

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Ιατρικής



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

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



Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών στη «Μοριακή Ιατρική»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ TNF- α ΣΕ
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΩΝ**

Παπαθανασίου Σταμάτης

Βιολόγος, MSc

ΑΘΗΝΑ 2015

Εργαστήριο Εκπόνησης Διδακτορικής Εργασίας:

Εργαστήριο Γιασεμής Καπετανάκη, Αναπληρώτρια Διευθύντρια Κέντρου Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Επιστημονικώς Υπεύθυνη:

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

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ανάγνου Νικόλαος: Καθηγητής, Πρόεδρος Τριμελούς Επιτροπής - Επιβλέπων

Καπετανάκη Γιασεμή: Καθηγήτρια και Ερευνήτρια Α΄

Βασιλάτης Δημήτριος : Ερευνητής Γ΄

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ανάγνου Νικόλαος

**Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Καπετανάκη Γιασεμή

**Ερευνήτρια Α΄
Κέντρο Βασικής Έρευνας
ΠΒΕΑΑ**

Βασιλάτης Δημήτριος

**Ερευνητής Γ΄
Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής και
Μεταφραστικής Έρευνας
ΠΒΕΑΑ**

Μπούμπας Δημήτριος

**Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Δαλάκας Μαρίνος

**Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Σανούδου Δέσποινα

**Επίκουρη Καθηγήτρια
Τμήμα Ιατρικής
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Καραλή Αικατερίνη

**Ερευνήτρια Β΄
Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής και
Μεταφραστικής Έρευνας
ΠΒΕΑΑ**



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή χρηματοδοτήθηκε από την υποτροφία «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ ΙΙ» με Κ.Α. 70/3/11013 και Επιστημονικό Υπεύθυνο τον Καθηγητή Ανάγνου Νικόλαο,

του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Πρόλογος

Καμία αποφθευγματική πρόταση δεν θα ξεκινήσει αυτόν το σύντομο πρόλογο. Καμία βαρυσήμαντη φράση δεν θα βοηθήσει να κάνει περισσότερο χαρούμενους τους ανθρώπους που πρέπει να είναι χαρούμενοι αφού τον διαβάσουν.

Με τις πιο απλές λέξεις.

Ευχαριστώ αυτούς που βοήθησαν επιστημονικά από την αρχή ως το τέλος. Οι καθηγητές μου, η Κα Καπετανάκη η υπεύθυνη και ο Κος Ανάγνου ο επιβλέπων της διατριβής μου. Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής του διδακτορικού μου. Οι καθηγητές μου από τα πρώτα χρόνια σπουδών μου στην Κρήτη. Τα όμορφα μυαλά με τις συζητήσεις στους διαδρόμους του ΠΒΕΑΑ ή σε διεθνή συνέδρια που μου έδωσαν δύναμη.

Οι δικοί μου άνθρωποι ξέρουν πολύ καλά ποιοι είναι. Ευχαριστώ αυτούς που ήταν εδώ για όλα τα μικρά ή μεγάλα βήματα σε αυτή τη διαδρομή. Ευχαριστώ αυτούς που δεν μπορούσαν να είναι είναι πάντα εδώ, αλλά ήταν ΠΑΝΤΑ εδώ.. Όλοι αυτοί διαβάζουν τα ονόματά τους αυτήν τη στιγμή.

Είμαι σίγουρος πως εκείνοι που πρέπει να χαρούν τελειώνοντας αυτές τις γραμμές είναι ήδη χαρούμενοι. Όχι μόνο γιατί τον τελευταίο καιρό με βλέπουν να ζω το όνειρο και να ετοιμάζομαι για το επόμενο. Αλλά από την αρχή αυτής της προσπάθειας. Γιατί ξέρουν όλον αυτόν τον καιρό πως μου αρέσει να ονειρεύομαι.

Εκείνο που βοήθησε να το απολαύσω περισσότερο και κάνει όλο αυτό τόσο σημαντικό ήταν η παρέα...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT.....	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1 Απόκριση του μυοκαρδίου στο στρες.....	17
1.1 Εισαγωγή στους μηχανισμούς απόκρισης του μυοκαρδίου στο στρες.....	17
1.2 Κυτταροκίνες ως στρες-επαγόμενες πρωτεΐνες στο μυοκάρδιο	18
2 Ο παράγοντας TNF- α	19
2.1 Βασικά χαρακτηριστικά βιολογίας του TNF- α	19
2.2 Μεταβίβαση σήματος του TNF- α	20
2.2.1 Ενεργοποίηση του NF- κ B.....	22
2.2.2 Βασικές λειτουργίες του NF- κ B.....	25
2.2.3 Ενεργοποίηση των JNK και p38MAPK κινασών	26
2.3 Ο ρόλος του TNF- α σε βιολογικές διεργασίες	26
2.4 TNF- α στην παθοφυσιολογία ανθρώπου.....	28
2.4.1 Ο παράγοντας TNF- α στο μυοκάρδιο	28
2.4.2 Αρνητικές δράσεις του TNF- α και άλλων κυτταροκινών στο μυοκάρδιο	29
2.4.2.1 Μηχανισμοί συστολικής δυσλειτουργίας	29
2.4.2.2 Μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου	31
2.4.3 Θετικές δράσεις του TNF- α και άλλων κυτταροκινών στο μυοκάρδιο	32
2.4.4 Αντι-TNF- α στρατηγικές θεραπείας σε κλινικές μελέτες.....	35
2.4.5 Διαγονιδιακά ποντίκια υπερέκφρασης TNF- α στην καρδιά – μοντέλα διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας	37
2.4.5.1 Μορφολογικά-Ιστολογικά Χαρακτηριστικά.....	37
2.4.5.2 Μηχανισμοί μοριακής παθοφυσιολογίας.....	40
2.4.5.3 Διαταραχές στο δίκτυο κυτταροσκελετού της δεσμίνης.....	42
3 Δίκτυα κυτταροσκελετού	44
3.1 Γενικά χαρακτηριστικά κυτταροσκελετικών δικτύων.....	44

4	Κυτταροσκελετός των Ενδιάμεσων Ινιδίων.....	46
4.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	46
4.2	Ενδιάμεσα ινίδια του πυρήνα.....	47
4.3	Δομική οργάνωση ενδιάμεσων ινιδίων	48
5	Δεσμίνη.....	51
5.1	Γενικά χαρακτηριστικά δεσμίνης.....	51
5.2	Γονιδιακή ρύθμιση και πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου της δεσμίνης	51
5.2.1	Γονιδιακή ρύθμιση της δεσμίνης.....	52
5.2.2	Πρωτεϊνική έκφραση της δεσμίνης.....	53
5.3	Έκφραση δεσμίνης κατά την ανάπτυξη.....	53
5.4	Δομή και ιδιότητες της δεσμίνης.....	54
5.5	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου της δεσμίνης.....	55
5.6	Πρότυπο υποκυτταρικής τοπολογίας της δεσμίνης	56
5.7	Αλληλεπίδραση της Δεσμίνης με κυτταρικά οργανίδια	58
5.7.1	Αλληλεπίδραση με τον πυρήνα	58
5.7.2	Αλληλεπίδραση με τα μιτοχόνδρια.....	58
5.7.3	Αλληλεπίδραση με τα λυσοσώματα	59
5.7.4	Αλληλεπίδραση δεσμίνης με άλλες πρωτεΐνες	60
5.7.4.1	Δεσμίνη και πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων	61
5.7.4.2	Δεσμίνη και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με ενδιάμεσα ινίδια	62
5.7.4.3	Δεσμίνη και πρωτεΐνες των σαρκομερών / πρωτεΐνες σχετιζόμενες με μεμβράνες.....	63
5.7.4.4	Δεσμίνη και μικρές θερμο-επαγόμενες πρωτεΐνες, σχετιζόμενες με την απόπτωση και με τα νουκλεϊκά οξέα πρωτεΐνες.....	64
5.8	Ασθένειες που σχετίζονται με τη δεσμίνη	65
5.9	Μηχανισμοί αποδιοργάνωσης του δικτύου δεσμίνης	67
5.9.1	Μεταλλάξεις της δεσμίνης	67
5.9.2	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της δεσμίνης	68
5.9.3	Πρωτεολυτικό κόψιμο της δεσμίνης.....	68
5.9.4	Κύκλος ζωής πρωτεΐνης της δεσμίνης.....	69
5.10	Λειτουργίες της δεσμίνης	70

5.10.1.1	Ρόλος δεσμίνης μέσω μελετών των Des ^{-/-} ποντικών.....	70
5.10.2	Ρόλος της δεσμίνης στη μυογένεση	71
5.10.3	Ρόλος της δεσμίνης στη φυσιολογία των σκελετικών μυών	71
5.10.4	Ρόλος της δεσμίνης στη φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος.....	72
5.10.5	Ρόλος της δεσμίνης στη φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος.....	72
5.10.6	Ρόλος της δεσμίνης στην οργάνωση και λειτουργία των μιτοχονδρίων	75
6	Κερατίνες.....	77
6.1	Εισαγωγή στις κερατίνες.....	77
6.2	Ιστο-ειδική έκφραση κερατινών.....	78
6.3	Έκφραση κερατινών σε φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες στρες	78
6.4	Έκφραση κερατινών σε μη επιθηλιακούς ιστούς.....	81
6.5	Λειτουργίες των κερατινών.....	82
6.5.1	Δομική στήριξη	82
6.5.2	Κερατίνες ως απόκριση σε παράγοντες του στρες.....	84
6.5.3	Ρύθμιση του πυρήνα	85
6.6	Μηχανισμοί ρύθμισης κυτταρικών διεργασιών από τις κερατίνες.....	86
6.6.1	Μηχανισμοί προστασίας από τον κυτταρικό θάνατο του K8/K18 ..	86
6.6.2	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κερατινών	88
6.7	Κερατίνες κατά την εμβρυική ανάπτυξη	89
6.8	Κερατίνες στην παθοφυσιολογία ανθρώπου.....	91
6.8.1	Οι κερατίνες απλών επιθηλίων (ΚΑΕ) ως βιο-δείκτες ιστικών βλαβών, καρκίνων και απόκρισης σε θεραπείες	91
6.8.2	Κερατίνες και καρκίνος.....	92
6.8.3	Μεταλλάξεις κερατινών	94
6.8.3.1	Μεταλλάξεις των κερατινών απλών επιθηλίων	94
6.9	Διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα για τη μελέτη των κερατινών απλών επιθηλίων	98
	ΣΚΟΠΟΣ.....	101

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	103
1 Πειραματόζωα.....	105
1.1 Διαγονιδιακά ποντίκια.....	105
1.2 Μοντέλα πειραματικά προκαλούμενης καρδιακής βλάβης.....	106
1.2.1 Μοντέλο περίσφιξης της αορτής (TAC).....	106
1.2.2 Μοντέλο ισχαιμίας του μυοκαρδίου (MI).....	107
2 Δείγματα ανθρώπινου μυοκαρδίου.....	107
2.1 Δείγματα ιστού ανθρώπινου μυοκαρδίου.....	108
2.2 Δείγματα ορού αίματος.....	108
3 Ηχοκαρδιογραφία.....	109
3.1 Ηχοκαρδιογραφικές παράμετροι.....	109
4 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	110
5 Συμβατική αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR).....	111
6 Απομόνωση RNA.....	111
6.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικού RNA.....	112
7 Σύνθεση cDNA.....	112
8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR).....	113
9 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών DNA.....	115
9.1 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων μικροσυστοιχιών DNA.....	115
9.2 Μετα-ανάλυση αποτελεσμάτων συνολικής γονιδιακής έκφρασης.....	116
10 Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP) σε καρδιακό ιστό.....	116
10.1 Προετοιμασία της χρωματίνης από ιστό ενήλικης καρδιάς.....	117
10.2 Ανοσοκατακρήμιση της χρωματίνης.....	117
10.3 Απομόνωση του DNA της ανοσοκατακρημισμένης χρωματίνης.....	118
10.4 Ανάλυση του DNA ανοσοκατακρημισμένης χρωματίνης.....	119
11 Ανάλυση γονιδιακής ρύθμισης με το σύστημα λουσιφεράσης.....	121
11.1 Κατασκευή γενετικών κατασκευών μελέτης της γονιδιακής ρύθμισης των Krt8 και Krt18.	121

11.2	Κατασκευή μεταλλαγμένων γενετικών κατασκευών για τη μελέτη του ρόλου συγκεκριμένων κΒ θέσεων στη ρύθμιση των Krt8 και Krt18.....	125
11.2.1	Μεταλλαξιγένεση in vitro σε στοχευμένες θέσεις	125
11.3	Επιμόλυνση κυττάρων με γενετικές κατασκευές και μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοζιδάσης.....	127
12	Ηλεκτρονική μικροσκοπία και ανοσοσήμανση με σωματίδια χρυσού.....	127
12.1	Ηλεκτρονική μικροσκοπία τομών μυοκαρδίου.....	128
12.2	Ηλεκτρονική μικροσκοπία απομονωμένων μιτοχονδρίων.....	128
12.3	Ανοσοσήμανση με σωματίδια χρυσού.....	128
13	Απομόνωση και λειτουργική ανάλυση καρδιακών μιτοχονδρίων.....	130
13.1	Απομόνωση μιτοχονδρίων του μυοκαρδίου.....	130
13.2	Ανάλυση μιτοχονδριακής κατανάλωσης οξυγόνου.....	131
13.3	Μετρήσεις γλουταθειόνης.....	131
13.4	Απομόνωση και μέτρηση νουκλεοτιδίων πυριδίνης.....	132
13.5	Ποσοτικοποίηση επιπέδων ATP.....	133
14	Ανάλυση ιστολογίας.....	133
14.1	Εγκλεισμός καρδιάς σε παραφίνη και τομές σε μικροτόμο.....	133
14.2	Τομές σε μικροτόμο παραφίνης.....	134
14.3	Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των ιστών.....	135
14.4	Χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη.....	135
14.5	Χρώση με Masson's trichrome.....	136
15	Ανάλυση επιπέδων νέκρωσης μυοκαρδίου μέσω χρώσης Evans Blue.....	136
16	Ηλεκτροφορητική Ανάλυση Πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western	137
16.1	Ομογενοποίηση.....	137
16.2	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	137
16.3	Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	138
17	Ανοσοφθορισμός.....	139

17.1	Έγκλειση ιστών και κρυτομές	140
17.2	Επώαση των τομών με πρώτα αντισώματα.....	140
17.3	Ανάλυση συνεστιακής μικροσκοπίας	143
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		145
1	Η καρδιο-ειδική υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α οδηγεί σε βελτίωση του παθολογικού φαινοτύπου του μοντέλου έλλειψης δεσμίνης.	147
1.1	Η εναπόθεση ασβεστίου και οι εκτεταμένες περιοχές ίνωσης του Des ^{-/-} μοντέλου εξαλείφονται έπειτα από υπερέκφραση του TNF-α.	147
1.2	Ο εκφυλισμός του μυοκαρδίου και η κυτταρική νέκρωση από την ενεργοποίηση φλεγμονοδών κυττάρων στο Des ^{-/-} μοντέλο ελαττώνεται σημαντικά στο μοντέλο υπερέκφρασης TNF-α.....	149
1.3	Τα χαρακτηριστικά της υπερδομής των Des ^{-/-} καρδιοκυττάρων παρουσιάζουν βελτίωση έπειτα από υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α.....	151
1.4	Οι λειτουργικές ιδιότητες των καρδιακών μιτοχονδρίων είναι βελτιωμένες στο Des ^{-/-} μυοκάρδιο έπειτα από υπερέκφραση του TNF-α	154
1.5	Η υπερέκφραση του TNF-α επιφέρει σημαντική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας στο Des ^{-/-} μυοκάρδιο.....	157
1.6	Η διάταση και η λέπτυνση των τοιχωμάτων του μυοκαρδίου βελτιώνονται στο TNF-αDes ^{-/-} σε σύγκριση με το Des ^{-/-} μοντέλο.....	160
2	Η απουσία του δικτύου της δεσμίνης οδηγεί σε βελτίωση παθολογικών χαρακτηριστικών του μοντέλου καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF-α...	160
2.1	Η καρδιακή λειτουργία είναι σημαντικά βελτιωμένη στο Tnf ^{Myh6} Des ^{-/-} σε σύγκριση με το MHCsTNFα μοντέλο.	160
2.2	Οι εμβόλιοι δίσκοι των Tnf ^{Myh6} Des ^{-/-} καρδιοκυττάρων παρουσιάζουν φυσιολογικά μορφολογικά και δομικά χαρακτηριστικά.....	161
3	Η υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α στο μυοκάρδιο οδηγεί στην ενεργοποίηση ομάδων γονιδίων που σχετίζονται με την αναδόμηση του ιστού και τον κυτταρικό θάνατο.	162
4	Στο Tnf ^{Myh6} Des ^{-/-} μυοκάρδιο επάγονται γονίδια που δηλώνουν ελάττωση των διεργασιών αναδόμησης του ιστού, σε σύγκριση με το MHCsTNFα.	164

5	Ελλείψη του κυτταροσκελετού της δεσμίνης, η υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α οδηγεί στην ενεργοποίηση ομάδων γονιδίων που σχετίζονται με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την προστασία από τον κυτταρικό θάνατο.....	165
5.1	Στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο επάγονται γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και την προστασία από τον κυτταρικό θάνατο.....	165
5.2	Στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο επάγονται γονίδια ενδιάμεσων ινιδίων των κυττάρων ιστού απλών επιθηλίων.....	170
6	Τα γονίδια της κερατίνης 8 και κερατίνης 18 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α και σχηματίζουν πρωτεΐνες.....	171
7	Οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκτείνονται στο μεγαλύτερο τμήμα του μυοκαρδίου υπερέκφρασης TNF-α και καθόλου στο WT μυοκάρδιο.....	173
8	Οι K8 και K18 σχηματίζουν ένα κυτταροσκελετικό δίκτυο με χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.....	175
8.1	Οι πρωτεΐνες K8 και K18 συνεντοπίζονται απόλυτα και σχηματίζουν δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων.....	175
8.2	Το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται ειδικά στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων.....	177
8.3	Το δίκτυο K8/K18 εκτείνεται στο σαρκόπλασμα στο επίπεδο των Μ-ζωνών των κοσταμερών.....	180
8.4	Το δίκτυο K8/K18 εκφράζεται στα μυοκαρδιοκύτταρα και όχι στους ινοβλάστες των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών.	181
9	Το δίκτυο K8/K18 εκφράζεται στα καρδιοκύτταρα νωρίς κατά τη γέννηση του ποντικιού.....	182
10	Το δίκτυο K8/K18 εμφανίζει μεγαλύτερη ειδικότητα εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε σύγκριση με το MHCsTNFα μυοκάρδιο.....	184
11	Το δίκτυο K8/K18 εμφανίζει μεγαλύτερη ειδικότητα εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους σε σύγκριση με τη δεσμίνη στο MHCsTNFα μυοκάρδιο.....	184
12	Το δίκτυο K8/K18 παρουσιάζει καρδιοπροστατευτική δράση στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντίκια.....	186
13	Η έλλειψη του δικτύου K8/K18 οδηγεί σε αύξηση της διάτασης του MHCsTNFα μυοκαρδίου.	189
14	Η καρδιοπροστατευτική δράση του δικτύου K8/K18 περιλαμβάνει την διατήρηση οργάνωσης και δομής των εμβόλιμων δίσκων.	190

15	Η ρύθμιση της δομής και της οργάνωσης των μιτοχονδρίων συμμετέχει στην καρδιοπροστατευτική δράση του δικτύου K8/K18.....	196
16	Το δίκτυο K8/K18 συμμετέχει στη διατήρηση των λειτουργικών ιδιοτήτων των καρδιακών μιτοχονδρίων στο $Tnf^{eMyh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.....	197
17	Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στο μηχανισμό εκτοπικής έκφρασης των Krt8 και Krt18 στο μυοκάρδιο.	201
17.1	Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στο μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης του Krt8 κατά την εκτοπική του έκφραση στο $Tnf^{eMyh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.	201
17.2	Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στο μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης του Krt18 κατά την εκτοπική του έκφραση στο $Tnf^{eMyh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.....	203
17.3	Ρυθμιστική περιοχή μεταξύ των Krt8 και Krt18 γενετικών τόπων σχετίζεται με τον παράγοντα NF-κB και εμφανίζει ενδεχόμενη συμμετοχή στην εκτοπική τους έκφραση στο $Tnf^{eMyh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.	205
18	Η έκφραση των γονιδίων Krt8 και Krt18 ρυθμίζεται από τον παράγοντα NF-κB in vitro.	206
19	Τα γονίδια Krt8 και Krt18 εκφράζονται στο μυοκάρδιο γενετικού μοντέλου με καρδιο-ειδική έκφραση συνεχώς ενεργοποιημένου IKK2.	210
20	Παρεμπόδισμός του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κB in vivo οδηγεί σε μείωση των επιπέδων εκτοπικής έκφρασης των Krt8 και Krt18 στο MHCsTNFα μυοκάρδιο.	212
21	Οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στο $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.....	213
22	Οι K8 και K18 εκφράζονται εκτοπικά στα καρδιοκύτταρα γενετικών μοντέλων καρδιομυοπάθειας.	216
23	Οι K8 και K18 εκφράζονται εκτοπικά στα καρδιοκύτταρα μοντέλων πειραματικά προκλυόμενης καρδιακής βλάβης.....	218
24	Η εκτοπική έκφραση του δικτύου K8/K18 είναι καρδιοπροστατευτική στο μοντέλο καρδιακής βλάβης από περίσφυξη της αορτής.	220
25	Οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.....	223
26	Στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια σχηματίζεται δίκτυο K8/K18 με χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων.....	225
27	Το δίκτυο της δεσμίνης είναι διαταραγμένο στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.....	228

- 28 Το δίκτυο K8/K18 εμφανίζει μεγαλύτερη ειδικότητα εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους σε σύγκριση με τη δεσμίνη στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.....229
- 29 Οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια της μελέτης μας παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα TNF-α.....230

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....233

- 1 Ο παράγοντας TNF-α παρουσιάζει καρδιοπροστατευτική δράση.....235
- 2 Η υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α βελτιώνει την καρδιομυοπάθεια που οφείλεται στην έλλειψη της δεσμίνης.....236
- 3 Το δίκτυο των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης είναι κυρίαρχης σημασίας για το μηχανισμό παθοφυσιολογίας του TNF-α.....237
- 4 Οι κερατίνες 8 και 18 ως στρες-επαγόμενες πρωτεΐνες στην καρδιακή παθοφυσιολογία.....239
- 5 Ο παράγοντας TNF-α οδηγεί στην εκτοπική έκφραση των K8 και K18 στο μυοκάρδιο.....241
- 6 Η δεσμίνη ως πιθανός ρυθμιστής της εκτοπικής έκφρασης των K8 και K18 στα μυοκαρδιοκύτταρα.....243
- 7 Οι επιθηλιακές κερατίνες K8/K18 εκφράζονται στο μυοκάρδιο.....244
- 8 Οι κερατίνες K8 και K18 εκφράζονται στα μυοκαρδιοκύτταρα και όχι στους καρδιακούς ινοβλάστες του παθολογικού μυοκαρδίου.....246
- 9 Μεταστροφή του γονιδιακού προτύπου έκφρασης του μυοκαρδίου σε πρότυπο έκφρασης εμβρυικής καρδιάς.....247
- 10 Καρδιακές κερατίνες K8/K18 και ιδιότητες πολυδύναμων κυττάρων.....248
- 11 Το δίκτυο K8/K18 ρυθμίζει την οργάνωση των εμβόλιμων δίσκων.....249
- 12 Το δίκτυο K8/K18 ρυθμίζει την οργάνωση και λειτουργία των μιτοχondρίων προσδίδοντας καρδιοπροστασία.....251
- 13 Οι κερατίνες K8 και K18 εκφράζονται στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια - Κλινική σημασία.....253
- 14 Το δίκτυο της δεσμίνης είναι διαταραγμένο στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια.....255

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΕΣ.....259

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....261

- Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου μέσω και στατιστική ανάλυση όλων των γενοτύπων σε ποντίκια ηλικίας 3ών και 6 μηνών.....289

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. Λίστα των γονιδίων με τη μεγαλύτερη μεταβολή από τη σύγκριση μεταγραφώματος μυοκαρδίου μεταξύ $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$ ποντικών.	291
Συμπληρωματικός Πίνακας 3. Πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τον πατάγοντα NF- κ B, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης (Genomatix/MatInspector), οι σε περιοχές που βρέθηκαν θετικές στην ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με anti-p65 στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάριο.	294
Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου μέσω και στατιστική ανάλυση των WT και $Krt18^{-/-}$ ποντικών 2- και 4-εβδομάδες μετά από χειρουργείο περίσφυξης αορτής TAC.	296

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ενήλικο μυοκάρδιο αποτελεί ένα μοναδικό σύστημα προσαρμογής σε στρεσογόνους παράγοντες, στην προσπάθεια να διατηρήσει την ομοιόστασή του. Η προφλεγμονώδης κυτταροκίνη του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) είναι ένα από τα σημαντικότερα στρες-επαγόμενα μόρια τα οποία υπερεκφράζονται στην καρδιά ως απόκριση σε βλάβη. Επιπλέον, η συνεχής έκφραση του TNF- α έχει σχετιστεί με την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας.

Παρότι προηγούμενες μελέτες στο μοντέλο βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης έχουν προτείνει πως χαμηλά επίπεδα έκφρασης του παράγοντα TNF- α μπορεί να προσδίδουν κυτταροπροστασία στο μυοκάρδιο, δεν είναι γνωστή η ενδεχόμενη καρδιοπροστατευτική δράση του TNF- α στην καρδιακή ανεπάρκεια και οι αντίστοιχοι μηχανισμοί. Ανακαλύψαμε μία καινοτόμο καρδιοπροστατευτική λειτουργία του TNF- α σε ένα γενετικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας, το ποντίκι έλλειψης του γονιδίου της δεσμίνης, μέσω εκτοπικής έκφρασης στα μυοκαρδιοκύτταρα των ειδικών πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων των απλών επιθηλίων, κερατίνη 8 (K8) και κερατίνη 18 (K18). Η εκτοπική έκφραση των K8 και K18 ρυθμίζεται από τον παράγοντα NF- κ B και οδηγεί στο σχηματισμό κυτταροσκελετικού δικτύου (K8/K18) που εντοπίζεται κυρίως στους εμβόλιμους δίσκους.

Το εναλλακτικό δίκτυο κυτταροσκελετού K8/K18 προσδίδει καρδιοπροστασία διατηρώντας την ακεραιότητα των εμβόλιμων δίσκων, καθώς και τη δομή και λειτουργία των μιτοχονδρίων. Επιπλέον παρουσιάζουμε πως η επαγωγή του εκτοπικού δικτύου K8/K18 συμβαίνει και σε άλλα γενετικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας και πειραματικά προκαλούμενης καρδιακής βλάβης, ενώ η έλλειψή του έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της ικανότητας προσαρμογής του μυοκαρδίου έπειτα από περίσφιξη της αορτής.

Τέλος, δείχνουμε πως οι K8/K18 εκφράζονται εκτοπικά και στο ανθρώπινο παθολογικό μυοκάρδιο, όπου επάγεται ο TNF- α . Το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται και σε αυτήν την περίπτωση στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων, όπου η δεσμίνη βρέθηκε να απουσιάζει.

Η παρούσα ερευνητική εργασία είναι η πρώτη που προτείνει την –επαγόμενη από τον TNF- α – εκτοπική έκφραση των πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων K8/K18 στην καρδιά, οι οποίες μπορεί να δρουν ως στρες-επαγόμενοι καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες στο παθολογικό μυοκάρδιο. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερης κλινικής σημασίας καθώς επεκτείνεται και στην καρδιακή ανεπάρκεια του ανθρώπου.

ABSTRACT

The adult myocardium demonstrates a unique system of adaptation to environmental stress, in an effort to preserve homeostasis. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) is one of the major stress-induced pro-inflammatory cytokines that is up-regulated in the heart following tissue injury and its sustained expression can contribute to the development of heart failure.

Although previous studies have shown that lower levels of TNF- α confer cytoprotection in the myocardium following ischemic reperfusion injury, whether TNF- α also exerts cytoprotective mechanisms in heart failure is not known. We discovered a novel cardioprotective function for TNF- α overexpression in a genetic heart failure model, the desmin deficient mice, through NF- κ B-mediated cardiomyocyte ectopic expression of keratin 8 (K8) and keratin 18 (K18), two simple epithelia-specific Intermediate Filament (IF) proteins. Ectopically expressed K8 and K18 (K8/K18) form a cytoskeletal network that localizes mainly at the Intercalated Discs (IDs).

This alternative K8/K18 cytoskeleton confers cardioprotection by maintaining both proper ID structure as well as mitochondrial integrity and function. Importantly, we demonstrated that K8/K18 ectopic induction also occurs in other genetic and experimental models of heart failure, and we show that loss of the K8/K18 network results in a maladaptive cardiac phenotype following transverse aortic constriction.

Finally, we found that in cardiomyocytes of human failing myocardium, where TNF- α is induced, K8/K18 are also expressed ectopically and localize primarily at IDs, where desmin cannot be detected. This is the first report to propose a TNF- α -mediated cardiac ectopic expression of K8/K18 IF proteins, which may act as stress-induced cardioprotective factors in the failing heart, a phenomenon of major clinical significance as it also extends to human heart failure.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 Απόκριση του μυοκαρδίου στο στρες

1.1 Εισαγωγή στους μηχανισμούς απόκρισης του μυοκαρδίου στο στρες

Η ικανότητα του μυοκαρδίου να προσαρμοστεί με επιτυχία σε περιβαλλοντικούς παράγοντες του στρες, που προκύπτει είτε από αιμοδυναμική υπερφόρτωση είτε από ισχαιμία του μυοκαρδίου ή έμφραγμα, καθορίζει τελικά εάν η καρδιά υποστεί βλάβη ή αντίθετα ανταπεξέλθει και διατηρήσει τη λειτουργία της (Mann 2003). Τρεις από τους κύριους μηχανισμούς που επιτρέπουν στην καρδιά να ανταπεξέλθει στο περιβαλλοντικό στρες είναι η υπερτροφία, οι κυτταροπροστατευτικές αποκρίσεις και οι επιδιορθωτικές διεργασίες. Οι σαφείς μηχανισμοί και τα μόρια που συμμετέχουν σε αυτούς δεν έχουν ακόμα ξεκάθαρα κατανοηθεί. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες κατέχουν σημαντικό ρόλο στις διεργασίες αυτές, δρώντας αυτοκρινώς ή παρακρινώς για την ενεργοποίηση, ρύθμιση και διατήρηση των αποκρίσεων του μυοκαρδίου στους περιβαλλοντικούς παράγοντες του στρες (Mann 2003).

Η άποψη πως κυτταρικοί υποπληθυσμοί του μυοκαρδίου προσαρμόζονται στο περιβαλλοντικό στρες συνθέτοντας και αντιδρώντας σε μια ποικιλία ενδογενών πρωτεϊνών επαγόμενων από το στρες είχε προταθεί αρχικά σε μελέτες αιμοδυναμικής υπερφόρτωσης (hemodynamic overload) σε καρδιές σκύλων (Hammond, Lai et al. 1982). Παρόλο που οι μελέτες αυτές δεν οδήγησαν στην ταυτοποίηση της φύσης των συγκεκριμένων επαγόμενων από το στρες πρωτεϊνών (Hammond, Lai et al. 1984), επακόλουθες αναφορές καθόρισαν τη βιοχημική φύση κάποιων από τους παράγοντες αυτούς που προέρχονται από το μυοκάρδιο. Τέτοιοι είναι ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor-beta, TGF-β), ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου (VEGF) και η αγγειοτενσίνη II (Weiner and Swain 1989; Casscells, Speir et al. 1990; Sadoshima, Xu et al. 1993; Li, Hampton et al. 1997).

Παρότι ο ακριβής ρόλος αυτών των ενδογενών στρες-επαγόμενων πρωτεϊνών δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, μπορεί να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη ή την αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου και την αγγειογένεση ως απόκριση στην ιστική βλάβη (Mann 2003). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως το μυοκάρδιο είναι ικανό να συνθέτει κυτταροπροστατευτικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της

αδενοσίνης, της βραδυκινίνης και του νιτρικού οξέος, σε απόκριση στη βλάβη από ισχαιμία (Goto, Liu et al. 1995; Bolli, Bhatti et al. 1997).

Τα δεδομένα αυτά προτείνουν πως η απόκριση του μυοκαρδίου στο περιβαλλοντικό στρες διαχωρίζεται σε δύο ανεξάρτητους μηχανισμούς ομοιόστασης, έναν που επιτρέπει στον ιστό να ελαχιστοποιήσει τις κυτταρικές βλάβες μέσω υπερέκφρασης κυτταροπροστατευτικών παραγόντων και δεύτερον έναν μηχανισμό που ενισχύει την επιδιόρθωση του ιστού όταν και εάν αυτές οι κυτταροπροστατευτικές αποκρίσεις δεν είναι αρκετές να εμποδίσουν τον κυτταρικό θάνατο (Mann 2003). Ωστόσο, οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για τη ρύθμιση των διαφορετικών αποκρίσεων στο στρες στο μυοκάρδιο, παραμένουν άγνωστοι.

1.2 Κυτταροκίνες ως στρες-επαγόμενες πρωτεΐνες στο μυοκάρδιο

Οι βασικές κυτταροκίνες που σχετίζονται σημαντικά με τους μηχανισμούς απόκρισης του μυοκαρδίου στο στρες ανήκουν στις οικογένειες του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF), της ιντερλευκίνης-1 (interleukin-1, IL-1), και της ιντερλευκίνης-6 (interleukin-6, IL-6), ενώ δευτερευόντως έχουν αναφερθεί και οι ιντερλευκίνη-18 (interleukin-18, IL-18), η καρδιοτροφίνη-1 (cardiotrophin-1) και ο παρεμποδιστικός παράγοντας λευχαιμίας (leukemia inhibitory factor). Αυτά τα μόρια έχουν χαρακτηριστεί ως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επειδή παραδοσιακά υπήρχε η θεώρηση πως προέρχονται αποκλειστικά από το ανοσοποιητικό σύστημα και είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων στους ιστούς. Ωστόσο πλέον γνωρίζουμε πως εκφράζονται από όλους τους εμπύρηνους κυτταρικούς τύπους του μυοκαρδίου, συμπεριλαμβανομένων των καρδιοκυττάρων (Kapadia, Lee et al. 1995; Kapadia, Oral et al. 1997).

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες δεν εκφράζονται συστηματικά στην καρδιά υπό φυσιολογικές συνθήκες (Kapadia, Lee et al. 1995; Kapadia, Oral et al. 1997). Ωστόσο, επάγονται αμέσως και συνεχόμενα αποκρινόμενες σε μια πληθώρα διαφορετικών βλαβών –ή παθολογιών– του μυοκαρδίου (Mann 2003). Είναι πλέον γνωστό πως η συνεχής υπερέκφραση των κυτταροκινών αυτών επιφέρει σοβαρές δυσλειτουργίες στην αριστερή κοιλία και αναδιαμόρφωση του ιστού οδηγώντας σε διατάραξη της καρδιακής λειτουργίας (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο). Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές πως χαμηλών επιπέδων έκφραση θα μπορούσε να οδηγήσει σε θετικές αποκρίσεις στο μυοκάρδιο, όπως στην περίπτωση βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο).

2 Ο παράγοντας TNF-α

2.1 Βασικά χαρακτηριστικά βιολογίας του TNF-α

Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) πήρε το όνομα του το 1975 από την παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη αυτή ασκούσε αντικαρκινική δράση *in vivo* και *in vitro* (Carswell, Old et al. 1975). Αργότερα η καχεκτίνη (cachectin), μια πρωτεΐνη που απομονώθηκε από κύτταρα τα οποία είχαν επωασθεί με ενδοτοξίνη, με ενδεχόμενο ρόλο στη μοριακή βάση της καχεξίας αποδείχτηκε πως είναι ταυτόσημη με τον TNF-α (Beutler, Mahoney et al. 1985; Pennica, Hayflick et al. 1985).

Ο TNF-α είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα και τη φλεγμονή, αλλά και στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση διαφόρων κυτταρικών τύπων, μεταξύ άλλων λειτουργιών (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα ως απόκριση σε επιμόλυνση και σε ανοσολογικές διεργασίες. Επίσης όμως παράγεται από άλλα κυτταρικά συστήματα, όπως τα B-κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα ηπατοκύτταρα και υπό συνθήκες από τα μυοκαρδιοκύτταρα (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο). Εκτός από την επαγωγή της δικής του έκφρασης, μπορεί να δράσει επάγοντας τη σύνθεση μικρών φλεγμονωδών μορίων-ρυθμιστών, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet-activating factor, PAF). Αντίστοιχα, ο TNF-β, ο οποίος αρχικά χαρακτηρίστηκε ως λεμφοτοξίνη (Ruddle and Waksman 1967), είναι μεγαλύτερο μόριο, λιγότερο δραστικό και βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από τον TNF-α, ενώ παράγεται κυρίως από τα T κύτταρα σε αντίθεση με τον TNF-α, για του οποίου την παραγωγή ευθύνονται κυρίως τα μακροφάγα. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 19 μέλη που ανήκουν στην οικογένεια των TNFs.

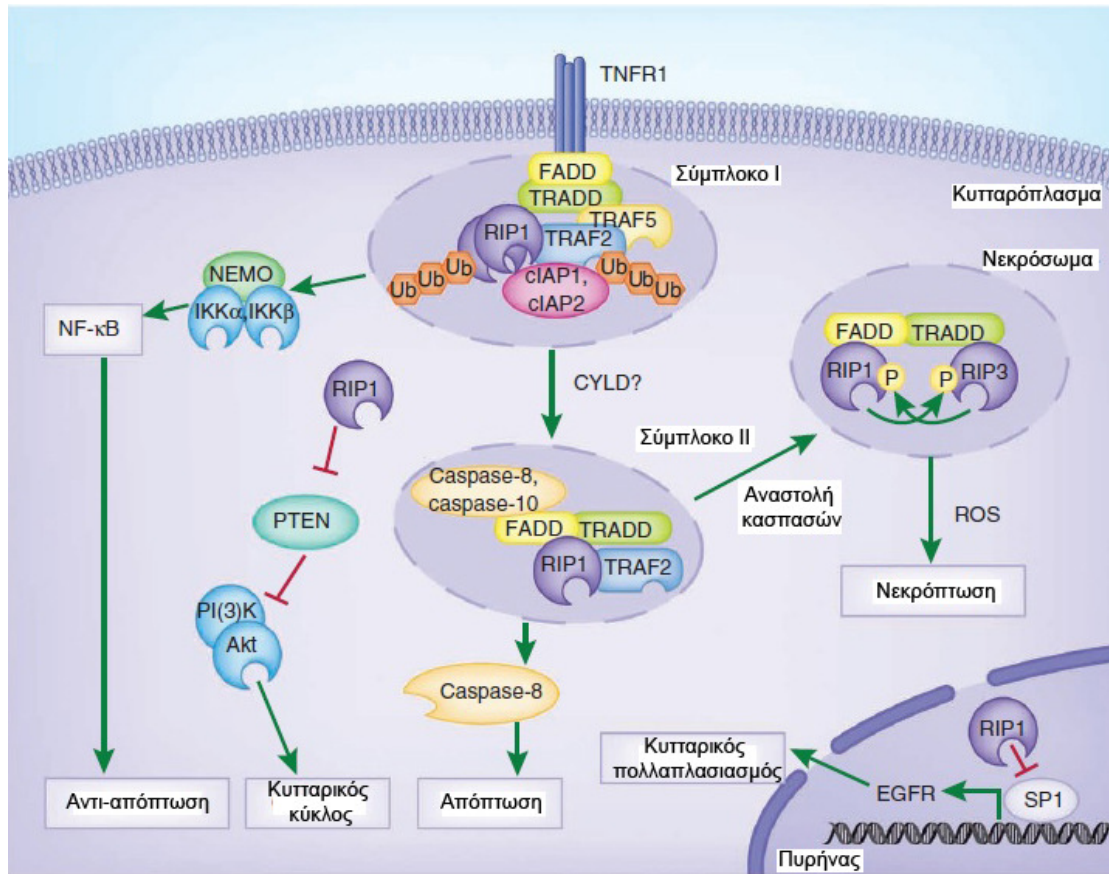
Ο TNF-α εκφράζεται ως μια πρόδρομη μορφή (pro-TNF), τη μη γλυκοζυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη 233 αμινοξέων. Στην 3' μη μεταφράσιμη περιοχή του mRNA του TNF-α, έχει πιστοποιηθεί μια αλληλουχία 69 νουκλεοτιδίων, η έλλειψη της οποίας έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της σταθερότητας του mRNA και κατ' επέκταση την αυξημένη έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης (Kontoyiannis, Pasparakis et al. 1999). Το πρόδρομο μόριο του TNF-α πέπτεται στη συνέχεια από το ένζυμο της κονβερτάσης του TNF-α (TNF-α convertase, TACE), μια πρωτεϊνάση της

οικογένειας μεταλλοπρωτεϊνών ντισιντεγκρίνης, για να προκύψει τελικά η εκκρινόμενη μορφή του TNF- α μεγέθους 157 αμινοξέων. Στην πρωτεολυτική αυτή διαδικασία του TNF- α παίζει σημαντικό ρόλο η μεριστυλίωσή του στο κυτταρόπλασμα.

Η έκφραση του πρόδρομου μορίου του TNF- α αυξάνεται ως απόκριση μιας ποικιλίας ερεθισμάτων επιμόλυνσης και φλεγμονής, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μεγάλες ποσότητες ώριμης πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, παραμένει και κάποια ποσότητα στη αρχική διαμεμβρανική μορφή του, η οποία έχει αποδειχτεί πως μπορεί και αυτή να ενεργοποιεί μονοπάτια μεταβίβασης σήματος (Kriegler, Perez et al. 1988; Rossol, Meusch et al. 2007). Ο TNF- α ρυθμίζει την έκφραση άλλων κυτταροκινών και χημοκινών, όπως οι ιντερλευκίνες 1 και 6 και η MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), άλλων παραγόντων όπως ο TGF- β , ο PDGF, καθώς επίσης και μιας ομάδας εικοσανοειδών και ορμονών (Tracey and Cerami 1989).

