστατικό του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας, αλλά και η λυσοσωματική πρωτεΐνη saposinD υποπροϊόν της prosaposin, οι οποίες μάλιστα αλληλεπιδρούν με την περιοχή κεφαλή της δεσμίνης. Μάλιστα, στα διαγονιδιακά ποντίκια φαίνεται να διαταράσσεται και η υποκυτταρική κατανομή της NDUF52. Οπότε, σε συμφωνία και με τις προαναφερθείσες μελέτες, η εν λόγω μελέτη υποστηρίζει ότι το εκτεταμένο κυτταροσκελετικό δίκτυο της δεσμίνης μέσω της περιοχής κεφαλή φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή μεταφορά και κυτταρική διανομή των

σχετιζόμενων πρωτεϊνών στα αντίστοιχα οργανίδια. Επίσης, η δεσμίνη μέσω του αμινοτελικού της άκρου αλληλεπιδρά με τη μυοσπρίνη, ρυθμίζοντας πιθανώς άμεσα ή έμμεσα τη διακίνηση κυστιδίων (ρυθμίζοντας μονοπάτια που αφορούν ενδοσώματα/ λυσοσώματα), τη βιογένεση και τη σωστή κατανομή των λυσοσωμάτων μέσα στο μυοκαρδιοκύτταρο [Kouloumenta et al., 2007]. Πράγματι, από την ηλεκτρονική μικροσκοπία παρατηρείται διάχυτος υποκυτταρικός εντοπισμός λυσοσωμάτων και σε περιπτώσεις σε άμεση γειτνίαση με μιτοχόνδρια, υποδεικνύοντας μιτοφαγική δράση. Γεγονός που συνάδει με την αυξημένη έκφραση της λυσοσωματικής πρωτεΐνης saposinD. Η λυσοσωματική δυσλειτουργία έχει περιγραφεί επίσης σε πληθώρα καρδιαγγειακών ασθενειών [Wang and Robbins, 2006; Chi et al., 2020]. Οι λυσοσωματικές διαταραχές ίσως επηρεάζουν τη διαδικασία σύντηξης αυτοφαγοσώματος/ λυσοσώματος, όπως συμβαίνει στη σπάνια νόσο Danon. Επιπλέον, ανιχνεύονται οι σχετιζόμενες με την αυτοφαγία πρωτεΐνες LC3 και p62 στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών Des-/-TgS13F ύστερα από διπλή ανοσοσήμανση σε τομές κρυοτόμου. Βέβαια, δεν παρατηρείται συνεντοπισμός των πρωτεϊνών με τη μεταλλαγμένη δεσμίνη pS13F, γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι η ελλειμματική μορφή της δεσμίνης συσσωρεύεται κυτταροπλασματικά και δεν αποικοδομείται. Σε συνάφεια με τις πρωτεΐνες της αυτοφαγίας, εντοπίζονται και αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στα διαγονιδιακά ζώα, σύμφωνα με τη μέθοδο TUNEL. Ενώ, αντίθετα ίσως σε μια προσπάθεια του μυοκαρδιοκυττάρου να ανταπεξέλθει παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι ο εντοπισμός λιποσταγονιδίων στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/-TgS13F, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει μεταβολικές διαταραχές. Τα λιποσταγονίδια είναι οργανίδια τα οποία σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) για τη βιογένεσή του και χρησιμεύουν στην αποθήκευση λιπιδίων (τριγλυκερίδια και χοληστερυλεστέρες). Επίσης, σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια στη ρύθμιση του λιπιδιακού μεταβολισμού και την παραγωγή ενέργειας, καθώς και με τα λυσοσώματα και αυτοφαγοσώματα κατά τη λιπόλυση [Goldberg et al., 2018]. Η βιογένεση των λιποσταγονιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες υποστηρίζει την καρδιακή λειτουργία, διατηρώντας την ομοιότητα των λιπιδίων, αλλά η συσσωρευση και η διόγκωση τους μπορεί να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη και εξέλιξη της καρδιακής νόσου. Τα λιποσταγονίδια στα διαγονιδιακά ποντίκια εντοπίζονται πλησίον των μιτοχονδρίων, υποδηλώνοντας ίσως τις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις της πάσχουσας καρδιάς λόγω των δομικών διαταραχών, αλλά και πιθανή διαταραχή της λιπιδιακής ομοιόστασης και οξειδωτικό στρες. [Huang et al., 2021; Dalt et al., 2023]