2.2 Μεταβίβαση σήματος του TNF- α

Όπως περιγράφεται στην Εικόνα 1, με την πρόσδεση του παράγοντα TNF- α στον υποδοχέα TNFR1 της μεμβράνης προκαλείται η αναδιοργάνωση του τελευταίου και επιτρέπεται η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain), η οποία επίσης περιέχει περιοχή θανάτου (death domain) (Hsu, Xiong et al. 1995). Στη συνέχεια, στο σύμπλοκο αυτό προσδένεται η κινάση σερίνης-θρεονίνης RIP (Receptor Interacting Protein) και ο παράγοντας TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2) ο οποίος προσελκύει το IKK σύμπλοκο με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των υπομονάδων του και άρα την ενεργοποίησή του από την κινάση RIP (Devin, Cook et al. 2000) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών από τον υποδοχέα TNFR1. Η πρόσδεση του TNF-α στον υποδοχέα TNFR1 προκαλεί τον τριμερισμό του και τη επακόλουθη συγκέντρωση μορίων που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του NF-κB. Ο NF-κB ρυθμίζει πληθώρα λειτουργιών όπως περιγράφεται στο κείμενο, όπως η ενεργοποίηση επιβιωτικών μονοπατιών με το σχηματισμό το συμπλόκου I όπως παρουσιάζεται στην εικόνα. Ο σχηματισμός αυτός στη συνέχεια ενδοκυτταρώνεται, οπότε διάφορες πρωτεΐνες απελευθερώνονται (TRAF-2, RIP) και στη θέση τους δεσμεύονται οι FADD και προκασπάση-8 για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο επαγωγής κυτταρικού θανάτου (σύμπλοκο II ή DISC). Στη συνέχεια ενεργοποιείται η κασπάση-8, η οποία απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και όπου και ενεργοποιεί τις τελικές κασπάσες-τελεστές, υπεύθυνες για τις αποπτωτικές διεργασίες. Προσαρμοσμένο από (Oeckinghaus, Hayden et al. 2011).

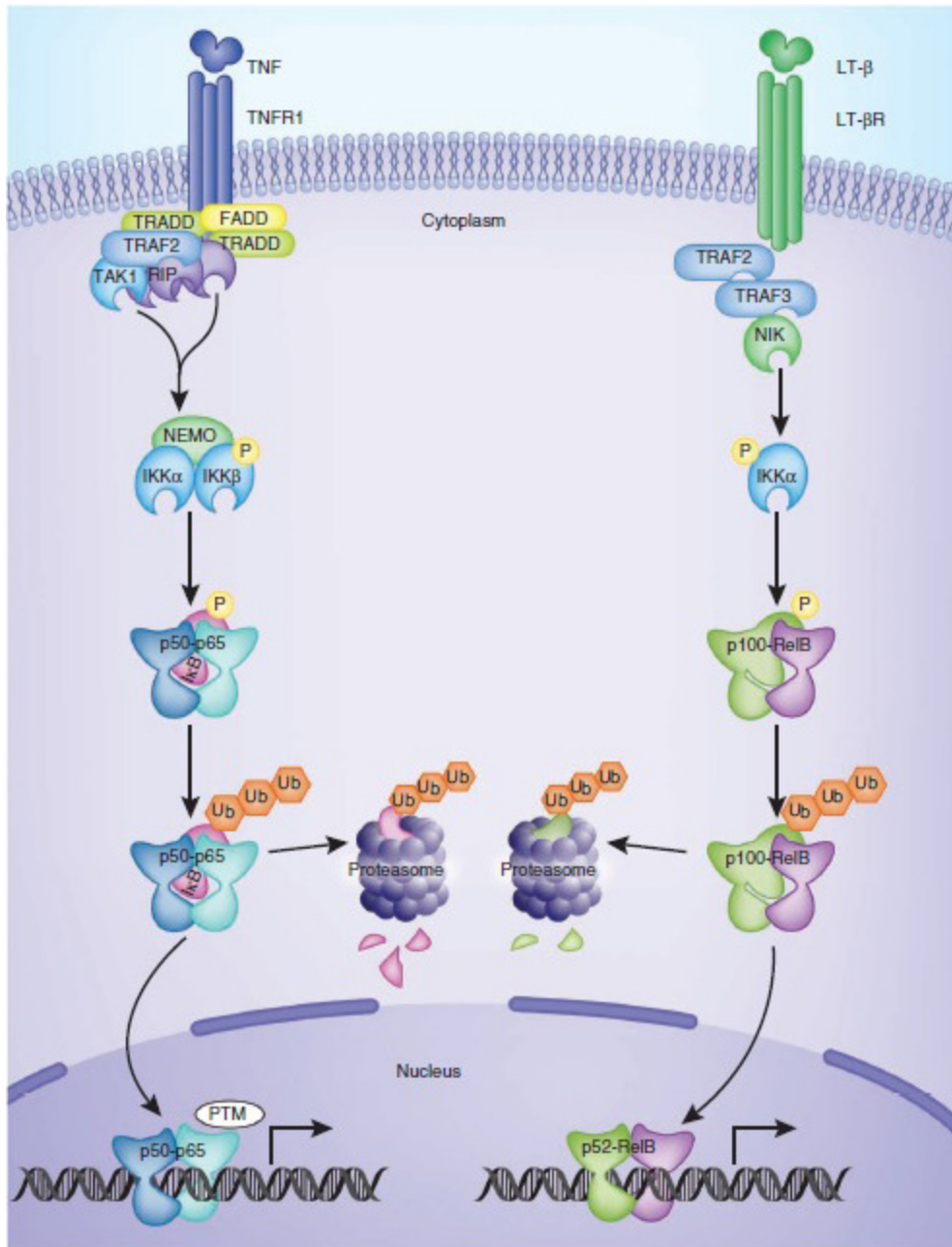
2.2.1 Ενεργοποίηση του NF-κB

Ο πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear Factor κB, NF-κB) ανακαλύφθηκε το 1986 (Sen and Baltimore 1986) και από τότε πλήθος μελετών έχουν πραγματοποιηθεί για το χαρακτηρισμό του. Αποτελεί διμερή πρωτεΐνων της οικογένειας Rel, οι οποίες περιλαμβάνουν μία συντηρημένη περιοχή ομολογίας Rel. Στα θηλαστικά, τα πέντε μέλη της οικογένειας, περιλαμβάνουν τις p50/p105 (NF-κB1), p52/p100 (NF-κB2), p65 (RelA), c-Rel και RelB. Τα διμερή του NF-κB τυπικά αποτελούνται από μία υπομονάδα p50/p105 ή p52/p100 σε σύμπλοκο με ένα άλλο μέλος της οικογένειας Rel, με πιο συχνή τη μορφή p65/p50 (Baldwin 1996).

Γενικά, τα διμερή του NF-κB αλληλεπιδρούν με μία παρεμποδιστική πρωτεΐνη κB (IκB), η οποία δρα ανασταλτικά για τη λειτουργία του. Με την αλληλεπίδραση αυτή καλύπτεται η αλληλουχία του πυρηνικού εντοπισμού του NF-κB, οπότε το τριμερές σύμπλοκο IκB/NF-κB παραμένει στο κυτταρόπλασμα και παρεμποδίζεται η μετακίνησή του στον πυρήνα, επομένως και η δράση του. Παρόλο που υπάρχουν επτά γνωστά μέλη της οικογένειας των IκB πρωτεϊνών, η ρύθμιση της ενεργότητας του NF-κB πραγματοποιείται πιο συχνά από τις δύο πιο κοινές ισομορφές IκBα και IκBβ.

Υπάρχουν γενικά τα αποκαλούμενα κανονικά και μη κανονικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB, ανάλογα με τα ερεθίσματα ενεργοποίησης και τα μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία περιγράφονται σχηματικά στην Εικόνα 2. Γενικά θα περιοριστούμε στην περιγραφή των κανονικών μονοπατιών σηματοδότησης (για τα μη κανονικά μονοπάτια σηματοδότησης βλέπε λεζάντα Εικόνας 2). Η ενεργοποίηση του NF-κB πραγματοποιείται με την απελευθέρωσή του από το ανενεργό σύμπλοκο που περιλαμβάνει την IκB πρωτεΐνη. Το παραπάνω επιτυγχάνεται με την φωσφορυλίωση του IκB από το σύμπλοκο IKK (Inhibitor of κB Kinase), ένα ετεροπολυμερές που αποτελείται κυρίως από τις καταλυτικές υπομονάδες IKKα και IKKβ, τη ρυθμιστική πρωτεΐνη NEMO και τη θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη 90 (Hsp 90) (Mercurio, Zhu et al. 1997; Zandi, Rothwarf et al. 1997; Yamaoka, Otsuka et al. 1998).

Διάφοροι παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν στην φωσφορυλίωση των δύο ρυθμιστικών σερινών (Ser32 και Ser36) ή τη φωσφορυλίωση της μονής ρυθμιστικής τυροσίνης (Tyr42) στο αμινοτελικό άκρο της IκB πρωτεΐνης. Η φωσφορυλίωση της IκB στις Ser32/Ser36 από την κινάση IKKβ (IκB kinase-β) αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB κατά την ισχαιμία μυοκαρδίου (Li, Kao et al. 2001; Onai, Suzuki et al. 2004). Τη φωσφορυλίωση του IκB ακολουθεί η ουμπικουϊτινυλίωσή του που αποτελεί και την απαραίτητη τροποποίηση προκειμένου να οδηγηθεί στο πρωτεάσωμα και να αποικοδομηθεί (Hayden and Ghosh 2004).



Εικόνα 2. Κανονικά και μη κανονικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB. Σε συνθήκες μη ενεργοποίησης τα διμερή του NF-κB παραμένουν προσδεδεμένα με τις παρεμποδιστικές πρωτεΐνες IκB, διατηρώντας τα ανενεργά σύμπλοκα του NF-κB στο κυτταρόπλασμα. Έπειτα από κάποιο ενεργοποιητικό ερέθισμα, δρομολογείται η αποδόμηση των IκB πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλιώσεων από το σύμπλοκο IKK κινασών, που περιλαμβάνει τις IKKα, την IKKβ, και μία ρυθμιστική υπομονάδα την IKKγ (NEMO). Η φωσφορυλίωση των IκB πρωτεϊνών τις οδηγεί σε στοχευμένη ουμπικουιλίνωση και αποδόμηση από το πρωτεάσωμα, απελευθερώνοντας έτσι τα

διμερή NF-κB να μετατοπιστούν στον πυρήνα. Συνήθως η σηματοδότηση του NF-κB διαχωρίζεται σε δύο τύπους μονοπατιών. Το κανονικό μονοπάτι (αριστερά) ενεργοποιείται από τα περισσότερα φυσιολογικά ερεθίσματα και αντιπροσωπεύεται στο σχήμα από το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω του TNFR1. Ενεργοποίηση του TNFR1 οδηγεί σε πρόσδεση του TRADD, το οποίο παρέχει μία πλατφόρμα πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες FADD και TRAF2. Η πρωτεΐνη TRAF2 αλληλεπιδρά με την RIP1 για την ενεργοποίηση των IKK κινασών. Κατά τη σηματοδότηση μέσω του κανονικού μονοπατιού, ο IκBα φωσφορυλιώνεται με τρόπο εξαρτώμενο από τις IKKβ και NEMO πρωτεΐνες, το οποίο οδηγεί σε μετατόπιση στον πυρήνα κυρίων ετεροδιμερών που περιέχουν την υπομονάδα p65 του NF-κB. Σε αντίθεση, τα μη κανονικά μονοπάτια σηματοδότησης του NF-κB ενεργοποιούνται από συγκεκριμένες κυτταροκίνες της οικογένειας TNF, όπως οι CD40L, BAFF και η λεμφοτοξίνη-β (LT-β) η οποία παρουσιάζεται στο σχήμα. Περιλαμβάνει φωσφορυλίωση από την κινάση IKKα των πρωτεϊνών p100 που αλληλεπιδρούν με την RelB, οδηγώντας σε μεταγραφικά ενεργά σύμπλοκα p52-RelB. Η ενεργοποίηση της IKKα και η φωσφορυλίωση της p100 εξαρτάται από την πρωτεΐνη NIK, η οποία ρυθμίζεται από τις TRAF3, TRAF2 και επιπλέον λιγάσες ουμπικουΐτινης. Η πρωτεΐνη του σχήματος LT-βR, αντιπροσωπεύει τον υποδοχέα της λεμφοτοξίνη-β. Από την ανασκόπηση των (Oeckinghaus, Hayden et al. 2011).

Ο TNF-α, όπως και άλλα μόρια που ρυθμίζουν τον NF-κB, ενεργοποιεί το σύμπλοκο IKK, το οποίο φωσφορυλιώνει τις σερίνες Ser32/Ser36 του IκBα και οδηγεί στην ουμπικουΐτινίωση και πρωτεολυτική αποικοδόμηση του IκB (Perkins 2000). Με τον τρόπο αυτόν απελευθερώνεται ο NF-κB και επιτρέπεται η μετάβασή του στον πυρήνα. Λιγότερα είναι γνωστά για τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης Tyr42 του IκBα ως απόκριση σε διάφορους παράγοντες ή ερεθίσματα (Bui, Livolsi et al. 2001). Επιπλέον, αν και είναι γνωστή η φωσφορυλίωση άλλων καταλοίπων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης του IκBα, οι θέσεις αυτές δεν έχουν σχετιστεί με την άμεση ενεργοποίηση του NF-κB (Baldwin 1996). Για την πλήρη ενεργοποίηση του NF-κB απαιτείται η φωσφορυλίωση των υπομονάδων του (μέσω διαφόρων κινασών όπως ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C και των MAPK πρωτεϊνικών κινασών).

2.2.2 Βασικές λειτουργίες του NF-κB

Η έκφραση περισσότερων από 200 γονιδίων ρυθμίζεται από τον παράγοντα NF-κB. Από την συνεχώς αυξανόμενη λίστα των μορίων τα οποία είναι γνωστό πως ρυθμίζονται από τον παράγοντα NF-κB δεν αποτελεί έκπληξη πως συμμετέχει σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών σε απόκριση διάφορων ερεθισμάτων ή καταστάσεων παθοφυσιολογίας. Ο NF-κB ενεργοποιείται σε απόκριση διαφόρων κυτταροκινών (όπως ο TNF-α και η ιντερλευκίνη 1), κάποιων βακτηριακών προϊόντων, αλλά και κάποιων παραγόντων στρες όπως η UV ακτινοβολία και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου. Από τις κύριες ομάδες γονιδίων που ρυθμίζονται από τον NF-κB είναι γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Baud and Karin 2001). Επιπλέον, ο NF-κB επάγει την ενεργοποίηση παραγόντων οι οποίοι σχετίζονται με την προστασία από την απόπτωση (Abu-Amer, Ross et al. 1998) αλλά και άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Γονίδια που ρυθμίζονται εν μέρει τουλάχιστον από τον παράγοντα NF-κB και σχετίζονται με το καρδιαγγειακό σύστημα περιλαμβάνουν μόρια που συμμετέχουν σε διεργασίες όπως παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO), βιοσύνθεση προσταγλανδινών, ρύθμιση ασβεστίου, λειτουργία των καρδιομυοκυττάρων, κυτταρική επιβίωση, απόπτωση, απόκριση στο στρες, ρύθμιση αυξητικών παραγόντων, οργάνωση εξωκυττάριας ουσίας, αναδόμηση ιστών και αντιοξειδωτικές διεργασίες (Brasier, Ron et al. 1990; Baldwin 1996; Hoffmann, Levchenko et al. 2002) (βλέπε παράγραφο «Θετικές δράσεις του TNF-α και άλλων κυτταροκινών στο μυοκάρδιο»).

Στην καρδιά, ο παράγοντας NF-κB εμπλέκεται στο μοντέλο βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Morishita, Sugimoto et al. 1997; Canty, Boyle et al. 1999; Sasaki, Galang et al. 1999; Maulik, Sasaki et al. 2000), στην “congestive” καρδιακή ανεπάρκεια (Gupta, Purcell et al. 2002), στην κατάσταση “preconditioning” του μυοκαρδίου (Maulik, Sato et al. 1998; Haudek, Spencer et al. 2001), στη μυοκαρδίτιδα (Satoh, Tamura et al. 1996), στην κατάσταση “unstable angina pectoris” (Ritchie 1998; Valen, Hansson et al. 2000), στη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (Kubota, McTiernan et al. 1997; Bryant, Becker et al. 1998; Sivasubramanian, Coker et al. 2001) και στην υπερτροφία μεμονωμένων καρδιοκυττάρων (Purcell, Tang et al. 2001; Gupta, Purcell et al. 2002; Higuchi, Otsu et al. 2002; Hirotsu, Otsu et al. 2002).

2.2.3 Ενεργοποίηση των JNK και p38MAPK κινασών

Ο TNF- α ενεργοποιεί διάφορες κινάσες της ομάδας των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από στρες (Stress Activated Protein Kinase) SAPK/c-Jun N-terminal kinase (JNK). Οι ισομορφές των JNK ενεργοποιούνται από διπλή φωσφορυλίωση σε θρεονίνη και τυροσίνη. Ακολουθεί η μεταφορά τους στον πυρήνα μετά την ενεργοποίησή τους, όπου ρυθμίζουν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο ATAF2 και ο cJun, φωσφορυλιώνοντας το αμινοτελικό τους άκρο (Chang and Karin 2001). Η cJun διμερίζεται για να σχηματίσει μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν προσδιοριστεί ως πρωτεΐνες-ενεργοποιητές (Activator Protein-1, AP-1). Οι πρωτεΐνες αυτές κατέχουν σημαντικό ρόλο σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως η διαφοροποίηση, η αναστολή της απόπτωσης και ο πολλαπλασιασμός. Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη TRAF2 διαμεσολαβεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των JNK από τον TNF- α , όπως έχει βρεθεί με μελέτες σε ποντίκια που εκφράζουν μια μεταλλαγμένη μορφή της TRAF2 ή δεν την εκφράζουν καθόλου (Reinhard, Shamooin et al. 1997). Αρκετές μελέτες επίσης συσχετίζουν την παρατεταμένη μεταβίβαση σήματος μέσω του JNK μονοπατιού με την ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών (Ham, Babij et al. 1995). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι ο ρόλος της JNK εξαρτάται από το ερέθισμα που πυροδοτεί την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού, αλλά και από το κυτταρικό σύστημα μελέτης.

Ο TNF- α μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση επιπλέον και του μονοπατιού των p38-MAPK κινασών, στο οποίο διαμεσολαβούν πολλά κοινά μόρια με τα δύο αυτά μονοπάτια. Οι p38 κινάσες, όπως και οι JNKs, φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι MEF2C και ATF2. Ο TNF- α έχει βρεθεί πως επάγει τη φωσφορυλίωση των p38 MAP κινασών (Baud and Karin 2001), η τελική δράση ωστόσο δεν έχει αποσαφηνιστεί καθώς στη βιβλιογραφία περιγράφονται μελέτες για την ενεργοποίηση τόσο αποπτωτικών όσο και αντι-αποπτωτικών μονοπατιών (Craig, Larkin et al. 2000; Grethe, Ares et al. 2004).

2.3 Ο ρόλος του TNF- α σε βιολογικές διεργασίες

Ο TNF- α είναι ευρέως μελετημένος παράγοντας και έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, παρουσιάζοντας πλειοτροπική δράση. Έχει βρεθεί πως ρυθμίζει αυτοκρινώς και παρακρινώς τα λεμφοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, λειτουργώντας ως ένας σημαντικός ρυθμιστής της ανοσολογικής απόκρισης (Banyer, Hamilton et al. 2000). Επιπροσθέτως, αυξάνει

την φαγοκυτταρική και κυτταροτοξική ικανότητα των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων, ενισχύει την χημειοταξία τους και οδηγεί στη δέσμευση λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο (leukostasis), επάγοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης λεμφοκυττάρων στις φλεγμονώδεις περιοχές (Rauchhaus, Koloczek et al. 2000).

Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του TNF- α , η περίσσεια του μορίου απελευθερώνεται στην κυκλοφορία, εφόσον η παραγωγή του υπερβαίνει τον αριθμό των υποδοχέων του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά την παρουσία του στο κυκλοφορικό ασκεί ενδοκρινείς και εξωκρινείς δράσεις επηρεάζοντας μεταβολικές διεργασίες, τη συνένωση μικροαγγείων, τη διεργασία του πυρετού, την υπόταση αλλά και τη σήψη (Dinarello, Cannon et al. 1986; Kwak, Larochelle et al. 1995).

Ο TNF- α μπορεί να οδηγήσει σε συγκεκριμένες και αρκετά διαφορετικές μεταξύ τους βιολογικές διεργασίες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο όπου ασκείται η δράση, τις ιδιότητες του συγκεκριμένου κυτταρικού συστήματος, την εκάστοτε παρουσία των υποδοχέων του, τη συγκέντρωσή του και τη διάρκεια δράσης του. Συμμετέχει στη ρύθμιση της αναδιαμόρφωσης των ιστών (tissue remodeling), η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική λειτουργία για την ομοιόσταση των οργάνων που περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, ο TNF- α μπορεί να επάγει άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων και των ινοβλαστών, επάγοντας τη σύνθεση αυξητικών παραγόντων, ενώ παράλληλα μπορεί να είναι κυτταροτοξικός για τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να οδηγεί στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, κολλαγενών, ενδιάμεσων ριζών οξυγόνου και μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (Tracey and Cerami 1989).

Όσον αφορά τις δράσεις του στα καρκινικά συστήματα, ο TNF- α επίσης παρουσιάζει αντιφατικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί πως τα επίπεδα έκφρασής του σχετίζονται ανάλογα με το βαθμό εξέλιξης του όγκου στον καρκίνο των ωοθηκών (Naylor, Stamp et al. 1993). Αντίθετα, η θεραπεία με TNF- α βελτίωσε την επιβίωση ποντικών με όγκο, ενώ παράλληλα παρακίνησε την προσκόλληση καρκινικών κυττάρων στο περιτόναιο (Malik, Naylor et al. 1990). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του TNF- α ή η μη ιστοειδική έκφρασή του μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα σε απόπτωση και νέκρωση.

2.4 TNF-α στην παθοφυσιολογία ανθρώπου

Ο παράγοντας TNF-α στην ανθρώπινη παθοφυσιολογία είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς έχει συνδεθεί με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών ή καταστάσεων που σχετίζονται με παθολογία, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Manicourt, Triki et al. 1993), το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Harel, Silva et al. 1993), η προεκλαμψία (Kupferminc, Peaceman et al. 1999), η απόρριψη μοσχευμάτων (Wu, Lovett et al. 1992) και η περιφερειακή εντερίτιδα (Sandborn, McLeod et al. 1999). Ο ρόλος του TNF-α είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και οι μηχανισμοί δράσης του αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας και, σε περιπτώσεις, επιστημονικής αντιπαράθεσης, όπως οι λειτουργίες του στα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου αλλά και σε επιβιωτικούς μηχανισμούς, ή στο ρόλο του στην καρδιακή παθοφυσιολογία, όπως συζητείται σε επόμενο κεφάλαιο.

2.4.1 Ο παράγοντας TNF-α στο μυοκάρδιο

Έχει πλέον καταρριφθεί η άποψη πως οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι δεν μπορούν να εκφράσουν TNF-α και πως τα μακροφάγα είναι κυρίως τα κύτταρα με την ικανότητα αυτή και αποτελούν τον πληθυσμό κυττάρων στον οποίο οφείλεται η ανίχνευσή του TNF-α σε σχεδόν όλα τα όργανα (Arras, Hoche et al. 1996). Στο μυοκάρδιο έχουν βρεθεί μόνιμοι πληθυσμοί μακροφάγων οι οποίοι είχαν θεωρηθεί ως πηγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένου και του TNF-α (Gurevitch, Frolkis et al. 1996). Η πρώτη συσχέτιση των επιπέδων του TNF-α που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος με την παθογένεση της καρδιακής ανεπάρκειας προέκυψε το 1990 (Levine, Kalman et al. 1990). Στη συνέχεια υπήρξαν αναφορές οι οποίες συσχέτιζαν το έμφραγμα του μυοκαρδίου με την αύξηση στην κυκλοφορία τόσο του TNF-α όσο και των υποδοχέων του (Latini, Bianchi et al. 1994).

Η ανακάλυψη πως τα μυοκαρδιοκύτταρα είναι ικανά να παράγουν TNF-α ως απόκριση στην ενδοτοξίνη (Kapadia, Lee et al. 1995), ήταν καταλυτική για την απόδειξη της προέλευσης του TNF-α στην καρδιά από τα ίδια τα μυοκαρδιοκύτταρα, εκτός των άλλων. Παράλληλα, μελέτες έδειξαν πως το υγιές μυοκάρδιο δεν εκφράζει TNF-α, όπως αναφέρθηκε παραπάνω γενικά για τις επαγόμενες από το στρες κυτταροκίνες, σε πλήρη αντίθεση με το μυοκάρδιο ασθενών στα τελευταία στάδια της καρδιακής ανεπάρκειας, όπου TNF-α εκφράζεται σε τεράστιες ποσότητες (Torre-Amione, Kapadia et al. 1996). Ακολούθησαν και άλλες μελέτες που τεκμηρίωσαν την αύξηση της έκφρασης του TNF-α από τα μυοκαρδιοκύτταρα σε περιπτώσεις

ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, εγκαύματος, εμφράγματος του μυοκαρδίου και καρδιοπνευμονικής παράκαμψης (cardiopulmonary bypass) (Gurevitch, Frolkis et al. 1996; Wan, DeSmet et al. 1996), όπως αναφέρθηκε και γενικά για τις επαγόμενες από το στρες κυτταροκίνες στην καρδιά.

Ως προς τις δράσεις των κυτταροκινών στο μυοκάρδιο, σε γενικό πλαίσιο έχουν σχετιστεί με αρνητικές επιπτώσεις. Ωστόσο, η μικρής διάρκειας, περιορισμένη έκφραση των κυτταροκινών που επάγονται ως απόκριση στο στρες μπορεί να οδηγήσει σε προστατευτικές δράσεις στην καρδιά έπειτα από περιβαλλοντικές βλάβες (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο), ενώ η έκφρασή τους για μακρές περιόδους ή σε παραπάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να επιφέρει καταστροφικές δράσεις στο μυοκάρδιο. Ενώ είναι πλέον ξεκάθαρο από μεγάλο αριθμό μελετών πως η έκφραση των προφλεγμονοδών κυτταροκινών απορυθμίζεται (για παράδειγμα συνεχώς) στην καρδιά σε μια πληθώρα παθοφυσιολογικών καταστάσεων, οι υπεύθυνοι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτή την απορύθμιση δεν είναι γνωστοί.

2.4.2 Αρνητικές δράσεις του TNF-α και άλλων κυτταροκινών στο μυοκάρδιο

Όπως αναφέρθηκε, οι στρες-επαγόμενες κυτταροκίνες, έχει βρεθεί πως ρυθμίζουν αρνητικά τη συστολική λειτουργία του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα για τον παράγοντα TNF-α, η επίδρασή συνοψίζεται στη μειωμένη συστολική ικανότητα του μυοκαρδίου, στην μειωμένη συστηματική αντίσταση των αγγείων, στο μειωμένο κλάσμα εξώθησης, στην υπόταση και τη διάταση των κοιλιών (Mann 2003).

Αρχικά παρατηρήθηκε πως κατά την επίδραση με ενδοτοτοξίνη, ο TNF-α είναι ο ρυθμιστής της κατάπτωσης του μυοκαρδίου (Tracey, Lowry et al. 1986). Συγκεκριμένα, η χορήγηση του TNF-α είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολική οξείδωση, την υπόταση, την υπεργλυκαιμία και υπερκαλιαιμία, την οξεία νέκρωση και τη φλεγμονή, ενδείξεις που συνηγορούν σε μειωμένη καρδιακή λειτουργία. Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε αργότερα πως η χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του TNF-α για να εξουδετερώσει την πρωτεΐνη της κυκλοφορίας, οδήγησε στην αναστροφή των αρνητικών του επιδράσεων (Tracey, Fong et al. 1987)

2.4.2.1 Μηχανισμοί συστολικής δυσλειτουργίας

Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία που περιγράφει τις αρνητικές ινοτρόπους δράσεις στη λειτουργία του ενήλικου μυοκαρδίου από τις

προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF, IL-2 και IL-6 (Finkel, Oddis et al. 1992; Yokoyama, Vaca et al. 1993; Mann 2003). Είναι ωστόσο ενδιαφέρον πως για την IL-1β δεν έχει περιγραφεί άμεση επίδραση στη συσταλτικότητα της καρδιάς (Finkel, Oddis et al. 1992). Στην ίδια μελέτη σε καρδιακό ιστό από χάμστερ, υψηλές συγκεντρώσεις του TNF-α (≥ 900 U/ml¹), του IL-2 (≥ 60 U/ml¹) και του IL-6 (≥ 500 U/ml¹) ήταν ικανές να επιφέρουν μία άμεση μείωση στη συσταλτικότητα της καρδιάς, η οποία αναστρεφόταν απόλυτα με την απομάκρυνση των κυτταροκινών. Το εύρημα αυτό πιστοποιήθηκε και σε κυτταρικό επίπεδο σε επόμενη μελέτη για τον TNF και τον IL-6, σε απομονωμένα καρδιακά κύτταρα αιλουροειδών και πτηνών. Στην αναφορά με τα απομονωμένα καρδιακά κύτταρα αιλουροειδούς προτάθηκε πως ο μηχανισμός των αρνητικών ινοτρόπων δράσεων στην καρδιακή λειτουργία σχετίζεται με την ενδοκυτταρική ομοιόσταση του ασβεστίου (Yokoyama, Vaca et al. 1993).

Είναι γνωστό πως η ομοιόσταση του ασβεστίου κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στον κύκλο συστολής και χαλάρωσης του μυοκαρδίου. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αρνητική επίδραση του TNF-α στον κύκλο αυτό αποτελεί πιθανή αιτιολογία των προβλημάτων που προκαλεί. Αμέσως μετά τη χορήγηση του TNF-α παρατηρήθηκε πως το εύρος του δυναμικού του ασβεστίου μειώθηκε κατά τη διάρκεια της συστολής. Το παραπάνω αποτελεί ένδειξη πως ο TNF-α μειώνει τη συστολική λειτουργία αναστέλλοντας την απελευθέρωση του ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (Yokoyama, Vaca et al. 1993). Πιο συγκεκριμένα, παρεμποδίζεται η εισροή ιόντων ασβεστίου από διαύλους επικοινωνίας με τον εξοκυτταρικό χώρο, μειώνοντας το δυναμικό (Krown, Yasui et al. 1995). Επιπλέον, ο TNF-α οδηγεί στην αύξηση της σφιγγοσίνης, με αποτέλεσμα να ρυθμίζει το δυναμικό του ασβεστίου και τη συστολική λειτουργία. Τέλος, το NO που παράγεται ως απόκριση στον TNF-α απευαισθητοποιεί τα μυοϊνίδια στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο (Kumar, Paladugu et al. 2007).

Ανάλογα με την ταχύτητα απόκρισης στην επίδραση του TNF-α ενεργοποιούνται δύο διακριτοί μηχανισμοί ρύθμισης της αρνητικής ινοτρόπου δράσης του. Κατά την πρώιμη φάση, η αντίδραση εκδηλώνεται μέσα σε λίγα λεπτά από την έκθεση στον TNF-α, ενώ κατά την όψιμη απαιτούνται ώρες έκθεσης στον TNF-α. Στην περίπτωση της πρώιμης φάσης παρατηρείται ταχεία αποικοδόμηση της σφιγγομυελίνης, ύστερα από την πρόσδεση του TNF-α στον TNFR1. Οι μεταβολίτες των σφιγγολιπιδίων στη συνέχεια δρουν ως δευτερογενή μηνυματοφόρα μόρια που εμπλέκονται στη μείωση του δυναμικού του ασβεστίου δεσμεύοντας τον υποδοχέα ρυανοδίνης (ryanodine), οπότε και παρεμποδίζεται η απελευθέρωση του ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (Dettbarn, Betto et al. 1994). Στην περίπτωση που παρεμποδιστεί η παραγωγή της σφιγγοσίνης, μειώνεται δραματικά η δυσλειτουργία

στη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου σε απόκριση στον TNF- α , το οποίο αποδεικνύει τη συσχέτιση της άμεσης παραγωγής της σφίγγωσίνης ύστερα από έκθεση στον TNF- α με τη διατάραξη της ομοιόστασης του ασβεστίου και τη δυσλειτουργία του μυοκαρδίου. Αντίστοιχα, η χορήγηση σφίγγωσίνης οδήγησε στην ίδια μείωση της συσταλτικότητας με τον TNF- α , με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της (Oral, Dorn et al. 1997).

Κατά την όψιμη φάση, η παραγωγή του NO ως απόκριση του TNF- α είναι υπεύθυνη για τη διατάραξη της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου. Ωστόσο το NO έχει αναφερθεί να παρουσιάζει καρδιοπροστατευτική δράση, κυρίως σε περιπτώσεις ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, επομένως η συμμετοχή του στη δυσλειτουργία της καρδιάς παραμένει αμφιλεγόμενη (Schluter, Weber et al. 1994; Keaney, Hare et al. 1996). Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί πως η υπερέκφραση του TNF- α οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της ATPάσης του σαρκο/ενδοπλασματικού δικτύου 2A, (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase, SERCA2A) η οποία είναι υπεύθυνη για την ομοιόσταση του ασβεστίου στο μυοκαρδιοκύτταρο (Kubota, Bounoutas et al. 2000).

2.4.2.2 Μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου

Ο όρος αναδιαμόρφωση (remodeling) του μυοκαρδίου και συγκεκριμένα αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας του μυοκαρδίου, έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει το πλήθος των αλλαγών που συμβαίνουν στο σχήμα, το μέγεθος και τη σύσταση της παθολογικής καρδιάς που δεν σχετίζονται με αύξηση του μήκους των σαρκομερών (Cohn 1995). Έχει δείξει εμφατικά πως ο TNF- α επάγει την αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου και συμβάλλει στη δυσλειτουργία του, μέσω αλλαγών που επιφέρει στην εξωκυττάρια ύλη. Η αρχική ένδειξη προήλθε από δείγματα μυοκαρδίου ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, όπου το κολλαγόνο τύπου I ήταν διασπασμένο (Weber, Pick et al. 1988), αλλά η πλειοψηφία των δεδομένων προέρχεται από μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν TNF- α (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο). Η διάσπαση αυτή του κολλαγόνου τύπου I που περιβάλλει τα καρδιομυοκύτταρα και τα διασυνδέει, οδηγεί σε μείωση στην ανάπτυξη της δύναμης στην καρδιά, καθώς επίσης σε αναδιοργάνωση ομάδων μυϊκών ινών (Factor and Robinson 1988; Weber, Jalil et al. 1989). Με τη χορήγηση TNF- α σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, παρατηρήθηκαν μεταβολές των διαστάσεων της αριστερής κοιλίας, οι οποίες συνοδεύτηκαν από προοδευτική αποικοδόμηση της εξωκυττάριας

ύλης (Bozkurt, Kribbs et al. 1998), ενώ και σε εθελοντές η επαγωγή του TNF- α οδήγησε σε 20% αύξηση του τελοδιαστολικού όγκου μέσα σε 5 ώρες (Suffredini, Fromm et al. 1989). Σε μοντέλα ποντικών με γενετική αποσιώπηση του γονιδίου του TNF- α όπου προκλήθηκε περίσφιξη της αορτής, παρουσιάστηκε βελτίωση στην υπερτροφία, στην απόπτωση, στη φλεγμονώδη απόκριση αλλά και στην ίνωση σε σύγκριση με ποντίκια μάρτυρες της μελέτης (Sun, Chen et al. 2007).

2.4.3 Θετικές δράσεις του TNF- α και άλλων κυτταροκινών στο μυοκάρδιο

Αναφορές στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν την άποψη πως μικρού επιπέδου έκφραση των προφλεγμονωδών μορίων, μπορεί να είναι προστατευτική για το μυοκάρδιο. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί πως η οικογένεια των προφλεγμονωδών μορίων που ρυθμίζουν το σύστημα απόκρισης της έμφυτης ανοσίας είναι φυλογενετικά αρχαία και επομένως είναι πιθανό να εξελίχθηκε στους οργανισμούς με σχετικά μικρό χρόνο ζωής (βλέπε Κεφάλαιο «Συζήτηση»). Επομένως, η ενεργοποίηση του συστήματος απόκρισης της έμφυτης ανοσίας δεν έχει σχεδιαστεί να παρέχει προσαρμοστικούς μηχανισμούς μακράς περιόδου στον οργανισμό. Όπως αναφέρεται και στην αντίστοιχη παράγραφο, συνεχής ή/και μεγάλων επιπέδων έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο μυοκάρδιο προκαλεί γενικά ιστική βλάβη και έντονες καρδιακές δυσλειτουργίες.

Η πρώτη μελέτη που έδειξε την ενδεχόμενη προστατευτική δράση των κυτταροκινών στο μυοκάρδιο ήταν η επίδραση του TNF σε αρουραίους που οδήγησε σε προστασία της καρδιάς από βλάβη μέσω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης *ex vivo* (Eddy, Goeddel et al. 1992). Έπειτα από βλάβη μέσω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης οι καρδιές των ζώων στις οποίες είχε προηγουμένως επιδράσει TNF είχαν περίπου 3 φορές μείωση στην ποσότητα απελευθέρωσης της δεϋδρογενάσης της λακτάσης (Eddy, Goeddel et al. 1992) και παρουσίασαν αύξηση στο ποσοστό επαναφοράς της πίεσης της αριστερής κοιλίας σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Nelson, Wong et al. 1995). Ο IL-1 μπορεί επίσης να προστατεύσει τις καρδιές αρουραίων από βλάβη μέσω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης *in vitro* (Terracio, Miller et al. 1988; Maulik, Engelman et al. 1993). Επακόλουθες *in vitro* και *ex vivo* μελέτες έχουν δείξει πως ο TNF σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης μπορεί να προστατεύσει τα μυοκαρδιοκύτταρα ενάντια στη βλάβη από ισχαιμία ή υποξία (Nakano, Knowlton et al. 1998), στην περίπτωση της ισχαιμικής προετοιμασίας (ischemic preconditioning) (Deuchar, Opie et al. 2007) και στην περίπτωση οξειδωτικού στρες ελεύθερων ριζών (Lecour, Rochette et al. 2005).

Επιπροσθέτως, κυτταροπροστατευτικές δράσεις όμοιες με αυτές του παράγοντα TNF μπορούν να προκύψουν έπειτα από ενεργοποίηση είτε του υποδοχέα τύπου 1 (p55, TNFR1) είτε του υποδοχέα τύπου 2 (p75, TNFR2), το οποίο προτείνει πως οι δράσεις αυτές εξαρτώνται από τους υποδοχείς αυτούς. Παρόλο που οι παραπάνω μελέτες δεν ταυτοποίησαν τους υπεύθυνους μηχανισμούς για τις δράσεις αυτές, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι γνωστό πως οδηγούν στην υπερέκφραση τουλάχιστον δύο από τις γνωστές ομάδες κυτταροπροστατευτικών πρωτεϊνών, τη δισμουτάση υπεροξειδίου του μαγγανίου (manganese superoxide dismutase, MnSOD) (Wong and Goeddel 1988; Eddy, Goeddel et al. 1992) και τις κυτταροπροστατευτικές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (heat shock proteins, HSPs) (Low-Friedrich, Weisensee et al. 1992; Nakano, Knowlton et al. 1996). Η επαγωγή της MnSOD είναι άμεση και συμβαίνει έπειτα από επίδραση χαμηλών επιπέδων TNF, σε συμφωνία με την άποψη του ομοιοστατικού ρόλου των χαμηλών επιπέδων των κυτταροκινών (Wong and Goeddel 1988).

Δεδομένου πως τα μυοκαρδιοκύτταρα βρίσκονται συνεχώς υπό την επίδραση ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι TNF και IL-1 μπορεί να κατέχει σημαντικούς ρόλους στην προστασία της καρδιάς από το οξειδωτικό στρες, ειδικά κατά τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Ο TNF έχει επίσης δειχθεί πως μπορεί να οδηγήσει στην υπερέκφραση της θερμοεπαγόμενης πρωτεΐνης 72 (HSP72) (Nakano, Knowlton et al. 1996), μία πρωτεΐνη που πιστεύεται πως προστατεύει την καρδιά από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Marber, Mestril et al. 1995; Plumier, Ross et al. 1995). Επιπλέον, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως οι TNF και IL-1β μπορούν να ενεργοποιήσουν το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (nuclear factor-kappa B), ο οποίος είναι καρδιοπροστατευτικός υπό συγκεκριμένες καταστάσεις, πιθανόν μέσω υπερέκφρασης ενός ή περισσότερων κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των MnSOD, τους κυτταρικούς παρεμποδιστές της απόπτωσης 1 και 2 (cellular inhibitors of apoptosis 1 and 2, c-IAP1 and c-IAP2) και μέλη της οικογένειας Bcl-2, συμπεριλαμβανομένων των Bcl-2, Bfl-1 και Bcl-xL (Wang, Mayo et al. 1998; Erl, Hansson et al. 1999; Lee, Palfrey et al. 1999; Narula, Pandey et al. 1999).

Ευρήματα άλλων μελετών έχουν δείξει παρόμοια δράση για την οικογένεια κυτταροκινών IL-6, που περιλαμβάνει την ιντερλευκίνη-6 (IL-6), τον παράγοντα παρεμπόδισης λευκαϊμίας (leukemia inhibitory factor, LIF), την καρδιοτροφίνη-1 (CT-1), την ιντερλευκίνη-11 (IL-11), τον νευροτροφικό ακτινωτό παράγοντα (ciliary neurotrophic factor, CNTF) και την ογκοστατίνη M (oncostatin M, OSM). Αυτές οι κυτταροκίνες ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των μυοκαρδιοκυττάρων, είτε μέσω ομοδιμερισμού των υποδοχέων gp130 είτε μέσω ετεροδιμερισμού των gp130 με άλλους

διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Συγκεκριμένα για την πρωτεΐνη CT-1, μελέτες έχουν δείξει πως παρεμποδίζει την απόπτωση που προκύπτει από τη στέρηση θρεπτικών παραγόντων σε απομονωμένα καρδιοκύτταρα νεογέννητων ζώων, μέσω ενός μονοπατιού που εξαρτάται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης MAPK (Nelson, Wong et al. 1995; Fujio, Kunisada et al. 1997).

Επιπλέον υποστηρικτικές για την ενδεχόμενη προστατευτική δράση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην καρδιά, είναι μελέτες σε ποντίκια με διατάραξη της σηματοδότησης των υποδοχέων προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Τα ομόζυγα ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα gp130 (Yoshida, Taga et al. 1996) πεθαίνουν μεταξύ της 12.5 εμβρυικής μέρας μέχρι τη γέννα. Οι κοιλίες του μυοκαρδίου σε αυτά τα ποντίκια αναπτύσσονται φυσιολογικά έως την εμβρυική μέρα 14.5, ωστόσο μετά την 16.5 μέρα τα *gp130^{-/-}* παρουσιάζουν σημαντικά υποπλαστική κοιλία, με ιδιαίτερα λεπτό τοίχωμα. Βάση και άλλων ευρημάτων σε ζωικά μοντέλα, είναι πιθανόν τα αναπτυξιακά προβλήματα της καρδιάς και η εμβρυική θνησιμότητα στα *gp130^{-/-}* ποντίκια να είναι αποτέλεσμα αιμοποιητικών ανωμαλιών και να σχετίζονται με την έλλειψη οξυγόνου και πως το μονοπάτι του gp130 υποδοχέα είναι ένα απαραίτητο μονοπάτι επιβίωσης των μυοκυττάρων που ενεργοποιείται ως απόκριση στο στρες.