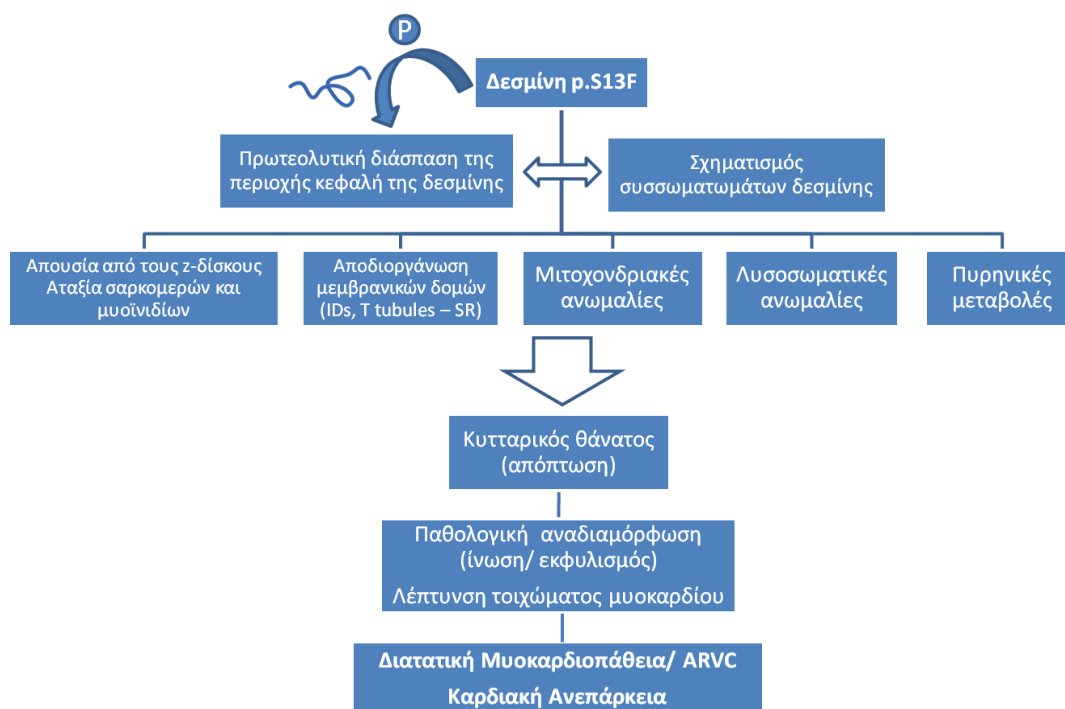
4.4 Οι διαταραχές του κυτταροσκελετικού δικτύου ινιδίων δεσμίνης πλήττουν τον πυρήνα

Επιπλέον, η ηλεκτρονική μικροσκοπία στα διαγονιδιακά ποντίκια Des-/- TgS13F υποδεικνύει ότι πλήττεται εκτενώς η πυρηνική μεμβράνη των μυοκαρδιοκυττάρων. Συγκεκριμένα, το σχήμα του πυρήνα χάνει τη σφαιρικότητά του και εμφανίζει αναδιπλώσεις και εγκοιλώσεις. Επίσης, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης των πυρηνικών ενδιάμεσων ινιδίων λαμίνης A/C. Όπως έχει αναφερθεί η δεσμίνη συνδέεται στον πυρήνα είτε μέσω συμπλεγμάτων σύνδεσης LINC είτε μέσω των πυρηνικών πόρων. Η σωστή σύζευξη μεταξύ των πυρηνικών και των κυτταροπλασματικών κυτταροσκελετικών συστημάτων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής ολόκληρου του κυττάρου, ενώ οποιαδήποτε αλλαγή στο LINC σύμπλεγμα μπορεί να επηρεάσει διάφορες πυρηνικές λειτουργίες, καθώς η στενή σχέση μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης και λαμίνης φαίνεται να επιστεγάζει την ολοκλήρωση της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας, μεταφέροντας τα ερεθίσματα από το ECM προς τον πυρήνα [Capetanaki et al., 2015]. Μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η απώλεια της δεσμίνης οδηγεί σε συρρίκνωση και αναδίπλωση των πυρήνων των μυοκαρδιοκυττάρων με τη συνεπακόλουθη επίπτωση στη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου [Heffler et al., 2020]. Το φαινόμενο φαίνεται να καθοδηγείται από τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, υποδεικνύοντας τη συσχέτιση δεσμίνης και μικροσωληνίσκων στην πυρηνική δομή. Αυτή η πυρηνική περιέλιξη προκαλεί βλάβες στο DNA, επιδρώντας περαιτέρω στην καρδιακή δυσλειτουργία [Heffler et al., 2020].

4.5 Η προστασία της δεσμίνης από την πρωτεολυτική διάσπαση ως θεραπευτικός στόχος

Το γεγονός ότι η πρωταρχική πρωτεολυτική διάσπαση της περιοχής κεφαλή της δεσμίνης εξαιτίας της μεταλλαγής S13F, οδηγεί σε διαταραχές στην υποκυτταρική κατανομή του εκτεταμένου κυτταροσκελετικού δικτύου των ινιδίων δεσμίνης και στον σχηματισμό συσσωματωμάτων δεσμίνης με τις επακόλουθες δομικές και λειτουργικές μεταβολές, υποδεικνύουν τη σημασία της περιοχής κεφαλή στη δομή, τη συγκρότηση και τη λειτουργία της δεσμίνης και των σχετιζόμενων πρωτεϊνών/δομών. Η προστασία, λοιπόν, της δεσμίνης από την πρωτεολυτική διάσπαση θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο σε αυτή, αλλά και σε παρόμοιες περιπτώσεις. Πράγματι, στην περίπτωση της προστατευτικής μεταλλαγής D263E από την πρωτεολυτική διάσπαση της δεσμίνης στο επαγόμενο από τον TNF- α μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας, η καρδιακή λειτουργία βελτιώθηκε αισθητά [Kouloumenta et al., 2007]. Παρομοίως, η αναστολή της λειτουργίας της GSK3 β , εμπόδισε τη φωσφορυλίωση της περιοχής κεφαλή και τον αποπολυμερισμό της δεσμίνης και απέκλεισε την μυϊκή ατροφία ύστερα από νηστεία ή απονεύρωση στα υπό μελέτη