Μελέτες σε ποντίκια με διπλή έλλειψη των υποδοχέων του TNF τύπου 1 και τύπου 2, έχουν δείξει πως αυτά τα ποντίκια εμφανίζουν αυξημένο μέγεθος εμφραγματικής βλάβης σε απόκριση σε ισχαιμία (Kurrelmeyer, Michael et al. 2000). Αντίθετα με τα *gp130^{-/-}* ποντίκια, τα *TNFR1^{-/-}TNFR2^{-/-}* παρουσιάζουν φυσιολογικό καρδιακό φαινότυπο υπό κανονικές συνθήκες χωρίς στρες, αλλά εμφάνισαν αύξηση στο μέγεθος της εμφραγματικής βλάβης έπειτα από οξεία περίσφιξη της στεφανιαίας αρτηρίας. Παρόλο που οι μελέτες αυτές δεν ταυτοποίησαν τους βιολογικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τις κυτταροπροστατευτικές δράσεις του TNF, η παρατήρηση πως η αποσιώπηση και των δύο υποδοχέων TNFR1 και TNFR2 ήταν απαραίτητη για την αύξηση της ιστικής βλάβης, υπονοεί πως οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούν ο καθένας σηματοδοτικά κυτταροπροστατευτικά μονοπάτια παρόμοιας δράσης. Παρότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταροπροστασίας που είναι κοινά μεταξύ των TNFR1 και TNFR2 δεν είναι γνωστά, είναι σημαντικό πως η ενεργοποίηση του NF-κB συμβαίνει μέσω και των δύο υποδοχέων (Rothe, Sarma et al. 1995), ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροπροστατευτικές δράσεις όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, ένας κοινός στόχος των μονοπατιών δύο υποδοχέων TNFR1 και TNFR2, ο σχετιζόμενος με τον υποδοχέα TNF παράγοντας 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2), προτάθηκε πως συμμετέχει στην κυτταροπροστασία του TNF στην καρδιά έπειτα από βλάβη

ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Burchfield, Dong et al. 2010). Ακόμα πιο πρόσφατα, η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε πως η δυσφερλίνη (dysferlin), μία εξωκυτταρική πρωτεΐνη επιδιόρθωσης της μεμβράνης που ενεργοποιείται από το ασβέστιο, ρυθμίζεται μεταγραφικά από τον παράγοντα NF-κB που ενεργοποιείται από το μονοπάτι που συμμετέχει ο TRAF2 και απαιτείται για την κυτταροπροστασία της σηματοδότησης του TRAF2 έπειτα από βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης (Tzeng, Evans et al. 2014).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, είναι πιθανόν πως οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες κατέχουν ρόλο στη ρύθμιση των αποκρίσεων του μυοκαρδίου στο στρες, παρέχοντας πρώιμα αντι-αποπτωτικά κυτταροπροστατευτικά σήματα που βοηθούν στην επιδιόρθωση και την αναδιαμόρφωση του ιστού έπειτα από βλάβες του μυοκαρδίου. Είναι σημαντικό όμως να σημειωθεί πως η καρδιοπροστατευτική δράση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και συγκεκριμένα του TNF-α δεν έχει πλήρως εδραιωθεί στην επιστημονική κοινότητα, καθώς οι πειραματικές ενδείξεις είναι πολύ λίγες σε σχέση με τις αρνητικές δράσεις του στο μυοκάρδιο και οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί της ενδεχόμενης καρδιοπροστασίας παραμένουν ανεξιχνίαστοι.

2.4.4 Αντι-TNF-α στρατηγικές θεραπείας σε κλινικές μελέτες

Τα δεδομένα από τις μελέτες του ρόλου των κυτταροκινών στην καρδιακή λειτουργία οδήγησαν στη θεώρηση πως η παρεμπόδιση της δράσης τους, ή η μείωση των επιπέδων έκφρασής τους στις περιπτώσεις παθολογίας του μυοκαρδίου, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί κλινικά σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Συγκεκριμένα η παρεμπόδιση της ενεργότητας του TNF-α απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εφόσον είχε επιδείξει ήδη επιτυχία στην κλινική, στη θεραπεία ανοσολογικών ασθενειών, κυρίως για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Οι ανταγωνιστές κυτταροκινών με τις εμπορικές ονομασίες Etanercept (ETA) και Infliximab (INF) ήταν οι πλέον διαδεδομένοι και με άδεια για κλινική εκμετάλλευση, ενώ είναι και οι δύο δραστικοί στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Reimold 2002). Το Etanercept, αποτελούμενο από ανασυνδυασμένο διαλυτό p75 υποδοχέα (TNFR1) προσδεδεμένο στην Fc περιοχή ανθρώπινης IgG, προσδένεται στον TNF-α και τον απενεργοποιεί. Το Infliximab αποτελείται από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο προσδένεται και στο διαλυτό και στο διαμεμβρανικό TNF-α παρεμποδίζοντας τη δράση τους.

In vitro και *in vivo* μελέτες για το Etanercept έδειξαν πως μπορεί να αναστρέψει κάποιες από τις καταστροφικές δράσεις του TNF-α (Karadia, Lee et al. 1995; Bozkurt, Kribbs et al. 1998). Στη συνέχεια διεξήχθησαν κλινικές μελέτες για την αξιολόγηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας του Etanercept στη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας (Deswal, Bozkurt et al. 1999; Bozkurt, Torre-Amione et al. 2001). Τα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης των Bozkurt και συνεργατών, παρότι ήταν ενθαρρυντικά καθώς έδειξαν βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας, θεωρήθηκαν προσωρινά και όχι ιδιαίτερα αξιόπιστα λόγω του μικρού αριθμού ασθενών και του μικρού χρόνου παρακολούθησης της πορείας της ασθένειας (3 μήνες μετά τη θεραπεία) (Bozkurt, Torre-Amione et al. 2001).

Για τη διαλεύκανση της κλινικής αξιοποίησης του Etanercept πραγματοποιήθηκαν δύο μεγαλύτερες κλινικές μελέτες, οι RENAISSANCE (randomized Etanercept North American Strategy to study antagonism of cytokines) and RECOVER (research into Etanercept cytokine antagonism in vascular dysfunction) (Anker and Coats 2002). Οι κλινικές μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε το Etanercept, οι ασθενείς είχαν χαρακτηριστεί με καρδιακή ανεπάρκεια τύπου III ή IV (σύμφωνα με την ταξινόμηση της New York Heart Association) και κλάσμα εξώθησης μικρότερο από 30% (βλ. ανασκόπηση (Khanna, McMahan et al. 2004)).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα για τη χρήση του Etanercept στη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας από τη μελέτη αυτή δεν ήταν θετικά, δεδομένου ότι ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών όχι μόνο δε βελτίωσε την κλινική του εικόνα, αλλά αντίθετα παρατηρήθηκε επιδείνωσή της. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης ATTACH για το Infliximab, μια οργανωμένη μεγάλη μελέτη με στόχο να χαρακτηρίσει την κλινική αξιολόγηση του μονοκλωνικού αυτού αντισώματος έναντι του TNF-α σε 150 ασθενείς με μέτρια έως έντονη καρδιακή ανεπάρκεια (Chung, Packer et al. 2003). Τα αποτελέσματα αυτών των κλινικών μελετών, μαζί με δεδομένα μελετών για τον αγγειακό ιστό, αποδεικνύουν τη δράση των αντισωμάτων αυτών στην παρεμπόδιση της βιοενεργότητας του TNF-α αλλά αποτυγχάνουν στη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, προτείνοντας πως η επαγωγή του TNF-α και ο ρόλος του στην παθοφυσιολογία είναι πιο πολύπλοκος από ότι θεωρούταν.

Εξήγηση για τα παραπάνω αποτελέσματα των κλινικών ερευνών δεν είναι ακόμα πλήρως χαρακτηρισμένη ερευνητικά. Έχουν διατυπωθεί υποθέσεις, όπως ότι η παραγωγή του TNF-α μπορεί να είναι ένα επιφανόμενο ή τελικά, να είναι μια απόκριση προσαρμοστικότητας του μυοκαρδίου με καρδιακή ανεπάρκεια. Η πλέον ενδιαφέρουσα άποψη είναι πως με την αναστολή της δράσης των κυτταροκινών στο μυοκάρδιο, παρεμποδίζονται και οι ενδεχόμενες θετικές, προσαρμοστικές δράσεις

τους στην καρδιακή φυσιολογία και βιολογία του καρδιοκυττάρου, όπως περιγράφηκαν εκτενώς στην αντίστοιχη παράγραφο. Επιπλέον λόγοι που μπορεί να ερμηνεύουν την αποτυχία χρήσης των θεραπειών αντι-κυτταροκινών, μπορεί να είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες, ή η επιλογή των ασθενών. Η αρχική εφαρμογή θα έπρεπε να γίνει σε ασθενείς με πιο προχωρημένου βαθμού καρδιακή ανεπάρκεια, οι οποίοι εμφανίζουν και υψηλότερες συγκεντρώσεις TNF-α. Επίσης υπάρχει η άποψη ότι το Etanercept μπορεί να είναι τοξικά σε συνδυασμό με άλλες αγωγές, ή μπορεί να δρα ως πρωτεΐνη μεταφορέας (carrier) η οποία σταθεροποιεί τον TNF-α και συμβάλλει με αυτόν τον τρόπο στη συσσώρευση ανοσοαντιδρώντος TNF-α στην περιφερική κυκλοφορία. Ο TNF-α που είναι συνδεδεμένος στο Etanercept δεν είναι ισχυρά προσκολλημένος, αλλά αποσπάται με πολύ ταχύ ρυθμό (~620 msec) (Suffredini, Reda et al. 1995). Το παραπάνω οδηγεί σε αύξηση της διάρκειας της βιοενεργότητας του TNF-α, με αποτέλεσμα να δρα ως ενεργοποιητικός ανταγωνιστής, προκαλώντας έτσι επιδείνωση της καρδιακής παθολογίας (Mann 2002).

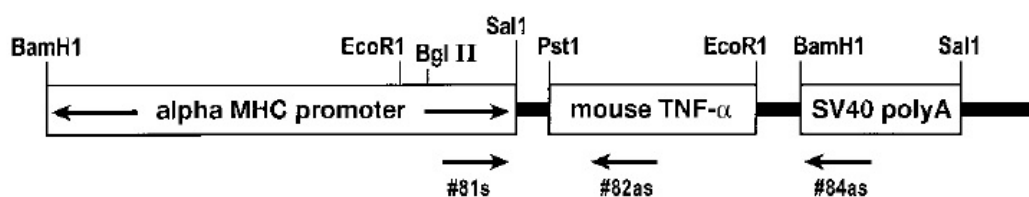
Πιο πρόσφατα, έχει προταθεί επίσης πως ο γενότυπος του γονιδίου του TNF-α στους ασθενείς μπορεί να σχετίζεται με τη διαφορετική απόκριση στη θεραπεία αντι-κυτταροκινών (βλ. ανασκόπηση (Javed and Murtaza 2013)). Δεδομένα για το παραπάνω έχουν προκύψει στην περίπτωση θεραπείας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας με το Infliximab, όπου ασθενείς με το γενότυπο 308G/G έχουν καλύτερη απόκριση στο φάρμακο από αυτούς με γενότυπους A/A ή A/G (Mugnier, Balandraud et al. 2003), αλλά η ενδεχόμενη συσχέτιση του γενετικού τύπου του TNF-α στην απόκριση ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια στη θεραπεία αντι-κυτταροκινών δεν έχει ακόμα μελετηθεί.

2.4.5 Διαγονιδιακά ποντίκια υπερέκφρασης TNF-α στην καρδιά – μοντέλα διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας

2.4.5.1 Μορφολογικά-Ιστολογικά Χαρακτηριστικά

Σημαντική πληροφορία για τις δράσεις του TNF-α στην καρδιά και το ρόλο του στην ανάπτυξη της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας προήλθε από μελέτες σε ποντίκια που υπερεκφράζουν τον TNF-α ιστοειδικά στο μυοκάρδιο, που δημιουργήθηκαν από διάφορες ερευνητικές ομάδες. Για τη δημιουργία των μοντέλων αυτών χρησιμοποιήθηκε ο καρδιο-ειδικός υποκινητής α -Myosin Heavy Chain (α MHC) (Εικόνα 3). Τα πρώτα ποντίκια που παράχθηκαν εμφάνισαν θνησιμότητα σε πολύ

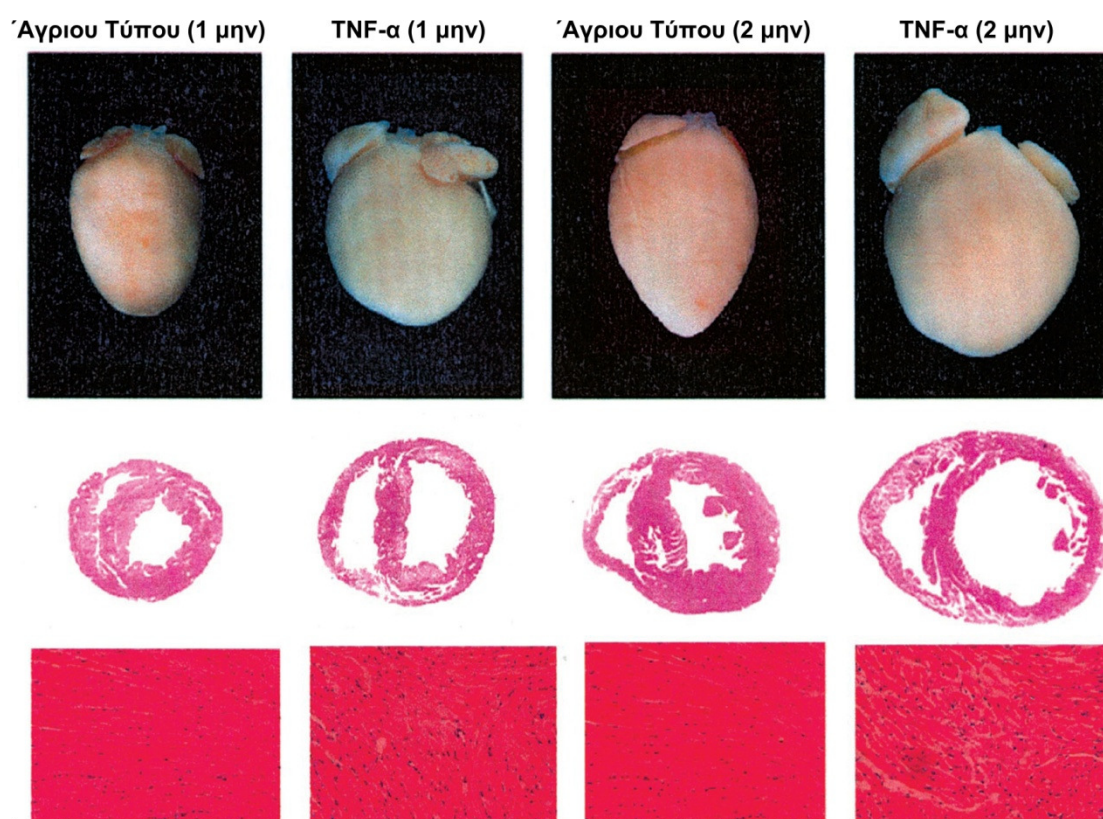
πρώιμα στάδια, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του TNF- α , εξαιτίας του μεγάλου αριθμού αντιγράφων που ενσωματώθηκαν στο γονιδιώμα τους. Κάποια από τα κύρια ιστολογικά χαρακτηριστικά των μυοκαρδίων των μοντέλων αυτών είναι ο φαινότυπος ομόκεντρης υπερτροφίας αρχικά και στη συνέχεια η εμφάνιση ίνωσης, η διάταση των κόλπων και των κοιλιών, η εκτεταμένη διήθηση φλεγμονωδών λεμφοκυττάρων σε κάποια μοντέλα και η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων (Kubota, McTiernan et al. 1997; Bryant, Becker et al. 1998).



Εικόνα 3. Στρατηγική κλωνοποίησης του διαγονιδίου καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF- α του μοντέλου MHCsTNF α . Το διαγονίδιο που κατασκευάστηκε αποτελείται από ένα τμήμα μεγέθους 5.5 kb του υποκινητή του γονιδίου *Myh6* (*a*-myosin heavy chain), με τη στρατηγική κλωνοποίησης που παρουσιάζεται στο σχήμα. Η ρυθμιστική αλληλουχία αυτή ελέγχει την έκφραση του γονιδίου του TNF- α (*Tnf*) ποντικού, μεγέθους 1.1 kb που κωδικοποιεί ολόκληρη την κωδική περιοχή και ένα τμήμα της 3'-μη μεταφράσιμης περιοχής του. Στη συνέχεια προστέθηκε ένα τμήμα μεγέθους 150 bp που περιέχει σήμα πολυαδενυλίωσης του SV40 για σταθερότητα του mRNA του διαγονιδίου. Εικόνα από (Li, Moody et al. 2000).

Ένα από τα πλέον διαδεδομένα διαγονιδιακά μοντέλα καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF- α είναι το “MHCsTNF α ” μοντέλο (Li, Moody et al. 2000), που δημιουργήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Mann. Ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό του μοντέλου είναι πως τα ποντίκια αυτά προσομοιάζουν την παθολογία των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, αφού εμφανίζουν υπερτροφία των μυοκαρδιοκυττάρων, διάταση των δύο κόλπων και των δύο κοιλιών, μυοϊνδιακή αταξία, διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων, αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ύλης με εναπόθεση κολλαγόνου, μειωμένη β -αδρενεργική απόκριση και πρώιμο θάνατο, με ένα ποσοστό 20-25% αυτών των ποντικών να πεθαίνει περίπου στην ηλικία των 6 μηνών.

Η συνεχής παρακολούθηση των ποντικών αυτών έδειξε υψηλού βαθμού κοιλιακό εκτοπισμό, με συχνή κοιλιακή ταχυκαρδία και αρρυθμογόνα περιστατικά, τα οποία μπορεί να αιτιολογήσουν μερικώς την πρόωμη θνησιμότητά τους (Feldman, Combes et al. 2000; Sivasubramanian, Coker et al. 2001). Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στους κόλπους, οι οποίοι παρουσιάζουν διαταραχές στην ομοιόσταση του ασβεστίου και δυσλειτουργία της συσταλτικότητας, εντείνοντας το πρόβλημα της κολπικής αρρυθμίας στην καρδιακή ανεπάρκεια (Saba, Janczewski et al. 2005). Με χρήση τεχνικών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας βρέθηκαν επίσης διαταραχές της υπερδομής των μιτοχονδρίων, όπως ανωμαλίες στη σύσταση, τη δομή και το μέγεθός τους.



Εικόνα 4. Παθολογικός φαινότυπος ιστολογίας και μορφολογίας του μοντέλου καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF-α. Μορφολογικός και ιστολογικός χαρακτηρισμός του μοντέλου υπερέκφρασης TNF-α στην καρδιά “MHCsTNFα” (Li, Moody et al. 2000). Παρουσιάζεται η εμφάνιση υπερτροφίας μετά τον πρώτο μήνα μετά τη γέννηση, η οποία ακολουθείται από έντονη διάταση των κόλπων και των κοιλιών (Sivasubramanian, Coker et al. 2001).

Η λειτουργία της καρδιάς των μοντέλων με καρδιο-ειδική υπερέκφραση TNF-α είναι σημαντικά διαταραγμένη, όπως βρέθηκε με μεθόδους υπερηχογραφίας του μυοκαρδίου (Εικόνα 4). Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν πάχυνση του οπίσθιου τοιχώματος και μειωμένη κλασματική βράχυνση κατά τον πρώτο μήνα, δημιουργώντας έναν υπερτροφικό φαινότυπο (Εικόνα 4). Οι μελέτες αυτές έδειξαν όπως αναφέρθηκε τη μετάβαση από την υπερτροφία στη διάταση από τον 1^ο στους 3 μήνες, ακολουθούμενη από τη συστολική δυσλειτουργία (Engel, Peshock et al. 2004; Haudek, Taffet et al. 2007), χαρακτηριστικά που μπορεί να παραλληλιστούν απόλυτα με την πορεία των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια. Στους 3 μήνες ζωής των ποντικών αυτών, παρατηρείται σημαντική λέπτυνση του οπίσθιου τοιχώματος, ενώ εμφανίζεται δραματική αύξηση της τελοδιαστολικής και τελοσυστολικής διαμέτρου του μυοκαρδίου. Η κλασματική βράχυνση είναι και σε αυτή την ηλικία μειωμένη που υποδηλώνει τη διαταραγμένη καρδιακή λειτουργία, η οποία οδηγεί στην πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας.

2.4.5.2 Μηχανισμοί μοριακής παθοφυσιολογίας

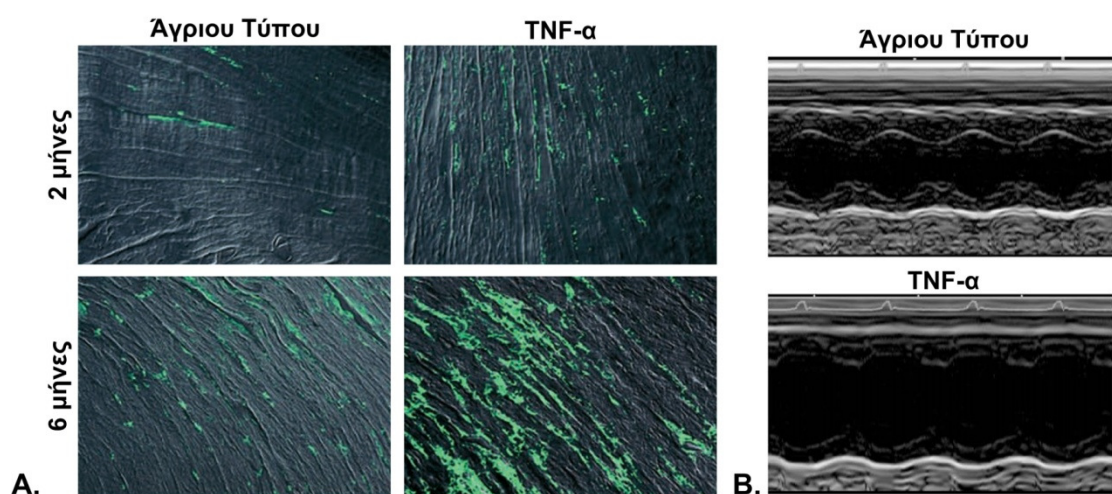
2.4.5.2.1 Μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης ιστού

Η αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου αποτελεί βασικό μηχανισμό της παθολογίας του μυοκαρδίου στα μοντέλα καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF-α. Τα ποντίκια αυτά χαρακτηρίζονται από μια σειρά μεταβολών σε μοριακό επίπεδο, όπως η έκφραση πρωτεϊνών του εμβρυϊκού σταδίου συμπεριλαμβανομένου του ANF (atrial natriuretic factor) και του βMHC, οι οποίες είναι δείκτες υπερτροφίας. Επιπλέον παρατηρείται επανέκφραση κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη 1β και η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (monocyte chemoattractant protein, MCP). Η αυξημένη ενεργότητα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 και 9 (matrix metalloprotease, MMP) και η αντίστοιχη μείωση στα επίπεδα των αναστολέων τους (TIMPs) κατά των πρώτο μήνα μετά τη γέννηση των διαγονιδιακών ποντικών αποτελεί κεντρικό μηχανισμό που οδηγεί στην αναδιαμόρφωση του ιστού.

Η εμφάνιση διάμεσης (interstitial) εναπόθεσης κολλαγόνου που παρατηρείται προοδευτικά από τον πρώτο μήνα και κατά τη διάρκεια ζωής των ποντικών (Sivasubramanian, Coker et al. 2001) (Εικόνα 5) αποτελεί χαρακτηριστικό του μηχανισμού παθοφυσιολογίας και είναι σε συμφωνία με την αναδιαμόρφωση του ιστού που συζητήθηκε παραπάνω. Η υπερέκφραση της MMP-2 στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α φαίνεται να είναι προστατευτική, καθώς αποσιώπηση του

γονιδίου της MMP-2 μειώνει την επιβίωση και οδηγεί σε επιδείνωση της καρδιακής ανεπάρκειας (Matsusaka, Ikeuchi et al. 2005).

Σημαντική είναι και η συμβολή του μονοπατιού του TGFβ στους μηχανισμούς παθοφυσιολογίας των μοντέλων αυτών. Στο MHCsTNFα μοντέλο βρέθηκε πως ο TNF-α αυξάνει τα επίπεδα του TGFβ (Sakata, Chancey et al. 2008), ο οποίος είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη μεταβίβαση σήματος που οδηγεί στην εναπόθεση κολλαγόνου. οδήγησε στον έλεγχο της υπόθεσης ότι το μυοκάρδιο που υπερεκφράζει TNF-α καταλήγει στην ενδιάμεση (interstitial) ίνωση μέσω του TGFβ.



Εικόνα 5. Εναπόθεση κολλαγόνου και διαταραχές στη καρδιακή λειτουργία των μοντέλων με καρδιο-ειδική υπερέκφραση TNF-α. A. Παρουσιάζεται με ανοσοφθορισμό για το κολλαγόνο τύπου I, η διάμεση εναπόθεση κολλαγόνου (πράσινο), στοιχείο της αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου MHCsTNFα. B. Ανάλυση υπερηχογραφίας, όπου η αύξηση της τελοδιαστολικής και τελοσυστολικής διαμέτρου στα ποντίκια που υπερεκφράζουν TNF-α σε σχέση με τα WT.

2.4.5.2.2 Μηχανισμοί απόπτωσης

Η συμβολή μηχανισμών που σχετίζονται με διεργασίες της απόπτωσης είναι βασική και έχει εκτενώς μελετηθεί στα μοντέλα καρδιοειδικής υπερέκφρασης TNF-α. Μελέτες στο μοντέλο MHCsTNFα έδειξαν πως τα ίδια τα καρδιοκύτταρα αποτελούν στόχο αποπτωτικών μηχανισμών (Engel, Peshock et al. 2004). Ο TNF-α είναι ικανός να ενεργοποιήσει πολλαπλά αποπτωτικά μονοπάτια στο μυοκάρδιο (Haudek, Taffet et al. 2007). Έχει δείχτει η ενεργοποίηση κυρίως αποπτωτικών μορίων όπως τα διάφορα μέλη της οικογένειας των κασπασών, το Fas, το Bax και το Bad, αλλά και αντι-

αποπτωτικών μορίων όπως τα Bcl-2, Bfl-1 και ο NF-κB (Kubota, Miyagishima et al. 2001). Στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α παρατηρείται έντονη απελευθέρωση κυτταροχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, αλλά και αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων των πρωτεϊνών Omi/HtrA2 και Smac/Diablo. Η υπερέκφραση Bcl-2 στο μυοκάρδιο των MHCsTNFα ποντικών οδηγεί σε σημαντική –αλλά όχι ολοκληρωτική– μείωση των ποσοστών απόπτωσης, ενώ παραμένει ενεργοποιημένη η κασπάση-8 και το Bid, οδηγώντας σε εναλλακτικό αποπτωτικό μονοπάτι (Haudek, Taffet et al. 2007).

Επιπροσθέτως, σε κάποια από τα μοντέλα καρδιοειδικής υπερέκφρασης TNF-α, βρέθηκε να παρουσιάζεται μυοκαρδίτιδα, η οποία χαρακτηρίστηκε από διάχυτη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στο μυοκάρδιο (Kubota, McTiernan et al. 1997; Bryant, Becker et al. 1998).

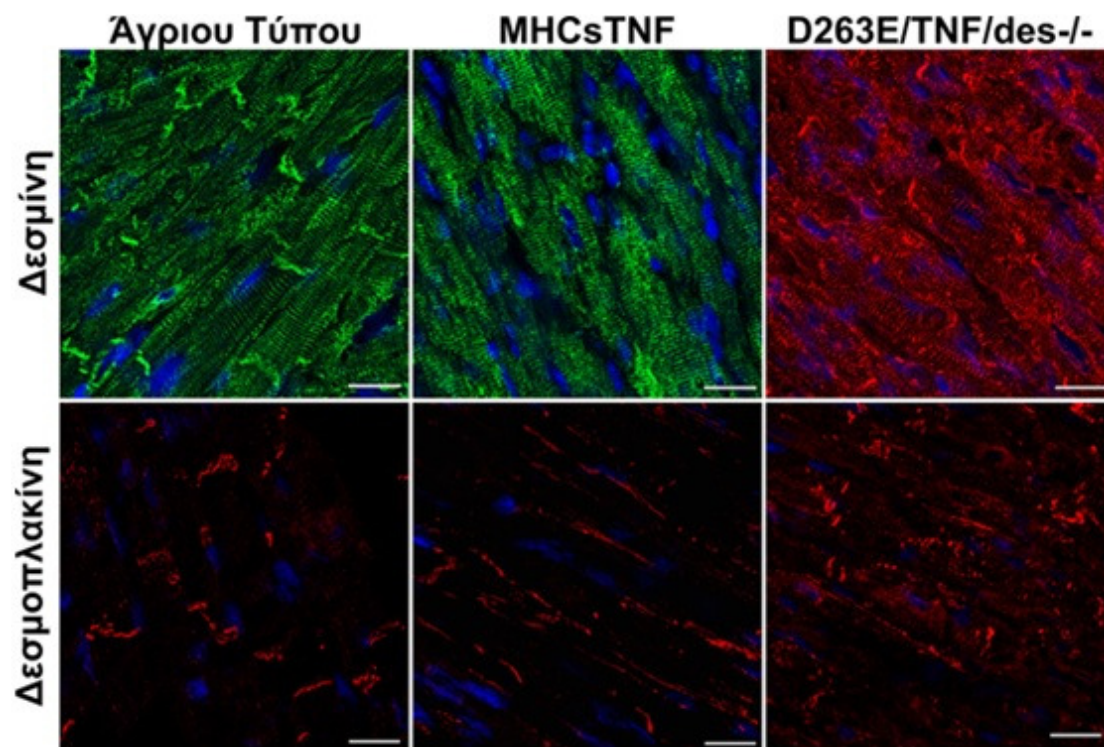
2.4.5.3 Διαταραχές στο δίκτυο κυτταροσκελετού της δεσμίνης

2.4.5.3.1 Ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης αποτελεί κύριο στόχο του μηχανισμού καρδιακής παθολογίας του TNF-α.

Όπως συζητείται εκτεταμένα στο αντίστοιχο κεφάλαιο, ο κυτταροσκελετός των κυτταροπλασματικών ενδιάμεσων ινιδίων των καρδιοκυττάρων αποτελείται κυρίως από την πρωτεΐνη δεσμίνη. Η φυσιολογική οργάνωση και ρύθμιση της δεσμίνης είναι πρωταρχικής σημασίας για την ομοιόσταση του καρδιοκυττάρου σε διάφορα επίπεδα, από την οργάνωση της γενικότερης αρχιτεκτονικής των οργανιδίων έως την εξειδικευμένη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών, σημαντικών για την επιβίωση των καρδιοκυττάρων.

Μελέτη των ιδιοτήτων της δεσμίνης στο διαγονιδιακό μοντέλο καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF-α (MHCsTNF) κατέδειξε μια εξαιρετικά σημαντική δράση του παράγοντα TNF-α στα καρδιοκύτταρα, τη διατάραξη του δικτύου της δεσμίνης (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Συγκεκριμένα, η δεσμίνη στα καρδιοκύτταρα των MHCsTNF ζώων εμφανίζεται σε συσσωματώματα που περιέχουν τη θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη HSP25 και παρουσιάζει διαταραγμένο πρότυπο εντόπισης, απουσιάζοντας σε μεγάλο βαθμό από τους εμβόλιμους δίσκους (Εικόνα 6). Επιπλέον, πρωτεΐνες που αποτελούν κύρια συστατικά των εμβόλιμων δίσκων εμφανίζονται επίσης διαταραγμένες στα MHCsTNF καρδιοκύτταρα. Η δεσμοπλακίνη, η β-κατενίνη και η κονεξίνη-43 εμφανίζει ένα μη φυσιολογικό πρότυπο εντόπισης πλαγίως των καρδιομυοκυττάρων, ενώ απουσιάζουν από τους εμβόλιμους δίσκους όπως και η

δεσμίνη. Μελέτη της υπερδομής των μυοκαρδιοκυττάρων των MHCsTNF ποντικών επίσης κατέδειξε την αποδιοργάνωση των εμβόλιμων δίσκων.



Εικόνα 6. Το δίκτυο της δεσμίνης είναι διαταραγμένο στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α λόγω της πρωτεόλυσής της. Ανοσοφθορισμός σε καρδιές ποντικών MHCsTNF, D263E MHCsTNF α *Des*^{-/-} και ποντικών άγριου τύπου για τη δεσμίνη και τη δεσμοπλακίνη. Η D263E δεσμίνη διατηρεί, εν μέρει, την παρουσία της στους εμβόλιμους δίσκους στο MHCsTNF μυοκάρδιο, όπως και η δεσμοπλακίνη, σε σύγκριση με τη διαταραγμένη εντόπισή τους στο MHCsTNF μυοκάρδιο. Μπάρα κλίμακας: 20 μ m. Από (Panagoroulou, Davos et al. 2008).

Στην ίδια μελέτη, αποδείχθηκε πως η διατάραξη του δικτύου της δεσμίνης στα MHCsTNF καρδιοκύτταρα οφείλεται στην πρωτεόλυσή της από την κασπάση 6 στη θέση 263 της αμινοξικής αλληλουχίας (Panagoroulou, Davos et al. 2008), όπου αποτελεί γνωστό σημείο πρωτεόλυσης από την κασπάση. Πιο σημαντικό όμως είναι το εύρημα πως η συγκεκριμένη τροποποίηση της δεσμίνης που προκαλεί η υπερέκφραση του TNF- α είναι επίσης υπεύθυνη, εν μέρει τουλάχιστον, για την ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, η δημιουργία ενός

διαγονιδιακού μοντέλου με μεταλλαγμένο μόριο δεσμίνης, ανθεκτικό στην πρωτεόλυση από την κασπάση λόγω σημειακής μετάλλαξης (D263E δεσμίνη) έδειξε πως αναστρέφει σε κάποιο βαθμό τον παθολογικό φαινότυπο του MHCsTNF μοντέλου (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Τα MHCsTNF D263E *Des*^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία σε σύγκριση με τα MHCsTNF, ενώ η δεσμίνη που δεν πρωτεολύεται από την κασπάση 6 εμφανίζεται σε μεγάλο βαθμό φυσιολογικά στους εμβόλιμους δίσκους και παρουσιάζει εμφανώς λιγότερα συσσωματώματα (Εικόνα 6).

Επιπλέον μειώνεται το ποσοστό των αποπτωτικών καρδιομυοκυττάρων στο μοντέλο αυτό, παρεμποδίζεται η λέπτυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας και βελτιώνεται η οργάνωση των εμβόλιμων δίσκων, με τη δεσμοπλακίνη και τη β-κατενίνη να εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό σε αυτούς. Τα παραπάνω ευρήματα καταδεικνύουν έναν κεντρικό ρόλο του μορίου της δεσμίνης στο μηχανισμό ανάπτυξης καρδιακής ανεπάρκειας λόγω μεγάλων επιπέδων υπερέκφρασης του παράγοντα TNF-α.

3 Δίκτυα κυτταροσκελετού

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά κυτταροσκελετικών δικτύων

Από τα κυρίαρχα συστατικά των κυττάρων, τα κυτταροσκελετικά δίκτυα αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως ιδιαίτερα σημαντικά λειτουργικά συστήματα, επιπλέον του ρόλου τους στην αρχιτεκτονική του κυττάρου. Τρεις είναι οι βασικοί τύποι κυτταροσκελετικών δικτύων: οι μικροσωληνίσκοι, τα ενδιάμεσα ινίδια και τα μικροϊνίδια της ακτίνης (Lazarides 1980; Steinert and Parry 1985; Fuchs and Weber 1994).

Οι μικροσωληνίσκοι διαμορφώνουν δίκτυα επιμήκων κυλίνδρων με μήκος που κυμαίνεται από 200 nm έως 25 μm και διάμετρο 25 nm. Συγκροτούνται από 13 πρωτοϊνίδια που είναι πολυμερή των διμερών α και β τουμπουλίνης, ενώ η περιοχή οργάνωσής τους ονομάζεται κεντροσωμάτιο. Το δίκτυο μικροσωληνίσκων συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως αυτές της κυτταρικής κίνησης, της μίτωσης και της μεταφοράς κυστιδίων και οργανιδίων (Wittmann and Desai 2005).

Τα μικροϊνίδια της ακτίνης αποτελούν ελικοειδή πολυμερή της πρωτεΐνης ακτίνης. Έχουν διάμετρο περίπου 7 nm και οργανώνονται σε μια ποικιλία δομών, ως γραμμικές δέσμες ή και τρισδιάστατα αλληλεπικαλυπτόμενα συστήματα. Τα ινίδια ακτίνης εντοπίζονται ιδιαίτερα κάτω ακριβώς από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ είναι διασκορπισμένα σε ολόκληρο το κύτταρο και ευθύνονται κυρίως για τη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και την απορρόφηση τάσεων. Έχουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία του κυττάρου με τον εξωκυττάριο χώρο, σε κάποιες διακυτταρικές συνδέσεις καθώς και στην κυτταρική κίνηση. Επιπλέον στο μυϊκό κύτταρο, αποτελούν κύριο συστατικό της συσταλτικής συσκευής των σαρκομεριδίων, ρυθμίζοντας τη σύσπαση των μυών (Delon and Brown 2007).

Η ακτίνη και η τουμπουλίνη, οι πρωτεΐνες που σχηματίζουν τα ινίδια ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους αντίστοιχα, είναι ιδιαίτερα συντηρημένες πρωτεΐνες. Τα ινίδια ακτίνης και οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν «τοπολογικά κλειστά» πολυμερή, καθώς χαρακτηρίζονται από ένα χαρακτηριστικό πρότυπο πολικότητας με ένα άκρο ταχέως πολυμερισμού και ένα άκρο αργού πολυμερισμού. Αυτή η πολικότητα είναι απαραίτητη για τη χρησιμότητά τους ως πλατφόρμες για πρωτεΐνες-κινητήρες σε διεργασίες μεταφοράς αντίθετων κατευθύνσεων. Σε αντίθεση, τα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροπλάσματος σχηματίζουν ευέλικτα δίκτυα χωρίς πολικότητα, με χαρακτηριστικές ιδιότητες.

Τα ενδιάμεσα ινίδια έχουν κατά μέσο όρο διάμετρο 10-12 nm, δηλαδή ανάμεσα της διαμέτρου των μικροϊνιδίων ακτίνης και αυτής των μικροσωληνίσκων. Συγκροτούν μια μεγάλη και ιδιαίτερα ετερογενή οικογένεια πρωτεϊνών, αφού δομούνται από διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες με διακριτές ιδιότητες. Ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό των ενδιάμεσων ινιδίων είναι πως παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση, η οποία επιπλέον ρυθμίζεται αναπτυξιακά, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων και των μικροϊνιδίων (Lazarides 1980; Fuchs and Weber 1994). Η οργάνωσή τους ρυθμίζεται από πολύπλοκους μηχανισμούς οι οποίοι μελετώνται έως σήμερα, ενώ μέλη της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων συμμετέχουν στη συγκρότηση του πυρηνικού σκελετού. Οι λειτουργίες των ενδιάμεσων ινιδίων είναι πολυάριθμες και συμμετέχουν σε πληθώρα διεργασιών κατέχοντας κεντρικούς ρόλους, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Λεπτομερής ανάλυση και παραδείγματα λειτουργιών των ενδιάμεσων ινιδίων περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους.

Σε αντίθεση με παλαιότερες απόψεις, ο κυτταροσκελετός δεν είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των ευκαρυωτικών κυττάρων μόνο, καθώς πρόσφατα έχει πιστοποιηθεί η παρουσία ομόλογων πρωτεϊνών σε προκαρυωτικά κύτταρα για όλους του τύπους των ινιδίων του κυτταροσκελετού (Pogliano 2008).

4 Κυτταροσκελετός των Ενδιάμεσων Ινιδίων

4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων αποτελούν τα δομικά συστατικά των σκελετικών ινιδίων με μέσο όρο διαμέτρου μεγαλύτερο από αυτόν των ινιδίων ακτίνης και μικρότερη από αυτόν των μικροσωληνίσκων. Τα ενδιάμεσα ινίδια εκφράζονται σε ένα πρότυπο ειδικό για τον ιστό και το κυτταρικό διαμέρισμα (Fuchs and Cleveland 1998; Ku, Zhou et al. 1999) και χωρίζονται σε 5 κύριους τύπους βάσει των ομοιοτήτων τους στην αμινοξική αλληλουχία και στην πρωτεϊνική τους δομή. Οι τύποι I-IV σχηματίζουν τα κυτταροπλασματικά ενδιάμεσα ινίδια, ενώ οι πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων τύπου V σχηματίζουν τις πυρηνικές λαμίνες (Πίνακας 1).

Η έλλειψη δομικής πολικότητας, το πρότυπο συγκρότησης και ανακύκλωσής τους μέσα στα κύτταρα, η απουσία της υδρόλυσης ως τρόπου ρύθμισης της δυναμικής των ινιδίων τους και η σύνδεσή τους με σημαντικές δομές κυτταρικής προσκόλλησης, είναι στοιχεία που ξεχωρίζουν τα ενδιάμεσα ινίδια από τα μικροϊνίδια της ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους (Fuchs and Weber 1994). Σε αντίθεση με τους άλλους τύπους δικτύων κυτταροσκελετού, τα μέλη της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων, τα οποία κωδικοποιούνται από 70 γονίδια στον άνθρωπο (Szeverenyi, Cassidy et al. 2008), παρουσιάζουν πολύ διαφορετικές αμινοξικές αλληλουχίες, αλλά ένα κοινό πρότυπο δομικής οργάνωσης (Szeverenyi, Cassidy et al. 2008). Επιπλέον, έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα ένας αυξανόμενος αριθμός ισομορφών συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων λόγω εναλλακτικού ματίσματος RNA (Hol, Roelofs et al. 2003). Οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση κατά την ανάπτυξη, παράλληλα διαφορετικών κατευθύνσεων της διαφοροποίησης, αποδεικνύοντας πως κατέχουν συγκεκριμένες ιστο-ειδικές ιδιότητες (Lazarides 1982; Hesse, Magin et al. 2001).