ποντίκια [Aweida et al., 2018]. Οι GSK3s αποτελούν θεραπευτικό στόχο στις μυοκαρδιακές ασθένειες μέσω των πολλαπλών ρόλων τους [Lal et al., 2015]. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια ότι το πρότυπο φωσφορυλίωσης της δεσμίνης διαφέρει στον σκελετικό μυ, όπου η τριπλά φωσφορυλιωμένη δεσμίνη είναι επιβλαβής, από τον καρδιακό μυ, όπου η μονοφωσφορυλιωμένη δεσμίνη έχει τοξική δράση. Έτσι στην καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρείται απενεργοποίηση της δράσης της GSK3β και συσσώρευση της μονοφωσφορυλιωμένης και διασπασμένης στην περιοχή κεφαλή δεσμίνης [Agnetti et al., 2014; Rainer et al., 2018]. Η διαφορετική επίδραση μπορεί να οφείλεται πρωταρχικά στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που μελετήθηκαν, αλλά και στο γεγονός ότι στη μυϊκή ατροφία ακολουθείται αντίθετο μονοπάτι σηματοδότησης από την καρδιακή υπερτροφία [Singh et al., 2020]. Επίσης, η ίδια ερευνητική ομάδα υποστηρίζει ότι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων δεσμίνης σε έναν οξύ τραυματισμό, όπως στην ισχαιμία, μπορεί να έχει προστατευτική δράση, ενώ η παρατεταμένη ή υπερβολική συσσώρευση συσσωματωμάτων δεσμίνης είναι αυτή που μπορεί να βλάψει την πρωτεόσταση (proteostasis) και να συντελέσει στην ανάπτυξη της καρδιακής νόσου [Singh et al., 2020]. Επομένως, απαιτούνται λεπτοί χειρισμοί και περαιτέρω διερεύνηση των διαδικασιών που οδηγούν στα παθολογικά φαινόμενα.



Εικόνα 4.1 Μοντέλο επίδρασης της μεταλλαγμένης δεσμίνης S13F στα μυοκαρδιοκύτταρα των διαγονιδιακών ποντικών Des-/-TgS13F στην εξέλιξη της καρδιακής νόσου.

5. Βιβλιογραφία

- Agnetti G, Halperin VL, Kirk JA, Chakir K, Guo Y, Lund L, Nicolini F, Gherli T, Guarnieri C, Caldarera CM, Tomaselli GF, Kass DA, Van Eyk JE. 2014. Desmin modifications associate with amyloid-like oligomers deposition in heart failure. *Cardiovasc Res* 102: 24–34.
- Agnetti G, Herrmann H, Cohen S. 2022. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis. *The FEBS Journal* 289: 2755–2770.
- Ahmed RE, Tokuyama T, Anzai T, Chanthra N, Uosaki H. 2022. Sarcomere maturation: function acquisition, molecular mechanism, and interplay with other organelles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 377: 20210325.
- Ahn J, Lee J, Jeong S, Kang S, Park B-J, Ha N-C. 2021. Beta-strand-mediated dimeric formation of the Ig-like domains of human lamin A/C and B1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 550: 191–196.
- Aki T, Noritake K, Unuma K, Uemura K. 2018. Autophagic Regulation of Cardiomyocyte Survival and Heart Regeneration. In: Turksen K, editor. *Autophagy in Health and Disease: Potential Therapeutic Approaches Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Cham: Springer International Publishing, p 101–118.
- Anastasi G, Cutroneo G, Gaeta R, Di Mauro D, Arco A, Consolo A, Santoro G, Trimarchi F, Favaloro A. 2009. Dystrophin-glycoprotein complex and vinculin-talin-integrin system in human adult cardiac muscle. *Int J Mol Med* 23: 149–159.
- Anseau E, Eidahl JO, Lancelot C, Tassin A, Matteotti C, Yip C, Liu J, Leroy B, Hubeau C, Gerbaux C, Cloet S, Wauters A, Zorbo S, Meyer P, Pirson I, Laoudj-Chenivresse D, Wattiez R, Harper SQ, Belayew A, Coppée F. 2016. Homologous Transcription Factors DUX4 and DUX4c Associate with Cytoplasmic Proteins during Muscle Differentiation. *PLoS One* 11: e0146893.
- Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, Pellegrini C, Grasso M, Previtali S, Repetto A, Bellini O, Azan G, Scaffino M, Campana C, Piccolo G, Viganò M, Tavazzi L. 2006. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur J Heart Fail* 8: 477–483.
- Ausmees N, Kuhn JR, Jacobs-Wagner C. 2003. The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* 115: 705–713.
- Aweida D, Rudesky I, Volodin A, Shimko E, Cohen S. 2018. GSK3- β promotes calpain-1-mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy. *Journal of Cell Biology* 217: 3698–3714.
- Aziz A, Hess JF, Budamagunta MS, FitzGerald PG, Voss JC. 2009. Head and Rod 1 Interactions in Vimentin*. *Journal of Biological Chemistry* 284: 7330–7338.
- Aziz A, Hess JF, Budamagunta MS, Voss JC, FitzGerald PG. 2010. Site-directed Spin Labeling and Electron Paramagnetic Resonance Determination of Vimentin Head Domain Structure*. *Journal of Biological Chemistry* 285: 15278–15285.
- Bang M-L, Chen J. 2015. Roles of Nebulin Family Members in the Heart. *Circ J* 79: 2081–2087.

- Benson MA, Tinsley CL, Blake DJ. 2004. Myospryn Is a Novel Binding Partner for Dysbindin in Muscle *. *Journal of Biological Chemistry* 279: 10450–10458.
- Benson MA, Tinsley CL, Waite AJ, Carlisle FA, Sweet SMM, Ehler E, George CH, Lai FA, Martin-Rendon E, Blake DJ. 2017. Ryanodine receptors are part of the myospryn complex in cardiac muscle. *Sci Rep* 7: 6312.
- Bergman JEH, Veenstra-Knol HE, van Essen AJ, van Ravenswaaij CMA, den Dunnen WFA, van den Wijngaard A, van Tintelen JP. 2007. Two related Dutch families with a clinically variable presentation of cardioskeletal myopathy caused by a novel S13F mutation in the desmin gene. *Eur J Med Genet* 50: 355–366.
- Beuttenmüller M, Chen M, Janetzko A, Kühn S, Traub P. 1994. Structural elements of the amino-terminal head domain of vimentin essential for intermediate filament formation in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 213: 128–142.
- Bhosle RC, Michele DE, Campbell KP, Li Z, Robson RM. 2006. Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346: 768–777.
- Bott CJ, Winckler B. 2020. Intermediate filaments in developing neurons: Beyond structure. *Cytoskeleton (Hoboken)* 77: 110–128.
- Braunwald E. 2017. Cardiomyopathies: An Overview. *Circ Res* 121: 711–721.
- Brodehl A, Hedde PN, Dieding M, Fatima A, Walhorn V, Gayda S, Šarić T, Klauke B, Gummert J, Anselmetti D, Heilemann M, Nienhaus GU, Milting H. 2012. Dual Color Photoactivation Localization Microscopy of Cardiomyopathy-associated Desmin Mutants. *J Biol Chem* 287: 16047–16057.
- Capetanaki Y. 2000. Desmin Cytoskeleton in Healthy and Failing Heart. *Heart Fail Rev* 5: 203–220.
- Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. 2007. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Experimental Cell Research* 313: 2063–2076.
- Capetanaki Y, Milner DJ. 1998. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. *Subcell Biochem* 31: 463–495.
- Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. 2015. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol* 32: 113–120.
- Capetanaki YG, Ngai J, Lazarides E. 1984. Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6909–6913.
- Carlsson L, Thornell LE. 2001. Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol Scand* 171: 341–348.
- Caron A, Chapon F. 1999. Desmin phosphorylation abnormalities in cytoplasmic body and desmin-related myopathies. *Muscle Nerve* 22: 1122–1125.

- Cattin M-E, Muchir A, Bonne G. 2013. "State-of-the-heart" of cardiac laminopathies. *Curr Opin Cardiol* 28: 297–304.
- Chernoivanenko IS, Matveeva EA, Gelfand VI, Goldman RD, Minin AA. 2015. Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. *FASEB j.* 29: 820–827.
- Chernyatina AA, Nicolet S, Aebi U, Herrmann H, Strelkov SV. 2012. Atomic structure of the vimentin central α -helical domain and its implications for intermediate filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 13620–13625.
- Chi C, Riching AS, Song K. 2020. Lysosomal Abnormalities in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 811.
- Cho A, Kato M, Whitwam T, Kim JH, Montell DJ. 2016. An atypical Tropomyosin in *Drosophila* with intermediate filament-like properties. *Cell Rep* 16: 928–938.
- Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schröder R. 2013. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 125: 47–75.
- Cohen S, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL. 2012. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol* 198: 575–589.
- Conover GM, Gregorio CC. 2011. The desmin coil 1B mutation K190A impairs nebulin Z-disc assembly and destabilizes actin thin filaments. *J Cell Sci* 124: 3464–3476.
- Conover GM, Henderson SN, Gregorio CC. 2009. A myopathy-linked desmin mutation perturbs striated muscle actin filament architecture. *Mol Biol Cell* 20: 834–845.
- Conway JF, Parry DAD. 1988. Intermediate filament structure: 3. Analysis of sequence homologies. *International Journal of Biological Macromolecules* 10: 79–98.
- Coulombe PA, Ma L, Yamada S, Wawersik M. 2001. Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci* 114: 4345–4347.
- Crocini C, Gotthardt M. 2021. Cardiac sarcomere mechanics in health and disease. *Biophys Rev* 13: 637–652.
- Da Dalt L, Cabodevilla AG, Goldberg IJ, Norata GD. 2023. Cardiac lipid metabolism, mitochondrial function, and heart failure. *Cardiovascular Research* 119: 1905–1914.
- Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG. 2000. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N Engl J Med* 342: 770–780.
- Dayal AA, Medvedeva NV, Nekrasova TM, Duhalin SD, Surin AK, Minin AA. 2020. Desmin Interacts Directly with Mitochondria. *Int J Mol Sci* 21: 8122.
- Diokmetzidou A, Soumaka E, Kloukina I, Tsikitis M, Makridakis M, Varela A, Davos CH, Georgopoulos S, Anesti V, Vlahou A, Capetanaki Y. 2016. Desmin and α B-crystallin interplay in maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival. *Journal of Cell Science*: jcs.192203.

- Eibauer M, Weber MS, Kronenberg-Tenga R, Beales CT, Boujemaa-Paterski R, Turgay Y, Sivagurunathan S, Kraxner J, Köster S, Goldman RD, Medalia O. 2023. Vimentin filaments integrate low complexity domains in a highly complex helical structure. *Biochemistry*.
- Eibauer M, Weber MS, Turgay Y, Sivagurunathan S, Goldman RD, Medalia O. 2021. The molecular architecture of vimentin filaments. 2021.07.15.452584.
- Eid Mutlak Y, Aweida D, Volodin A, Ayalon B, Dahan N, Parnis A, Cohen S. 2020. A signaling hub of insulin receptor, dystrophin glycoprotein complex and plakoglobin regulates muscle size. *Nat Commun* 11: 1381.
- Ervasti JM. 2003. Costameres: the Achilles' Heel of Herculean Muscle *. *Journal of Biological Chemistry* 278: 13591–13594.
- Fountoulakis M, Soumaka E, Rapti K, Mavroidis M, Tsangaris G, Maris A, Weisleder N, Capetanaki Y. 2005. Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38: 461–474.
- Franke WW, Borrmann CM, Grund C, Pieperhoff S. 2006. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *European Journal of Cell Biology* 85: 69–82.
- Frauen R, Frank D, Frey N. 2015. Sarcomeric Signaling. In: Ehler E, editor. *Cardiac Cytoarchitecture: How to Maintain a Working Heart*. Cham: Springer International Publishing, p 141–160.
- Galata Z, Kloukina I, Kostavasili I, Varela A, Davos CH, Makridakis M, Bonne G, Capetanaki Y. 2018. Amelioration of desmin network defects by α B-crystallin overexpression confers cardioprotection in a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by LMNA gene mutation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 125: 73–86.
- Gard JJ, Yamada K, Green KG, Eloff BC, Rosenbaum DS, Wang X, Robbins J, Schuessler RB, Yamada KA, Saffitz JE. 2005. Remodeling of gap junctions and slow conduction in a mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 67: 539–547.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493–501.
- Geisler N. 1982. Proteinchemical characterization of three structurally distinct domains along the protofilament unit of desmin 10 nm filaments. *Cell* 30: 277–286.
- Georgakopoulou S, Möller D, Sachs N, Herrmann H, Aebi U. 2009. Near-UV Circular Dichroism Reveals Structural Transitions of Vimentin Subunits during Intermediate Filament Assembly. *Journal of Molecular Biology* 386: 544–553.
- Georgatos SD, Blobel G. 1987. Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J Cell Biol* 105: 117–125.
- Georgatos SD, Weber K, Geisler N, Blobel G. 1987. Binding of two desmin derivatives to the plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes: evidence for a