Το ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό της ιστοειδικότητας των ενδιάμεσων ινιδίων έχει ως αποτέλεσμα για παράδειγμα στα επιθηλιακά κύτταρα να εκφράζεται μία ετερογενής ομάδα κερατινών (λεπτομερής ανάλυση της βιολογίας των κερατινών ακολουθεί στην αντίστοιχη παράγραφο), ενώ η βιμεντίνη (vimentin) να αποτελεί την κυρίαρχη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων στο μεσέγγυμα, στα ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα. Επιπλέον ο κυτταροσκελετός των μυοβλαστών, εκτός των πρωτεϊνών των σαρκομερών αποτελείται κυρίως από ενδιάμεσα ινίδια, με κύριες πρωτεΐνες τη δεσμίνη, τη συνκοιλίνη (syncoilin) και τη συνεμίνη (synemin) και τα νευρικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ενδιάμεσα ινίδια να χαρακτηρίζονται από

συμπλέγματα ενδιάμεσων ινιδίων της τριπλέττας των νευροϊνιδίων (NF-L, NF-M, NF-H - Neurofilament Light, Medium, Heavy) και της α -ιντερνεξίνης (α -internexin) (Herrmann, Bar et al. 2007).

Οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων δικτύων αποτελούν κυρίαρχα κυτταροσκελετικά συστήματα σε όλους τους οργανισμούς μεταζώων, όπως αποκαλύφθηκε από σχετικές μελέτες. Έτσι, πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων παρατηρούνται σε απλούς ζωικούς οργανισμούς όπως ο θαλάσσιος σπόγγος *Hydra* και ο νηματώδης *Caenorhabditis*. Συγκεκριμένα για τα ευρέως διαδεδομένα πειραματικά μοντέλα, ο *Caenorhabditis elegans* έχει τουλάχιστον 12 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων, η *Drosophila melanogaster* στερείται κυτταροπλασματικών ενδιάμεσων ινιδίων, ενώ έχει 2 γονίδια που κωδικοποιούν τις πυρηνικές λαμίνες και τέλος η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* πιστεύεται ότι δεν έχει καμία τέτοια πρωτεΐνη (Erber, Riemer et al. 1999; Karabinos, Schmidt et al. 2001). Είναι ενδιαφέρον πως ο αριθμός των γονιδίων ενδιάμεσων ινιδίων αυξάνεται παράλληλα με την εξέλιξη των οργανισμών.

Τα ενδιάμεσα ινίδια από την άλλη, δεν εκφράζονται στα φυτά και τους μύκητες. Πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελεί η ύπαρξη της δομής του κυτταρικού τοιχώματος στα αντίστοιχα κυτταρικά συστήματα, επομένως δεν υπήρξε ανάγκη να αναπτύξουν εναλλακτικούς τρόπους μηχανικής σταθεροποίησης δομών, όπως τα κύτταρα των ζωικών οργανισμών που στερούνται κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον, τα ζώα χρειάζονται μυσ για μια πληθώρα βασικών δραστηριοτήτων όπως η κυκλοφορία του αίματος, η αναπνοή, η περισταλτική κίνηση του εντέρου και η μετακίνηση. Επιπλέον η ύπαρξη κυτταροπλασματικών διαφοροποιήσεων που επιτρέπουν τη διακυτταρική σύνδεση και επικοινωνία όπως οι χασματοσύνδεσμοι, τα δεσμοσώματα, οι σύνδεσμοι πρόσδεσης και οι στενοσύνδεσμοι αποτελούν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ζωικών κυττάρων. Αυτοί οι σύνδεσμοι, μαζί με τα ενδιάμεσα ινίδια των μεταζώων, αλλά και με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που διασυνδέουν, δημιουργούν ένα διακυτταρικό δίκτυο συνδέοντας τα μεμονωμένα κύτταρα σε ιστούς (Lazarides 1980).

4.2 Ενδιάμεσα ινίδια του πυρήνα

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που διαχωρίζει τα ενδιάμεσα ινίδια από τα άλλα δίκτυα κυτταροσκελετού, είναι πως τα πιο σύγχρονα μετάζωα παρουσιάζουν δύο παράλληλα δίκτυα ενδιάμεσων ινιδίων, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Το πυρηνικό δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων στα μεσοφασικά κύτταρα σχηματίζει ένα πολύπλοκο πλέγμα, που αποτελείται από τις λαμίνες A, C, B1 και B2 (lamin A,

lamin C, lamin B1, και lamin B2) (Stuurman, Heins et al. 1998). Το πλέγμα αυτό εντοπίζεται κυρίως στον πυρηνικό φάκελο και διασυνδέει λειτουργικά πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, συμπλέγματα πυρηνικών πόρων και πρωτεΐνες ετεροχρωματίνης (Burke and Stewart 2002; Guelen, Pagie et al. 2008). Το πυρηνικό δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων διασυνδέεται άμεσα με τα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροπλάσματος μέσω των πλεκτινών και πρωτεϊνών αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες της εσωτερικής και εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, όπως η nesprin-3a και οι πρωτεΐνες Sun (Ketema, Wilhelmsen et al. 2007).

Κατά τη μίτωση, το σύστημα των λαμινών αποδιοργανώνεται μέσω της δράσης των μιτωτικών κινασών, ενώ τα κυτταροπλασματικά δίκτυα ενδιάμεσων ινιδίων από-πολυμερίζονται μόνο σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Heald and McKeon 1990). Ενδιαφέρον παρουσιάζει μία δομή συγκεκριμένου τύπου λαμινών, της λαμίνης B2, η οποία αναδιοργανώνεται και ενσωματώνεται σε έναν υποστηρικτικό μηχανισμό της μιτωτικής ατράκτου, που ονομάζεται «spindle matrix» (Tsai, Wang et al. 2006).

Οι λαμίνες σχηματίζουν δίκτυα σε *in vitro* συνθήκες κάπως διαφορετικά από αυτά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων. Για παράδειγμα, παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό επαναλαμβανόμενο μοτίβο μεγέθους άξονα 24 nm). Με αργό αλλά στοχευμένο τρόπο, η οργάνωση των επαναλαμβανόμενων δομών της λαμίνης σε δίκτυα προχωρεί οδηγώντας στο σχηματισμό χαρακτηριστικών παρακρυσταλλικών ινιδίων (Heitlinger, Peter et al. 1991; Stuurman, Heins et al. 1998).

4.3 Δομική οργάνωση ενδιάμεσων ινιδίων

Με λεπτομερή σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας στα ανώτερα σπονδυλωτά, οι ερευνητές έχουν ταξινομήσει τις πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων σε 6 ομάδες βάσει της ομολογίας στην αλληλουχία τους (sequence homology classes, SHCs). Ο τύπος I αποτελείται από τις όξινες κερατίνες και ο τύπος II από τις βασικές κερατίνες. Η βιμεντίνη, η δεσμίνη, η GFAP (glial fibrillary acidic protein), η περιφερίνη (periferin) ανήκουν στον τύπο III, ενώ οι νευροϊνιδιακές πρωτεΐνες NF-L, NF-M, NF-H (Neurofilament Light, Medium, Heavy) και η α-ιντερνεξίνη (α-internexin), καθώς επίσης η συνεμίνη και η νεστίνη (nestin) ανήκουν στα ενδιάμεσα ινίδια τύπου IV. Τέλος οι πυρηνικές λαμίνες στα τύπου V ενδιάμεσα ινίδια και ο τύπος VI αποτελείται από δύο πρωτεΐνες των φακών του ματιού, τις Bfsp1, που επίσης είναι γνωστή και ως φιλεσίνη (filensin) και την Bfsp2, γνωστή και ως

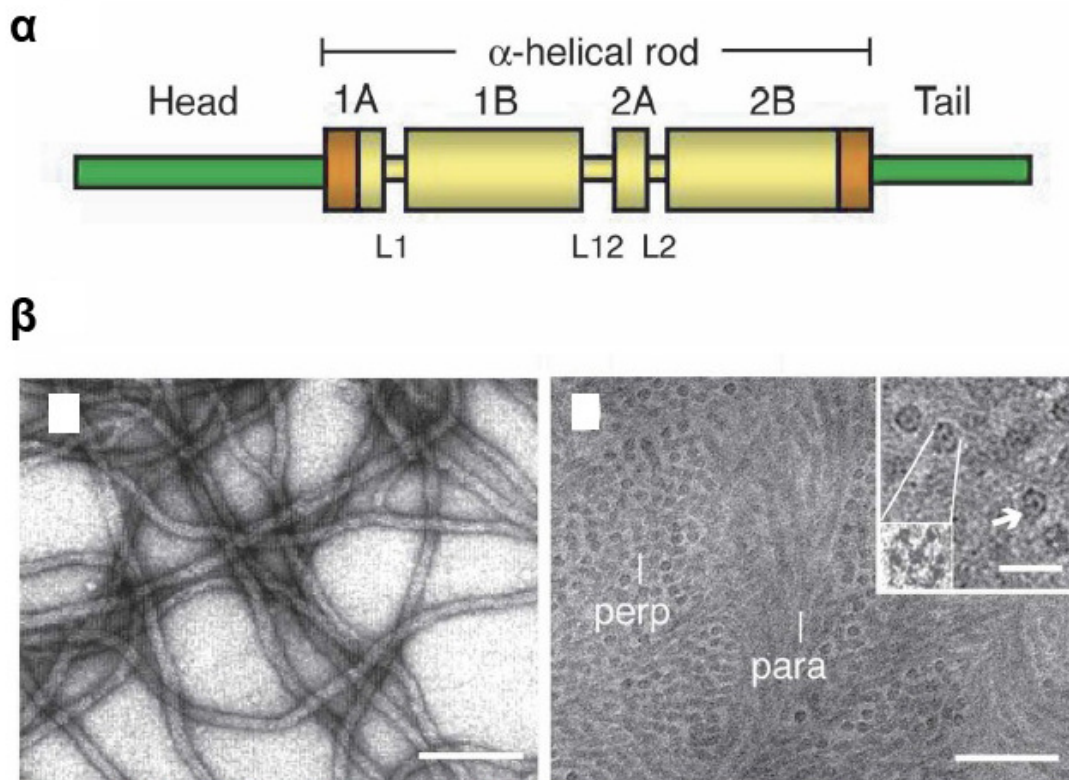
φακινίνη (phakinin) και CP49 (Parry and Steinert 1999). Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κατηγορίες πρωτεϊνών Ενδιάμεσων Ινιδίων

Όνομα	Τύπος	Ιστοειδικότητα
Κερατίνες (όξινες) (9-20)	I	Επιθήλιο
Κερατίνες (βασικές) (1-8)	II	Επιθήλιο
Βιμεντίνη	III	Μεσέγχυμα
Δεσμίνη	III	Μυς
GFAP	III	Αστροκύτταρα/γλοία
Περιφερίνη	III	Π.Ν.Σ., Νευρώνες
Συνκοιλίνη	III	Μυς
Νευροϊνίδια (ελαφριά, μεσαία και βαριά αλυσίδα, NF-L, NF-M, NF-H)	IV	Κ.Ν.Σ.
α-ιντερνεξίνη	IV	Κ.Ν.Σ.
Νεστίνη	IV	Νευροεπιθήλιο
Συνεμίνη	IV	Μυς
Λαμίνες A και C	V	Πυρήνας
Λαμίνες B1 και B2	V	Πυρήνας
Φακινίνη	VI	Φακός οφθαλμού
Φιλεσίνη	VI	Φακός οφθαλμού

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται ένα μοντέλο δομικής οργάνωσης των πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων, το οποίο γενικά χαρακτηρίζει όλους τους τύπους, παρά τη μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών. Συγκεκριμένα, το μοντέλο χαρακτηρίζεται από μια κεντρική ραβδόμορφη περιοχή (rod domain) μήκους περίπου 45 nm, με διαμόρφωση α-έλικας, η οποία περιβάλλεται από τις μη ελικοειδείς άμινο-

και καρβόξυ- τελικές περιοχές που χαρακτηρίζονται ως κεφαλή (head) και ουρά (tail) αντίστοιχα. Η ραβδόμορφη περιοχή διακόπτεται από 3 συνδετικές περιοχές και θεωρείται σχετικά συντηρημένη μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων, ενώ η κεφαλή και η ουρά παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια αναφορικά με το μέγεθος, την αλληλουχία, τη δομή και τη λειτουργία τους (βλ. ανασκοπήσεις (Herrmann, Bar et al. 2007; Kim and Coulombe 2007)) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Δομή ενδιάμεσων ινιδίων. (α) Σχηματική αναπαράσταση της τριτοταγούς δομής των ενδιάμεσων ινιδίων. Μία κεντρική ραβδόμορφη δομή (“rod”) α-έλικας λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής της οργάνωσης των δικτύων. Περιβάλλεται από δομές που δεν είναι α-ελικοειδείς, την κεφαλή (“head”) στο Ν΄ άκρο και την ουρά (“tail”) στο C΄ άκρο. Στην κεντρική rod περιοχή μεγέθους 310 αμινοξέων οι περιοχές 1A, 2A και 3A που περιέχουν επαναλήψεις επτάδας, διακόπτονται από τρεις συντηρημένες περιοχές ένωσης, τις L1, L12 και L2. Τα όρια της περιοχής rod αποτελούνται από υψηλά συντηρημένες περιοχές 15-20 αμινοξέων (παρουσιάζονται με πορτοκαλί χρώμα) που είναι κρίσιμες για τον πολυμερισμό και εμφανίζονται συχνά σε ανθρώπινες μεταλλάξεις. (β) Δίκτυα ενδιάμεσων ινιδίων που επανασηματίστηκαν *in vitro* από απομονωμένες ανθρώπινες πρωτεϊνών κερατίνης K5 και K14, όπως παρουσιάζονται με ηλεκτρονική μικροσκοπία αρνητικής χρώσης

(αριστερά). Μπάρα κλίμακας: 100 nm. Δίκτυα ενδιάμεσων ινιδίων κερατινών στο στρώμα “stratum corneum” της επιδερμίδας ανθρώπου χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική μικροσκοπία εξειδικευμένου τύπου (δεξιά). Παρουσιάζονται δίκτυα πυκνά οργανωμένων κερατινών σε παράλληλο (“para”) ή κάθετο (“perp”) επίπεδο στην τομή. Μπάρα κλίμακας: 50 nm. Από την ανασκόπηση (Kim and Coulombe 2007).

5 Δεσμίνη

5.1 Γενικά χαρακτηριστικά δεσμίνης

Η δεσμίνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροπλάσματος στα μυϊκά κύτταρα. Η έκφρασή της παρουσιάζει κυρίως μυοειδικό πρότυπο και ανήκει στα τύπου-III ενδιάμεσα ινίδια. Απομονώθηκε αρχικά από τους Lazarides και Hubbard το 1976 (Lazarides and Hubbard 1976) και αποτελεί το 0,35% των συνολικών πρωτεϊνών στο σκελετικό μυ και το 2% στον καρδιακό μυ των θηλαστικών. Επιπλέον εκφράζεται στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (Wede, Lofgren et al. 2002). Όπως αναπτύσσεται παρακάτω, η δεσμίνη προσδέεται σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών και διασυνδέει τα κυτταρικά οργανίδια όπως τον πυρήνα, τα μιτοϊνίδια και τα μιτοχόνδρια με το σαρκόλειμμα, την κυτταρική μεμβράνη των μυών.

Στις επόμενες παραγράφους περιγράφεται η έκφραση, τοπολογία, οι ιδιότητες του μορίου της και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του δικτύου της δεσμίνης και η συσχέτισή της με την ανθρώπινη παθοφυσιολογία, ενώ παράλληλα αναπτύσσεται και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της όπως προκύπτει από σύγχρονες κυρίως μελέτες με πειραματικά ζωικά μοντέλα.

5.2 Γονιδιακή ρύθμιση και πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου της δεσμίνης

Το γονίδιο της δεσμίνης στον άνθρωπο βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του δεύτερου χρωμοσώματος, ενώ στο ποντίκι στη ζώνη C3 του πρώτου χρωμοσώματος. Υπάρχει σε ένα μοναδικό αντίγραφο στο γονιδίωμα όλων των σπονδυλωτών και παρουσιάζει υψηλή ομολογία μεταξύ των διαφόρων ειδών (Capetanaki, Ngai et al.

1984). Το γονίδιο της δεσμίνης στο ποντίκι έχει μέγεθος περίπου 8,4 kb και περιλαμβάνει 9 εξόνια μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται εσόνια με μέγεθος από 0,1-2,2 kb (Li, Lilienbaum et al. 1989), ενώ περιέχει και μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 1,2 kb στα εσόνια που ανήκει στην ανθρώπινη οικογένεια AluI επαναλήψεων.

5.2.1 Γονιδιακή ρύθμιση της δεσμίνης

Κατά την ανάπτυξη, η έκφραση του γονιδίου της δεσμίνης ρυθμίζεται από τους μυογενείς HLH μεταγραφικούς παράγοντες (Myf5, myogenin, MRF4, MyoD), σε συνεργασία με μέλη της οικογένειας των MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2) μεταγραφικών ρυθμιστών τόσο στην καρδιά, όσο και στο σκελετικό μυ (Kuisk, Li et al. 1996). Ένα E1-box στις πρώτες 85 βάσεις ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της μυοειδικής έκφρασης της δεσμίνης σε χαμηλά επίπεδα. Η μέγιστη επαγωγή επιτυγχάνεται από ένα τμήμα ρυθμιστικών στοιχείων μεταξύ των βάσεων -578 και -976, το οποίο περιέχει ένα δεύτερο E2-box και μια θέση δέσμευσης παραγόντων MEF2. Η περιοχή αυτή θεωρείται πως λειτουργεί ως ενισχυτής (Li and Capetanaki 1993; Li and Capetanaki 1994). Έχει βρεθεί ένας ακόμα ενισχυτής που σχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης της δεσμίνης, ο οποίος βρίσκεται σε απομακρυσμένο σημείο (~ 1 kb ανοδικά) και περιέχει μία θέση πρόσδεσης του μυοειδικού μεταγραφικού παράγοντα MEF2 που ακολουθείται από μια αλληλουχία GANNTG (E-box), η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης των mHLH μεταγραφικών παραγόντων (Myf5, myogenin, MRF4, MyoD). Ο παράγοντας MEF2C (μέλος της οικογένειας MEF2) και οι mHLH παράγοντες, προσδένονται στις αντίστοιχες περιοχές του ενισχυτή και σε συνεργασία με ένα δεύτερο E-box στον υποκινητή, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της μεταγραφής της δεσμίνης.

Η MEF2 περιοχή πρόσδεσης είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία του ενισχυτή του γονιδίου της δεσμίνης τόσο στον καρδιακό μυ, όσο και στους σκελετικούς μυς. Έχει δειχτεί πως μεταλλάξεις στη θέση πρόσδεσης των παραγόντων MEF2 καταστέλλουν πλήρως τη μεταγραφή του γονιδίου της δεσμίνης στην καρδιά και τους σωμίτες κατά την οργανογένεση, ενώ μεταλλάξεις στο E2-box καταστέλλουν την ενεργοποίηση του γονιδίου μόνο στους σκελετικούς μυς και τα πρόδρομα κύτταρά τους, αλλά όχι στον καρδιακό μυ. Επιπλέον, η συνεργασία των ρυθμιστικών παραγόντων MEF2 με τους παράγοντες mHLH φαίνεται πως είναι απολύτως απαραίτητη για την ομαλή μεταγραφή κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης των σκελετικών μυών (Li and Capetanaki 1993; Kuisk, Li et al. 1996).

5.2.2 Πρωτεϊνική έκφραση της δεσμίνης

Η δεσμίνη αποτελεί την πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων σε όλους τους τύπους μυϊκών κυττάρων, δηλαδή στα σκελετικά, τα λεία και τα καρδιακά κύτταρα (Lazarides 1980; Capetanaki, Ngai et al. 1984). Ανοσοαποτύπωση τύπου SDS-PAGE με ειδικά για τη δεσμίνη αντισώματα οδηγούν στην ανίχνευση μίας μοναδικής μπάντας με που ανταποκρίνεται στο μοριακό βάρος των 58 kDa. Επιπρόσθετα με το μυ, η έκφραση της δεσμίνης έχει περιγραφεί σε μία ευρεία κλίμακα φυσιολογικών και σχετιζόμενων με ασθένεια κυττάρων, για παράδειγμα στα περικύτταρα, στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, στα μυοειδή κύτταρα του στρώματος του πλακούντα, στα κύτταρα Sertoli, στα πειραματικά ποδοκύτταρα και στα μεσοτελειωματικά κύτταρα (Clemen, Herrmann et al. 2013).

5.3 Έκφραση δεσμίνης κατά την ανάπτυξη

Η δεσμίνη είναι ένας από τους πλέον πρώιμους δείκτες κατά την ανάπτυξη των μυών (Capetanaki, Bloch et al. 2007) σε όλα τα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων των αμφιβίων και των ιχθύων, καταδεικνύοντας έναν σημαντικό μηχανισμό αναπτυξιακής συντήρησης (Herrmann, Fouquet et al. 1989). Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου του ποντικιού, η δεσμίνη εκφράζεται στο νευροεξώδερμα στο χρονικό σημείο των 8,25 ημερών μετά τη σύλληψη, παροδικά μαζί με τη βιμεντίνη, τη νεστίνη και τις κερατίνες. Η βιμεντίνη αποτελεί την πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων των πρώιμων μυοβλαστών. Κατά τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα μυϊκά κύτταρα ωστόσο, η δεσμίνη υπερεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό, ενώ η έκφραση της βιμεντίνης σιγείται εντελώς (Duprey and Paulin 1995).

Στο χρονικό σημείο της 8,5 ημερών μετά τη γονιμοποίηση, η δεσμίνη εμφανίζεται στην αναπτυσσόμενη καρδιά και κατά την ένατη ημέρα στους μυοτόμους (Schaart, Viebahn et al. 1989). Έχει προταθεί πως το γονίδιο της εκφράζεται τουλάχιστον μισή με μία μέρα νωρίτερα από το χρονικό σημείο ανίχνευσης της πρωτεΐνης (Kuisk, Li et al. 1996). Η δεσμίνη εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε δορυφορικά κύτταρα και σε διαιρούμενους μυοβλάστες, αλλά και σε ενήλικα σκελετικά και καρδιακά βλαστικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα περισσότερα μυοειδικά γονίδια (Kaufman and Foster 1988; Allen, Rankin et al. 1991).

Είναι ενδιαφέρον πως η έκφραση της δεσμίνης προηγείται των άλλων μυοειδικών δομικών πρωτεϊνών, ακόμα και των μυογενών μεταγραφικών παραγόντων όπως οι myoD, μυογενίνη και myf4 (myf-6), με εξαίρεση τον myf-5 (Li, Choudhary et al. 1994; Kuisk, Li et al. 1996). Μετάγραφο του Myf-5 ανιχνεύονται πριν την ενεργοποίηση της δεσμίνης, υποδηλώνοντας ότι ο Myf-5 μπορεί να παίζει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στη μυογενή διαφοροποίηση (Li and Capetanaki 1993).

5.4 Δομή και ιδιότητες της δεσμίνης

Το πρωτεϊνικό μόριο της δεσμίνης αποτελείται από 470 αμινοξέα και έχει μέγεθος 53 kDa, το οποίο προκύπτει από ένα μετάγραφο μεγέθους 2.2 kb όπως ανιχνεύεται και στους τρεις τύπους μυϊκού ιστού μέσω ανάλυσης κατά Northern (Li, Lilienbaum et al. 1989). Παρουσιάζει μια κεντρική ραβδόμορφη περιοχή (rod domain) με διάταξη α-έλικας, τυπική για όλα τα ενδιάμεσα ινίδια. Πρόκειται για μια εκτενώς συντηρημένη δομή, η οποία περιβάλλεται από δύο περιοχές (παρουσιάζεται μοντέλο ενδιάμεσων ινιδίων στην Εικόνα 7). Η ελικοειδής κεντρική περιοχή αποτελείται από 308 αμινοξέα και διακόπτεται από δύο ή τρεις βραχείς, μη ελικοειδείς συνδέσμους, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο τρεις ή τέσσερις έλικες που συνθέτουν μια επτάδα επαναλήψεων (heptade repeats), υπεύθυνη για την περιελιγμένη της διαμόρφωση (coiled-coil).

Οι μη ελικοειδείς περιοχές της αμινοτελικής κεφαλής και της καρβοξυτελικής ουράς παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία. Όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο, οι περιοχές αυτές είναι σημεία στόχοι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, κυρίως φωσφορυλίωσης και γλυκοζυλίωσης, που ρυθμίζουν τη δυναμική της συγκρότησης της δομής των ενδιάμεσων ινιδίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά και της ανάπτυξης (Eriksson, Brautigan et al. 1992; Heins and Aebi 1994; Sihag, Inagaki et al. 2007). Η κεφαλή της δεσμίνης αποτελείται από 84 αμινοξέα και είναι πλούσια σε αργινίνες, σερίνες και αρωματικά αμινοξέα, ενώ έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση των ινιδίων και στις αλληλεπιδράσεις των διμερών μορίων δεσμίνης. Η καρβοξυτελική περιοχή του μορίου είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση των ινιδίων και την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες και οργανίδια (βλ. ανασκόπηση (Bar, Mucke et al. 2007)), ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι είναι απαραίτητη για την τοπολογία ολόκληρου του μορίου στους Z-δίσκους (Mavroidis, Panagoroulou et al. 2008).

Το διαφορετικό πρότυπο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και γενικότερα η ετερογένεια στις ακραίες περιοχές της κεφαλής και της ουράς, μπορεί να εξηγούν την αυστηρά ελεγχόμενη ιστοειδική λειτουργία των διαφόρων πρωτεϊνών της υπερ-οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων.

5.5 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου της δεσμίνης

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών των ενδιάμεσων ινιδίων, όπως ήδη αναφέρθηκε. *In vitro* μετάφραση της δεσμίνης σκελετικού και λείου μυ πτηνών, χρησιμοποιώντας ένα ειδικό μη-κυτταρικό σύστημα, οδήγησε κυρίως στο σχηματισμό μη φωσφορυλιωμένης δεσμίνης, προτείνοντας πως σε κανονικές συνθήκες φωσφορυλιώνεται ένα μικρό μόνο ποσοστό της δεσμίνης (O'Connor, Asai et al. 1981).

Από την άλλη, η δεσμίνη έχει περιγραφεί ως ένας από τους κυρίους δέκτες 32P στους διαφοροποιούμενους μυοσωλήνες (myotubes) του κοτόπουλου. Ενζυμική ανάλυση δύο διαστάσεων της δεσμίνης έδειξε πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης στο μόριο της δεσμίνης (Gard, Yamada et al. 2005). Επιπλέον, η τοποειδική φωσφορυλίωση της δεσμίνης από διάφορες κινάσες, μεταξύ των οποίων η πρωτεϊνική κινάση A και C, η Aurora-B, η CDC2 και η Rho κινάση, αλλάζουν τη δυναμική της συγκρότησης των ινιδίων σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου (Inada, Togashi et al. 1999; Kawajiri, Yasui et al. 2003; Izawa and Inagaki 2006).

Άλλη μελέτη έδειξε πως η δεσμίνη αποτελεί υπόστρωμα της p21-ενεργοποιούμενης κινάσης (PAK) οδηγώντας κυρίως σε φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης στο ‘head’ τμήμα του μορίου της δεσμίνης, ενώ φωσφορυλίωσή της μέσω της PAK οδηγεί σε ισχυρή παρεμπόδιση σχηματισμού ινιδίων (Ohtakara, Inada et al. 2000). Το ίδιο συμβαίνει και με την ADP-ριβοζυλίωση της δεσμίνης μέσω μιας ειδικής για αργινίνη μονο-ADP-ριβοζυλτρανσφεράσης των μυών, η οποία στοχεύει πρωταρχικά την αργινίνη 48 και λιγότερο την αργινίνη 68 του ‘head’ τμήματός της (Zhou, Huiatt et al. 1996).

Μεταγενέστερη μελέτη έδειξε πως ADP-ριβοζυλιωμένη δεσμίνη δεν μπορεί να σχηματίσει ινίδια με άλλα ίδια μόρια δεσμίνης αλλά και δεν επηρεάζει το σχηματισμό ινιδίων μη τροποποιημένων μορίων δεσμίνης. Αντίθετα, η ADP-ριβοζυλίωση ήδη σχηματισμένων ινιδίων δεσμίνης οδηγεί σε από-συναρμολόγησή τους και αυτή η διεργασία εξαρτάται από την επιπρόσθετη φωσφορυλίωση αμινοξέων (Yuan, Huiatt et al. 1999).

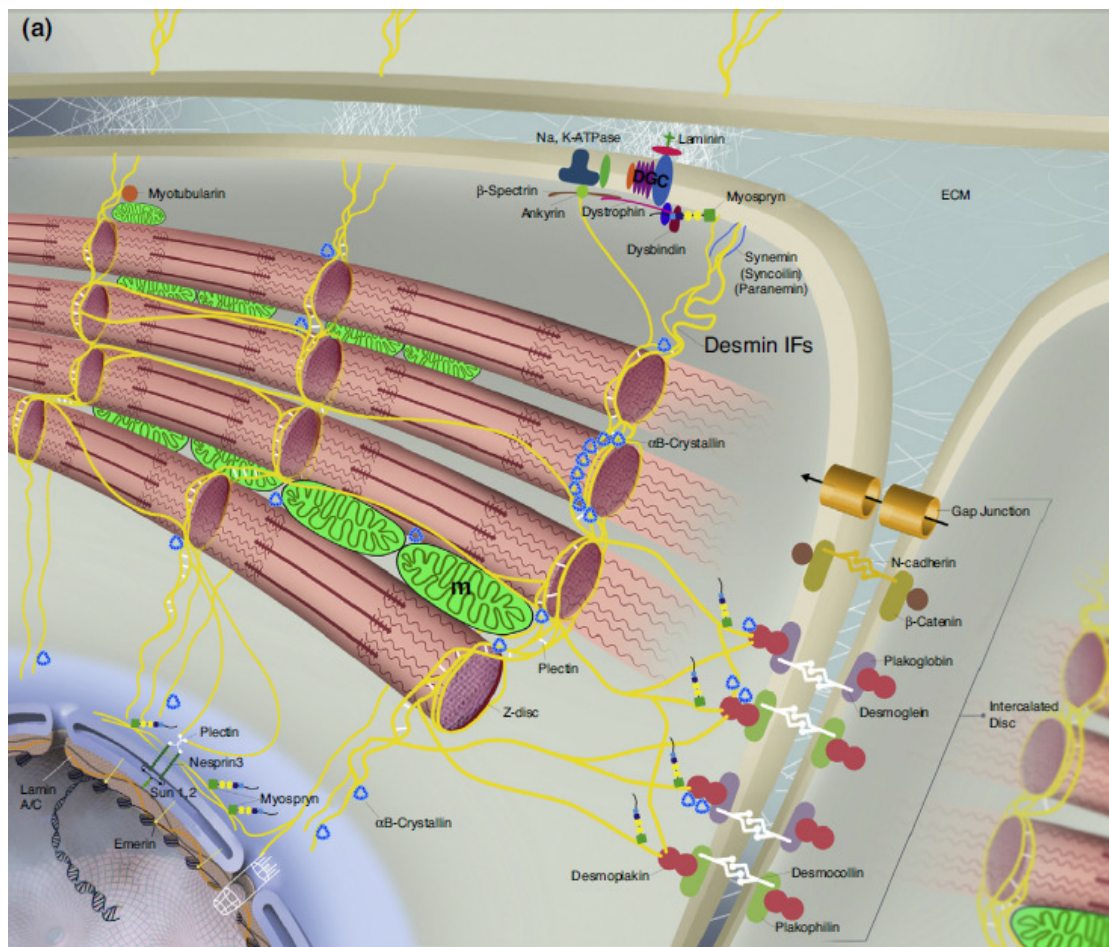
5.6 Πρότυπο υποκυτταρικής τοπολογίας της δεσμίνης

Η δεσμίνη παρουσιάζει ένα ειδικό πρότυπο εντόπισης σε περιοχές του σαρκοπλάσματος και κάτω από την κυτταρική μεμβράνη. Συγκεκριμένα περιβάλλει τους Z-δίσκους και εκτείνεται από τον ένα Z-δίσκο μέχρι τον άλλο, όπως φαίνεται με ανοσοεντοπισμό της σε τομείς σκελετικού μυός (Schroder, Warlo et al. 1999). Επιπλέον, στην περίπτωση του καρδιακού μυός είναι σημαντικό πως η δεσμίνη είναι εμπλουτισμένη στους εμβόλιμους δίσκους, όπως επίσης και στο επίπεδο των νευρομυϊκών συνδέσεων στον σκελετικό μυ (Tidball 1992).

Ηλεκτρονική μικροσκοπία σε συνδυασμό με την τεχνική του ανοσοχρυσού παρουσιάζει τη δεσμίνη σε ιώδεις δομές στα κοσταμερή, που αποτελούν την προέκταση των Z-δίσκων των μυοϊνιδίων στην κυτταρική μεμβράνη, σε ιώδεις δομές των Z-δίσκων, στα μιτοχόνδρια και στις πλάκες των δεσμοσωμάτων των εμβόλιμων δίσκων όπου το δίκτυο της δεσμίνης ενώνεται με τη δεσμοπλακίνη, μέλος της οικογένεια των πλακινών πρωτεϊνών διασύνδεσης κυττάρων (Kartenbeck, Franke et al. 1983; Reipert, Steinbock et al. 1999). Αυτό το τρισδιάστατο ιώδες δίκτυο του κυτταροσκελετού της δεσμίνης που περιβάλλει τα σαρκομερή διασυνδέει τα γειτονικά μυοϊνίδια (Εικόνα 8) και ενώνει τη συσταλτή συσκευή των μυοϊνιδίων με τον πυρήνα και άλλα κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, με την εξωκυττάρια ουσία (Capetanaki, Bloch et al. 2007).

Τα κοσταμερή έχουν προσδιοριστεί ως σημεία αλληλοσύνδεσης κυτταροσκελετικών δικτύων και των σαρκομερών, τα οποία συμβάλλουν στη μεταβίβαση μηχανικών δυνάμεων και σημάτων μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Στα κοσταμερή εντοπίζονται αρκετές κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, αλλά και κινάσες (Pardo, Siliciano et al. 1983; Samarel 2005).

Επιπλέον της μηχανικής υποστήριξης, αυτό το πολύπλοκο σύμπλεγμα αλληλεπιδράσεων θεωρείται πως αποτελεί και τη βάση της μηχανο-χημικής σηματοδότησης μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τμημάτων. Τα ενδιάμεσα ινίδια γενικά και η δεσμίνη ειδικότερα, έχουν προταθεί να προσδένονται άμεσα στο γενωμικό DNA και να επιτελούν ρόλους στη γονιδιακή ρύθμιση και στην οργάνωση του DNA (Traub 1995; Chung, Arutyunov et al. 2015). Επιπλέον ρόλοι της δεσμίνης στη μορφολογία και ομοιόσταση του πυρήνα, στα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα, περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους.



Εικόνα 8. Το δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης στο μυοκαρδιοκύτταρο. Το δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης (Desmin IFs, κίτρινο) εξαπλώνεται στο σαρκόπλασμα και συγκροτεί μαζί με την παρανεμίνη, τη συνεμίνη και τη συνκοιλίνη ένα εκτενές κυτταροπλασματικό δίκτυο. Η δεσμίνη διασυνδέει τα μυοϊνίδια μεταξύ τους και τα περιβάλλει στο ύψος των Z-δίσκων. Συνδέει επιπλέον ολόκληρη τη συστατική συσκευή με τα μεμβρανικά οργανίδια του κυτταροπλάσματος, όπως τα μιτοχόνδρια (πράσινο), τα λυσοσώματα, τον πυρήνα, το σαρκοπλασματικό δίκτυο και επίσης το σαρκεύλημα. Στα μυοκαρδιομυοκύτταρα η δεσμίνη προσδένεται στα δεσμοσώματα των εμβόλιμων δίσκων (“Intercalated Disc”), τις μηχανικές και λειτουργικές διασυνδέσεις μεταξύ των καρδιοκυττάρων, οι οποίοι παρουσιάζονται σχηματικά με κάποιες από τις πρωτεΐνες που περιλαμβάνει. Από την ανασκόπηση (Carpetanaki Y, Parathanasiou S et al. 2015).

5.7 Αλληλεπίδραση της Δεσμίνης με κυτταρικά οργανίδια

5.7.1 Αλληλεπίδραση με τον πυρήνα

Τα ινίδια της δεσμίνης εκτείνονται από τους Z-δίσκους προς τους πυρηνικούς πόρους, οι οποίοι περικυκλώνονται από ινίδια λαμίνης που συνδέονται με ετεροχρωματίνη (Lockard and Bloom 1993; Tolstonog, Sabasch et al. 2002; Mermelstein, Andrade et al. 2006) (Εικόνα 8). Γενικά, τα κυτταροπλασματικά ενδιάμεσα ινίδια, αλληλεπιδρούν με τον πυρηνικό φάκελο καθώς και με την πυρηνική θεμέλια ουσία, ενώ το σχήμα και η μορφολογία του πυρήνα αλλάζουν κατά την διάρκεια της μυϊκής συστολής. Μελέτες σε ποντίκια από τα οποία απουσιάζει είτε οι λαμίνες A/C είτε η δεσμίνη υποστηρίζουν την άποψη ότι τα κυτταροπλασματικά ενδιάμεσα ινίδια σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την πυρηνική μεμβράνη του πυρήνα (Capetanaki, Milner et al. 1997; Ralston, Lu et al. 2006).

Μία ενδιαφέρουσα υπόθεση είναι πως τα κυτταροπλασματικά δίκτυα ενδιάμεσων ινιδίων μπορεί να επηρεάζουν την ρύθμιση διαφόρων γονιδίων (Chung, Arutyunov et al. 2015) (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο). Έχει επίσης προταθεί σε παλαιότερες *in vitro* μελέτες πως η δεσμίνη αλληλεπιδρά άμεσα με τη λαμίνη Β μέσω των καρβοξυτελικών τους περιοχών (Georgatos, Weber et al. 1987), η αλληλεπίδραση αυτή ωστόσο δεν έχει επιβεβαιωθεί σε *in vivo* συστήματα μελέτης. Επιπλέον, κατά την μειωμένη έκφραση δεσμίνης έχει παρατηρηθεί ανώμαλη έκφραση των μυοειδικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των μυογενών μεταγραφικών παραγόντων myoD και μυογενίνη, σε μελέτες στην κυτταρική σειρά C2C12 και σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα από ποντίκια που τους λείπει η δεσμίνη (Li, Choudhary et al. 1994; Weitzer, Milner et al. 1995; Capetanaki, Bloch et al. 2007).

Τέλος, το δίκτυο δεσμίνης εκτός από το να συμμετέχει ενεργά στην αλλαγή του σχήματος του πυρήνα, έχει προταθεί πως παίζει ρόλο και στη διαμόρφωση της ετεροχρωματίνης (Capetanaki 2000; Shah, Davis et al. 2004; Capetanaki, Bloch et al. 2007). Τα παραπάνω στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση της ρύθμισης της πυρηνικών λειτουργιών από τη δεσμίνη.

5.7.2 Αλληλεπίδραση με τα μιτοχόνδρια

Σε περιοχές των μιτοχονδρίων ο κυτταροσκελετός της δεσμίνης εμφανίζεται εμπλουτισμένος και με πυκνή κατανομή, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή σύνδεση της δεσμίνης με τη μιτοχονδριακή μεμβράνη άμεσα ή μέσω μιας ενδιάμεσης

πρωτεΐνης (Tokuyasu, Dutton et al. 1983). Μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία προτείνουν ότι η πρωτεΐνη σύνδεσης πλεκτίνη, μπορεί να εμπλέκεται σε αυτή τη συσχέτιση (Reipert, Steinbock et al. 1999).

Ενώ δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο διαμεσολαβείται η αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τα μιτοχόνδρια, πρόσφατα αποτελέσματα συνηγορούν σε άμεση αλληλεπίδραση του δικτύου της δεσμίνης με πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής μεμβράνης (αδημοσίευτα αποτελέσματα, εργαστήριο Καπετανάκη). Επιπλέον, παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν δείξει πως η δεσμίνη ρυθμίζει βασικές μιτοχονδριακές λειτουργίες, πιθανά μέσω αλληλεπίδρασής της με τα μιτοχονδριακά σημεία επαφής, τις περιοχές συνένωσης της εσωτερικής με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο και (Milner, Mavroidis et al. 2000; Capetanaki 2002)).

5.7.3 Αλληλεπίδραση με τα λυσοσώματα

Δεδομένα μελετών του εργαστηρίου μας έχουν δείξει πως το αμινοτελικό άκρο της δεσμίνης αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη που περιέχει παρόμοια με TRIM δομή, τη μυοσπρίνη (myospryn). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται τόσο στο σκελετικό, όσο και στον καρδιακό μυ και συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη στην περιφέρεια του πυρήνα σε μυοκαρδιοκύτταρα νεογέννητων ποντικών καθώς και στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των μυοκαρδιοκυττάρων ενήλικων ποντικών (Kouloumenta, Mavroidis et al. 2007). Η μυοσπρίνη αλληλεπιδρά επίσης με το σύμπλοκο της βιογένεσης των οργανιδίων BLOC-1 (Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex 1) μέσω της dysbindin. Το σύμπλοκο αυτό σχετίζεται με τα λυσοσώματα και εμπλέκεται στη μετακίνηση των πρωτεϊνών και τη βιογένεση των οργανιδίων (Li, Zhang et al. 2003).

Σε μυοκαρδιοκύτταρα νεογέννητων ποντικών απουσία δεσμίνης, η μυοσπρίνη χάνει τον περιπυρηνικό εντοπισμό της και τα λυσοσώματα δεν κατορθώνουν να κατανεμηθούν ομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα, αλλά συγκεντρώνονται γύρω από τον πυρήνα (Kouloumenta, Mavroidis et al. 2007). Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων έχει προταθεί ένας πιθανός ρόλος των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης και των συσχετιζόμενων με αυτή πρωτεϊνών στη μετακίνηση των κυστιδίων και στη βιογένεση οργανιδίων.