- conserved site-specificity in intermediate filament-membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6780–6784.
- Goldberg IJ, Reue K, Abumrad NA, Bickel PE, Cohen S, Fisher EA, Galis ZS, Granneman JG, Lewandowski ED, Murphy R, Olive M, Schaffer JE, Schwartz-Longacre L, Shulman GI, Walther TC, Chen J. 2018. Deciphering the Role of Lipid Droplets in Cardiovascular Disease. *Circulation* 138: 305–315.
- Goldman RD, Chou YH, Prahlad V, Yoon M. 1999. Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J* 13 Suppl 2: S261-265.
- Gruenbaum Y, Foisner R. 2015. Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu Rev Biochem* 84: 131–164.
- Heffler J, Shah PP, Robison P, Phyo S, Veliz K, Uchida K, Bogush A, Rhoades J, Jain R, Prosser BL. 2020. A Balance Between Intermediate Filaments and Microtubules Maintains Nuclear Architecture in the Cardiomyocyte. *Circ Res* 126.
- Hernandez DA, Bennett CM, Dunina-Barkovskaya L, Wedig T, Capetanaki Y, Herrmann H, Conover GM. 2016. Nebulette is a powerful cytolinker organizing desmin and actin in mouse hearts. *Mol Biol Cell* 27: 3869–3882.
- Herrmann H, Aebi U. 1998. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8: 177–185.
- Herrmann H, Aebi U. 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12: 79–90.
- Herrmann H, Aebi U. 2004. Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 749–789.
- Herrmann H, Aebi U. 2016. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8: a018242.
- Herrmann H, Bär H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U. 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 562–573.
- Herrmann H, Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U. 1996. Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: The Role of its Head, Rod and Tail Domains. *Journal of Molecular Biology* 264: 933–953.
- Hesse M, Magin TM, Weber K. 2001. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *Journal of Cell Science* 114: 2569–2575.

- Hofner M, Höllrigl A, Puz S, Stary M, Weitzer G. 2007. Desmin stimulates differentiation of cardiomyocytes and up-regulation of brachyury and nkx2.5. *Differentiation* 75: 605–615.
- Höllrigl A, Hofner M, Stary M, Weitzer G. 2007. Differentiation of cardiomyocytes requires functional serine residues within the amino-terminal domain of desmin. *Differentiation* 75: 616–626.
- Hong T, Shaw RM. 2017. Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiological Reviews* 97: 227–252.
- Huang W, Gao F, Zhang Y, Chen T, Xu C. 2021. Lipid Droplet-Associated Proteins in Cardiomyopathy. *Annals of Nutrition and Metabolism* 78: 1–13.
- Hyder CL, Pallari H-M, Kochin V, Eriksson JE. 2008. Providing cellular signposts – Post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Letters* 582: 2140–2148.
- Izawa I, Inagaki M. 2006. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* 97: 167–174.
- Janué A, Odena MA, Oliveira E, Olivé M, Ferrer I. 2007. Desmin Is Oxidized and Nitrated in Affected Muscles in Myotilinopathies and Desminopathies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 66: 711–723.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583–589.
- Kaushik G, Spenlehauer A, Sessions AO, Trujillo AS, Fuhrmann A, Fu Z, Venkatraman V, Pohl D, Tuler J, Wang M, Lakatta EG, Ocorr K, Bodmer R, Bernstein SI, Van Eyk JE, Cammarato A, Engler AJ. 2015. Vinculin network-mediated cytoskeletal remodeling regulates contractile function in the aging heart. *Sci. Transl. Med.* 7.
- Kedia N, Arhzaouy K, Pittman SK, Sun Y, Batchelor M, Weihl CC, Bieschke J. 2019. Desmin forms toxic, seeding-competent amyloid aggregates that persist in muscle fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 16835–16840.
- Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeöld A, Fischer I, Paulin D, Schröder R, Wiche G. 2008. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *Journal of Cell Biology* 181: 667–681.
- Kouloumenta A, Mavroidis M, Capetanaki Y. 2007. Proper Perinuclear Localization of the TRIM-like Protein Myospryn Requires Its Binding Partner Desmin. *Journal of Biological Chemistry* 282: 35211–35221.
- Kreplak L, Aeby U, Herrmann H. 2004. Molecular mechanisms underlying the assembly of intermediate filaments. *Experimental Cell Research* 301: 77–83.

- Kreplak L, Fudge D. 2007. Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back. *BioEssays* 29: 26–35.
- Lal H, Ahmad F, Woodgett J, Force T. 2015. The GSK-3 Family as Therapeutic Target for Myocardial Diseases. *Circulation Research* 116: 138–149.
- Lapouge K, Fontao L, Champliand M-F, Jaunin F, Frias MA, Favre B, Paulin D, Green KJ, Borradori L. 2006. New insights into the molecular basis of desmoplakin and desmin-related cardiomyopathies. *Journal of Cell Science* 119: 4974–4985.
- Lazarides E, Hubbard BD. 1976. Immunological characterization of the subunit of the 100 Å filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 4344–4348.
- Li H, Choudhary S, Milner D, Munir M, Kuisk I, Capetanaki Y. 1994. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *Journal of Cell Biology* 124: 827–841.
- Li J, Radice GL. 2010. A New Perspective on Intercalated Disc Organization: Implications for Heart Disease. *Dermatology Research and Practice* 2010: e207835.
- 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. 2003. 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* 35: 84–89.
- Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell L-E, Babinet C, Paulin D. 1997. Desmin Is Essential for the Tensile Strength and Integrity of Myofibrils but Not for Myogenic Commitment, Differentiation, and Fusion of Skeletal Muscle. *Journal of Cell Biology* 139: 129–144.
- Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. 2016. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters* 21: 29.
- Lockard VG, Bloom S. 1993. Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 25: 303–309.
- Lodish HF ed. 2000. *Molecular cell biology*, 4th ed. New York: W.H. Freeman. 1084 p.
- Lois-Bermejo I, González-Jiménez P, Duarte S, Pajares MA, Pérez-Sala D. 2022. Vimentin Tail Segments Are Differentially Exposed at Distinct Cellular Locations and in Response to Stress. *Front. Cell Dev. Biol.* 10: 908263.
- Luk A, Ahn E, Soor GS, Butany J. 2009. Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol* 62: 219–225.
- Mahmoodzadeh S, Dworatzek E. 2019. The Role of 17 β -Estradiol and Estrogen Receptors in Regulation of Ca²⁺ Channels and Mitochondrial Function in Cardiomyocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 310.
- Manring HR, Dorn LE, Ex-Willey A, Accornero F, Ackermann MA. 2018. At the heart of inter- and intracellular signaling: the intercalated disc. *Biophys Rev* 10: 961–971.

- Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C, Grosgeat Y. 1982. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation* 65: 384–398.
- Martin TG, Kirk JA. 2020. Under construction: the dynamic assembly, maintenance, and degradation of the cardiac sarcomere. *J Mol Cell Cardiol* 148: 89–102.
- Mavroidis M, Davos CH, Psarras S, Varela A, C. Athanasiadis N, Katsimpoulas M, Kostavasili I, Maasch C, Vater A, Van Tintelen JP, Capetanaki Y. 2015. Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 110: 27.
- Mavroidis M, Panagopoulou P, Kostavasili I, Weisleder N, Capetanaki Y. 2008. A missense mutation in desmin tail domain linked to human dilated cardiomyopathy promotes cleavage of the head domain and abolishes its Z-disc localization. *FASEB j.* 22: 3318–3327.
- McDonagh TA, Komajda M, Maggioni AP, Zannad F, Gheorghiade M, Metra M, Dargie HJ. 2011. Clinical trials in acute heart failure: simpler solutions to complex problems. Consensus document arising from a European Society of Cardiology cardiovascular round-table think tank on acute heart failure, 12 May 2009. *Eur J Heart Fail* 13: 1253–1260.
- McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ. 2000. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 355: 2119–2124.
- McLendon PM, Robbins J. 2011. Desmin-related cardiomyopathy: an unfolding story. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1220–H1228.
- Mencarelli C, Ciolfi S, Caroti D, Lupetti P, Dallai R. 2011. Isomin: a novel cytoplasmic intermediate filament protein from an arthropod species. *BMC Biol* 9: 17.
- Meng J-J, Bornslaeger EA, Green KJ, Steinert PM, Ip W. 1997. Two-hybrid Analysis Reveals Fundamental Differences in Direct Interactions between Desmoplakin and Cell Type-specific Intermediate Filaments *. *Journal of Biological Chemistry* 272: 21495–21503.
- Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. 2000. Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function. *Journal of Cell Biology* 150: 1283–1298.
- Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y. 1996. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *Journal of Cell Biology* 134: 1255–1270.
- Mizuno Y, Thompson TG, Guyon JR, Lidov HG, Brosius M, Imamura M, Ozawa E, Watkins SC, Kunkel LM. 2001. Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6156–6161.
- Mücke N, Kämmerer L, Winheim S, Kirmse R, Krieger J, Mildenerberger M, Baßler J, Hurt E, Goldmann WH, Aebi U, Toth K, Langowski J, Herrmann H. 2018. Assembly Kinetics of Vimentin Tetramers to Unit-Length Filaments: A Stopped-Flow Study. *Biophysical Journal* 114: 2408–2418.