5.7.4 Αλληλεπίδραση δεσμίνης με άλλες πρωτεΐνες

Πολλές από τις λειτουργίες της δεσμίνης στηρίζονται στην αλληλεπίδρασή της με άμεσο ή έμμεσο τρόπο με άλλες πρωτεΐνες. Από τη ανακάλυψή της έως τώρα έχει ταυτοποιηθεί μία πληθώρα αλληλεπιδρώντων με τη δεσμίνη πρωτεϊνών (βλέπε βιβλιογραφική ανασκόπηση (Capetanaki Y, Parathanasiou S et al. 2015)). Συγκεκριμένα για τα μυϊκά κύτταρα η δεσμίνη έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων, με πρωτεΐνες των σαρκομερών, με πρωτεΐνες που σχετίζονται με μεμβράνες, με μικρές πρωτεΐνες απόκρισης στο θερμικό στρες, με πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την απόπτωση και με νουκλεϊκά οξέα.

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί αρκετές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η δεσμίνη σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών και η λίστα αυτή διαρκώς αυξάνεται. Η δεσμίνη δημιουργεί ετεροπολυμερή με άλλες πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων του ίδιου τύπου, όπως η βιμεντίνη, η νεστίνη και η GFAP με τις οποίες μπορεί να συνυπάρχει στο ίδιο κύτταρο (Kachinsky, Dominov et al. 1994; Guma, Mello et al. 2001). Η συνεμίνη και η παρανεμίνη αρχικά απομονώθηκαν ως πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη δεσμίνη (Granger and Lazarides 1980), αλλά σήμερα κατατάσσονται ως αυτόνομες πρωτεΐνες τύπου IV των ενδιάμεσων ινιδίων.

Ο ρόλος της συνεμίνης εντοπίζεται στη διασύνδεση των ενδιάμεσων ινιδίων του μυϊκού κυττάρου με τους Z-δίσκους και τα κοσταμερίδια, αφού περιέχει περιοχές πρόσδεσης για τη δεσμίνη, την α-ακτινίνη και την βινκουλίνη (Bellin, Huiatt et al. 2001). Η παρανεμίνη, αλλά όχι η συνεμίνη και η νεστίνη, αποδεδειγμένα αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για το σχηματισμό του εκτεταμένου δικτύου των ινιδίων της δεσμίνης (Schweitzer, Klymkowsky et al. 2001). Επιπλέον, από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, η δεσμίνη αλληλεπιδρά με τη συνεμίνη, τη συνκοιλίνη και τις πυρηνικές λαμίνες μέσω της εμερίνης (Εικόνα 8) (Costa, Escalera et al. 2004).

Εκτός από τις πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, η δεσμίνη αλληλεπιδρά με μια σειρά πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, της μυϊκής ίνας και του σαρκομεριδίου. Η δεσμίνη προσδένεται έμμεσα στους συνδέσμους της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των οποίων διαμεσολαβείται η κυτταρική επικοινωνία διαμέσου της συνκοιλίνης και συνεμίνης, αλλά υπάρχει ταυτόχρονα και άμεση αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τις πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σπεκτρίνη και αγκυρίνη (Larsen, Dalen et al. 1999). Η αγκυροβόλησή της στα δεσμοσώματα πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασής της με τη δεσμοπλακίνη (Meng, Bornslaeger et al. 1997; Lapouge, Fontao et al. 2006).

5.7.4.1 Δεσμίνη και πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά την ανάπτυξη των μυών η δεσμίνη έχει προταθεί πως αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων, τη βιμεντίνη, την νεστίνη, τη συνεμίνη και τη συνκοιλίνη. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται με ένα ειδικό πρότυπο τοπολογίας και χρονικής στιγμής. Επιπλέον, οι πυρηνικές λαμίνες τύπου-B έχει προταθεί πως αλληλεπιδρούν άμεσα με τη δεσμίνη (Georgatos, Weber et al. 1987; Lockard and Bloom 1993).

Η συσχέτιση με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων είναι πιο ξεκάθαρη. Η δεσμίνη και η βιμεντίνη είναι ενδιάμεσα ινίδια τύπου-III, ενώ οι πρωτεΐνες νεστίνη, συνεμίνη και συνκοιλίνη είναι τύπου-IV, όπως έχουμε ήδη αναφέρει. Η δεσμίνη, η βιμεντίνη και η νεστίνη εκφράζονται μαζί και συνεντοπίζονται στους μυοβλάστες, ενώ έχει περιγραφεί πως και οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν δίκτυα ετεροπολυμερών ενδιάμεσων ινιδίων με τη δεσμίνη (Herrmann, Bar et al. 2007). Κατά τα μετέπειτα στάδια της μυογένεσης, ενώ η έκφραση της βιμεντίνης αποσιωπάται οι δεσμίνη και νεστίνη συνεχίζουν να εκφράζονται (Sharma, Mucke et al. 2009). Σε αντίθεση με τη δεσμίνη, η νεστίνη παραμένει κυρίως στις νευρομυϊκές και μυοτενόντιες συνδέσεις στους ώριμους σκελετικούς μύες (Carlsson, Li et al. 1999). Επιπλέον, η συνεμίνη βρέθηκε να συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη και τη βιμεντίνη (Granger and Lazarides 1980), ωστόσο φαίνεται να μην συμμετέχει στο σχηματισμό ινιδίων με αυτές, αλλά να προσδένεται με τη δεσμίνη και τη βιμεντίνη προτού σχηματίσουν ινίδια (Bellin, Sernett et al. 1999). Στον ώριμο σκελετικό μυ, η συνεμίνη εντοπίζεται στην περιφέρεια των Z-δίσκων και στο σαρκόλειμμα (Mizuno, Thompson et al. 2001).

Άλλη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων που αλληλεπιδρά άμεσα και συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη στον ώριμο σκελετικό μυ είναι η συνκοιλίνη, η οποία εντοπίζεται στις νευρομυϊκές συνάψεις, το σαρκόλειμμα και τους Z-δίσκους. Παρόμοια με τη συνεμίνη, η συνκοιλίνη προσδένεται με τα ενδιάμεσα ινίδια αλλά δεν συμμετέχει στο σχηματισμό μεικτών ινιδίων και επομένως αποτελεί πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τα ενδιάμεσα ινίδια. Τέλος, η συνκοιλίνη έχει προταθεί πως έχει ρόλο στην κυτταροσκελετική αγκίστρωση των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης (Poop, Howman et al. 2002).

5.7.4.2 Δεσμίνη και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με ενδιάμεσα ινίδια

Η δεσμίνη αλληλεπιδρά άμεσα με πολλές πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τα ενδιάμεσα ινίδια. Η σωστή δομικά και λειτουργικά οργάνωση του συστήματος του δικτύου ινιδίων της δεσμίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδρασή της με ισομορφές της πρωτεΐνης πλεκτίνης. Στο σκελετικό μυ, οι δύο ισομορφές 1d και 1f της πλεκτίνης διασυνδέουν το δίκτυο της δεσμίνης στους Z-δίσκους και τα κοσταμερή αντίστοιχα, ενώ η ισομορφή 1b διασυνδέει τη δεσμίνη με τα μιτοχόνδρια (Konieczny, Fuchs et al. 2008).

Η πλεκτίνη έχει αναφερθεί να προσδέεται άμεσα στο τμήμα ράβδου διπλής ελίκωσης (coiled-coil rod) της δεσμίνης μέσω του πέμπτου επαναληπτικού τμήματος πλακίνης και μέρους της ακόλουθης περιοχής πρόσδεσης στο μόριό της (Favre, Schneider et al. 2011). Κατά τη διαφοροποίηση του μυός η δεσμίνη έχει βρεθεί να συνεντοπίζεται με την παρανεμίνη, το ορθόλογο στο κοτόπουλο του γονιδίου νεστίνης των θηλαστικών (Robson, Huiatt et al. 2004), στο επίπεδο των Z-δίσκων στους μυοσωλήνες. Σε αντίθεση με την πλεκτίνη και αντίστοιχα με τη νεστίνη, η έκφραση της παρανεμίνης μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση και αποσιωπάται στα ώριμα μυϊκά κύτταρα (Breckler and Lazarides 1982).

Έχει περιγραφεί πως η παρανεμίνη αλληλεπιδρά με το δίκτυο της δεσμίνης για τη δημιουργία ενός ευρύτερου δικτύου δεσμίνης, αλλά δεν σχηματίζει ετεροπολυμερή με τη δεσμίνη (Schweitzer, Klymkowsky et al. 2001). Μία πρωτεΐνη η οποία προσδέεται άμεσα με τη δεσμίνη είναι η μυοσπρίνη (myospryn) ή αλλιώς πρωτεΐνη σχετιζόμενη με καρδιομυοπάθειες 5, η οποία αποτελεί συστατικό βιογένεσης του συμπλόκου 1 οργανιδίων σχετιζόμενων με τα λυσοσώματα (BLOC-1). Αυτή η αλληλεπίδραση περιλαμβάνει την περιοχή ‘head’ του μορίου της δεσμίνης και ένα μοτίβο 24^{ov} αμινοξέων στο τέλος της SPRY περιοχής της μυοσπρίνης. Και οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται σε στενή σχέση με τον πυρήνα και το ενδοπλασματικό δίκτυο σε καρδιοκύτταρα νεογέννητων όπως επίσης και στους εμβόλιμους δίσκους, τα κοσταμερή και τα λυσοσώματα στον ενήλικο καρδιακό μυ. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, έχει προταθεί πως η αλληλεπίδραση δεσμίνης-μυοσπρίνης παίζει ρόλο στη βιογένεση και τοποθέτηση των λυσοσωμάτων (Kouloumenta, Mavroidis et al. 2007).

Επιπλέον, η δεσμίνη έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με την μυοτουμπουλαρίνη (myotubularin), μια πρωτεΐνη μεταλλάξεις της οποίας έχουν βρεθεί στη σχετιζόμενη με το X χρωμόσωμα κεντροπυρηνική μυοπάθεια (XLCNM ή myotubular μυοπάθεια). Οι μεταλλάξεις της μυοτουμπουλαρίνης που προκαλούν τη μυοπάθεια XLCNM βρέθηκαν πως παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση δεσμίνης-μυοτουμπουλαρίνης οδηγώντας σε ελαττωματικό δίκτυο δεσμίνης στον σκελετικό μυ. Επιπλέον, μείωση

της έκφρασης όπως επίσης και έκφραση μεταλλαγμένης μυοτουμουλαρίνης προκαλούν μορφολογικές και λειτουργικές ανωμαλίες στα μιτοχόνδρια (Hnia, Tronchere et al. 2011). Στα κύτταρα του μυομητρίου, η δεσμίνη έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη SP-A, μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών των κολεκτινών. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει αναφερθεί πως παρεμποδίζει τον πολυμερισμό των ινιδίων της δεσμίνης (Garcia-Verdugo, Synguelakis et al. 2008).

5.7.4.3 Δεσμίνη και πρωτεΐνες των σαρκομερών / πρωτεΐνες σχετιζόμενες με μεμβράνες

Η δεσμίνη έχει αναφερθεί πως αλληλεπιδρά άμεσα με συστατικά της συσταλτής συσκευής. Η πρωτεΐνη των Μ-ζωνών μυομεσίνη-1 (myomesin-1, ή αλλιώς skelemin) περιγράφηκε αρχικά ως πρωτεΐνη πρόσδεσης στη δεσμίνη στο σκελετικό μυ (Price 1987). Με αυτόν τον τρόπο η δεσμίνη συνδέεται με τις Z- και M- γραμμές, οπότε συγκρατεί το σαρκομερίδιο τόσο στις άκρες όσο και στο κέντρο του ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο τη συσταλτικότητα του (Costa et al., 2004). Επιπρόσθετα, η περιοχή ράβδου διπλής ελίκωσης (coiled-coil rod) της δεσμίνης αλληλεπιδρά με τη νεμπουλίνη στο επίπεδο των Z-δίσκων (Bang, Gregorio et al. 2002).

Η βασική καλπονίνη των λείων μυών, μια σημαντική πρωτεΐνη πρόσδεσης στην ακτίνη, στην τροπομοσύνη και την καλμοδουλίνη, έχει χαρακτηριστεί ως μια τρίτη πρωτεΐνη πρόσδεσης των σαρκομερών στη δεσμίνη, επίσης στην περιοχή ράβδου (rod) (Fujii, Takagi et al. 2000). Τα τρία στοιχεία του κυτταροσκελετού διασυνδέονται μέσω της πρωτεΐνης πλεκτίνης (plectin), που αποδεδειγμένα αλληλεπιδρά και με τα τρία συστατικά του: τα μικροϊνίδια ακτίνης, τα ενδιάμεσα ινίδια και τους μικροσωληνίσκους (Wiche 1998).

Το δίκτυο της δεσμίνης των μυϊκών κυττάρων είναι αγκιστρωμένο στον κυτταροσκελετό στο επίπεδο των κοσταμερών μέσα από την κυτταρική μεμβράνη. Σε αυτό το επίπεδο, το δίκτυο της δεσμίνης έχει προταθεί να προσδένεται με την πρωτεΐνη σπεκτρίνη (Langley and Cohen 1986). Ένας επιπλέον σύνδεσμος μεταξύ του δικτύου της δεσμίνης και του κυτταροσκελετού στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης εντοπίζεται από την άμεση αλληλεπίδραση της αμινοτελικής περιοχής της δεσμίνης με την αγκυρίνη (Georgatos, Weber et al. 1987). Τέλος, η δεσμίνη βρέθηκε να αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, όπου έχει προταθεί πως παρουσιάζει κάποιο ρόλο στην οργάνωση της περιοχής “motor end plate” υπό της μεμβράνης (Mitsui, Kawajiri et al. 2000).

5.7.4.4 Δεσμίνη και μικρές θερμο-επαγόμενες πρωτεΐνες, σχετιζόμενες με την απόπτωση και με τα νουκλεϊκά οξέα πρωτεΐνες

Οι δύο μικρές θερμο-επαγόμενες HspB1 (αλλιώς Hsp25, Hsp27) και HspB5 (αλλιώς αB-crystallin) προσδένονται άμεσα στη δεσμίνη (Bennardini, Wrzosek et al. 1992). Η αλληλεπίδραση της HspB1 με τη δεσμίνη εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της HspB1 στο κατάλοιπο σερίνης 15 (Kawano, Fujita et al. 2012). Επιπλέον, η δεσμίνη έχει χαρακτηριστεί ως υπόστρωμα για την κασπάση-6 και τις καλπαΐνες. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απόπτωσης, η κασπάση-6 κόβει την ανθρώπινη δεσμίνη στο συντηρημένο αμινοξύ ασπαραγίνη 264 (αντιστοιχεί στο αμινοξύ Asp263 για τη δεσμίνη ποντικού) το οποίο βρίσκεται στην περιοχή «L12 linker» του μορίου της (Fig. 7). Το αμινοξυτελικό προϊόν της δεσμίνης έπειτα από το κόψιμό της έχει σχετιστεί με έναν ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης μέσω μιας αρνητικής επίδρασης στη συνοχή του δικτύου ινιδίων της δεσμίνης (Chen, Chang et al. 2003).

Η δεσμίνη είναι επίσης ειδικός στόχος της πρωτεολυτικής δράσης του συστήματος της καλπαΐνης (Ca-ενεργοποιούμενη προτεϊνάση κυστεΐνης) (Goll, Thompson et al. 2003). Η περιορισμένη πρωτεόλυση της δεσμίνης από τις καλπαΐνες οδηγεί σε προϊόντα πρωτεόλυσης των τμημάτων της κεφαλής, ράβδου και ουράς (head, rod και tail), τα οποία δεν είναι πλέον ικανά να μετάσχουν στο σχηματισμό δικτύων ενδιάμεσων ινιδίων δεσμίνης, αλλά αντίθετα παρεμποδίζουν έντονα τη φυσιολογική διαδικασία σχηματισμού ινιδίων (Bar, Sharma et al. 2009). Το σύστημα της καλπαΐνης έχει επίσης αναφερθεί πως έχει ρόλο στην ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της δεσμίνης κατά το σχηματισμό των μυοσωλήνων (Elamrani, Brustis et al. 1995). Όπως άλλες πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων, η περιοχή κεφαλής της δεσμίνης παρουσιάζεται να προσδένεται *in vitro* σε μονόκλωνα RNA και DNA μόρια (Vorgias and Traub 1986). Αυτή η ιδιότητα αντικατοπτρίζει το υψηλό ποσοστό βασικών αμινοξικών καταλοίπων (12 αργινίνες) και την έλλειψη των αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων στο τμήμα κεφαλής του μορίου της δεσμίνης. Η αλληλεπίδραση *in vitro* της δεσμίνης και του DNA είναι ειδικά στοχευμένο σε εκτεθειμένες μονόκλωνες περιοχές επαναληπτικών αλληλουχιών DNA και κινητών στοιχείων του και φαίνεται να προκαλεί μεταβολές στη ρύθμιση του DNA (Tolstonog, Wang et al. 2000).

5.8 Ασθένειες που σχετίζονται με τη δεσμίνη

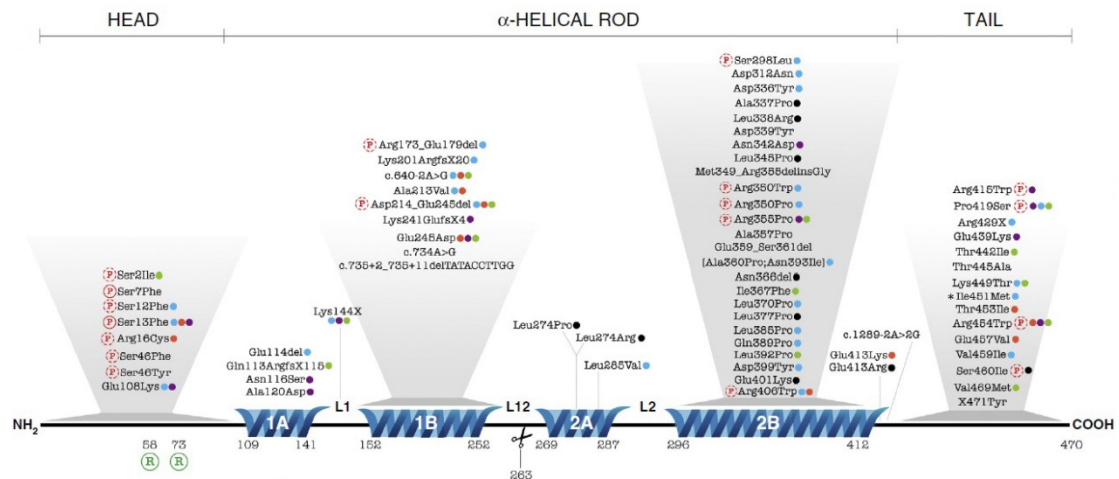
Μεταλλάξεις ή άλλες τροποποιήσεις που έχουν ως αποτέλεσμα ελαττωματικό δίκτυο δεσμίνης προκαλούν ασθένειες του σκελετικού και καρδιακού μυός, τις αποκαλούμενες μυοπάθειες που οφείλονται στη δεσμίνη (desmin related myopathies, DRMs), ή δεσμινοπάθειες. Οι DRMs ανήκουν στη γενετικά ετερογενή ομάδα μυοπαθειών που ονομάζονται μυοϊνώδεις μυοπάθειες οι οποίες προκαλούνται από μεταλλάξεις στην δεσμίνη, την αB-κρυσταλλίνη, τη φιλαμίνη-C, τη μυοτιλίνη, τις ZASP, BAG3, FHL1, VCP και την πλεκτίνη και χαρακτηρίζονται από σαρκοπλασματικά συσσωματώματα που περιέχουν δεσμίνη (Selcen 2011). Οι DRMs παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών και παθολογικών χαρακτηριστικών, όμοια με πολλές άλλες μυοπάθειες και με τους περισσότερους τύπους μυοκαρδιοπαθειών (Goldfarb and Dalakas 2009).

Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 70 μεταλλάξεις της δεσμίνης οι οποίες σχετίζονται με δεσμινοπάθειες (Clemen, Herrmann et al. 2013; Capetanaki Y, Papathanasiou S et al. 2015) (Εικόνα 9). Ο αριθμός αυτός συνεχώς αυξάνεται, εξαιτίας της σύγχρονης γνώσης για τη συμμετοχή της δεσμίνης σε αυτού του τύπου τις παθολογίες και λόγω λανθασμένων διαγνώσεων στο παρελθόν. Οι μεταλλάξεις αυτές συνοψίζονται στην Εικόνα 9, όπου φαίνεται ότι η πλειοψηφία τους έχει βρεθεί στην κεντρική ραβδόμορφη περιοχή και πολύ λιγότερες στην κεφαλή και την ουρά του μορίου. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο τμήμα “rod 2B” της δεσμίνης είναι οι πιο συνήθεις σε ασθενείς με παθολογία του σκελετικού και καρδιακού μυός, ενώ των τμημάτων της κεφαλής και ουράς κυριαρχούν σε ασθενείς που παρουσιάζουν παθολογία μόνο στον καρδιακό μυ (Clemen, Herrmann et al. 2013).

Πρόκειται κυρίως για σημειακές παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλάξεις, κάποιες αφορούν περιπτώσεις ελλειμμάτων και έχει περιγραφεί και μετάλλαξη ένθεσης ενός νουκλεοτιδίου που οδηγεί σε πρόωμο τερματισμό της μετάφρασης. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως σημειακές μεταλλάξεις είναι ικανές να οδηγήσουν σε ιδιαίτερα έντονες αλλαγές στη δομή και τη συγκρότηση των ινιδίων της δεσμίνης, το οποίο είναι και ο κυρίαρχος μηχανισμός παθοφυσιολογίας (Kaminska, Strelkov et al. 2004).

Περισσότερες από το 70 % των μεταλλάξεων της δεσμίνης σχετίζονται με καρδιακή παθολογία. Ο φαινότυπος των μεταλλάξεων αυτόν μπορεί να περιλαμβάνει βλάβες στο σύστημα μεταφοράς σήματος και όλους τους τύπους καρδιομυοπάθειας, όπως διατατική μυοκαρδιοπάθεια (dilated cardiomyopathy, DCM) η οποία είναι και η πιο συχνή, ακολουθούμενη από τη περιοριστική (restrictive, RCM), την υπερτροφική (hypertrophic, HCM), την αρρυθμογόνο μυοκαρδιοπάθεια δεξιάς κοιλίας

(arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy, ARVD/C) και συνδυασμούς τους (Goldfarb and Dalakas 2009; Clemen, Herrmann et al. 2013).



Εικόνα 9. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της δεσμίνης που σχετίζονται με ασθένειες. Παρουσιάζονται οι γνωστές μεταλλάξεις που έχουν πιστοποιηθεί στο γονίδιο της δεσμίνης στον άνθρωπο. Η πλειοψηφία τους εντοπίζεται στην κεντρική περιοχή και συγκεκριμένα στο τμήμα 2B, αλλά ανιχνεύονται επίσης μεταλλάξεις στα τμήματα της κεφαλής και της ουράς (βλέπε ανασκοπήσεις (Goldfarb and Dalakas 2009) και (Capetanaki Y, Parathanasiou S et al. 2015)). Από ανασκόπηση (Capetanaki Y, Parathanasiou S et al. 2015).

Η πλειοψηφία των ασθενών, κυρίως της οικογενούς ή σποραδικής πρωτογενούς δεσμινοπάθειας, εμφανίζει αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα. Ωστόσο έχουν αναφερθεί και αυτοσωμικές υποτελείς περιπτώσεις, αλλά και εμφάνιση *de novo* μεταλλάξεων (Goldfarb and Dalakas 2009). Τα συμπτώματα των περισσότερων δεσμινοπαθειών αρχικά περιορίζονται στους μύς των ποδιών, ενώ αδυναμία και ατροφία εμφανίζονται και τα άνω άκρα. Εκτός από ατροφία των μυών των ποδιών αλλά και των άνω άκρων, εξέχον χαρακτηριστικό των πρωτογενών δεσμινοπαθειών είναι η εμφάνιση μυοκαρδιοπάθειας, όπως ήδη αναφέρθηκε, όπως διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας με διαταραχές στην καρδιακή αγωγιμότητα, αρρυθμίες και τέλος συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας. Η εμφάνιση μυοκαρδιοπάθειας είναι πιθανό να προηγείται, να συμπίπτει ή να έπεται της σκελετικής μυϊκής αδυναμίας. Στον ίδιο φαινότυπο και με την ίδια συμπτωματολογία καταλήγουν και δευτερογενείς μυοκαρδιοπάθειες (Bar, Mucke et al. 2007; Capetanaki, Bloch et al. 2007).

Ο βαθμός της εκφύλισης του μυός αντικατοπτρίζει και την εξέλιξη της ασθένειας. Η συγκέντρωση βασεοφιλικών ή εωσινοφιλικών έγκλειστων σωματίων, καθώς και η παρουσία κενотоπίων αποτελούν κάποια από τα χαρακτηριστικά που παρατηρούνται με φωτονική μικροσκοπία. Μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκαλύπτονται λεπτομερώς οι μυοϊνδιακές βλάβες που χαρακτηρίζονται από ανώμαλη ενδοσαρκοπλασματική συγκέντρωση συσσωματωμάτων που περιέχουν κοκκιώδες και νηματοειδές υλικό. Η φυσιολογική οργάνωση και λειτουργία του δικτύου της δεσμίνης διαταράσσεται από τη σταδιακή συγκέντρωση των συσσωματωμάτων με πολλαπλές συνέπειες για το μυϊκό κύτταρο, όπως προβλήματα συσταλτικότητας. Τα χαρακτηριστικά της παθοφυσιολογίας αντανακλώνται ιδιαίτερα αξιόπιστα και στα διάφορα διαγονιδιακά ποντίκια με έκφραση μεταλλαγμένων μορίων δεσμίνης (Clemen, Herrmann et al. 2013).

Δεν υπάρχει προς το παρόν εξειδικευμένη φαρμακευτική αγωγή για τις πρωτογενείς δεσμινοπάθειες, και η σωστή διαχείριση των ασθενών αυτών περιλαμβάνει κλινική επαγρύπνηση σχετικά με καρδιακά ή αναπνευστικά προβλήματα. Η μυοκαρδιοπάθεια, οι καρδιακές αρρυθμίες, προβλήματα στην καρδιακή αγωγιμότητα και η προοδευτική αναπνευστική ανεπάρκεια είναι οι αναμενόμενες ανωμαλίες που θα προκύψουν και θα πρέπει να αντιμετωπιστούν εγκαίρως. Επομένως οι ενδεχόμενες αγωγές απευθύνονται στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και όχι στην άμεση και οριστική θεραπεία των δεσμινοπαθειών.

5.9 Μηχανισμοί αποδιοργάνωσης του δικτύου δεσμίνης

5.9.1 Μεταλλάξεις της δεσμίνης

Όπως περιγράφηκε ήδη αναλυτικά, οι περισσότερες μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο της δεσμίνης εντοπίζονται στο τμήμα «coil 2B», την πιο σημαντική περιοχή για το σχηματισμό ενδιάμεσων ινιδίων (Εικόνα 9). Έχει δειχτεί με πειράματα σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές πως η πλειοψηφία των μεταλλάξεων της δεσμίνης έχουν ως αποτέλεσμα τα μόρια δεσμίνης να μην έχουν ικανότητα σχηματισμού ενδιάμεσων ινιδίων, αντιθέτως τα μεταλλαγμένα μόρια σχηματίζουν πρωτεϊνικά συσσωματώματα. Επιπλέον, οι περισσότερες μεταλλάξεις προκαλούν την αποδιοργάνωση προϋπάρχοντος δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων (Bar, Mucke et al. 2005). Ωστόσο, η προοδευτική φύση της παθολογίας των ανθρώπινων δεσμινοπαθειών προτείνει πως η δημιουργία συσσωματωμάτων της μεταλλαγμένης δεσμίνης δεν μπορεί να είναι ο μοναδικός παράγοντας ανάπτυξης της ασθένειας.

5.9.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της δεσμίνης

Η δεσμίνη αποτελεί υπόστρωμα ενός ευρέως φάσματος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως φωσφορυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση, ουμπικουϊτινιλίωση, γλυκοζυλίωση, οξειδωση και νίτρωση (Εικόνα 9) (Winter, Paulin et al. 2014). Οι περισσότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις προκαλούν αποδιοργάνωση του δικτύου της δεσμίνης, εκτός από την ουμπικουϊτινιλίωση που οδηγεί στην αποδιάταξή της. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορεί επίσης να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της δεσμίνης με τις αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες της. Στις δεσμινοπάθειες, η δεσμίνη μπορεί να είναι υπερ-φωσφορυλιωμένη (Caron and Charon 1999) και στόχος οξειδωσης και νίτρωσης νίτρωσης (Janue, Odena et al. 2007).

Στις καρδιακές ασθένειες, η δεσμίνη έχει δείχτει πως είναι φωσφορυλιωμένη σε μη φυσιολογικό βαθμό (Capetanaki Y, Parathanasiou S et al. 2015) και επίσης πως είναι στόχος τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Diguët, Mallat et al. 2011). Επιπλέον, κατά την ατροφία των μυών έχει βρεθεί μία σύνδεση μεταξύ της φωσφορυλίωσης και της επακόλουθης ουμπικουϊτινιλίωσης και αποδιάταξης της δεσμίνης (Cohen, Zhai et al. 2012), η οποία αποτελεί έναν νέο μηχανισμό παθοφυσιολογίας. Τέλος, οι μεταλλάξεις της δεσμίνης οι οποίες επηρεάζουν τις περιοχές της όπου συμβαίνουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της (Εικόνα 9), θα μπορούσε να προκαλούν απορύθμιση της δυναμικής του δικτύου δεσμίνης και να οδηγεί σε ανάπτυξη παθολογίας.

5.9.3 Πρωτεολυτικό κόψιμο της δεσμίνης

Η μελέτη του πρωτεολυτικού κοψίματος της δεσμίνης έχει οδηγήσει στο χαρακτηρισμό νέων μηχανισμών που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρδιακών ασθενειών. Όπως αναφέρθηκε στην αντίστοιχη παράγραφο, η δεσμίνη έχει δείχτει πως αποτελεί κύριο στόχο στην καρδιακή ανεπάρκεια, μέσω ενός νέου μηχανισμού παθοφυσιολογίας που περιλαμβάνει το πρωτεολυτικό κόψιμό της στην περιοχή της «L1-L2 linker» από την κασπάση-6, η οποία επάγεται από τον παράγοντα TNF- α (Panagoroulou, Davos et al. 2008) (Εικόνα 7).

Η συντηρημένη αλληλουχία αναγνώρισης από τις κασπάσες των ενδιάμεσων ινιδίων περιλαμβάνεται και στο μόριο της δεσμίνης. Το 2003 δείχθηκε ωστόσο πως η δεσμίνη πέπτεται *in vitro* στο ασπαρτικό οξύ στη θέση 263 μόνο από την κασπάση-6, όπως και σε κυτταρικές σειρές έπειτα από επαγωγή απόπτωσης μέσω του παράγοντα TNF- α . Το αμινοτελικό προϊόν της πέψης δεν έχει την ικανότητα να σχηματίζει

ινίδια, συγκεντρώνεται σε μεγάλα ενδοκυτταρικά συσσωματώματα και παρεμποδίζει το σχηματισμό ινιδίων τόσο της δεσμίνης όσο και της βιμεντίνης (Chen, Chang et al. 2003). Επομένως η πρωτεόλυση ακόμα και ενός μικρού ποσοστού της δεσμίνης μπορεί να επιφέρει δραματικές συνέπειες στο σχηματισμό των δικτύων ενδιαμέσων ινιδίων. Όπως αναφέρθηκε στην αντίστοιχη παράγραφο για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν μεταλλαγμένο μόριο δεσμίνης στη θέση 263 (D263E δεσμίνη), σε παλαιότερα *in vitro* πειράματα είχε επίσης δείχτει πως η D263E δεσμίνη δεν αποτελεί υπόστρωμα πρωτεόλυσης από την κασπάση-6 (Chen, Chang et al. 2003). Επιπρόσθετα, σταθερός μετασχηματισμός κυττάρων με τη μεταλλαγμένη δεσμίνη D263E, προσέδωσε κάποιου βαθμού κυτταροπροστασία στον επαγόμενο από τον TNF-α κυτταρικό θάνατο (Chen, Chang et al. 2003).

Επίσης, το κόψιμο της δεσμίνης στο αμινοτελικό άκρο στο τμήμα “head” αναφέρθηκε πρόσφατα στην καρδιακή ανεπάρκεια ανθρώπων και κυνών (Agnetti, Halperin et al. 2014). Τέλος, μια μετάλλαξη που σχετίζεται με δεσμινοπάθειες στο καρβοξυτελικό άκρο της δεσμίνης έχει δείχτει *in vivo* πως προκαλεί το πρωτεολυτικό κόψιμο της στο αμινοξυτελικό άκρο (Mavroidis, Panagoroulou et al. 2008). Ωστόσο, μεταλλάξεις ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε κόψιμο από κασπάσες δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα.

5.9.4 Κύκλος ζωής πρωτεΐνης της δεσμίνης

Η απορύθμιση του κύκλου ζωής της δεσμίνης θα μπορούσε επίσης να αποτελεί έναν μηχανισμό παθοφυσιολογίας στις δεσμινοπάθειες. Πράγματι, σε ασθενείς με διατακτική καρδιομυοπάθεια έχει παρατηρηθεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της δεσμίνης (Agnetti, Halperin et al. 2014). Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί μηχανισμό αντιστάθμισης βλαβών, όπως έχει προταθεί από μελέτες σε διαγονιδιακά μοντέλα υπερέκφρασης δεσμίνης (Weisleder, Soumaka et al. 2004), ή σε απορύθμιση του φυσιολογικού ρυθμού αποδιάταξης της όπως φαίνεται από αναφορές για βλάβες του συστήματος του πρωτεασώματος σε δεσμινοπάθειες (Liu, Chen et al. 2006). Ο ρυθμός αποδιάταξης της πρωτεΐνης της δεσμίνης προτάθηκε πρόσφατα πως ρυθμίζεται από τη λιγάση ουμπικουϊτίνης TRIM32 (Cohen, Zhai et al. 2012), η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη μυοπαθειών (Kudryashova, Wu et al. 2009). Επιπροσθέτως, το YOD1, ένα ένζυμο από-ουμπικουϊτινιλίωσης βρέθηκε να σταθεροποιεί τα πρωτεϊνικά επίπεδα της δεσμίνης και η μειωμένη του έκφραση εμπλέκεται στον μηχανισμό παθολογίας της καρδιακής ανεπάρκειας που προκαλείται από επιμόλυνση με τον ιό Coxsackievirus B3 (Ye, Zhang et al. 2014).

5.10 Λειτουργίες της δεσμίνης

Στην αντίστοιχη παράγραφο, συζητήθηκαν κάποιες από τις βασικές λειτουργίες των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων. Ως στοιχεία του κυτταροσκελετού, η μηχανική υποστήριξη, η διατήρηση της τάσης, η κυτταρική συνοχή και ο προσδιορισμός του κυτταρικού σχήματος είναι κάποιες από τις βασικές λειτουργίες της δεσμίνης (βλ. ανασκόπηση (Fuchs and Weber 1994)). Ωστόσο, η σύγχρονη θεώρηση για τη λειτουργική σημασία της δεσμίνης είναι πολυδιάστατη και αναφέρεται σε πολλά επίπεδα κυτταρικών διεργασιών, όπως περιγράφεται σύντομα στις επόμενες παραγράφους.

5.10.1.1 Ρόλος δεσμίνης μέσω μελετών των $Des^{-/-}$ ποντικών

Η δημιουργία ποντικών που δεν εκφράζουν δεσμίνη βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση της λειτουργικής σημαντικότητας της δεσμίνης και στην κατανόηση των μηχανιστικών χαρακτηριστικών της (Li, Colucci-Guyon et al. 1996; Milner, Weitzer et al. 1996). Για τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκε το $Des^{-/-}$ μοντέλο που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας (Milner, Weitzer et al. 1996). Η στρατηγική γονιδιακής στόχευσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού για τη δημιουργία του μοντέλου περιγράφεται στην εργασία των Milner et al., 1996. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για αυτή τη μετάλλαξη εξάλειψης στόχευσε τις 319 βάσεις στο 3' άκρο του πρώτου εξονίου, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι δε θα παραχθεί μερικώς λειτουργικό προϊόν (Weitzer, Milner et al. 1995).

Τα $Des^{-/-}$ ποντίκια δεν παράγουν καθόλου δεσμίνη τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, όπως έδειξαν αναλύσεις κατά Northern και Western σε δείγματα από σκελετικό μυ. Τα ποντίκια αυτά είναι γόνιμα, βιώσιμα και δε διαφέρουν ανατομικά από τα ετερόζυγα αδέρφια τους, εκτός από ένα πολύ μικρό ποσοστό ποντικών που εμφανίζει ελαφρώς μειωμένο μέγεθος.

5.10.2 Ρόλος της δεσμίνης στη μυογένεση

Στη δεσμίνη έχει αποδοθεί ένας ρόλος στη φυσιολογική έκφραση μυοειδικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των μυογενών μεταγραφικών παραγόντων myoD και μυογενίνης (Li, Choudhary et al. 1994). Σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα μελέτης δείχτηκε πως η αναστολή της έκφρασης της δεσμίνης παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών και τη δημιουργία μυοσωλήνων (myotubes). Επιπρόσθετα, η έλλειψη της δεσμίνης αναστέλλει τη μυογένεση των σκελετικών μυών, καθώς τα επίπεδα έκφρασης των μυογενών, ρυθμιστικών γονιδίων myoD και μυογενίνης είναι εξαιρετικά χαμηλά, οπότε δεν παρατηρείται δημιουργία μυοσωλήνων και παρεμποδίζεται η συσταλτική ικανότητα των κυττάρων.

Επιπλέον, αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό η μυογένεση των λείων μυών, σε αντίθεση με τα καρδιομυοκύτταρα, των οποίων η διαφοροποίηση επηρεάζεται πολύ λιγότερο (Weitzer, Milner et al. 1995). Τα αποτελέσματα αυτά είναι εξαιρετικής σημασίας καθώς υποδεικνύουν πως η δεσμίνη μπορεί να είναι ένα ρυθμιστικό μόριο στη μυογένεση ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων με κάποιον μηχανισμό ο οποίος παραμένει άγνωστος.

5.10.3 Ρόλος της δεσμίνης στη φυσιολογία των σκελετικών μυών

Η απουσία της δεσμίνης επιφέρει εκτεταμένο εκφυλισμό και έντονη αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής τόσο του καρδιακού όσο και του σκελετικού μυός, όπως έχει δειχθεί από ιστολογικές αναλύσεις και μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στα *Des^{-/-}* ποντίκια. Οι δομικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν διατάραξη της διασύνδεσης των μυϊκών ινών στο σαρκείλημα, διαταραχή της πλευρικής στοίχισης των μυϊκών ινών και της οργάνωσης των μιτοχονδρίων, καθώς και αλλαγή της θέσης και του σχήματος του πυρήνα (Milner, Weitzer et al. 1996; Capetanaki, Milner et al. 1997). Επιπλέον, η δεσμίνη είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική έκταση και συστολή των μυοϊνιδίων, αλλά και για τη διατήρηση του μυϊκού ιστού, καθώς οι σκελετικοί μύες των *Des^{-/-}* ποντικίων εμφανίζουν εντονότερη ακαμψία από τους αντίστοιχους άγριου τύπου (Anderson, Li et al. 2002). Απουσία δεσμίνης, η συνοχή των μυοϊνιδίων είναι μειωμένη, ο όγκος τους ελαφρώς αυξημένος, ενώ η τοπολογία των πυρήνων των μυϊκών ινών επηρεάζεται σημαντικά (Shah, Davis et al. 2004).

5.10.4 Ρόλος της δεσμίνης στη φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος

Στα *Des^{-/-}* ποντίκια η έλλειψη της δεσμίνης προκαλεί επίσης διαταραχές στη φυσιολογία των λείων μυών. Εντονότερες βλάβες παρατηρούνται στην αορτή, όπου παρουσιάζεται υποπλασία και χαλαρή οργάνωση των λείων μυϊκών κυττάρων, απώλεια του πυρηνικού σχήματος, μερικός εκφυλισμός και κενά γύρω από τον πυρήνα των μυϊκών ινών. Στους υπόλοιπους λείους μύες οι ανωμαλίες εμφανίζονται ηπιότερες σε γενικό πλαίσιο, με κοινό χαρακτηριστικό την χαλαρή κυτταρική οργάνωση και την υποπλασία (Li, Colucci-Guyon et al. 1996; Milner, Weitzer et al. 1996).

5.10.5 Ρόλος της δεσμίνης στη φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος

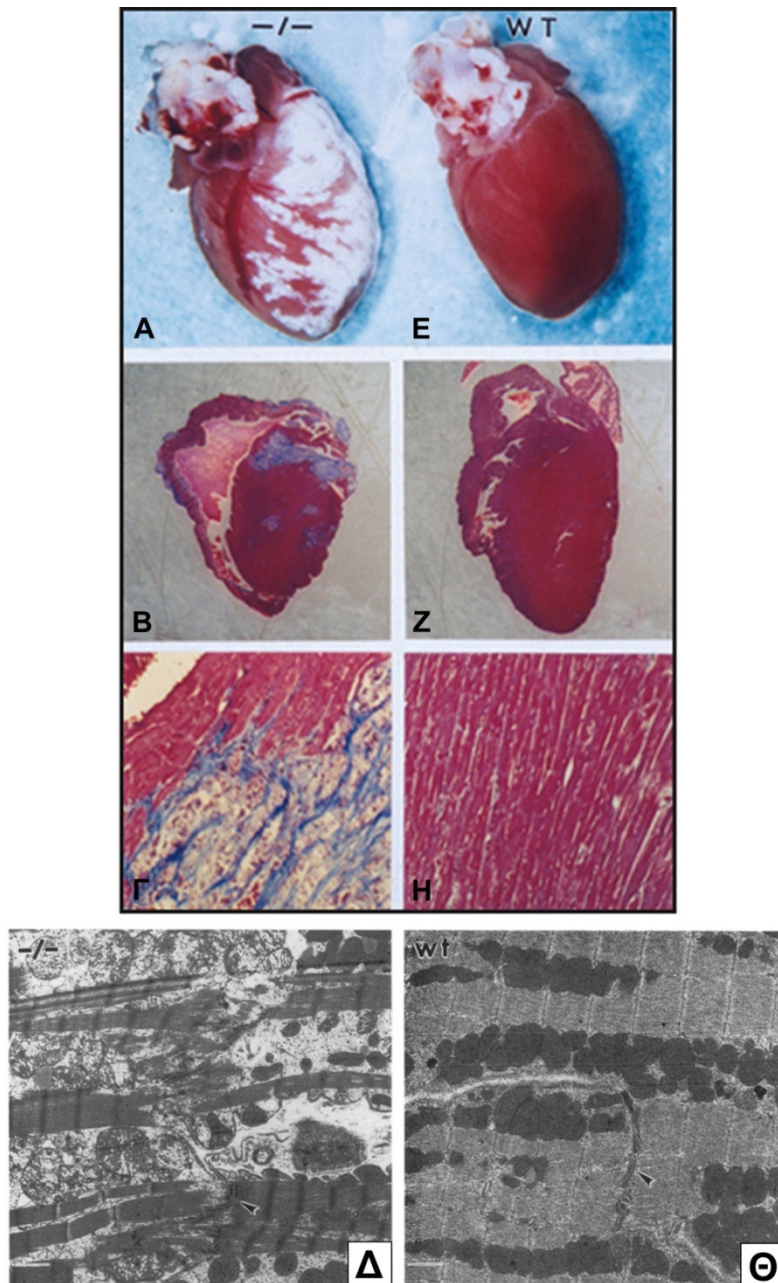
Οι εντονότερες ανωμαλίες που προκαλούνται λόγω έλλειψης της δεσμίνης εντοπίζονται στον καρδιακό μυ. Στα *Des^{-/-}* ποντίκια παρατηρείται εκτενής θάνατος των καρδιομυοκυττάρων και διάταση των θαλάμων της καρδιάς, καθώς και εναπόθεση ασβεστίου και ινώδους ιστού στις νεκρωτικές περιοχές (Milner et al., 1996, Li et al., 1996). Το μυοκάρδιο των ποντικίων αυτών εμφανίζει εκφυλισμό των μιτοχονδρίων, ανωμαλίες στους εμβόλιμους δίσκους και διάρρηξη των μυϊκών ινιδίων όπως προκύπτει από μελέτες μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Milner, Weitzer et al. 1996; Capetanaki, Milner et al. 1997) (Εικόνα 10).