- Murray B. 2012. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy (ARVD/C): a review of molecular and clinical literature. *J Genet Couns* 21: 494–504.
- Nunes Vicente F, Lelek M, Tinevez J-Y, Tran QD, Pehau-Arnaudet G, Zimmer C, Etienne-Manneville S, Giannone G, Leduc C. 2022. Molecular organization and mechanics of single vimentin filaments revealed by super-resolution imaging. *Science Advances* 8: eabm2696.
- Omary MB. 2009. “IF-pathies”: a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest* 119: 1756–1762.
- Oxford EM, Everitt M, Coombs W, Fox PR, Kraus M, Gelzer ARM, Saffitz J, Taffet SM, Moïse NS, Delmar M. 2007. Molecular composition of the intercalated disc in a spontaneous canine animal model of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 4: 1196–1205.
- Panagopoulou P, Davos CH, Milner DJ, Varela E, Cameron J, Mann DL, Capetanaki Y. 2008. Desmin mediates TNF- α -induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *Journal of Cell Biology* 181: 761–775.
- Papathanasiou S, Rickelt S, Soriano ME, Schips TG, Maier HJ, Davos CH, Varela A, Kaklamanis L, Mann DL, Capetanaki Y. 2015. Tumor necrosis factor- α confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nat Med* 21: 1076–1084.
- Parry DA, Steinert PM. 1999. Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys* 32: 99–187.
- Paulin D, Li Z. 2004. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res* 301: 1–7.
- Pawelzyk P, Mücke N, Herrmann H, Willenbacher N. 2014. Attractive Interactions among Intermediate Filaments Determine Network Mechanics In Vitro. *PLOS ONE* 9: e93194.
- Pica EC, Kathirvel P, Pramono ZAD, Lai P-S, Yee W-C. 2008. Characterization of a novel S13F desmin mutation associated with desmin myopathy and heart block in a Chinese family. *Neuromuscular Disorders* 18: 178–182.
- Pinali C, Bennett HJ, Davenport JB, Caldwell JL, Starborg T, Trafford AW, Kitmitto A. 2015. Three-Dimensional Structure of the Intercalated Disc Reveals Plicate Domain and Gap Junction Remodeling in Heart Failure. *Biophys J* 108: 498–507.
- Premchandar A, Mücke N, Poznański J, Wedig T, Kaus-Drobek M, Herrmann H, Dadlez M. 2016. Structural Dynamics of the Vimentin Coiled-coil Contact Regions Involved in Filament Assembly as Revealed by Hydrogen-Deuterium Exchange. *Journal of Biological Chemistry* 291: 24931–24950.
- Rainer PP, Dong P, Sorge M, Fert-Bober J, Holewinski RJ, Wang Y, Foss CA, An SS, Baracca A, Solaini G, Glabe CG, Pomper MG, Van Eyk JE, Tomaselli GF, Paolocci N, Agnetti G. 2018. Desmin Phosphorylation Triggers Preamyloid Oligomers Formation and Myocyte Dysfunction in Acquired Heart Failure. *Circ Res* 122: e75–e83.

- Reipert S. 1999. Association of Mitochondria with Plectin and Desmin Intermediate Filaments in Striated Muscle. *Experimental Cell Research* 252: 479–491.
- Ren J, Tsilafakis K, Chen L, Lekkos K, Kostavasili I, Varela A, Cokkinos DV, Davos CH, Sun X, Song J, Mavroidis M. 2021. Crosstalk between coagulation and complement activation promotes cardiac dysfunction in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Theranostics* 11: 5939–5954.
- Samarel AM. 2005. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2291-2301.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Molecular cloning: a laboratory manual.
- Samson C, Petitalot A, Celli F, Herrada I, Ropars V, Le Du M-H, Nhiri N, Jacquet E, Arteni A-A, Buendia B, Zinn-Justin S. 2018. Structural analysis of the ternary complex between lamin A/C, BAF and emerin identifies an interface disrupted in autosomal recessive progeroid diseases. *Nucleic Acids Res* 46: 10460–10473.
- Sanbe A, Osinska H, Saffitz JE, Glabe CG, Kaye R, Maloyan A, Robbins J. 2004. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: A cardiac amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 10132–10136.
- Sanbe A, Osinska H, Villa C, Gulick J, Klevitsky R, Glabe CG, Kaye R, Robbins J. 2005. Reversal of amyloid-induced heart disease in desmin-related cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 13592–13597.
- Sanghvi-Shah R, Weber GF. 2017. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front Cell Dev Biol* 5: 81.
- Selcen D, Ohno K, Engel AG. 2004. Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* 127: 439–451.
- Sharma S, Mücke N, Katus HA, Herrmann H, Bär H. 2009. Disease mutations in the “head” domain of the extra-sarcomeric protein desmin distinctly alter its assembly and network-forming properties. *J Mol Med (Berl)* 87: 1207–1219.
- Sheikh F, Ross RS, Chen J. 2009. Cell-cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc Med* 19: 182–190.
- Shoeman RL, Hüttermann C, Hartig R, Traub P. 2001. Amino-terminal Polypeptides of Vimentin Are Responsible for the Changes in Nuclear Architecture Associated with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Activity in Tissue Culture Cells. *MBoC* 12: 143–154.
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. 2007. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Experimental Cell Research* 313: 2098–2109.
- Singh S, Kadioglu H, Patel K, Carrier L, Agnetti G. 2020. Is Desmin Propensity to Aggregate Part of its Protective Function? *Cells* 9: 491.

- Smolina N, Bruton J, Sjoberg G, Kostareva A, Sejersen T. 2014. Aggregate-prone desmin mutations impair mitochondrial calcium uptake in primary myotubes. *Cell Calcium* 56: 269–275.
- Snider NT, Ku N-O, Omary MB. 2018. The sweet side of vimentin. *eLife* 7: e35336.
- Snider NT, Omary MB. 2014. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 163–177.
- van Spaendonck-Zwarts KY, van Hessem L, Jongbloed JDH, de Walle HEK, Capetanaki Y, van der Kooi AJ, van Langen IM, van den Berg MP, van Tintelen JP. 2011. Desmin-related myopathy. *Clin Genet* 80: 354–366.
- Stevens TL, Wallace MJ, El Refaey M, Roberts JD, Koenig SN, Mohler PJ. 2020. Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Molecular Insights for Improved Therapeutic Design. *J Cardiovasc Dev Dis* 7: 21.
- Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25: 243–251.
- Stuurman N, Heins S, Aebi U. 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 122: 42–66.
- Takemura M, Gomi H, Colucci-Guyon E, Itohara S. 2002. Protective Role of Phosphorylation in Turnover of Glial Fibrillary Acidic Protein in Mice. *J Neurosci* 22: 6972–6979.
- Te Riele ASJM, Hauer RN. 2015. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: clinical challenges in a changing disease spectrum. *Trends Cardiovasc Med* 25: 191–198.
- van Tintelen JP, Van Gelder IC, Asimaki A, Suurmeijer AJH, Wiesfeld ACP, Jongbloed JDH, van den Wijngaard A, Kuks JBM, van Spaendonck-Zwarts KY, Notermans N, Boven L, van den Heuvel F, Veenstra-Knol HE, Saffitz JE, Hofstra RMW, van den Berg MP. 2009. Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene. *Heart Rhythm* 6: 1574–1583.
- Toivola DM, Tao G-Z, Habtezion A, Liao J, Omary MB. 2005. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in Cell Biology* 15: 608–617.
- Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. 1983. Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 96: 1727–1735.
- Towbin JA, Bowles NE. 2006. Dilated cardiomyopathy: a tale of cytoskeletal proteins and beyond. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17: 919–926.
- Tsikitis M, Galata Z, Mavroidis M, Psarras S, Capetanaki Y. 2018. Intermediate filaments in cardiomyopathy. *Biophys Rev* 10: 1007–1031.
- Tsilafakis K, Mavroidis M. 2024. Are the Head and Tail Domains of Intermediate Filaments Really Unstructured Regions? *Genes (Basel)* 15: 633.