Οι καρδιές των *Des^{-/-}* ποντικίων είναι μεγαλύτερες του φυσιολογικού, ενώ η μεγέθυνση μπορεί να είναι πιο έντονη σε ποντίκια που πεθαίνουν είτε λόγω ξαφνικού θανάτου, είτε λόγω καταπόνησης από έντονη άσκηση (κολύμβηση). Επίσης παρατηρείται διάταση, με μέτρια ή και σοβαρή λέπτυνση του μυοκαρδιακού τοιχώματος. Σε μερικές περιπτώσεις ο εκφυλισμός του μυοκαρδίου μπορεί να φθάσει σε επικίνδυνα επίπεδα που είναι ικανά να οδηγήσουν σε διάρρηξή του (Milner, Taffet et al. 1999; Capetanaki 2000). Μορφομετρικός χαρακτηρισμός απομονωμένων καρδιομυοκυττάρων από καρδιά που δεν εκφράζει δεσμίνη έδειξε 24 % αύξηση στον κυτταρικό όγκο, εξαιτίας αύξησης κατά την εγκάρσια διάμετρο, χαρακτηριστικό ομόκεντρης υπερτροφίας των μυοκαρδιοκυττάρων.

Στις *Des^{-/-}* καρδιές παρατηρείται επιπλέον επαγωγή της έκφρασης εμβρυϊκών γονιδίων. Παρότι το συνολικό πρότυπο της έκφρασης πρωτεϊνών-μαρτύρων υποδεικνύει ότι το *Des^{-/-}* μυοκάρδιο παρουσιάζει μοριακό φαινότυπο αντίστοιχο της υπερτροφίας που οφείλεται σε αυξημένη πίεση, ο υπερτροφικός φαινότυπος είναι παροδικός και γρήγορα υπερκαλύπτεται από το διατατικό, λόγω του υψηλού ποσοστού κυτταρικού θανάτου (Milner, Taffet et al. 1999). Η διάταση της καρδιάς

συνοδεύεται από συσταλτική δυσλειτουργία με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας.

Στην προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκαν οι βλάβες που παρουσιάζονται στο καρδιαγγειακό σύστημα των *Des^{-/-}* ποντικών, λόγω διαταραχών στα λεία μυϊκά κύτταρα. Ωστόσο, η μυοκαρδιοπάθεια λόγω της έλλειψης της δεσμίνης δεν οφείλεται σε αγγειακές ανωμαλίες, καθώς η στοχευμένη έκφραση της δεσμίνης μόνο στα μυοκαρδιοκύτταρα επαναφέρει το φυσιολογικό φαινότυπο αποδεικνύοντας ότι η απουσία της από την καρδιά και όχι τους λείους μυς, είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση μυοκαρδιοπάθειας (Weisleder, Soumaka et al. 2004).



Εικόνα 10. Διαταραχές του μυοκαρδίου λόγω έλλειψης της δεσμίνης. Μορφολογικά παρατηρούνται εναποθέσεις ασβεστίου στα εξωτερικά τοιχώματα των κοιλιών απουσία δεσμίνης (Α). Με χρώση Masson βάφονται (μπλε) οι ινωτικές περιοχές που προέρχονται από τον εκφυλισμό του $Des^{-/-}$ μυοκαρδίου (Β και Γ), σε σχέση με το μυοκάρδιο άγριου τύπου (Ζ και Η). Μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία δείχνει ότι τα μιτοχόνδρια στο $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο εμφανίζουν έντονη διόγκωση και αποδιοργάνωση. Επιπλέον τα μυοϊνίδια παρουσιάζονται κατεστραμμένα σε αρκετές περιοχές και οι εμβόλιμοι δίσκοι (βέλος) εμφανίζονται αλλοιωμένοι (Δ). Αντίθετα, τα μιτοχόνδρια από μυοκάρδιο αγρίου τύπου εμφανίζονται παράλληλα προς τα μυοϊνίδια και οι εμβόλιμοι δίσκοι (βέλος)

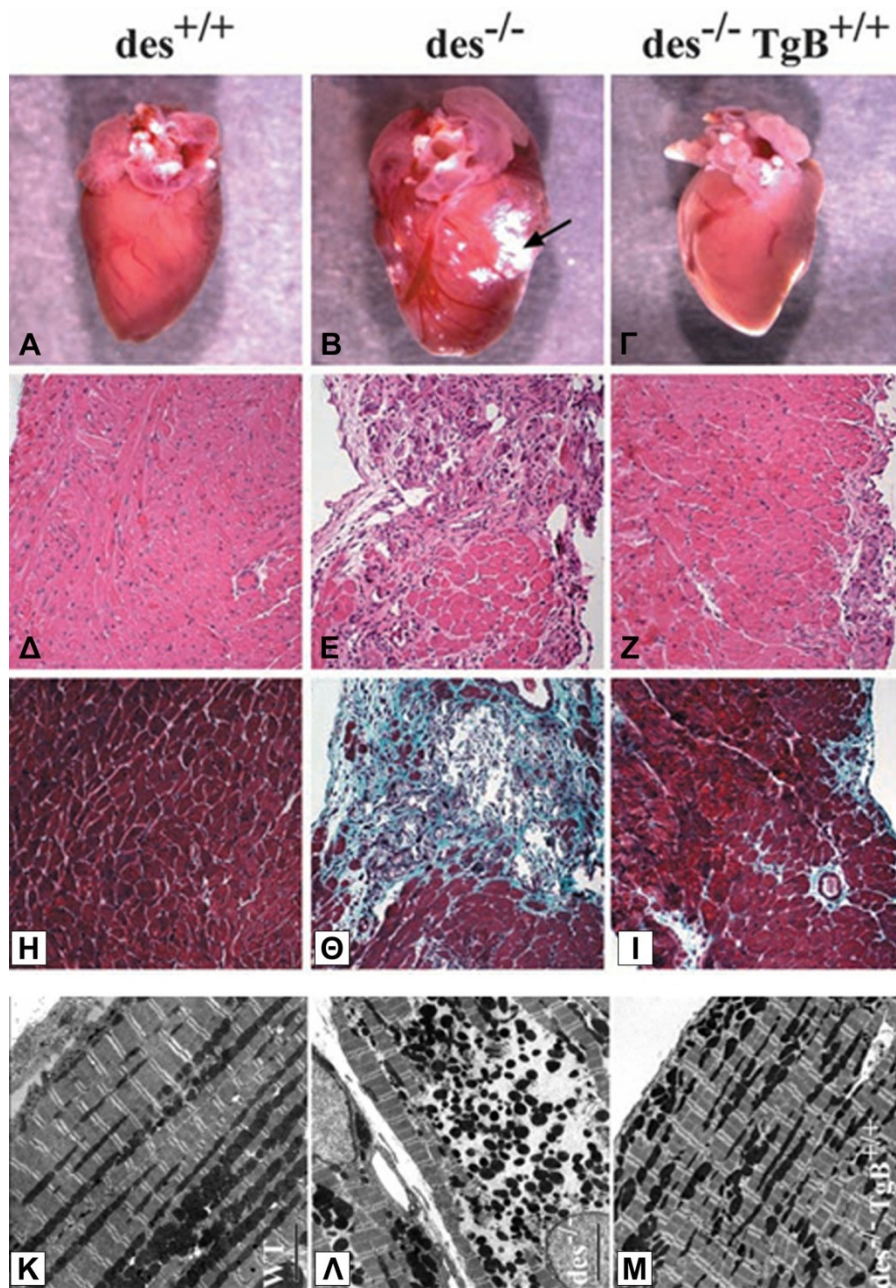
παρουσιάζονται ξεκάθαρα μεταξύ των μυοκαρδιοκυττάρων (Milner, Weitzer et al. 1996).

5.10.6 Ρόλος της δεσμίνης στην οργάνωση και λειτουργία των μιτοχονδρίων

Είναι γνωστό πως τα μιτοχόνδρια συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με όλα τα στοιχεία του κυτταροσκελετού, όπως μικροϊνίδια ακτίνης, μικροσωληνίσκους και ενδιάμεσα ινίδια (Rappaport, Oliviero et al. 1998). Η μελέτη των *Des^{-/-}* ποντικών κατέδειξαν πως η δεσμίνη ρυθμίζει τη δομή, τη μορφολογία, τη θέση και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων στα μυϊκά κύτταρα (Caretanaki 2002). Στο σκελετικό μυ, η έλλειψη της δεσμίνης οδηγεί σε ανώμαλη συσσώρευση υποσαρκειλημματικών (subsarcolemmal) μιτοχονδρίων, ενώ στον έντονο πολλαπλασιασμό των μιτοχονδρίων στο μυοκάρδιο.

Επιπλέον, η λειτουργία των καρδιακών μιτοχονδρίων είναι ελαττωματική έλλειψη της δεσμίνης, όπως φαίνεται από μελέτες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής λειτουργίας. Ο μέγιστος ρυθμός της ADP-ενεργοποιούμενης κατανάλωσης οξυγόνου και η K_m του ADP είναι σημαντικά μειωμένα στους μύες όπου απουσιάζει η δεσμίνη. Τέλος, η σύζευξη της κρεατινικής κινάσης και του μεταφορέα νουκλεοτιδίων αδενίνης (adenine nucleotide translocator, ANT) χάνονται στους παραπάνω ιστούς (Milner, Mavroidis et al. 2000). Παρόμοιες μιτοχονδριακές ανωμαλίες έχουν παρατηρηθεί και σε ασθενείς που φέρουν μια μετάλλαξη ένθεσης στο γονίδιο της δεσμίνης, η οποία προκαλεί συγκέντρωση του μορίου σε συσσωματώματα. Επομένως τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν πως η δεσμίνη παίζει ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων.

Η πορίνη (Voltage Dependent, Anion Channel, VDAC) είναι μια πρωτεΐνη που φαίνεται να εμπλέκεται στη μεταφορά ασβεστίου, τη μεταβολική ροή και τη σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου (Szabadkai, Bianchi et al. 2006). Μαζί με την πρωτεΐνη ANT δημιουργούν κανάλια και ελέγχουν τη διαπερατότητά τους ως προς το ADP και άλλα μόρια όπως το κυτταρόχρωμα c, το οποίο είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Η πορίνη ενδέχεται να αλληλεπιδρά με την δεσμίνη άμεσα ή έμμεσα μέσω μιας άλλης πρωτεΐνης. Την υπόθεση αυτή ενισχύει η παρατήρηση ότι η πλειοψηφία των διαταραχών που οφείλονται στην έλλειψη δεσμίνης διορθώνονται έπειτα από υπερέκφραση της πρωτεΐνης BCL-2 στην καρδιά *Des^{-/-}* ποντικίου (Εικόνα 9) (Weisleder, Taffet et al. 2004). Η BCL-2 είναι μια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη η οποία φυσιολογικά ανιχνεύεται στα σημεία επαφής των μιτοχονδρίων και ρυθμίζει τη λειτουργία της πορίνης.



Εικόνα 11. Καρδιο-ειδική υπερέκφραση της BCL-2 προστατεύει το $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο. Μορφολογική μελέτη καρδιών από ποντίκια WT (A), $Des^{-/-}$ (B) και $bcl-2Des^{-/-}$ (Γ). Ανάλυση ιστολογίας με χρώση εωσίνη/αιματοξυλίνη (Z) και με τριχρωμία Masson (I), από $bcl-2Des^{-/-}$ ποντίκια παρουσιάζει τη σημαντική ελάττωση της εκφύλισης και ίνωσης του $bcl-2Des^{-/-}$ μυοκαρδίου σε σύγκριση με το $Des^{-/-}$. Ηλεκτρονική μικροσκοπία μυοκαρδίου από $bcl-2Des^{-/-}$ ποντίκια (M) δείχνει την βελτίωση των ανωμαλιών που παρατηρούνται στο $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο (Λ) (Weisleder, Taffet et al. 2004).

6 Κερατίνες

6.1 Εισαγωγή στις κερατίνες

Οι κερατίνες αποτελούν τα επιθηλιο-ειδικά μέλη της υπεροικογένειας των γονιδίων και πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων. Ομαδοποιούνται σε τύπου I (28 γονίδια) και τύπου II (26 γονίδια) πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων (όξινες και βασικές κερατίνες, αντίστοιχα). Είναι αυστηρά ρυθμιζόμενες ως ζεύγη πρωτεϊνών, αντικατοπτρίζοντας τη φύση σχηματισμού τους ετεροπολυμερών ινιδίων διατομής 10 nm, με τρόπο ιστο-ειδικό και σχετιζόμενο με το στάδιο διαφοροποίησης στα επιθήλια (Moll, Franke et al. 1982; Fuchs 1995; Schweizer, Bowden et al. 2006). Παραδείγματα των τύπου III ενδιάμεσων ινιδίων περιλαμβάνουν τη δεσμίνη στους μύες και τη βιμεντίνη στα μεσεγχυματικά κύτταρα και του τύπου IV περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες νευροϊνιδίων των νευρονικών κυττάρων (βλέπε Πίνακα 1).

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε ένας οδηγός για την ονοματολογία και κατηγοριοποίηση των κερατινών (Schweizer, Bowden et al. 2006), ο οποίος είναι πλέον ευρέως αποδεκτός. Σε συντομία, οι 54 λειτουργικές κερατίνες του ανθρώπου κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται και ταυτοποιούνται από έναν αριθμό. Συγκεκριμένα, κατηγοριοποιούνται ως επιθηλιακές κερατίνες, που αντιστοιχούν σε 37 γονίδια και κερατίνες τριχών, οι οποίες αναφέρονται σε 17 γονίδια. Για παράδειγμα, οι επιθηλιακές κερατίνες τύπου I αριθμούνται ως 9-28 και του τύπου II επιθηλιακές κερατίνες ως 1-8 και 71-80 (Schweizer, Bowden et al. 2006).

Διάφορα χαρακτηριστικά διαχωρίζουν τις κερατίνες από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων (Coulombe and Omary 2002; Pan, Hobbs et al. 2013). Αρχικά, εκφράζονται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και δεύτερον σχηματίζουν υποχρεωτικά ετεροπολυμερή ενωμένα με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς, τα οποία περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία τύπου I και μία τύπου II κερατίνη. Ωστόσο, η δομική οργάνωση των κερατινών είναι παρόμοια με αυτή των άλλων πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων (Εικόνα 7). Περιέχουν ένα κεντρικό ραβδωτό τμήμα σπειροειδούς α -έλικας, ανάμεσα σε τμήματα της κεφαλής και της ουράς, τα οποία δεν παρουσιάζουν δομή α -έλικας (Herrmann, Strelkov et al. 2009). Οι ακραίες αυτές περιοχές περιέχουν τις περισσότερες από τις δομές ρυθμιστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης και της γλυκοζυλίωσης, και αποτελούν τα τμήματα τα οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ετερογένεια μεταξύ των διαφορετικών κερατινών (Coulombe and Omary 2002). Επιπλέον, παρόμοια με άλλα ενδιάμεσα ινίδια, οι κερατίνες εμφανίζονται ως τετραμερή στην απλούστερη

κυτταροπλασματική τους δομή (Omary, Ku et al. 1998) που περιλαμβάνουν 2 ετεροπολυμερικά διμερή τύπου I και τύπου II (Herrmann, Strelkov et al. 2009).

6.2 Ιστο-ειδική έκφραση κερατινών

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των κερατινών είναι πως κυριαρχεί ένα συγκεκριμένο ζεύγος κερατινών ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο του επιθηλίου και το στάδιο διαφοροποίησης (Coulombe and Omary 2002). Για παράδειγμα στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας εκφράζονται οι κερατίνη 5 / κερατίνη 14 (K5/K14), ενώ στα κερατινοκύτταρα της υπερβασικής στιβάδας εκφράζονται οι K1/K10. Οι κερατίνες που εκφράζονται κυρίως στα απλά (μονόστιβα) επιθήλια αποτελούν τις κερατίνες απλών επιθηλίων (εφεξής, KAE) (simple epithelial keratins, SEKs) και περιλαμβάνουν τις K7, K8, K18, K19, K20 και K23. Ωστόσο υπάρχουν κάποιες ιδιαίτερες εξαιρέσεις στην έκφραση των KAE, όπως η έκφραση κάποιων σε ιστούς με στρωματοποιημένο επιθήλιο (όπως οι K7 και K19 στο επιθήλιο της ουροδόχου κύστης) και κάποιες KAE που έχουν βρεθεί σε μη επιθηλιακούς ιστούς (βλέπε αντίστοιχη παράγραφο).

Επιπλέον, καθώς τα απλά επιθήλια συνήθως επενδύουν αδένες και βρίσκονται σε όργανα που συμμετέχουν σε διεργασίες έκκρισης ή απορρόφησης ουσιών, τα μεμονωμένα κύτταρα συνήθως είναι πολωμένα, το οποίο δείχνει πως το μοναδικό πρότυπο έκφρασης των KAE σε αυτά τα κύτταρα είναι πιθανόν να έχει λειτουργικές συνέπειες που σχετίζονται με την πολωμένη διευθέτηση πρωτεϊνών, την απορρόφηση και την έκκριση (Toivola, Tao et al. 2005).

6.3 Έκφραση κερατινών σε φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες στρες

Οι κερατίνες απλών επιθηλίων (KAE) με την πιο πληθωρική παρουσία και οι περισσότερο μελετημένες είναι οι K8 και K18 (Ku, Toivola et al. 2004). Πολλά απλά επιθήλια εκφράζουν επίσης σε διάφορα επίπεδα τις K7, K19 και K20, ωστόσο τα ενήλικα ηπατοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς νεφρικών σωληναρίων (και οι δύο κυτταρικοί τύποι αυτοί είναι πολωμένα κύτταρα απλών επιθηλίων) εκφράζουν μόνο τις K8 και K18 (Ku, Strnad et al. 2007). Σε αντίθεση, τα εντεροκύτταρα παρουσιάζουν ένα πολύπλοκο πρότυπο έκφρασης KAE που εξαρτάται

από το στάδιο διαφοροποίησης και του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι περιορισμένη σχετικά με την K23 που έχει ταυτοποιηθεί πρόσφατα, αλλά είναι γνωστό πως εκφράζεται σε όγκους του παγκρέατος και του κόλον, αλλά σε χαμηλά επίπεδα (Omary, Ku et al. 2009). Οι K8 και K18 βρίσκονται επίσης σε ψευδοστρωματοποιημένα επιθήλια και επιθήλια του ουροθηλίου, όπου εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα του αυλού. Οι K7 και K19 χρησιμεύουν ως μάρτυρες των πορογενών επιθηλίων και βρίσκονται επίσης στα γαστρεντερικά επιθήλια, ενώ μικρά επίπεδα των K18 και K19 βρίσκονται κατά περιπτώσεις στη βασική στοιβάδα του μη-κερατινοποιημένου πλακώδους επιθηλίου (Moll, Divo et al. 2008). Η K20 εντοπίζεται κυρίως σε τελικώς διαφοροποιημένα εντεροκύτταρα, στο επιθήλιο του ουροθηλίου και το γαστρικό επιθήλιο και στα νευροενδοκρινή κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Merkel του δέρματος (Moll, Divo et al. 2008). Επιπλέον εμφανίζεται να υπερεκφράζεται σημαντικά σε βλάβες του παγκρέατος, μαζί με τις K8, K18 και K19 (Zhong, Zhou et al. 2004).

Κάποιοι κυτταρικοί τύποι παρουσιάζουν μία πολωμένη διεύθυνση των ΚΑΕ σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως παρατηρήθηκε σε παγκρεατικά αδενοκυψελιδικά κύτταρα ποντικού. Για παράδειγμα, οι K8 και K18 εντοπίζονται κυρίως ως κυτταροπλασματικά ινίδια, ενώ οι K7 και K19 βρίσκονται κυρίως στο πλευρικό διαμέρισμα κοντά στη μεμβράνη (Toivola, Baribault et al. 2000). Αυτή η εξειδικευμένη υποκυτταρική εντόπιση μπορεί να δηλώνει τις διαφορετικές ιδιότητες σχηματισμού ινιδίων που παρατηρούνται κατά τη μελέτη των πρωτεϊνών αυτών σε απομονωμένες μορφές ή μετά από κυτταρικό μετασχηματισμό (Fradette, Germain et al. 1998), ή μπορεί να δηλώνει μοναδικές τροποποιήσεις κερατινών ή αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Είναι σημαντικό, πως η υπερέκφραση των K19 και K20 έπειτα από βλάβη του παγκρέατος συνοδεύεται από τη ενσωμάτωσή τους σε κυτταροπλασματικά ινίδια, ενώ η τοποθέτησή τους επανέρχεται στο τυπικό τους πρότυπο κατά την επούλωση (Zhong, Zhou et al. 2004).

Καθώς παρουσιάζουν τέτοια ποικιλομορφία στον αριθμό, στη δομή και στην ιστο-ειδική τους έκφραση, οι κερατίνες αποτελούν σημαντικούς ιστολογικούς δείκτες και παρουσιάζουν ένα δυναμικό πρότυπο έκφρασης κατά την εμβρυογένεση και σε κάποιες καταστάσεις στρες. Κατά την εμβρυογένεση, η έκφραση των κερατινών τύπου II προηγείται της έκφρασης των τύπου I κερατινών, ωστόσο απαιτούνται μέλη και των δύο οικογενειών για το σχηματισμό κυτταροπλασματικών ινιδίων (Lu, Hesse et al. 2005). Επιπλέον, οι εμβρυικοί ηπατοβλάστες εκφράζουν K7, K14 και K19, ενώ καμία από αυτές δεν ανιχνεύονται στα ενήλικα ηπατοκύτταρα (Omary, Ku et al. 2002). Στο εμβρυικό νεφρό, οι κερατίνες και η βιμεντίνη συχνά συνεκφράζονται, ενώ σπάνια βρίσκονται στο ίδιο κύτταρο στα ενήλικα άτομα (Moll, Hage et al. 1991).

Παρόμοια με τις αλλαγές στην έκφραση των κερατινών που σχετίζονται με την εμβρυογένεση, τέτοιες αλλαγές συμβαίνουν και ως απόκριση στο στρες, πιθανόν οφειλόμενες στην αναγέννηση ή στη αποδιαφοροποίηση. Για παράδειγμα, *de novo* έκφραση της K7 και σε μικρότερο βαθμό της K19, παρουσιάζεται σε χολοστατικές ηπατικές βλάβες του ανθρώπου (Ku, Strnad et al. 2007). Σε χρόνιες βλάβες των νεφρών, έχει παρατηρηθεί αυξημένη ή *de novo* έκφραση των K7, K17 και K19 όπως και άλλων ενδιαμέσων ινιδίων εκτός των κερατινών (Moll, Hage et al. 1991). Οι συνθήκες στρες επηρεάζουν όχι μόνο το πρότυπο έκφρασης των κερατινών, αλλά και τα επίπεδα έκφρασης και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους. Για παράδειγμα, αυξημένη φωσφορυλίωση των κερατινών είναι δείκτης ιστικής βλάβης και ανάπτυξης της νόσου στο ήπαρ του ανθρώπου και του ποντικίου (Ku, Strnad et al. 2007) και στα εντερικά κύτταρα “goblet” ποντικίου (Zhou, Cadrin et al. 2006). Υπό συγκεκριμένες συνθήκες στρες, η έκφραση των KAE αυξάνεται έως και 3 φορές, το οποίο μπορεί να συνεισφέρει στην απαραίτητη κυτταροπροστασία που παρέχουν οι K8 και K18 στο ήπαρ, ωστόσο η σημαντικότητα αυτής της υπερέκφρασης δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί άμεσα (Ku, Strnad et al. 2007). Συγκεκριμένα, υπερέκφραση των KAE έπειτα από βλάβη έχει παρατηρηθεί στο ήπαρ ποντικίου (Cadrin, Hovington et al. 2000), στην πειραματική παγκρεατίτιδα (Zhong, Zhou et al. 2004) και χολολιθίαση στο ποντίκι.

Τα ευρήματα αυτά στα τροφικά υποστηρίζονται από την παρατήρηση της επαγωγής K8 και K18 σε ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κύρωση (primary biliary cirrhosis, PBC) (Fickert, Trauner et al. 2003). Εναλλακτικά, το στρες μπορεί επίσης να επάγει την αποδόμηση των K8 και K18, όπως παρατηρήθηκε στα A549 ανθρώπινα κύτταρα καλλιέργειας έπειτα από έκθεση σε μηχανικό στρες (Jaitovich, Mehta et al. 2008), αλλά δεν είναι ξεκάθαρο εάν αυτό συμβαίνει *in vivo* και εάν η επαγωγή των κερατινών σε σύγκριση με την αποδόμησή τους διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της βλάβης ή του ιστού. Για παράδειγμα, οι K8, K18 και K19 είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στην αποδόμηση κατά την πειραματική παγκρεατίτιδα, ενώ η ακτίνη και η τουμπουλίνη πρωτεολύονται δραματικά (Zhong and Omary 2004). Αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν μία ξεκάθαρη διαφοροποίηση μεταξύ των KAE και του σκελετού των ινιδίων ακτίνης και των μικροσωληνίσκων στη βάση της απόκρισης στο στρες.

6.4 Έκφραση κερατινών σε μη επιθηλιακούς ιστούς

Επιπρόσθετα του κλασσικού ιστο-ειδικού και εξαρτώμενου από το στάδιο διαφοροποίησης προτύπου έκφρασης, οι ΚΑΕ εντοπίζονται επίσης σε κάποια μη επιθηλιακά συστήματα. Για παράδειγμα, οι Κ8 και Κ19 έχει προταθεί πως εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο ενήλικο μυοκάρδιο, όπου εντοπίζονται στους Ζ-δίσκους και τις Μ-ζώνες των μυοϊνιδίων κοντά στο σαρκόλειμμα, ενώ η έκφραση της Κ18 στην καρδιά περιορίζεται στα έμβρυα έως και την εμβρυική μέρα 16 και εξαφανίζεται στα ενήλικα (Ursitti, Lee et al. 2004). Η παρουσία της Κ19 στον μυ προτάθηκε πως είναι σημαντική, καθώς τα ποντίκια με έλλειψη της Κ19 αναπτύσσουν μια ήπια μυοπάθεια του ταχείας σύσπασης (fast-twitch) σκελετικού μυός σε συνδυασμό με τη διατάραξη των κοσταμερών και την ανώμαλη συγκέντρωση των μιτοχονδρίων στα κενά μεταξύ του σαρκειλήματος και των γειτονικών μυοϊνιδίων (Stone, O'Neill et al. 2007). Ωστόσο, τα παραπάνω ευρήματα για την έκφραση των Κ8/Κ19 στον μυ δεν έχουν πιστοποιηθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες.

Το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, ένα μονόστιβο από επίπεδα εξαγωνικά κύτταρα, επίσης εκφράζουν το ζεύγος Κ8/Κ18. Επιπλέον, το ανώμαλο ενδοθήλιο του κερατοειδούς σε ασθενείς με πολύμορφη οπίσθια δυστροφία του κερατοειδούς (posterior polymorphous corneal dystrophy, PPCD) παρουσιάζει πολύστιβα χαρακτηριστικά με έκφραση κυρίως των Κ7 και Κ19 επιπλέον των Κ8 και Κ18 (Cockerham, Laver et al. 2002). Αυτό το διαταραγμένο πρότυπο έκφρασης των κερατινών μπορεί να αντιπροσωπεύει μία διαδικασία μετάπλασης από έναν ενδοθηλιακό σε έναν επιθηλιακό φαινότυπο.

Εκτοπική έκφραση των κερατινών συμβαίνει επίσης κατά την αθηροσκλήρωση της νόσου της στεφανιαίας αρτηρίας. Σε αυτήν την περίπτωση, τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων στις αθηρωσκληρωτικές περιοχές βλάβης εκφράζουν Κ8/Κ18, οι οποίες δεν ανιχνεύονται σε φυσιολογικά αγγεία (Jahn, Kreuzer et al. 1993). Η έκφραση κερατινών σε αυτά τα κύτταρα απαιτεί κυτταρική προσκόλληση σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας καθώς και μιτογόνα ερεθίσματα (Moon, Yau et al. 2008). Οι επαγόμενες Κ8/Κ18 είναι υπερφωσφορυλιωμένες εξαιτίας της απόκρισης στο στρες, όπως παρατηρείται στα ενδιάμεσα ινίδια σε τυπικές περιπτώσεις απόκρισης σε βλάβες (Omary, Ku et al. 2006), ή πιθανόν ως αποτέλεσμα της απόπτωσης κατά την ωρίμανση των αθηρωματικών πλακών, η οποία οδηγεί σε ίνωση (Bar, Bea et al. 2001). Είναι ενδιαφέρον, τέλος, πως τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων του ανθρώπινου ομφάλιου λώρου εκφράζουν Κ8, Κ18 και Κ19 (Bar, Bea et al. 2001), το οποίο όπως προτάθηκε θα μπορούσε να σχετίζεται με τη μυογενή διαφοροποίηση (Bader, Jahn et al. 1988).

6.5 Λειτουργίες των κερατινών

Σημαντική πρόοδος στην έρευνα των κερατινών τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει στη συσχέτιση των ενδιάμεσων ινιδίων των κερατινών με 2 κυρίαρχες λειτουργίες. Πρώτον, τη δομική στήριξη, χωρίς την οποία οι φυσικές βλάβες εκθέτουν την κληρονομική ευαισθησία και οδηγούν σε απουσία της ακεραιότητας του κυττάρου. Δεύτερη είναι η λειτουργική ρύθμιση μεταβολικών διεργασιών και μονοπατιών που ελέγχουν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την απόπτωση. Οι δύο αυτοί ρόλοι εμπεριέχουν ρυθμιζόμενες αλληλεπιδράσεις με διαφορετικές ομάδες κυτταρικών πρωτεϊνών (Kim and Coulombe 2007; Toivola, Strnad et al. 2010).

Οι επιφάνειες του σώματος και διάφορα εσωτερικά όργανα καλύπτονται από πολωμένα επιθηλιακά φύλλα, τα κύτταρα των οποίων εξαρτώνται λειτουργικά από τα δίκτυα κερατινών. Μεταξύ των πολλαπλών ρόλων τους, οι ιστοί αυτοί μας προστατεύουν από περιβαλλοντικούς παράγοντες στρες διαφόρων μορφών, συμπεριλαμβανομένων του μηχανικού, κυτταροτοξικού, οξειδωτικού και μεταβολικού στρες. Διατάραξη αυτών των προστατευτικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν τις κερατίνες σχετίζεται με πολλές ασθένειες (McLean and Moore 2011; Pan, Hobbs et al. 2013). Σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες συνεχίζουν να στοχεύουν στη διευκρίνιση του πότε και με ποιους τρόπους εκδηλώνονται οι προστατευτικοί αυτοί μηχανισμοί των κερατινών.

Πρόοδος έχει πραγματοποιηθεί επίσης στην τοπολογική μελέτη του σχηματισμού και της αναδιοργάνωσης του δικτύου κερατινών σε ζωντανά επιθηλιακά κύτταρα. Αντίστοιχα, έχουν περιγραφεί υπεύθυνοι μηχανισμοί για την προσκόλληση των ινιδίων κερατίνης σε σημεία διασυνδέσεων των κυττάρων μεταξύ τους και κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία και την επιφάνεια του πυρήνα και συζητούνται σε βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις (Simpson, Patel et al. 2011). Ο ρόλος των μεταλλάξεων των κερατινών ως υπεύθυνοι παράγοντες στις κληρονομικές επιθηλιακές διαταραχές συνεχίζει να συγκεντρώνει αρκετό ενδιαφέρον και επιπλέον συζητείται σε βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις (Pan, Hobbs et al. 2013).

6.5.1 Δομική στήριξη

Η λειτουργία δομικής στήριξης των κερατινών εκτιμήθηκε αρχικά από τις ασθένειες ευαισθησίας του δέρματος στις οποίες εμπλέκονται μεταλλάξεις επιδερμικών κερατινών (McLean and Moore 2011; Pan, Hobbs et al. 2013). Τα

σύνδρομα πομφολυγώδης επιδερμόλυση (epidermolysis bullosa simplex, EBS) και επιδερμολυτική υπερκεράτωση (epidermolytic hyperkeratosis, EHK) αποτελούν παραδείγματα γενετικών ασθενειών που προκύπτουν από μεταλλάξεις στα K5/K14 και K1/K10, ζεύγη ετεροδιμερών κερατίνης τα οποία εκφράζονται στη βασική και υπερβασική στιβάδα της επιδερμίδας, αντίστοιχα, και χαρακτηρίζονται από κυτταρόλυση των κερατινοκυττάρων και απώλεια της δομικής ακεραιότητας στα αναφερόμενα στρώματα της επιδερμίδας (McLean and Moore 2011; Pan, Hobbs et al. 2013).

Διάφορα κύρια χαρακτηριστικά του φαινοτύπου του συνδρόμου EBS, έχουν ταυτοποιηθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν μόρια K14 με μεταλλάξεις έλλειψης (Coulombe, Hutton et al. 1991) και σε ποντίκια με έλλειψη της K14 (Lloyd, Yu et al. 1995) ή της K5 (Peters, Kirfel et al. 2001). Παρόμοια, διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν μία μεταλλαγμένη πρωτεΐνη K10 με έλλειψη τμήματός της (Porter, Leitgeb et al. 1996), ή τη K10 με τη μετάλλαξη R154C (Arin, Longley et al. 2001), παρουσιάζουν βλάβες που προσομοιάζουν την ασθένεια της επιδερμολυτικής υπερκεράτωσης.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η απενεργοποίηση της K10 επάγει υπερπολλαπλασιασμό όπως παρουσιάζεται στην επιδερμολυτική υπερκεράτωση, αλλά όχι εμφανείς κυτταρικές ευαισθησίες στην επιδερμίδα (Reichelt, Bussow et al. 2001). Αυτή η διαφορά πιθανόν σχετίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην επαγωγή των πρωτεϊνών K5 και K14 και στον πολυμερισμό τους με την K1, σε διαφοροποιούμενα κερατινοκύτταρα της υπερβασικής στιβάδας της επιδερμίδας των ποντικών με έλλειψη της K10 (Reichelt, Bussow et al. 2001). Μία πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει αυτήν τη άποψη, καθώς παρουσιάζει πως ποντίκια με διπλή έλλειψη των K10 και K1 εμφανίζουν φαινότυπο θνησιμότητας των νεογέννητων με εκτεταμένες βλάβες στο δέρμα και κυτταρόλυση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων της υπερβασικής στιβάδας. Ο φαινότυπος των ποντικών με διπλή έλλειψη των K10 και K1 επίσης υποστηρίζει την άποψη της συμμετοχής των κερατινών στη ρύθμιση της ακεραιότητας του πυρήνα όπως και της προσκόλλησης μέσω των δεσμοσωμάτων.

Οι φαινότυποι που προκύπτουν από μεταλλάξεις στις κερατίνες και εμφανίζουν ευαισθησία της επιδερμίδας, σχετίζονται επίσης και με μεταβολές των μικρο-μηχανικών ιδιοτήτων του κυτταροσκελετού (McLean and Moore 2011; Coulombe and Lee 2012). Οι μοναδικές ιδιότητες των δικτύων κερατινών, όπως η ικανότητα να αυτο-οργανώνονται σε διασυνδεδεμένα δίκτυα (Lee and Coulombe 2009), η αλληλεπίδρασή τους με συνδέσμους κυττάρων (δεσμοσώματα) και κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία (ημιδεσμοσώματα), όπως και με την F-ακτίνη και τους μικροσωληνίσκους (Simpson, Patel et al. 2011), προτείνουν ακόμα ένα ρόλο

στη λειτουργία της δομικής στήριξης. Ενώ τα χαρακτηριστικά της υπερδομής των δικτύων κερατινών με διάφορες ανωμαλίες ξεκάθαρα προτείνουν τη σημαντικότητά τους για τη μηχανική του κυττάρου και του ιστού, η βαθύτερη κατανόηση αυτού του ρόλου είναι δύσκολη δεδομένων των περιορισμών των *ex vivo* κυτταρικών μελετών και των τεχνικών που χρησιμοποιούνται (Pan, Hobbs et al. 2013).

Διατάραξη, μέσω μεταλλάξεων, της προσκόλλησης των ενδιάμεσων ινιδίων των κερατινών σε διασυνδέσεις μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε ανωμαλίες που θα συμπεριλάβουν στη συνέχεια και ευαισθησία των κερατινοκυττάρων και του ιστού γενικότερα (Jonkman, Pasmooij et al. 2005). Επιπροσθέτως με την πρόσδοση μηχανικής ακεραιότητας σε κυτταρικά και υποκυτταρικά επίπεδα, η προσκόλληση των ενδιάμεσων δικτύων των κερατινών στα δεσμοσώματα, μπορεί επίσης να επηρεάσει το σχηματισμό, το μέγεθος και τη μοριακή σύνθεσή τους (Godsel, Hsieh et al. 2005).

6.5.2 Κερατίνες ως απόκριση σε παράγοντες του στρες

Παραπάνω συζητήθηκε μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες των κερατινών, την ειδική απόκρισή τους σε παράγοντες του στρες με σκοπό, όπως θεωρείται, να συνεισφέρουν σε διεργασίες κυτταροπροστασίας. Τα ενδιάμεσα ινίδια κερατινών προσδίδουν σημαντική προστασία στα εσωτερικά όργανα, παρόλο που αυτά είναι δύσκολο να υποστούν μηχανικό στρες του επιπέδου που δέχονται η επιδερμίδα και άλλα επιφανειακά επιθήλια. Το συκώτι, για παράδειγμα, είναι ένα μεταβολικά υπερδραστήριο όργανο το οποίο λειτουργεί εν μέρη για την αποτοξίνωση ξένων ουσιών. Προηγούμενες προσπάθειες έχουν ξεκάθαρα αποδείξει πως οι K8 και K18, και εν μέρη διάφορες συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσής τους, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τα ηπατοκύτταρα να ανταπεξέλθουν σε παράγοντες μεταβολικού, οξειδωτικού και χημικού στρες (Pan, Hobbs et al. 2013).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως, επιπρόσθετα στη φωσφορυλίωση, η ομοιοπολική τροποποίηση γλυκοζυλίωσης (O-linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc) στα αμινοξέα σερίνης 30/31/49 της K18, ενισχύει τη λειτουργία ρύθμισης του στρες των ηπατικών κερατινών (Ku, Toivola et al. 2010). Πράγματι, σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες, ποντίκια που υπερεκφράζουν τη μεταλλαγμένη ανθρώπινη K18 S30/31/49A (η οποία δεν μπορεί να γλυκοζυλιωθεί με τροποποίηση O-GlcNAc) δείχνουν ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και αυξημένη θνησιμότητα έπειτα από στρεπτοζοτοκίνη, PUGNAc (1, 5-υδροξυμολακτόνη), ή αντισώματα για το Fas (Ku, Toivola et al. 2010). Στη συγκεκριμένη μελέτη προτείνεται πως υπό κανονικές

συνθήκες η συγκεκριμένη τροποποίηση Ο-γλυκοζυλίωσης της K18 δρα στη θετική ρύθμιση της ενεργότητας των Akt και PKC κινασών επιβιωτικών μονοπατιών, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από την απόπτωση και προωθώντας τους αντισταθμιστικούς μηχανισμούς τους στο στρες.

6.5.3 Ρύθμιση του πυρήνα

Επιπρόσθετα με τους ρόλους τους στη διασύνδεση των κυττάρων, τα δίκτυα ενδιάμεσων ινιδίων των κερατινών μπορεί να είναι σημαντικά και στη ρύθμιση του σχήματος και του μεγέθους του πυρήνα. Η πλεκτίνη, μία ευρέως γνωστή πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τα ενδιάμεσα ινίδια (Suozzi, Wu et al. 2012), βρέθηκε πρόσφατα πως αλληλεπιδρά με τη νεσπρίνη-3, μία πρωτεΐνη του εξωτερικού πυρηνικού φακέλου (Wilhelmsen, Litjens et al. 2005), προσφέροντας στοιχεία για την πολυαναμενόμενη υπόθεση της προσκόλλησης των κυτταροπλασματικών δικτύων στον πυρήνα (Dupin, Sakamoto et al. 2011). Σε συμφωνία με το παραπάνω, στοχευμένη διαγραφή της νεσπρίνης-3 στο μοντέλο ψαριού-ζέμπρα (zebrafish) διαταράσσει την περιπυρηνική συγκέντρωση των ινιδίων κερατινών (Postel, Ketema et al. 2011).

Οι Lee και συνεργάτες (Lee, Kim et al. 2012) κρυσταλλοποίησαν με επιτυχία και έλυσαν την πρώτη δομή σε ατομικό επίπεδο ενός ετεροτυπικού συμπλόκου κερατίνης που αποτελούταν από επαναλήψεις επτάδας που περιείχαν 2B υπομονάδες της K5 και K14. Το πρότυπο του σπειροειδούς ετεροδιμερούς παρουσιάζει διάφορους ασύμμετρους (π.χ. πολυκατευθυντικούς) δεσμούς οι οποίοι πιθανόν κατευθύνουν την διεργασία σχηματισμού ετεροδιμερών τύπου I με τύπου II κερατίνες.

Αποτελεί έκπληξη ωστόσο, πως ένα στοιχείο του κρυσταλλικού δικτύου που σχετίζεται με συμμετρία έχει σπειροειδή ετεροδιμερή που σχηματίζουν ένα ιδιαίτερο αντικείμενο σχήματος X, που ανήκει σε έναν ομοτυπικό δεσμό δισουλφιδίου που περιέχει την κυστεΐνη 367 στην K14. Αυτός ο δεσμός δισουλφιδίου είναι εμπλουτισμένος στην περιπυρηνική περιοχή των βασικών κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας, όπου προτείνεται πως σταθεροποιεί ένα κλουβί ενδιάμεσων δικτύων κερατινών το οποίο μπορεί να επηρεάζει το μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα σε κάποιο πρώιμο στάδιο της διαφοροποίησης (Lee, Kim et al. 2012). Αυτό το κατάλοιπο κυστεΐνης είναι συντηρημένο στην K14 και στις σχετιζόμενες κερατίνες τύπου I, συμπεριλαμβανομένης της K10.

Με δεδομένα τα παραπάνω, είναι ενδιαφέρον πως στα ποντίκια με διπλή έλλειψη K1/K10 δείχνουν πρώιμες διαταραχές των πυρήνων στα υπερβασικά στρώματα της επιδερμίδας, μαζί με μειωμένα επίπεδα της εμερίνης, της λαμίνης A/C και της Sun-1, παρά το σχετικά φυσιολογικό πρόγραμμα διαφοροποίησής τους (Wallace, Roberts-Thompson et al. 2012). Ενώ χρειάζεται προσοχή για τη διατύπωση οποιασδήποτε υπόθεσης σε αυτό το σημείο, τα ευρήματα αυτά προτείνουν πως, όπως συμβαίνει με τις πυρηνικές λαμίνες (Butin-Israeli, Adam et al. 2012), τα περιπυρηνικά δίκτυα ενδιάμεσων δικτύων των κερατινών θα μπορούσαν επίσης να συνεισφέρουν στον καθορισμό της πυρηνικής μορφολογίας και να συμμετέχουν στη φυσιολογία του πυρήνα.

6.6 Μηχανισμοί ρύθμισης κυτταρικών διεργασιών από τις κερατίνες

6.6.1 Μηχανισμοί προστασίας του K8/K18 από τον κυτταρικό θάνατο

Τα τελευταία κυρίως χρόνια, συνεχώς αυξανόμενα πειραματικά δεδομένα παρουσιάζουν τις κερατίνες και ιδιαίτερα τις κερατίνες των απλών επιθηλίων, ως νέες κυτταροπροστατευτικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, με διάφορες μηχανικές και μη μηχανικές λειτουργίες (Omary, Ku et al. 2009; Pan, Hobbs et al. 2013). Αυτές περιλαμβάνουν προστασία από το κυτταρικό στρες και την απόπτωση (Pan, Hobbs et al. 2013), ρύθμιση της επιθηλιακής πολικότητας, στόχευση πρωτεϊνών σε υποκυτταρικά διαμερίσματα (Omary, Ku et al. 2009; Toivola, Strnad et al. 2010; Coulombe and Lee 2012; Pan, Hobbs et al. 2013) και ρύθμιση της μετάφρασης (Kim, Lee et al. 2010).

Το ζεύγος κερατινών K8/K18, μεταξύ όλων των άλλων ζευγών κερατινών, είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς είναι οι πρώτες κερατίνες που εκφράζονται στην εμβρυογένεση των σπονδυλωτών (Oshima, Howe et al. 1983), είναι οι πιο διαδεδομένες κερατίνες στα εσωτερικά όργανα (Moll, Franke et al. 1982; Quinlan, Cohlberg et al. 1984) καθώς αποτελούν το βασικό συστατικό του μονόστιβου επιθηλίου και έχουν σχετιστεί με συγκεκριμένες μηχανικές και μη μηχανικές κυτταροπροστατευτικές λειτουργίες. Εμπλέκονται σε διάφορες ασθένειες, που σχετίζονται με την παθολογία του ήπατος έως και τον καρκίνο, ενώ έχει προταθεί πως εμπλέκονται στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών, σε προστασία από τον κυτταρικό θάνατο, στη στόχευση πρωτεϊνών και ρύθμιση οργανιδίων, καθώς και μεταφοράς πρωτεϊνών σε υποκυτταρικό επίπεδο (Omary, Ku et al. 2009; Toivola,

Strnad et al. 2010; Coulombe and Lee 2012; Pan, Hobbs et al. 2013; Kim and Coulombe 2007).

Σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια, αρκετές μελέτες τονίζουν το ρόλο του ζεύγους κερατινών K8/K18 συγκεκριμένα στη ρύθμιση διεργασιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο, προσδίδοντας έναν νέο, μη μηχανικό, κυτταροπροστατευτικό ρόλο για αυτές τις πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων. Μελέτες σε ηπατοκύτταρα με έλλειψη της K8 ή/και της K18 έδειξαν πως αυτές συνεισφέρουν στην προστασία από την απόπτωση που προκαλείται από τον παράγοντα TNFα (ή τον παράγοντα Fas) (Caulin, Ware et al. 2000; Gilbert, Loranger et al. 2001), ενώ αντίστοιχες ιδιότητες ρύθμισης του μονοπατιού του TNFα έχουν προταθεί και για την K17, χρησιμοποιώντας γενετικά μοντέλα με έλλειψη της πρωτεΐνης αυτής (Tong and Coulombe 2006).

Πολλαπλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τη λειτουργία των κερατινών στον ανταγωνισμό των μονοπατιών των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο από τον κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα, η K8 έχει προταθεί να ρυθμίζει τη στόχευση του υποδοχέα του Fas στην πλασματική μεμβράνη (Gilbert, Loranger et al. 2001), ενώ η K18 πως ρυθμίζει τη διαθεσιμότητα της TRADD μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης, παρεμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα TNFR1 στην μεμβράνη, η οποία είναι αναγκαία για την έναρξη του μονοπατιού του κυτταρικού θανάτου (Inada, Izawa et al. 2001). Επιπλέον για την K18 έχει προταθεί πως ρυθμίζει την απόκριση στον κυτταρικό θάνατο, προστατεύοντας τα ηπατοκύτταρα μέσω της ρύθμισης του κυτταροπροστατευτικού παράγοντα c-FLIP (Gilbert, Loranger et al. 2004).

Η ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου από το ζεύγος κερατινών K8/K18 δεν περιορίζεται μόνο στην απόπτωση μέσω των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου, αλλά κατέχουν έναν γενικό ρυθμιστικό ρόλο ελέγχοντας βασικά στάδια των διεργασιών ενεργοποίησης των κασπασών. Η πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA που περιέχει υπομονάδα δράσης κυτταρικού θανάτου (Death Effector Domain-containing DNA binding protein, DEDD) κατευθύνει την προ-κασπάση 3 στα ινίδια κερατινών στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης στα επιθηλιακά κύτταρα, έπειτα από ενεργοποίηση είτε των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου, είτε του μονοπατιού κυτταρικού θανάτου εξαρτώμενου από τα μιτοχόνδρια (Lee, Schickling et al. 2002). Παρόμοια συγκέντρωση της ενεργής κασπάσης 9 έχει επίσης παρατηρηθεί στα ινίδια των κερατινών (Dinsdale, Lee et al. 2004). Το προτεινόμενο μοντέλο λειτουργίας των ινιδίων των κερατινών και της DEDD που σχετίζεται με αυτά, είναι να προσφέρουν ένα υπόστρωμα για τη συγκέντρωση και την αυτο-ενεργοποίηση της προ-κασπάσης 3, οδηγώντας στην πρωτεόλυση και ενεργοποίησή της, η οποία επίσης ενεργοποιεί

έναν κύκλο πολλαπλασιασμού των κασπασών ενεργοποιώντας την προ-κασπάση 9 (Dinsdale, Lee et al. 2004).

Υποστηρίζοντας το παραπάνω μοντέλο, η έκφραση μεταλλαγμένου μορίου DEDD με ανικανότητα αλληλεπίδρασης με τις κερατίνες, παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (Lee, Schickling et al. 2002). Επιπροσθέτως, η ικανότητα της DEDD να αλληλεπιδρά με τα ινίδια K8/K18 σχετίζεται σημαντικά με αυξημένη ευαισθησία στην απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων (Schutte, Henfling et al. 2006). Επιπλέον, παρεμπόδιση της συγκέντρωσης των κασπασών από τα ινίδια K8/K18 μέσω της eIF3k, επάγει την απόπτωση μέσω της αύξησης της διαθεσιμότητας των κασπασών στους στόχους τους που δεν σχετίζονται με τις κερατίνες (Lin, Chen et al. 2008). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ένα ρόλο για το δίκτυο ινιδίων K8/K18 στη ρύθμιση της ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των κασπασών, λειτουργώντας ως μια πλατφόρμα συγκέντρωσης και ρύθμισης των πρωτεϊνών του αποπτωτικού μηχανισμού του κυττάρου.

6.6.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κερατινών

Οι λειτουργίες του δικτύου K8/K18 βασίζονται στη δυναμική αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες και από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση σερινών. Σημεία φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων βρίσκονται στις περιοχές της κεφαλής και του ουραίου άκρου, οι οποίες είναι και τα πιο εκτεθειμένα τμήματα των πρωτεϊνών αυτών (Omary, Ku et al. 1998). Έχει ταυτοποιηθεί ένας σημαντικός αριθμός θέσεων φωσφορυλίωσης που περιλαμβάνει τις θέσεις Ser23/Ser73/Ser431 στην K8 και τις Ser33/Ser52 στην K18 (Omary, Ku et al. 1998), ενώ η υπερφωσφορυλίωση των K8/K18 σχετίζεται με την ανάπτυξη της νόσου σε ασθενείς με χρόνια νόσο του ήπατος (Toivola et al., 2004; Zatloukal et al., 2004). Γενικότερα, οι λειτουργίες των K8/K18 στο ήπαρ ρυθμίζονται δυναμικά και σε μεγάλο βαθμό από το πρότυπο φωσφορυλίωσής τους (Omary, Ku et al. 1998) (Omary, Ku et al. 2009).

Έχει προταθεί πως η υπερφωσφορυλίωση των K8/K18 παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της οργάνωσης των ινιδίων των κερατινών, στην αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτές, όπως οι 14-3-3 πρωτεΐνες, και στον κύκλο ζωής των πρωτεϊνών (Coulombe and Omary 2002). Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της K18 στη σερίνη 52 προκαλεί τη ραγδαία πρωτεόλυσή της, τη διευθέτησή της σε καθορισμένο πρότυπο πόλωσης σε ιστούς και παίζει ρόλο στην αναδιοργάνωση των ινιδίων (Ku and Omary 1994). Στις αθηρωματικές πλάκες της

νόσου της στεφανιαίας αρτηρίας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν εκτοπική έκφραση των K8/K18 οι οποίες είναι υπερφωσφορυλιωμένες, ακολουθώντας το τυπικό πρότυπο απόκρισης των ενδιάμεσων ινιδίων έπειτα από βλάβη (Omary, Ku et al. 2006), ή μπορεί να αντιπροσωπεύει αποτέλεσμα της απόπτωσης κατά την ωρίμανση των αθηρωματικών πλακών η οποία οδηγεί σε ίνωση (Bar, Bea et al. 2001).

Η υπόθεση του «σπόγγου φωσφορικών ομάδων» η οποία προτάθηκε από τους Ku και Omary, προτείνει τη δυνατότητα της K8 να ανταγωνίζεται με προ-αποπτωτικά υποστρώματα ανεξάρτητα των κερατινών, για τη φωσφορυλίωση από τις κινάσες που ενεργοποιούνται ως απόκριση στο στρες, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον κυτταρικό θάνατο και την ιστική βλάβη υπό διάφορες συνθήκες (Ku and Omary 2006). Η έκφραση ενός μεταλλαγμένου μορίου της K8 με ανικανότητα φωσφορυλίωσης ενισχύει την απόπτωση που επάγεται από το Fas στο ήπαρ διαγονιδιακών μοντέλων ποντικών (Ku and Omary 2006).

Επιπρόσθετα της φωσφορυλίωσης, στις K8 και K18 συμβαίνει και δυναμική γλυκοζυλίωση O-συνδεδεμένης N-ακετυλγλυκοζαμίνης (O-GlcNAc) στη σερίνη ή θρεονίνη (Chou, Smith et al. 1992). Σε πρόσφατη μελέτη δείχτηκε πως η γλυκοζυλίωση της K18 προσδίδει έναν μοναδικό προστατευτικό ρόλο στη βλάβη του επιθηλίου, επάγοντας τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση των κινασών που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση (Ku, Toivola et al. 2010).

6.7 Κερατίνες κατά την εμβρυική ανάπτυξη

Ο ρόλος των κερατινών στην εμβρυική ανάπτυξη είναι γενικά δύσκολο να χαρακτηριστεί εξαιτίας πολύπλοκων παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικών πλεονασμών και των ιδιοτήτων των γενετικών υποστρωμάτων (Baribault, Penner et al. 1994). Παλιότερα μοντέλα ποντικών με ελαττωματική K8 ή συνδυασμό ελαττωματικών K18/K19 έχουν ξεκάθαρα δείξει έναν ρόλο για τις κερατίνες στην εμβρυική ανάπτυξη επηρεάζοντας τα γιγαντιαία κύτταρα του τροφοβλάστη και τις λειτουργίες του πλακούντα (Jaquemar, Kupriyanov et al. 2003). Με στόχο να απομονώσουν το λειτουργικό πλεονασμό από διαφορετικές κερατίνες, ερευνητές διέγραψαν ολόκληρη τη γενετική περιοχή στο χρωμόσωμα 15 του ποντικού που αντιστοιχεί στα γονίδια όλων των τύπου II κερατινών, δημιουργώντας το *KtyII^{-/-}* μοντέλο (Vijayaraj, Kroger et al. 2009). Αυτή η έλλειψη αποδεικνύεται θανατηφόρα στα έμβρυα ποντικού, στην εμβρυική μέρα E9.5 (στα μέσα της

κυοφορίας), αλλά οι επιθηλιακοί ιστοί φαίνονται κυρίως ανέπαφοι, χωρίς ίχνη κυτταρικής λύσης ή ευαισθησίας του ιστού.

Αντιθέτως, η θνησιμότητα σχετίζεται με άλλους παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του εσφαλμένου εντοπισμού των μετακομιστών GLUT-1 και GLUT-3, αυξημένη ενεργότητα της κινάσης AMP, κατασταλμένη ενεργότητα της mTORC1 και μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση στον αμνιακό σάκο (Vijayaraj, Kroger et al. 2009). Επιπλέον, τα *KtyII*^{-/-} έμβρυα παρουσιάζουν ελαττωματική προσκόλληση μεταξύ των στρωμάτων του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος, φαινόμενο στο οποίο πιθανόν οφείλονται σοβαρές διαταραχές κατά την αγγειογένεση και την αιμοποίηση, μαζί με μια διαταραχή στον πλακούντα, σχετιζόμενη με ανώμαλη διευθέτηση των δευτερογενών γιγαντιαίων κυττάρων του τροφοβλάστη. Το τελευταίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπεροξία του ιστού οφειλόμενη στη διαταραγμένη αγγειογένεση και στην ανεπαρκή ανταλλαγή αερίων μεταξύ του μητρικού και του εμβρυϊκού αίματος (Kroger, Vijayaraj et al. 2011).

Τα κύτταρα καλούνται να μεταναστεύσουν κατά την εμβρυογένεση, με σκοπό να σχηματίσουν νέες δομές και ιστούς. Μία πρόσφατη μελέτη της μετανάστευσης έπειτα από μηχανικό ερέθισμα στα κύτταρα του μοντέλου *Xenopus* φέρνουν στην επιφάνεια στοιχεία για τη ρύθμιση της εμβρυϊκής μετανάστευσης από τις κερατίνες (Weber, Bjerke et al. 2012). Παρατήρησαν πως η πολωμένη προεξοχή και η μετανάστευση μεμονωμένων κυττάρων του μεσενδοδέρματος συμβαίνει σε κατεύθυνση αντίθετη από αυτή που ασκείται από μια δύναμη εξώθησης που εφαρμόζεται σε καντχερίνες, οι οποίες έχουν εκτεθεί στην επιφάνεια. Είναι ενδιαφέρον πως αυτή η τροποποίηση ενεργοποιεί μία αναδιοργάνωση των ενδιάμεσων ινιδίων των κερατινών, συμπεριλαμβανομένης της στρατολόγησής τους σε περιοχές της καντχερίνης και απαιτεί έκφραση της xCK1 (hK8). Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης διασύνδεσης πλακογλοβίνης, προκαλεί παρόμοιες διαταραχές της προεξοχής και επηρεάζει την αναδιοργάνωση του δικτύου των κερατινών έπειτα από άσκηση δύναμης.

Αντίστοιχα, με την αποσιώπηση είτε της xCK1 ή της πλακογλοβίνης προκαλούνται μεταβολές στη δραστηριότητα της προεξοχής των μεσενδοδερμικών κυττάρων σε πραγματικά έμβρυα, παρουσιάζοντας στοιχεία για τη συμμετοχή των κερατινών και της πλακογλοβίνης στην κυτταρική μετανάστευση *in vivo*. Βάση των παραπάνω ευρημάτων, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί η συμμετοχή της K6, της πλακογλοβίνης και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις κερατίνες στη ρύθμιση της κινητικότητας των κερατινοκυττάρων κατά την ενήλικη ζωή.

6.8 Κερατίνες στην παθοφυσιολογία ανθρώπου

6.8.1 Οι κερατίνες απλών επιθηλίων (ΚΑΕ) ως βιο-δείκτες ιστικών βλαβών, καρκίνων και απόκρισης σε θεραπείες

Οι ΚΑΕ ή κομμάτια των ΚΑΕ που βρίσκονται στον ορό του κυκλοφορικού, από νεκρωτικά ή αποπτωτικά, καρκινικά ή μη καρκινικά κύτταρα, έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες για την παρακολούθηση της ανάπτυξης ασθένειας σε διάφορους τύπους καρκίνων (Linder 2007). Οι πιο διαδεδομένοι δείκτες είναι το αντιγόνο πολυπεπτιδίου ιστού (tissue polypeptide antigen, TPA), το οποίο αποτελεί μίξη των K8, K18 και K19, το ειδικό αντιγόνο πολυπεπτιδίου ιστού (tissue polypeptide-specific antigen, TPS), το οποίο προκύπτει από την K18, το τμήμα κερατίνης 21-1 (CYFRA 21-1), το οποίο προκύπτει από την K19 και το προϊόν πρωτεόλυσης της K18 από τις κασπάσες, το οποίο εμφανίζει το νέο επίτοπο Asp397 και αναγνωρίζεται από το αντίσωμα M30 (Leers, Kolgen et al. 1999).

Το TPA έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του ορού για την ταυτοποίηση ατόμων με διάφορα καρκινώματα επιθηλίων, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, και της ουροδόχου κύστεως (Barak, Goike et al. 2004). Τα TPS και CYFRA 21-1 έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική σε ασθενείς με καρκίνους του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτη και του πνεύμονα. Οι κύριες κλινικές χρήσεις των TPA, TPS και CYFRA 21-1 είναι η παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία και της επανεμφάνισης καρκίνου, καθώς και η παροχή πληροφοριών για την πρόγνωση των ασθενειών. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του μαστού, ξαφνική μείωση στα επίπεδα του TPS έπειτα από την έναρξη της θεραπείας έχει προταθεί να αντικατοπτρίζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Κατά αντιστοιχία, αυξημένα ή σταθερά επίπεδα TPS δείχνουν ανεπαρκή απόκριση, αλλά η χρήση του ως δείκτη καρκίνου στην κλινική ρουτίνα διαφέρει μεταξύ των οργανισμών (Duffy 2006).

Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί για τα TPA, TPS και CYFRA στους μικροκυτταρικούς καρκίνους του πνεύμονα (Nisman, Lafair et al. 1998). Ωστόσο, αυτοί οι δείκτες έχουν κάπως περιορισμένη κλινική εκμετάλλευση εξαιτίας της μη ειδικότητάς τους για τα διάφορα όργανα και των υψηλών επιπέδων τους στον ορό σε κάποιες καλοήθειες ασθένειες, όπως για παράδειγμα τα υψηλά επίπεδα του CYFRA στην περίπτωση της διάμεσης πνευμονικής ίνωσης (Nakayama, Satoh et al. 2003) και τα υψηλά επίπεδα του TPS σε διάφορες διαταραχές του ήπατος (Gonzalez-Quintela, Garcia et al. 2006). Είναι απαραίτητες οι επιπλέον μελέτες για την κλινική

εκμετάλλευση των μετρήσεων των ΚΑΕ στον ορό για τις κακοήθεις νόσους και τη σχετική ενδεχομένως συμμετοχή τους επίσης σε καλοήθεις διαταραχές.

Ακόμα ένας δείκτης που σχετίζεται με τις ΚΑΕ, όπως έχει αναφερθεί ήδη, είναι ο επίτοπος M30, ο οποίος αποτελεί έναν υποσχόμενο δείκτη για την ανίχνευση της ενεργοποίησης κασπασών σε διάφορα επίπεδα στην κλινική πράξη. Για παράδειγμα, έχει ανιχνευθεί στον ορό ασθενών με ηπατίτιδα C (HCV), όπου είναι δείκτης ινωτικής βλάβης στο ήπαρ (Bantel, Lugerling et al. 2004). Επιπλέον έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της απόκρισης σε θεραπεία εναντίον της HCV (Volkmann, Cornberg et al. 2006), έχει εφαρμοστεί ως πιθανός μη επεμβατικός τρόπος για το χαρακτηρισμό του επιπέδου βλάβης στη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (nonalcoholic steatohepatitis) (Wieckowska, Zein et al. 2006) και έχει χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης για την παρακολούθηση του επιπέδου της ηπατικής βλάβης που σχετίζεται με χρόνια μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) (Paratheodoridis, Hadziyannis et al. 2008).

Επιπλέον, η ανιχνευσιμότητα του M30 στον ορό μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στο διαχωρισμό της ασθένειας απόκρισης του ηπατικού και εντερικού μοσχεύματος από άλλες καταστάσεις με παρόμοια συμπτώματα. Ωστόσο, επιπρόσθετες μελέτες είναι απαραίτητες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και με τους κατάλληλους κλινικούς μάρτυρες για την ανάλυση δειγμάτων από διαφορετικές πηγές (ορός σε σύγκριση με πλάσμα) και διαφορετικές συνθήκες χειρισμού, για το διαχωρισμό των προϊόντων της κερατίνης 18 που προκύπτουν από την απόπτωση ή από τη νέκρωση (Kramer, Erdal et al. 2004). Καθώς η K18 μπορεί να πρωτεολυθεί σε 2 σημεία διαδοχικά, ο καθορισμός των επιπέδων στο κυκλοφορικό των αποπτωτικών τμημάτων που προκύπτουν από την πρωτεόλυση στο δεύτερο σημείο της K18 από τις κασπάσες (Tao, Li et al. 2008), όπως επίσης της K19 (Tao, Li et al. 2008) και της K20, μπορεί να είναι χρήσιμος στην κλινική πράξη.

6.8.2 Κερατίνες και καρκίνος

Η καρκινογένεση περιλαμβάνει διατάραξη των φυσιολογικών μονοπατιών κυτταρικής διαφοροποίησης και τυπικά συνοδεύεται από μεταβολές στη ρύθμιση των κερατινών σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο, όπως ήδη αναφέρθηκε. Ο χαρακτηρισμός του προφίλ έκφρασης των κερατινών παρέχει βιοδείκτες που είναι χρήσιμοι για τη διάγνωση, αλλά και όπως δείχνουν αυξανόμενες μελέτες τελευταία, για την πρόγνωση ή το σχετιζόμενο ρίσκο για πολλούς τύπους καρκίνων που βασίζονται στα επιθήλια (Karantza 2011). Ωστόσο σημαντικό είναι το ερώτημα εάν

αυτές οι μεταβολές στην έκφραση των κερατινών έχουν κάποιο αντίκτυπο σε οποιοδήποτε επίπεδο της βιολογίας του καρκίνου.

Ο καρκίνος των κυττάρων της βασικής στιβάδας του επιθηλίου (καρκίνος του δέρματος) είναι ο πιο συχνός καρκίνος στον ανθρώπινο πληθυσμό και σταθερά χαρακτηρίζεται από επαγωγή της K17, στο πλαίσιο ενός απλού προτύπου έκφρασης κερατινών (Grachtchouk, Mo et al. 2000). Σε ποντίκια με έλλειψη της K17 παρουσιάστηκε καθυστέρηση στη γέννηση όγκων που ομοιάζουν σε καρκίνωμα, οι οποίοι επάγονται από το Gli2 (Depianto, Kerns et al. 2010). Σε τέτοιους όγκους, η γενετική έλλειψη της K17 πολώνει την ανοσοαπόκριση και την παραγωγή κυτοκινών από ένα Th1/Th17 σε ένα Th2 πρότυπο. Συγκεκριμένα, η K17 βρέθηκε να επιδρά στην έκφραση χημοκινών όπως έδειξε άλλη ομάδα (Lo, Yu et al. 2010) ώστε να συμμετέχουν στην παθογένεση του καρκινώματος της βασικής στιβάδας του επιθηλίου του ανθρώπου, όπως οι CxCl5, CxCl9, CxCl10 και CxCl11 με έναν ανεξάρτητο από τα κερατινοκύτταρα τρόπο (Depianto, Kerns et al. 2010).

Είναι ενδιαφέρον πως η έλλειψη K5 σχετίζεται με την απορύθμιση μιας συγκεκριμένης ομάδας χημοκινών, συγκεκριμένα των Ccl2, Ccl19, Ccl20, που σχετίζεται με μία αύξηση των δενδριτικών κυττάρων Langerhans στην επιδερμίδα. Είναι ενδιαφέρουσα η ολοένα ενισχυόμενη άποψη για έναν ρυθμιστικό ρόλο των κερατινών στην ανοσία, όπως προκύπτει και από τα παραπάνω ευρήματα. Επιπρόσθετα με τα παραπάνω, μία πρόσφατη μελέτη σε επίπεδο γονιδιωμάτων ταυτοποίησε μοναδικούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphisms, SNPs) στη γενετική περιοχή του ανθρώπινου K5 που προσδίδουν αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκινώματος της βασικής στιβάδας του επιθηλίου (Depianto, Kerns et al. 2010).

Ο καρκίνος και η μετάσταση είναι ακόμα ένα πολύ σημαντικό σύστημα διαταραγμένης κυτταρικής κινητικότητας και μετανάστευσης. Όπως δείχτηκε στο παρελθόν, η χορήγηση σφινγκοσυλφωσφορυλχολίνης (sphingosylphosphorylcholine, SPC), ένα βιοενεργό λιπίδιο που βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, σε κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του παγκρέατος επάγει την διατάραξη των περιπυρηνικών ινιδίων των κερατινών, που συνοδεύεται με φωσφορυλίωση της K18 στη σερίνη 52 και της K8 στη σερίνη 431, με τη μείωση της σκληρότητας του κυτταροπλάσματος και την αυξημένη κυτταρική μετανάστευση (Beil, Micoulet et al. 2003). Μέλη των οικογενειών της τρανσγλουταμινάσης-2 και των πρωτεϊνικών κινασών επαγόμενων από μιτογόνα (JNK και ERK) πρόσφατα δείχτηκε πως επάγουν τη φωσφορυλίωση της K8 στη σερίνη 431, προωθούν την περιπυρηνική αναδιοργάνωση των ενδιάμεσων ινιδίων των κερατινών και ενισχύουν τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (Park, Lee et al. 2012).

Ωστόσο, στα συστήματα των κυτταρικών καλλιιεργειών και του καρκίνου των κυττάρων της πλακώδους στιβάδας του στόματος, η υπερέκφραση μεταλλαγμένων μορίων στις θέσεις S73 ή S431 και ανθεκτικών στη δράση των shRNA και σε κύτταρα με αποσιώπηση της K8, σχετίζεται με αύξηση στην κυτταρική κινητικότητα και την καρκινογένεση (Alam, Gangadaran et al. 2011). Αυτή η ασυμφωνία πιθανόν προκύπτει λόγω διαφορών στους κυτταρικούς τύπους και στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για να επάγουν την κυτταρική μετανάστευση, τονίζοντας ακόμα μια φορά τη σημαντικότητα των διαφορετικών συστημάτων στη μελέτη της ρύθμισης και λειτουργίας των κερατινών.

6.8.3 Μεταλλάξεις κερατινών

Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, είτε προκαλούν άμεσα, είτε προδιαθέτουν τα άτομα σε περισσότερες από 80 ανθρώπινες νόσους (Omary, Ku et al. 2009; Toivola, Boor et al. 2015) (βλέπε και “Human Intermediate Filament Database”; <http://www.interfil.org/index.php>). Καθώς τα απλά επιθήλια που εκφράζουν ΚΑΕ είναι ένα συστατικό πολλών ιστών και οργάνων, οι ΚΑΕ μπορεί να συμμετέχουν σε ασθένειες διαφόρων οργάνων.

Έως σήμερα, το ήπαρ φαίνεται να είναι το πρωταρχικό όργανο-στόχος, με μεταλλάξεις στα γονίδια *KRT8*, *KRT18* και *KRT19*, που κωδικοποιούν τις Κ8, Κ18 και Κ19 αντίστοιχα. Σε αντίθεση, καμία ανθρώπινη ασθένεια που να σχετίζεται με μεταλλάξεις στα γονίδια *KRT7*, *KRT20* και *KRT23* δεν έχει αναφερθεί έως τώρα. Οι ΚΑΕ επίσης σχετίζονται με ασθένειες σε άλλο επίπεδο, καθώς είναι σημαντικές στο σχηματισμό των σωματίων Mallory-Denk (Mallory-Denk bodies, MDBs), τα οποία είναι ηπατικά εγκλείσματα που παρατηρούνται σε διάφορες χρόνιες ασθένειες του ήπατος. Επίσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κάποιες ΚΑΕ χρησιμεύουν ως δείκτες για κάποιους καρκίνους των επιθηλίων, είναι στόχοι για αυτοαντισώματα και χρησιμεύουν ως δείκτες για την απόπτωση, ενώ είναι επίσης σημαντικές καθώς έχει δειχτεί πως προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση.

6.8.3.1 Μεταλλάξεις των κερατινών απλών επιθηλίων

Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις κερατίνες προκαλούν διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο, με τα όργανα τα οποία επηρεάζονται να

αντικατοπτρίζουν το μοναδικό πρότυπο έκφρασης συγκεκριμένων κερατινών (Εικόνα 12) (Omary, Ku et al. 2009; Toivola, Boor et al. 2015). Πράγματι, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν κερατίνες αλλά όχι τις ΚΑΕ προκαλούν ιστο-ειδικές ασθένειες με σχεδόν ολοκληρωτική διείσδυση, όπως είναι η περίπτωση των μεταλλάξεων στα *KRT5* και *KRT14*, οι οποίες προκαλούν πομφολυγώδη επιδερμόλυση (epidermolysis bullosa simplex, EBS) (Coulombe, Kerns et al. 2009). Αντίθετα, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις Κ8 και Κ18 αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ασθένεια, παρά το αίτιο. Αυτό είναι πιθανόν να σχετίζεται με το σημείο των μεταλλάξεων, που δεν αλληλεπικαλύπτονται με τα κύρια σημεία των μεταλλάξεων στο τέλος και την αρχή της περιοχής ράβδου (rod), όπου οι μεταλλάξεις προκαλούν τυπικά περισσότερο έντονες ασθένειες (Coulombe, Kerns et al. 2009; Toivola, Boor et al. 2015).

Η συσχέτιση των παραλλαγών των ΚΑΕ με τις οξείες και χρόνιες νόσους του ήπατος υποστηρίζεται από έναν αρκετά μεγάλο αριθμό μελετών. Στην περίπτωση της χρόνιας ηπατικής νόσου, παραλλαγές των *KRT8* και *KRT18* εμφανίζονται σε παρόμοιο βαθμό σε άτομα με ασθένεια του ήπατος τελικού σταδίου λόγω πολλαπλών αιτιολογιών (Ku, Strnad et al. 2007). Αυτή η αύξηση του ρίσκου επικινδυνότητας είναι μεγαλύτερη από 2.6 φορές από το ρίσκο επικινδυνότητας σε καπνιστές των 10-19 τσιγάρων την ημέρα σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (Ku, Strnad et al. 2007).

Η σχέση των παραλλαγών των ΚΑΕ με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (inflammatory bowel disease, IBD) είναι ιδιαίτερα πιθανόν να είναι περιορισμένη, σε αντίθεση με ευρήματα σε ποντίκια και στη σχέση των παραλλαγών των Κ8/Κ18 με τις ανθρώπινες νόσους του ήπατος (Tao, Strnad et al. 2007). Παρόλο που παραλλαγές της Κ8 παρατηρήθηκαν σε κάποιους ασθενείς με IBD, μια μελέτη μεγάλου αριθμού ασθενών κυρίως με οικογενή IBD, δεν έδειξε ισχυρή συσχέτιση (Tao, Strnad et al. 2007). Επιπροσθέτως, δεν υπάρχει κανένα στοιχείο συσχέτισης κάποιας παραλλαγής ΚΑΕ με την ανθρώπινη παγκρεατίτιδα, βάση αναλύσεων από δύο μελέτες με μεγάλο αριθμό ασθενών (Schneider, Lamb et al. 2006) και επιπλέον μελέτες διαγονιδιακών ποντικών (Omary, Ku et al. 2009). Για την Κ19, δεν υπάρχει ξεκάθαρη ένδειξη κάποιας παραλλαγής της να σχετίζεται με την IBD (Tao, Strnad et al. 2007), ενώ η πρωτοβάθμια κίρρωση χοληδόχου κύστεως (primary biliary cirrhosis, PBC) είναι η πρώτη ανθρώπινη ασθένεια που σχετίζεται με παραλλαγές της Κ19, όπως και της Κ18 (Zhong, Strnad et al. 2009).

Η κατανομή των μεταλλάξεων των Κ8 και Κ18 μέσα στα πρωτεϊνικά μόρια ποικίλει. Για παράδειγμα, γνωστές μεταλλάξεις στην Κ8 συμβαίνουν στην περιοχή της κεφαλής, του τμήματος ράβδου (rod) και του ουραίου τμήματος, ενώ μεταλλάξεις της Κ18 έχουν βρεθεί κυρίως στο τμήμα ράβδου και είναι πολύ λιγότερο συχνές σε

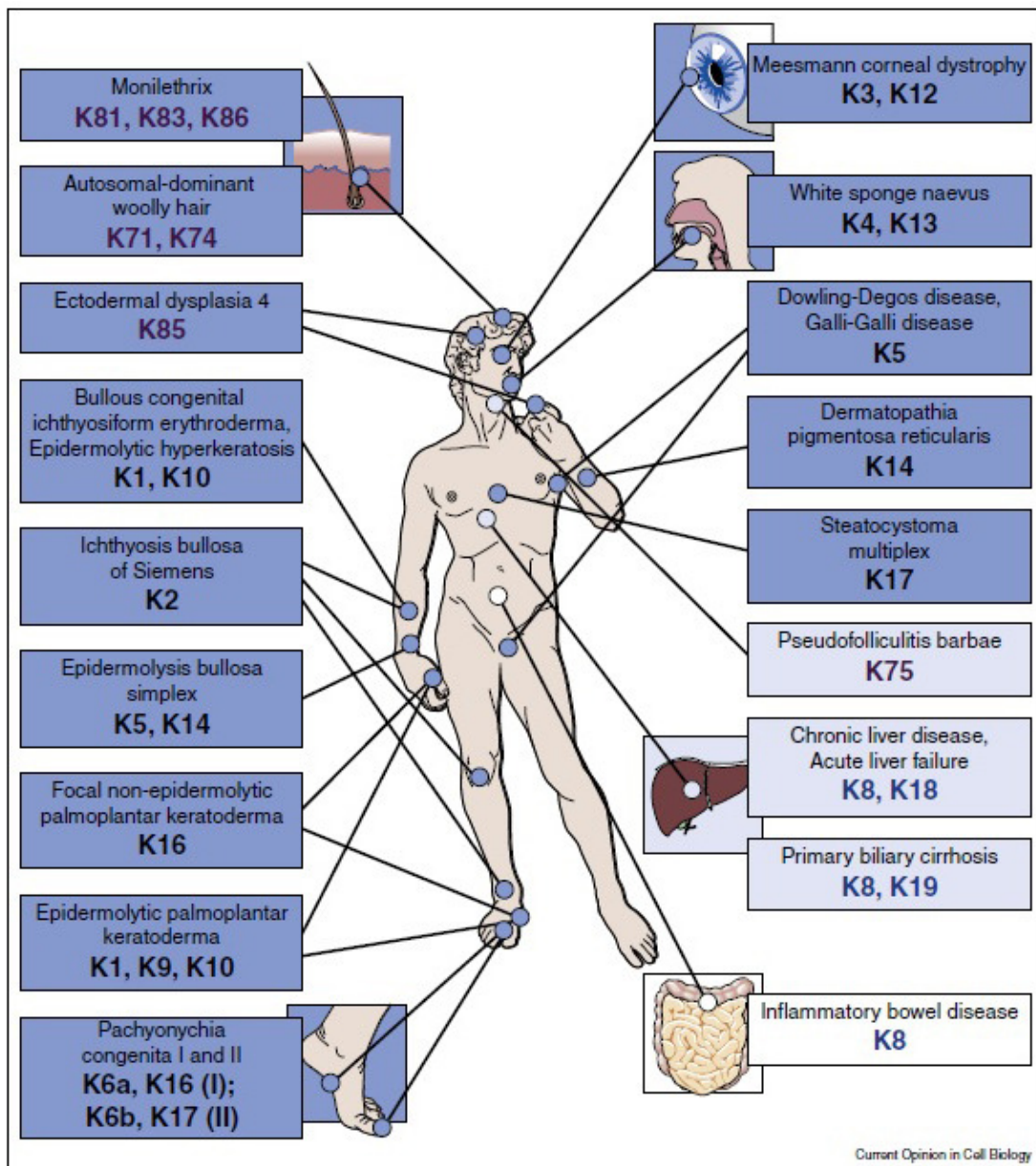
σχέση με τις παραλλαγές της K8. Η πιο κοινή παραλλαγή της K8 στο λευκό πληθυσμό της Αμερικής και της Ευρώπης είναι η R341H (Ku, Strnad et al. 2007). Η σημαντικότητα της μετάλλαξης αυτής στην K8 υποστηρίζεται και από μελέτες σε ζωικά μοντέλα, όπου προτείνεται πως η R341H μπορεί να οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των κερατινών και από μελέτες που δείχνουν πως η μετάλλαξη αυτή εμφανίζεται σε ασθενείς με νόσο του ήπατος τελικού σταδίου (Ku, Lim et al. 2005).

Δεν έχουν περιγραφεί συγκεκριμένες διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στις K8 και K18 ανάλογα με το φύλο, αλλά υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάλογα της εθνικής προέλευσης για τις μεταλλάξεις της K8 Y54H και G434S. Για παράδειγμα, το 2.1 % των Αφρικανο-Αμερικάνων ασθενών είχε μία από τις δύο παραλλαγές, σε σύγκριση με το 0.4 % των λευκών ασθενών (Ku, Lim et al. 2005). Επιπροσθέτως, η K8 Y54H μετάλλαξη βρέθηκε στο 2.4 % των Αφρικανών αλλά στο 0.1 % των Γερμανών, υποστηρίζοντας την εμφάνιση της παραλλαγής αυτής σχετικά αποκλειστικά στους Αφρικανούς. Μία πιθανή εξήγηση για τη σχετική συχνότητα των μεταλλάξεων της K8 R341H και G434S είναι η απαμίνωση της μεθυλιωμένης κυτοσίνης στις νησίδες διουκλεοτιδίων CpG, τον πιο συχνό τύπο μετάλλαξης στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Omary, Ku et al. 2009).

Δεν εμφανίζονται ωστόσο όλες οι παραλλαγές κερατινών στους ασθενείς με νόσους του ήπατος που σχετίζονται με αυτές. Αυτή είναι η περίπτωση κυρίως παραλλαγών κερατινών λιγότερο κοινών και επειδή μερικές μεταλλάξεις δεν εκδηλώνουν φαινότυπο, εκτός εάν το άτομο εκτεθεί σε βλάβη του ήπατος. Για παράδειγμα, η K8 G62C έχει ταυτοποιηθεί στο 1.3 % των ασθενών με νόσο του ήπατος στις ΗΠΑ σε σύγκριση με 0.9 % των φυσιολογικών και στο 1.6% των Γερμανών ασθενών, σε σύγκριση με 1.5 % των φυσιολογικών (Ku, Strnad et al. 2007). Ωστόσο, η έκφραση της K8 με τη μετάλλαξη G62C στα ποντίκια προκαλεί σημαντική προδιάθεση σε ηπατική βλάβη.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις των κερατινών δεν εκδηλώνουν φαινότυπο σε φυσιολογικές καταστάσεις, αλλά αποτελούν την πρώτη βάση σε γενετικό επίπεδο για να εκδηλωθεί νόσος έπειτα από βλάβη του ήπατος. Επιπλέον, η συχνότητα του αλληλίου είναι μικρότερη από 1 % – 2 % στον πληθυσμό των μεταλλάξεων των ΚΑΕ που είναι πιθανόν να προκαλούν παθολογία, βάση μελετών σε ζωικά μοντέλα και άλλα υποστηρικτικά δεδομένα από *in vitro* έρευνες. Επομένως, απαιτείται η συγκέντρωση δεδομένων από διαφορετικές αναλύσεις παραλλαγών κάποιας συγκεκριμένης ΚΑΕ με στόχο να προκύψει ένας αρκετά μεγάλος αριθμός για τη σύγκριση της συχνότητας της μετάλλαξης στη φυσιολογική ομάδα και στην ομάδα ασθενών με νόσο του ήπατος.

Η επιμόλυνση με HCV αποτελεί ένα πιθανό λόγο εκδήλωσης φαινοτύπου κάποιας σιωπηλής μετάλλαξης, ενώ υπάρχει μία αναφορά όπου έχει δείχθει πως άτομα με παραλλαγές της K8 εμφανίζονται πιο συχνά σε ασθενείς με HCV με προχωρημένη ίνωση, σε σύγκριση με αυτούς με πρόωμη ίνωση, ανεξαρτήτως της ηλικίας και άλλων αντίστοιχων παραγόντων (Strnad, Lienau et al. 2006). Η σχέση των μεταλλάξεων στις KAE με την εξέλιξη της ίνωσης του ήπατος υποστηρίζεται περαιτέρω από ευρήματα στα ποντίκια με την μετάλλαξη R90C στην K18, τα οποία αναπτύσσουν πιο έντονη ίνωση που προκαλείται από το θειοακεταμίδιο σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Strnad, Tao et al. 2008).