- Tsoupri E, Capetanaki Y. 2013. Myospryn: a multifunctional desmin-associated protein. *Histochem Cell Biol* 140: 55–63.
- Tsoupri E, Kostavasili I, Kloukina I, Tsikitis M, Miliou D, Vasilaki E, Varela A, Nakos-Bimpos M, Davos C, Mavroidis M, Polissidis A, Capetanaki Y. 2021. Myospryn deficiency leads to impaired cardiac structure and function and schizophrenia-associated symptoms. *Cell Tissue Res* 385: 675–696.
- Usman S, Aldehlawi H, Nguyen TKN, Teh M-T, Waseem A. 2022. Impact of N-Terminal Tags on De Novo Vimentin Intermediate Filament Assembly. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 6349.
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S. 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50: D439–D444.
- Vermeire P-J, Lilina AV, Hashim HM, Dlabolová L, Fiala J, Beelen S, Kukačka Z, Harvey JN, Novák P, Strelkov SV. 2023. Molecular structure of soluble vimentin tetramers. *Sci Rep* 13: 8841.
- Vermeire P-J, Stalmans G, Lilina AV, Fiala J, Novak P, Herrmann H, Strelkov SV. 2021. Molecular Interactions Driving Intermediate Filament Assembly. *Cells* 10: 2457.
- Vite A, Radice GL. 2014. N-cadherin/catenin complex as a master regulator of intercalated disc function. *Cell Commun Adhes* 21: 169–179.
- Vlachakis D, Tsilafakis K, Kostavasili I, Kossida S, Mavroidis M. 2024. Unraveling Desmin's Head Domain Structure and Function. *Cells* 13: 603.
- Volodin A, Kosti I, Goldberg AL, Cohen S. 2017. Myofibril breakdown during atrophy is a delayed response requiring the transcription factor PAX4 and desmin depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E1375–E1384.
- Wang Q, Tolstonog GV, Shoeman R, Traub P. 2001. Sites of Nucleic Acid Binding in Type I–IV Intermediate Filament Subunit Proteins. *Biochemistry* 40: 10342–10349.
- Wang X, Robbins J. 2006. Heart failure and protein quality control. *Circ Res* 99: 1315–1328.
- Wang X, Robbins J. 2014. Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 71: 16–24.
- Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. 2011. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 364: 1643–1656.
- Weisleder N, Soumaka E, Abbasi S, Taegtmeier H, Capetanaki Y. 2004. Cardiomyocyte-specific desmin rescue of desmin null cardiomyopathy excludes vascular involvement. *J Mol Cell Cardiol* 36: 121–128.

- Weitzer G, Milner DJ, Kim JU, Bradley A, Capetanaki Y. 1995. Cytoskeletal Control of Myogenesis: A Desmin Null Mutation Blocks the Myogenic Pathway during Embryonic Stem Cell Differentiation. *Developmental Biology* 172: 422–439.
- Wiche G. 1998. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* 111 (Pt 17): 2477–2486.
- Winter DL, Paulin D, Mericskay M, Li Z. 2014. Posttranslational modifications of desmin and their implication in biological processes and pathologies. *Histochem Cell Biol* 141: 1–16.
- Winter L, Wittig I, Peeva V, Eggers B, Heidler J, Chevessier F, Kley RA, Barkovits K, Strecker V, Berwanger C, Herrmann H, Marcus K, Kornblum C, Kunz WS, Schröder R, Clemen CS. 2016. Mutant desmin substantially perturbs mitochondrial morphology, function and maintenance in skeletal muscle tissue. *Acta Neuropathol* 132: 453–473.
- Witt SH, Labeit D, Granzier H, Labeit S, Witt CC. 2005. Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: Implications for MARP titin-based signaling. *J Muscle Res Cell Motil* 26: 401–408.
- Yacoub MH. 2014. Decade in review--cardiomyopathies: Cardiomyopathy on the move. *Nat Rev Cardiol* 11: 628–629.
- Zhang H, Bryson VG, Wang C, Li T, Kerr JP, Wilson R, Muoio DM, Bloch RJ, Ward C, Rosenberg PB. 2021. Desmin interacts with STIM1 and coordinates Ca²⁺ signaling in skeletal muscle. *JCI Insight* 6.
- Zhou X, Kato M, McKnight SL. 2023. How do disordered head domains assist in the assembly of intermediate filaments? *Current Opinion in Cell Biology* 85: 102262.
- Zhou X, Lin Y, Kato M, Mori E, Liszczak G, Sutherland L, Sysoev VO, Murray DT, Tycko R, McKnight SL. 2021. Transiently structured head domains control intermediate filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2022121118.
- Ziaeeian B, Fonarow GC. 2016. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 13: 368–378.