Εικόνα 12. Κερατίνες που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες. Παρουσιάζονται συνοπτικά, ανάλογα με το σημείο του ανθρώπινου σώματος που επηρεάζεται, ανθρώπινες ασθένειες (στη διεθνή τους ονομασία) οι οποίες σχετίζονται με κληρονομούμενες αλλαγές στις κερατίνες. Ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις παρουσιάζονται σε σκούρο μπλε χρώμα. Ασθένειες στις οποίες οι πολυμορφισμοί κερατινών αντιπροσωπεύουν παράγοντα κινδύνου παρουσιάζονται σε ανοιχτό μπλε. Σε άσπρο χρώμα παρουσιάζονται ασθένειες για τις οποίες δεν έχει ακόμα πλήρως δειχθεί η συσχέτισή τους με τις κερατίνες. Κερατίνες απλών επιθηλίων παρουσιάζονται σε μπλε φόντο, πολύστιβων επιθηλίων σε μαύρο φόντο και οι κερατίνες μαλλιών σε μωβ φόντο. Από την ανασκόπηση (Toivola, Boor et al. 2015).

6.9 Διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα για τη μελέτη των κερατινών απλών επιθηλίων

Η κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών για τις ΚΑΕ και γενετικών μοντέλων έλλειψής τους (knockout) έχει παράσχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των κερατινών *in vivo* και έχει βοηθήσει στην ταυτοποίηση των υποψήφιων ανθρώπινων ασθενειών που σχετίζονται με μεταλλάξεις στα γονίδια που τις κωδικοποιούν (Ku, Strnad et al. 2007).

Τα ποντίκια με έλλειψη της K8 σε γενετικό υπόβαθρο C57BL/6, παρουσιάζουν αιμορραγία στο ήπαρ και μεγαλύτερη του 90 % ποσοτού εμβρυική θνησιμότητα (Baribault, Price et al. 1993), ενώ ήταν τα πρώτα ποντίκια που δημιουργήθηκαν με έλλειψη κάποιου ενδιάμεσου ινιδίου. Έπειτα από διαδοχικές διασταυρώσεις των παραπάνω επιζώντων με ποντίκια με γενετικό υπόβαθρο FVB δημιουργήθηκαν ποντίκια με το συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο τα οποία εμφανίζουν εμβρυική θνησιμότητα σε ποσοστό 50 %. Ενώ τα επιζώντα ποντίκια παρουσιάζουν φυσιολογική διάρκεια ζωής, εμφανίζουν φαινότυπο ελκώδους κολίτιδας (Baribault, Penner et al. 1994) και σημαντική ευαισθησία στις βλάβες του ήπατος.

Παρόλο που και τα ποντίκια με έλλειψη της K8 και αυτά με έλλειψη της K18 στερούνται ινίδια κερατινών στα ηπατοκύτταρα, ο φαινότυπός τους είναι μερικώς διαφορετικός, μολονότι είναι διαφορετικών γενετικών υποβάθρων. Για παράδειγμα, δεν έχει παρατηρηθεί εμβρυική θνησιμότητα ή κολίτιδα στα ποντίκια με έλλειψη της K18 και μεικτό γενετικό υπόβαθρο, λόγω της λειτουργικής αντικατάστασης με την K19 (Magin, Schroder et al. 1998). Επιπλέον, τα ποντίκια με έλλειψη της K8, αλλά

και αυτά με έλλειψη της K18 παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στα ηπατοκύτταρα (Loranger, Duclos et al. 1997) και επιδεκτικότητα σε αποπτωτικό θάνατο των ηπατοκυττάρων (Oshima 2002).

Η πρώτη ξεκάθαρη και λεπτομερής σύνδεση μεταξύ των ΚΑΕ και των ασθενειών του ήπατος προήλθε από ποντίκια που υπερεκφράζουν μεταλλαγμένη K18, συγκεκριμένα με τη R90C μετάλλαξη (Ku, Michie et al. 1995). Τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν χρόνια ηπατίτιδα και σημαντική ευαισθησία των ηπατοκυττάρων κατά την αιμάτωση (Ku, Michie et al. 1995), με δραματική επιδεκτικότητα σε ηπατικές βλάβες. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη μελέτη και την αρχική ταυτοποίηση μεταλλάξεων στο *KRT18* και μετέπειτα στο *KRT8* σε ασθενείς με νόσο του ήπατος (Ku, Gish et al. 2001). Όπως έχει προαναφερθεί, το ήπαρ είναι το πρωταρχικό όργανο που επηρεάζεται από τις μεταλλάξεις στα *KRT8* και *KRT18*, παρόλο που οι K8 και K18 βρίσκονται σε διάφορους ιστούς έκκρισης, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, του εντέρου και του παγκρέατος.

Αποτελεί έκπληξη πως στο πάγκρεας ποντικιού, ούτε η έλλειψη της K8 (η οποία οδηγεί στην απουσία των ινιδίων κερατίνης στα κύτταρα αδενοκυψελίδων), ούτε η παρουσία της μεταλλαγμένης K18 με την R90C μετάλλαξη (η οποία προκαλεί τη διατάραξη των ινιδίων κερατίνης στα κύτταρα αδενοκυψελίδων), προκαλούν προδιάθεση σε βλάβες (Toivola, Baribault et al. 2000). Αυτό είναι πιθανόν να σχετίζεται με την επαγωγή της αντισταθμιστικής RegII (regenerating islet-derived II), η οποία έχει προστατευτικό ρόλο στο πάγκρεας και στην περίπτωση έλλειψης της K8 μπορεί επίσης να σχετίζεται με την αντισταθμιστική υπερέκφραση της ακτίνης και της τουμπουλίνης. Επιπλέον, η χρόνια παγκρεατίτιδα που προκαλείται από υπερέκφραση της ανθρώπινης K8 στα ποντίκια είναι πιθανόν να σχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης τα οποία είναι κυτταροτοξικά, όπως φαίνεται από μελέτες στα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τις K8 και K18 σε διάφορα επίπεδα.

Στο έντερο, η έκφραση διαφόρων ΚΑΕ είναι πιθανόν να συνεισφέρει στην έλλειψη φαινοτύπων που σχετίζονται με μεταλλάξεις, όπως έχει φανεί από μελέτες διαγονιδιακής έκφρασης είτε επικρατούς-αρνητικού K18 μορίου είτε μεταλλαγμένων μορφών της K20 (Zhou, Toivola et al. 2003). Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έχουν επίσης βοηθήσει στην κατανόηση του τρόπου που οι φυσικές ανθρώπινες μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις ΚΑΕ προδιαθέτουν για ηπατικές ασθένειες. Για παράδειγμα, υπερέκφραση μεταλλαγμένου μορίου K8 με τη φυσική ανθρώπινη μετάλλαξη G62C σε διαγονιδιακά ποντίκια, οδηγεί σε σημαντική προδιάθεση των ηπατοκυττάρων σε απόπτωση και σε βλάβες του ήπατος (Ku and Omary 2006). Αυτή η προδιάθεση σχετιζόταν με μία αλλαγή της διαμόρφωσης λόγω της μετάλλαξης που μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση της K8 από τις κινάσες του στρες

στη σερίνη 74 (Ku and Omary 2006) και ταυτοποιήθηκε περαιτέρω με τη δημιουργία διαγονιδιακού ποντικού που υπερεκφράζει τη μεταλλαγμένη K8 στο S74A, το οποίο παρουσιάζει τον ίδιο φαινότυπο με το ποντίκι με τη μετάλλαξη K8 G62C (Ku and Omary 2006).

Η γενικότερη σημαντικότητα της φωσφορυλίωσης των ΚΑΕ στην προστασία των κυττάρων από το στρες υποστηρίζεται επίσης από την αυξημένη προδιάθεση σε βλάβες του ήπατος σε ποντίκια που υπερεκφράζουν τη μεταλλαγμένη K8 στη θέση S53A, με ανικανότητα φωσφορυλίωσης στη θέση αυτή (Ku, Michie et al. 1998). Επιπλέον, στα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν το μεταλλαγμένο μόριο S34A K18, το οποίο μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 34 κατά τη μίτωση, η K18 δεν μπορεί πια να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες 14-3-3, παρεμποδίζοντας έτσι τη μεταφορά των 14-3-3 πρωτεϊνών από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα έπειτα από μερική ηπατεκτομή και οδηγεί σε περιορισμένη αναστολή της μίτωσης (Ku, Michie et al. 2002).

Συγκεντρωτικά, αυτά τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια οδήγησαν στην κατηγορηματική συσχέτιση των μεταλλάξεων των κερατινών με τις ανθρώπινες νόσους του ήπατος και στην κατανόηση κάποιων από τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς παθοφυσιολογίας.

ΣΚΟΠΟΣ

Η έρευνα στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει σκοπό την κατανόηση βασικών μηχανισμών κυτταρικής και μοριακής βιολογίας στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου.

Συγκεκριμένα θα γίνει προσπάθεια για τη διαλεύκανση μηχανισμών δράσης του παράγοντα TNF- α στο μυοκάρδιο με απώτερο στόχο την ανακάλυψη νέων μηχανισμών καρδιοπροστασίας.

Για το σκοπό αυτό, θα πραγματοποιηθεί σε βάθος συστηματική μελέτη των ιδιοτήτων του κυτταροσκελετού στο φυσιολογικό και παθολογικό μυοκάρδιο, με χρήση *in vivo* γενετικών μοντέλων, *in vitro* συστημάτων μελέτης και προσεγγίσεις ανάλυσης σε ανθρώπινους ιστούς.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1 Πειραματόζωα

1.1 Διαγονιδιακά ποντίκια

Στις μελέτες μας χρησιμοποιήθηκαν γενετικά μοντέλα ποντικών, του είδους “*Mus musculus*”. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το ποντίκι με καρδιο-ειδική υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α “MHCsTNFα”(Li, Moody et al. 2000) (αναφέρεται και ως “*Tnf^{Myh6}*” στην παρούσα διατριβή) σε γενετικό υπόστρωμα C57BL/6. Για τη δημιουργία των ποντικών *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* (γενετικό υπόστρωμα C57BL6/129SV) πραγματοποιήθηκαν ελεγχόμενες διασταυρώσεις με γενετικό έλεγχο των μοντέλων MHCsTNFα και *Des^{-/-}* (*Des^{-/-}* μοντέλο, γενετικό υπόστρωμα 129SV) (Milner, Weitzer et al. 1996).

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα ποντίκια έλλειψης του γονιδίου *Krt18* (*Krt18^{-/-}* μοντέλο, “Krt18tm1Tmm/J”, γενετικό υπόστρωμα MF1/129SV/FVB)(Magin, Schroder et al. 1998), από την εταιρεία “Jackson Laboratories”. Τα ποντίκια *Krt18^{-/-}* χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}*, *Des^{-/-}Krt18^{-/-}*, *Tnf^{Myh6}Krt18^{-/-}* με διαδοχικές ελεγχόμενες διασταυρώσεις και γενετικό έλεγχο. Όλες οι σειρές που περιέχουν το διαγονίδιο του *Tnf^{Myh6}* είναι σε ετεροζυγωτία. Τα ποντίκια *Tnf^{Myh6}3M* δημιουργήθηκαν μέσω με διαδοχικές ελεγχόμενες διασταυρώσεις και γενετικό έλεγχο των MHCsTNFα με τα “IkBa-3M” (γενετικό υπόστρωμα C57BL/6)(Brown, McGuinness et al. 2005).

Τα μοντέλα IKK^{MyHC} έχουν περιγραφεί στην εργασία των (Maier, Schips et al. 2012). Πολύ σύντομα, η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού IKK/NF-κB επιτυγχάνεται εκμεταλλεύόμενο ένα σύστημα “tet-off”, διασταυρώνοντας ποντίκια που εκφράζουν τον trans-ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης (tetracycline transactivator, tTA) υπό τη ρύθμιση του υποκινητή της α-βαρυάς αλυσίδας μυοσίνης (*Myh6*) για καρδιο-ειδική υπερέκφραση με τα ποντίκια που φέρουν διαγονίδιο (αποκρινόμενο στην τετρακυκλίνη, tTA-responsive) συνεχόμενης έκφρασης της ενεργής μορφής του IKK2 (IKK2-CA). Με την παρουσία τετρακυκλίνης στο πόσιμο νερό των ποντικών αυτών, η έκφραση του διαγονιδίου σιγείται. Για την ενεργοποίησή του και επομένως την ενεργοποίηση του μονοπατιού IKK/NF-κB στο μυοκάρδιο, αφαιρείται η τετρακυκλίνη από το πόσιμο νερό των ποντικών.

Τα ποντίκια του μοντέλου υπερέκφρασης της καλσινευρίνης εκφράζουν καρδιο-ειδικά μία συνεχώς ενεργοποιημένη μορφή της καλσινευρίνης υπό τη ρύθμιση του υποκινητή της α-βαρυάς αλυσίδας μυοσίνης (*Myh6*) και έχουν περιγραφεί στο παρελθόν (Molkentin, Lu et al. 1998). Τα ποντίκια έλλειψης της μυο-ειδικής

πρωτεΐνης “muscle LIM protein” (*Csrp3^{-/-}*) και έχουν επίσης περιγραφεί στο παρελθόν (Arber, Hunter et al. 1997).

Οι διαδικασίες συντήρησης και φροντίδας των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του οίκου πειραματόζωων του ιδρύματός μας, ο οποίος ακολουθεί τις προδιαγραφές και συστάσεις των οργανισμών Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) και Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Αντίστοιχα ακολουθήθηκαν οι προδιαγραφές των οργανισμών σε πειραματόζωα της μελέτης μας που συντηρούνταν σε μονάδες ιστιτούτων συνεργατών μας.

1.2 Μοντέλα πειραματικά προκαλούμενης καρδιακής βλάβης

1.2.1 Μοντέλο περίσφιξης της αορτής (TAC)

Χρησιμοποιήθηκαν WT και *Krt18^{-/-}* ποντίκια σε μελέτες πειραματικά προκαλούμενης καρδιακής βλάβης μέσω περίσφιξης της αορτής, για τη μελέτη της καρδιοπροστατευτικής δράσης της εκτοπικής έκφραση του K8/K18 στο μυοκάρδιο.

Οι χειρουργικές επεμβάσεις για τα ποντίκια της συγκεκριμένης ανάλυσης διεξήχθησαν σε ειδική μονάδα του Πανεπιστημίου της Ουάσινγκτον (Mouse Cardiovascular Phenotyping Core of Cardiovascular Division of Washington University School of Medicine).

Μεθοδολογία

Εν συντομία, αρσενικά ποντίκια 4-μηνών WT και *Krt18^{-/-}* (n = 7 και n = 8 ποντίκια αντίστοιχα, κατά την έναρξη των πειραμάτων, με γενετικό υπόβαθρο 129SV και 129SV/μικτό γενετικό υπόβαθρο, αντίστοιχα) αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση κεταμίνης (100 mg / kg) και ξυλαζίνης (10 mg / kg). Η χειρουργική επέμβαση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση άσηπτων τεχνικών. Κάθε ποντίκι συγκρατήθηκε σε ύπτια θέση σε μια θερμαινόμενη μαγνητική χειρουργική τράπεζα ανοξειδωτού χάλυβα.

Πραγματοποιήθηκε τομή μεταξύ των μεσοπλευρίων μυών για να εντοπιστεί η αορτή. Η αορτή ελευθερώνεται με πρόσθετη αμβλεία τομή. Τοθετείται μεταξωτό

ράμμα (7-0) γύρω από την αορτή και περιδένεται σφιχτά γύρω από βελόνα σύριγγας (27 gauge). Η βελόνα στη συνέχεια αφαιρείται ταχέως και κλείνεται το θωρακικό τοίχωμα πραγματοποιώντας ράμματα. Η χειρουργική τομή κλείστηκε σε δύο επίπεδα, με διακεκομμένο πρότυπο ραφής. Τα ποντίκια διατηρούνται ζεστά σε μαξιλάρι θέρμανσης καθόλη τη διαδικασία και κατά τη διάρκεια της ανάκτησης. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν μόνο ποντίκια με πετυχημένο χειρουργείο TAC, το οποίο αξιολογείται από τη μέτρηση της μέγιστης ταχύτητας ροής αίματος (μέγιστη ταχύτητα ≥ 3 mm / δευτερόλεπτα για επιτυχημένο TAC). Στη συνέχεια μελετήθηκε η καρδιακή λειτουργία των ποντικών αυτών με τη μέθοδο της M-Mode ηχοκαρδιογραφίας.

Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες εκτοπικής έκφρασης των K8/K18 στο μυοκάρδιο, έπειτα από πρόκληση καρδιακής βλάβης μέσω TAC ή MI χειρουργείων, είναι ανεξάρτητα από την παραπάνω ομάδα πειραματικών μοντέλων TAC.

1.2.2 Μοντέλο ισχαιμίας του μυοκαρδίου (MI)

Για τις μελέτες εκτοπικής έκφρασης των K8/K18 στο μυοκάρδιο, έπειτα από πρόκληση καρδιακής βλάβης χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια έπειτα από TAC ή MI χειρουργείων.

Συνοπτικά για τα χειρουργεία της ισχαιμίας μυοκαρδίου (MI), πραγματοποιήθηκε για 4 εβδομάδες μόνιμη απολίνωση της αριστερής πρόσθιας κατερχόμενης στεφανιαίας αρτηρίας (LAD), χρησιμοποιώντας ράμμα προλίνης (8-0).

2 Δείγματα ανθρώπινου μυοκαρδίου

Στα πλαίσια της έρευνας της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε ανθρώπινα δείγματα, με στόχο τη συσχέτιση με την ανθρώπινη παθοφυσιολογία των ευρημάτων μας στα πειραματικά ζωικά μοντέλα για την εκτοπική έκφραση των K8/K18 στο παθολογικό μυοκάρδιο.

2.1 Δείγματα ιστού ανθρώπινου μυοκαρδίου

Τα περισσότερα δείγματα ανθρώπινου καρδιακού ιστού απομονώθηκαν από την αριστερή κοιλία ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου, κατά τη διενέργεια χειρουργείου μεταμόσχευσης στο Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο Αθηνών (O.C.S.C.). Συγκεκριμένα, τα δείγματα του Ωνασείου απομονώθηκαν από τυχαία επιλεγμένες παθολογικές καρδιές 10 ασθενών, με μέσο όρο ηλικίας τα 41 χρόνια και αναλογία ανδρών/γυναίκων 7/3. Επιπλέον δείγματα έπειτα από μεταμόσχευση απομονώθηκαν από καρδιά ασθενούς του Τμήματος Καρδιοχειρουργικής του Πανεπιστημίου της Χαϊδελβέργης (Department of Cardiac Surgery of the University Hospital Heidelberg, Γερμανία).

Τα δείγματα φυσιολογικής καρδιάς απομονώθηκαν από μυοκάρδιο ατόμου με αίτιο θανάτου ανεξάρτητο καρδιακής παθολογίας (γένους αρσενικού, ηλικίας 26 ετών), χωρίς ιστορικό καρδιακής ασθένειας, με την άδεια της Ιατροδικαστικής Υπηρεσίας Αθηνών και επιπλέον από εμπορικά διαθέσιμο δείγμα αριστερής κοιλίας (γένους αρσενικού, ηλικίας 61 ετών) (Cat. #: T1234138; Lot No. #: B409106, Biochain Institute, Inc).

2.2 Δείγματα ορού αίματος

Τα δείγματα ορού αίματος ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια αναφέρονται στην ίδια ομάδα ασθενών του Ωνασείου από τους οποίους απομονώθηκε καρδιακός ιστός. Τα δείγματα ορού αίματος υγείων ατόμων ελήφθησαν στο Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο Αθηνών από τυχαία επιλεγμένα 10 άτομα χωρίς ιστορικό καρδιακής, νεφρικής ή ηπατικής ανεπάρκειας με παρόμοια κατανομή φύλου και ηλικίας με την ομάδα των ασθενών.

Τα δείγματα καρδιακού ιστού έπειτα από την απομόνωση καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο. Σε όλες τις περιπτώσεις έχει ληφθεί από τους αρμοδίους συναίνεση των δοτών. Οι έρευνες που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη διατριβή και η χρήση των ανθρώπινων δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους κανονισμούς που περιγράφονται στη Διακήρυξη του Ελσίνκι για την χρήση ανθρώπινων ιστών ή υποκειμένων και σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία και τους κανονισμούς της Επιτροπής Ηθικής του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου Αθηνών.

3 Ηχοκαρδιογραφία

Πραγματοποιήθηκε M-mode ηχοκαρδιογραφία, όπως περιγράφεται στη μελέτη (Psarras, Mavroidis et al. 2010), από εξειδικευμένο προσωπικό της μονάδας Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3.1 Ηχοκαρδιογραφικές παράμετροι

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν για την ανάλυση των λειτουργικών ιδιοτήτων του μυοκαρδίου είναι οι εξής: τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας (LVEDD), τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας (LVESD), πάχος του οπισθίου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή (PWTs) και κατά τη διαστολή (PWTd). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του λόγου της ακτίνας της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας προς το τελοδιαστολικό πάχος του οπισθίου τοιχώματος (r/h) και του ποσοστού της συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (FS %).

Μεθοδολογία

Εξετάστηκαν ποντίκια ηλικίας 3-μηνών και 6-μηνών, με τον αντίστοιχο αριθμό των ατόμων για κάθε ένα γονότυπο όπως παρουσιάζονται στον Συμπληρωματικό Πίνακα 1. Τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία συμπεριλήφθησαν ποντίκια στη μελέτη ήταν ο σωστός γενότυπο και να μην παρουσιάζουν οποιονδήποτε τύπο μόνιμων αρρυθμιών χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν από εξειδικευμένο υπερηχογραφιστή που δεν γνώριζε τους γενοτύπους των πειραματικών μοντέλων.

Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 100 mg / kg κεταμίνης. Η υπερηχοκαρδιογραφική ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υπερήχων (Vivid 7, General Electric Healthcare) με ένα 13-MHz γραμμικό μετατροπέα. 2D στοχευμένη απεικόνιση M-mode λαμβανόταν από την προβολή του

μικρού άξονα στο επίπεδο της μεγαλύτερης διάστασης της LV. Εικόνες ηχοκαρδιογραφίας αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Echopac PC SW 3.1.3 (General Electric Healthcare).

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

Σημείωση: Η ηχοκαρδιογραφική ανάλυση των ποντικών που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο περίσφιξης που περιγράφηκε στην αντίστοιχη ενότητα πραγματοποιήθηκε σε άλλη ειδική μονάδα συνεργατών μας του Πανεπιστημίου της Ουάσινγκτον.

4 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA ακολουθήθηκε με στόχο την ανάλυσή του με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την πιστοποίηση του γενοτύπου των γενετικών μοντέλων μας.

Μεθοδολογία

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται τμήμα της ουράς των ποντικών για την απομόνωση γενωμικού DNA. Ο ιστός επωάζεται σε διάλυμα Πρωτεΐνης K για 4 ώρες τουλάχιστον. Ακολουθεί εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης (pH 7.5), ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 12.000 g. Η υδατική φάση χρησιμοποιείται για επόμενη εκχύλιση με φαινόλη. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 12.000 g. Η υδατική φάση υποβάλλεται σε δεύτερο καθαρισμό με χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη.

Στην υδατική φάση που συλλέγεται, γίνεται κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου pH 5.2 και 2-2.5 όγκων παγωμένης αιθανόλης 100%. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και στη φάση αυτή το DNA γίνεται ορατό με μορφή ινιδίων. Το δείγμα φυγοκεντρείται στους 4οC για 20 λεπτά στα 12.000 g. Το DNA έχει κατακρημνιστεί και προστίθενται 300 μl αιθανόλης 70%. Το δείγμα φυγοκεντρείται στους 4οC για 10 λεπτά στα 12.000 g και το ίζημα παραμένει σε RT, για να απομακρυνθεί η αιθανόλη. Τέλος το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100 μl υπερκάθαρο νερό και φυλάσσεται στους 4οC. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται από τον εξής τύπο: Συγκέντρωση DNA (ng/μl) = $0. A_{260nm} \times 50 \times$ αραίωση.

5 Συμβατική αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR)

Για την πιστοποίηση του γενοτύπου των γενετικών μοντέλων μας πραγματοποιήθηκε ανάλυση του διαγονιδίου μέσω της μεθοδολογίας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές για κάθε διαγονίδιο που ελέγχθηκε σχεδιάστηκαν και δοκιμάστηκαν για την πιστότητά τους. Οι συνθήκες αντίδρασης για σχεδιάστηκαν ειδικά για κάθε γενότυπο και η μεθοδολογία βελτιστοποιήθηκε για τις συνθήκες κάθε αντίδρασης ξεχωριστά.

6 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε με το σύστημα TRIZOL (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά η μεθοδολογία περιλαμβάνει την ομογενοποίηση του ιστού με διάλυμα TRIZOL (500μl διαλύματος TRIZOL/καρδιά), τη φυγοκέντρωση του ομογενοποιημένου στις 14000 rpm για 10 λεπτά και την προσθήκη στο υπερκείμενο ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 14.000 g για 10 λεπτά και πλύση του ιζήματος με 70% αλκοόλη. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 50 μl H₂O χωρίς την παρουσία RNAασών.

6.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικού RNA

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το mRNA σε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR) και για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί με ακρίβεια το ποσό του RNA που περιέχεται σε κάθε δείγμα.

Ακολουθήθηκαν διάφορες μέθοδοι ποσοτικοποίησης RNA. Πιο συχνά χρησιμοποιήθηκαν οι εξής: A. Η φωτομέτρησή του σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος, στα 260 nm που απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα και στα 280 nm που απορροφούν οι πρωτεΐνες και υπολογισμός της συγκέντρωσης με βάση τον τύπο: Συγκέντρωση RNA (ng/μl) = $O.A._{260nm} \times 40 \times \text{αραίωση}$. B. Η μέτρησή του σε σύστημα ανάλυσης “Nanodrop” (Thermo Fisher Scientific Inc). Γ. Μέτρηση με το σύστημα “Quant-iT RNA HS assay kit” (Invitrogen) και μέτρηση στο ειδικό φωτόμετρο “Qubit™ fluorometer” (Invitrogen).

7 Σύνθεση cDNA

Ακολούθησε cDNA σύνθεση με χρήση oligodT εναρκτήριες αλληλουχίες (primers), με το σύστημα της Invitrogen (SuperScript II RNase-H Reverse Transcriptase), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μεθοδολογία

Σε ένα σωληνάριο eppendorf τοποθετούνται 10 μl από το RNA δείγμα ποσότητας 2 μg, 1μl εκκινητές “Oligo dT primers” (500μg/ml), 1 μl νουκλεοτίδια “dNTP mix” (10mM το καθένα) και καθαρό νερό σε τελικό όγκο 12 μl. Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης στους 65°C για 5 λεπτά και μεταφορά στον πάγο. Στην αντίδραση προστίθενται 4 μl “5x First-Strand Buffer” και 2 μl 0.1M DTT. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 42°C για 2 min. Τέλος προστίθενται 1 μl (200 units) SuprScript II RT, ακολουθεί επώαση στους 42°C για 50 min και απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 70°C για 15 min.

8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Για τη συγκριτική ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων στο μυοκάρδιο των ποντικών, ή για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, ακολουθήθηκε η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR).

Οι εκκινητές των γονιδίων που μελετήθηκαν, σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες του mRNA από το National Center for Biotechnology Information (NCBI) και από διάφορα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης. Ο σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με τέτοιο τρόπο, ώστε τα προϊόντα της PCR να περιέχουν τη σύνδεση 2 εξονίων και να έχουν μέγεθος μεταξύ 70 και 150 βάσεων, για να είναι μεγαλύτερη η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

Η ποσοτικοποίηση των mRNAs των γονιδίων, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα Platinum SYBR Green qPCR super mix UDG kit (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιπρόσθετα, μια καμπύλη αναφοράς του γονιδίου της β-ακτίνης (ή της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L13, *Rpl3*) ποντικού πραγματοποιήθηκε για κάθε πείραμα για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων. Ίσες αρχικές ποσότητες cDNA (25–100 ng) χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα της αντίδρασης.

Η κάθε αντίδραση PCR σε κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 3 επαναλήψεις στους θερμοκυκλοποιητές “ABI Prism 7000” (Applied Biosystems) και Roche LightCycler 480 (Roche) σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες:

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

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

Αλληλουχίες

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

Κερατίνη 8 (*Krt8*) FW: 5'-GGACATCGAGATCACCCACCT-3';
REV: 5'- TGAAGCCAGGGCTAGTGAGT-3'
Μέγεθος προϊόντος: 155 bp

Κερατίνη 18 (*Krt18*) FW: 5'- CAAGTCTGCCGAAATCAGGGAC -3';
REV: 5'- TCCAAGTTGATGTTCTGGTTTT -3'
Μέγεθος προϊόντος: 111 bp

β-ακτίνη (*Actb*) FW: 5'- TGGCTCCTAGCACCATGA -3';
REV: 5'- CCACCGATCCACACAGAG -3'
Μέγεθος προϊόντος: 70 bp

Ριβοσωμική πρ L13 (*Rpl13*) FW: 5'- CCTGCTGCTCTCAAGGTTGT -3';
REV: 5'- GGTACTTCCACCCGACCTC -3'
Μέγεθος προϊόντος: 88 bp

9 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών DNA

Για τη μελέτη του προτύπου ολικής έκφρασης των μυοκαρδίων των ποντικών πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ολικού μεταγραφώματος μέσω μικροσυστοιχιών DNA (whole genome microarrays). Ο υβριδισμός και η σάρωση πραγματοποιήθηκε σε εξειδικευμένη μονάδα του πανεπιστημίου MIT (BioMicrocenter, MIT, MA, USA).

Μεθοδολογία

Οι καρδιές απομονώθηκαν από ποντίκια 3ών μηνών, ακολούθησε πλύση με παγωμένο PBS για την απομάκρυνση του μεγάλου ποσοστού κυττάρων του αίματος και διατηρήθηκαν στο διάλυμα “RNAlater” (Ambion), το οποίο συντηρεί ανέπαφο το RNA του ιστού. Στη συνέχεια οι καρδιές ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα “Trizol” (Invitrogen) για την απομόνωση του ολικού RNA, όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου.

Τα RNA από 3 καρδιές ίδιου γενοτύπου ενώθηκαν και μετατράπηκαν σε μόρια cRNA σεσημασμένα με βιοτίνη. Ακολούθησε υβριδισμός τους σε τριπλές πλάκες ανά δείγμα για στατιστική ανάλυση. Οι πλάκες υβριδισμού για το συνολικό μεταγράφομα ποντικού που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι “Affymetrix 430 2.0 microarrays”.

9.1 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων μικροσυστοιχιών DNA

Η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών DNA πραγματοποιήθηκε με χρήση της πλατφόρμας λογισμικού “GeneSpring GX” (Genespring GX9 και GX12.5, Agilent). Το κατώφλι της ανάλυσης για την ομαλοποίηση των ομάδων διαφορετικών ιχνηθετών (cutoff filter probesets) ρυθμίστηκε στο 20 %. Η ανάλυση στατιστικής σημαντικότητας και ομαλοποίησης των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της ίδιας πλατφόρμας, με βάση τα τεστ “Unpaired t-test” και “Benjamini-Hochberg FDR multiple testing correction”

Τα αποτελέσματα ανάλυσης των μικροσυστοιχιών DNA για τη σύγκριση καρδιακών μεταγραφωμάτων μεταξύ των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* και *Des^{-/-}* ποντικών έχουν αποθεθεί στην παγκόσμια βάση του οργανισμού NCBI “Gene Expression Omnibus, GEO” με τον κωδικό αριθμό «GSE56286».

9.2 Μετα-ανάλυση αποτελεσμάτων συνολικής γονιδιακής έκφρασης

Πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών DNA, η βιοπληροφορική δηλαδή μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών, κυτταρικών διεργασιών, συσχέτισης με ασθένειες και μοριακών αλληλεπιδράσεων των μορίων των οποίων μεταβάλλεται η έκφραση στις καρδιές που αναλύθηκαν. Η μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των στατιστικά σημαντικά μεταβαλλόμενων γονιδίων ($FC \geq 2$, $P\text{-value} < 0.05$) της σύγκρισης *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* και *Des^{-/-}* μέσω της ειδικής πλατφόρμας “Ingenuity Pathway Analysis, IPA” (Ingenuity Systems, Qiagen).

10 Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP) σε καρδιακό ιστό

Για τη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης των *Krt8* και *Krt18* με στόχο τη διαλεύκανση μέρος του μοριακού της εκτοπικής τους έκφρασης στο μυοκάρδιο, ακολουθήθηκε επίσης η στρατηγική ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (ChIP) στον ιστό της καρδιάς.

Συγκεκριμένα μελετήθηκε ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στη γονιδιακή ρύθμιση των *Krt8* και *Krt18* στο μυοκάρδιο WT και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών ηλικίας 4^{ov} μηνών. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την υπομονάδα p65 NF-κB (C-20, cat.# sc-372, Santa Cruz Biotechnology) και για αναφορά το “normal rabbit IgG” (sc-2027, Santa Cruz Biotechnology), δοκιμασμένο εκτενώς για ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης στη βιβλιογραφία. Μία καρδιά ενήλικου ποντικίου χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση ChIP.

10.1 Προετοιμασία της χρωματίνης από ιστό ενήλικης καρδιάς

Απομονώθηκαν καρδιές από τα ποντίκια, έπειτα από διοχέτευση με παγωμένο PBS για την απομάκρυνση του μεγάλου ποσοστού των κυττάρων του αίματος. Ακολούθησε πλύση με παγωμένο PBS. Οι καρδιές κόπηκαν σε μικρά κομμάτια (διαμέτρου περίπου 10 mm). Ακολούθησε μονιμοποίηση του ιστού σε 1 % φορμαλδεΰδη για 30 λεπτά (RT) στο διάλυμα “Link buffer”. Η αντίδραση μονιμοποίησης τερματίστηκε με πλύσιμο στο “Link buffer” που περιέχει 0.125M γλυκίνη (5 λεπτά, RT) .

Ακολούθησε πλύσιμο με PBS και ομογενοποίηση των δειγμάτων με μηχανικό μέσο (μηχανικοί κοπτήρες, IKA Ultra Turrax T5 FU με ρύθμιση στα 40,000/min) πάντα στον πάγο. Έπειτα από ήπια φυγοκέντρηση (2300 g, 5 λεπτά, 4 °C), τα κύτταρα λύθηκαν σε διάλυμα “SDS lysis” για 1 ώρα στους 4°C. Οι πυρήνες απομονώνονται μέσω ομογενοποίησης με ομογενοποιητή “Dounce” (20 φορές).

Στη συνέχεια η προετοιμασία χρωματίνης περιλαμβάνει απομόνωσή της και κόψιμο του γενωμικού DNA σε μεγέθη 150 – 500 bp. Τα δείγματα υπόκεινται σε υπέρηχους, έντασης 40% για 23 γύρους των 30 δευτερόλεπτα ON / 45 δευτερόλεπτα OFF (στη συσκευή υπερήχων Sonics VCX-130). Η κομμένη χρωματίνη ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε 2.2 % πήκτωμα αγαρόζης (5 μl ανά δείγμα). Προστίθενται σε κάθε δείγμα 1 mL PBS και 1 mL Dilution Buffer (και τα δύο διαλύματα με αναστολείς πρωτεασών) σε τελικό όγκο 3 mL ανά δείγμα και αναδεύονται καλά. Υπολογίζουμε πάντα 50 μl κάθε δείγματος να αποθηκευτούν (–80 °C) για έλεγχο του δείγματος “input”.

10.2 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης πραγματοποιήθηκε με χρήση του συστήματος “Dynabeads Protein G” (Thermo Fisher Scientific Inc) που περιέχει μαγνητικά σφαιρίδια, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Γενικά η μεθοδολογία έχει ως εξής:

Χρησιμοποιούμε 1 ml του δείγματος χρωματίνης (από το συνολικό όγκο Vol = 3 ml) για κάθε αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης. Προσθέτουμε 2 μg αντισώματος. Χρησιμοποιούμε άλλο 1 ml του δείγματος χρωματίνης για ανοσοκατακρήμνιση με 2 μg καθαρισμένων πρωτεϊνών IgG. Τα δείγματα επωάζονται ολόκληρη νύχτα στους 4° C με ήπια περιστροφή.

Προετοιμάζουμε τα μαγνητικά σφαιρίδια σύμφωνα με τις οδηγίες του σε 1 ml Dilution Buffer” (χωρίς αναστολείς πρωτεασών) και Protein G-Dyna μαγνητικά σφαιρίδια (για 2μg αντισώματος → 5,5 μl σφαιρίδια). Μετά από ήπια ανακίνηση φυγοκεντρούμε (3.000 rpm, 4° C) και τοποθετούμε στον ειδικό μαγνήτη και απομακρύνουμε το υγρό. Στα eppendorfs αυτά προσθέτουμε στη συνέχεια την αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης και επωάζουμε για 2 ώρες με ήπια περιστροφή στους 4° C. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε (3.000 rpm, 4° C) και στον ειδικό μαγνήτη και απομακρύνουμε το υγρό.

Ακολουθούν πλυσίματα 2x με το διάλυμα “Low Salt Wash EF” (με αναστολείς πρωτεασών), 2x με το διάλυμα “High Salt Wash EF” (με αναστολείς πρωτεασών) και 1x με 1 mL από το διάλυμα “LiCl/detergent EF” και τέλος 1x με 1 mL από το διάλυμα “TE buffer EF”. Αφού απομακρύνουμε όσο το δυνατό περισσότερο από το υγρό, προχωράμε στην απομόνωση του DNA της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης.

10.3 Απομόνωση του DNA της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης

Προσθέτουμε 48 μl από το διάλυμα “Proteinase K Digestion EF” και 2 μl Πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml). Στο δείγμα “input DNA” (50 μL χρωματίνης) προσθέτουμε μl 10% SDS και 1 μl Πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml). Επωάζουμε στους 50°C για 15 λεπτά με έντονη ανακίνηση (vortexing) ανά διαστήματα. Τοποθετούμε το δείγμα στον ειδικό μαγνήτη για 2 min. Προσθέτουμε 3 μl 5M NaCl και 0.7 μl 30 mg/ml RNase A και επωάζουμε για 4 ώρες (έως 16 ώρες το ανώτερο) στους 65° C σε ειδικό φούρνο. Προσθέτουμε 3 μl Πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml) και επωάζουμε για 1 ώρα στους 50° C με έντονη ανακίνηση σε αραιά διαστήματα.

10.4 Ανάλυση του DNA ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης

Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του DNA με συμβατικές μεθόδους μοριακής βιολογίας (δεν περιγράφονται στην παρούσα διατριβή) και τα δείγματα, αφού ποσοτικοποιηθούν, είναι έτοιμα για την ανάλυση. Στην παρούσα μελέτη ακολουθήθηκε ανάλυση μέσω ποσοτικής RT-PCR με το σύστημα “Platinum SYBR Green qPCR super mix UDG w/ROX kit” (Invitrogen).

Ακολουθήθηκε ανάλυση μέσω RT-PCR μιας πληθώρας στόχων, που σχεδιάστηκαν βάσει της ανάλυσης που περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Στην παρούσα παράγραφο θα περιγραφούν στη συνέχεια μόνο οι αλληλουχίες που βρέθηκαν θετικές στην πρόσδεσή τους για τον p65 NF-κB (βλέπε και Συμπληρωματικό Πίνακα 3) και η αλληλουχίες της περιοχής αναφοράς, και είναι οι εξής:

- **“neg”** (chr18:83,352,556–83,352,688)

FW: 5'-ATGGGGCAGCCTAGTCACAGCA-3'

REV: 5'-TCACTTGTCCAGGAAGCAGCGAG-3'

Αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητική αναφορά (negative control, “neg”) και αναφέρεται σε περιοχή που δεν υπάρχει πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και συγκεκριμένα του παράγοντα NF-κB.

- **“K8R2P1”** (chr15:101,835,085–101,835,197)

FW: 5'-ACTCAACACAGGCAAGCTAC-3'

REV: 5'-CCACTGGTGGAGAACCTACAG-3'

- **“K18R1P3”** (chr15:101,858,467–101,858,567)

FW: 5'-CACTCCCTGTGTCTGGTGAGG-3'

REV: 5'-GGCGCCAGGATCGGG-3'

- “**K18R2P2**” (chr15:101,857,249–101,857,389)

FW: 5'-TCATTCAGCAGGAGTGGTCA-3'

REV: 5'-CTCCCCGGGCCTTTTCTTC-3'

- “**K8K18R2P2**” (chr15:101,843,747–101,844,883)

FW: 5'-TTGACTGCCTTGCAAACACTGC-3'

REV: 5'- TCCTAGTCTGGTCCGTCTGG-3'

Οι χρωμοσωμικές περιοχές αυτές αναφέρονται στο χαρτογραφημένο γονιδίωμα ποντικού “July 2007 mouse genome data” (*Mus musculus*; NCBI37/mm9) όπως περιγράφεται στην πλατφόρμα βιοπληροφορικής ανάλυσης “UCSC genome browser”.

Διαλύματα

Link buffer: 100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.9, 0.5 mM EGTA, 1 mM EDTA.

SDS lysis: 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA pH 8, 1 % SDS, 1 % αναστολείς πρωτεασών.

Dilution Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100.

Low Salt Wash EF: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 150 mM NaCl.

High Salt Wash EF: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH, pH 7.9, 500 mM NaCl.

LiCl'Wash'Buffer EF: 100 mM TrisZnCl, pH 7.5, 0.5 M LiCl, 1 NP-40, 1% Sodium Deoxycholate.

Proteinase'K'Digestion'Buffer EF: 20 mM HEPES, pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.5 SDS

TE/10 buffer EF: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA.

11 Ανάλυση γονιδιακής ρύθμισης με το σύστημα λουσιφεράσης

Για τη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης των *Krt8* και *Krt18* με στόχο τη διαλεύκανση μέρος του μοριακού της εκτοπικής τους έκφρασης στο μυοκάρδιο, ακολουθήθηκε επίσης η *in vitro* στρατηγική ανάλυσης με το σύστημα της λουσιφεράσης.

Συγκεκριμένα μελετήθηκε ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στη γονιδιακή ρύθμιση των *Krt8* και *Krt18* *in vitro* στην κυτταρική σειρά HEK293. Επιπλέον με τη μέθοδο αυτή μελετήθηκαν και οι συγκεκριμένες κB θέσεις που βρέθηκαν μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης και της ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης να προσδένουν τον παράγοντα NF-κB, σε ρυθμιστικές περιοχές των *Krt8* και *Krt18*.

11.1 Κατασκευή γενετικών κατασκευών μελέτης της γονιδιακής ρύθμισης των *Krt8* και *Krt18*.

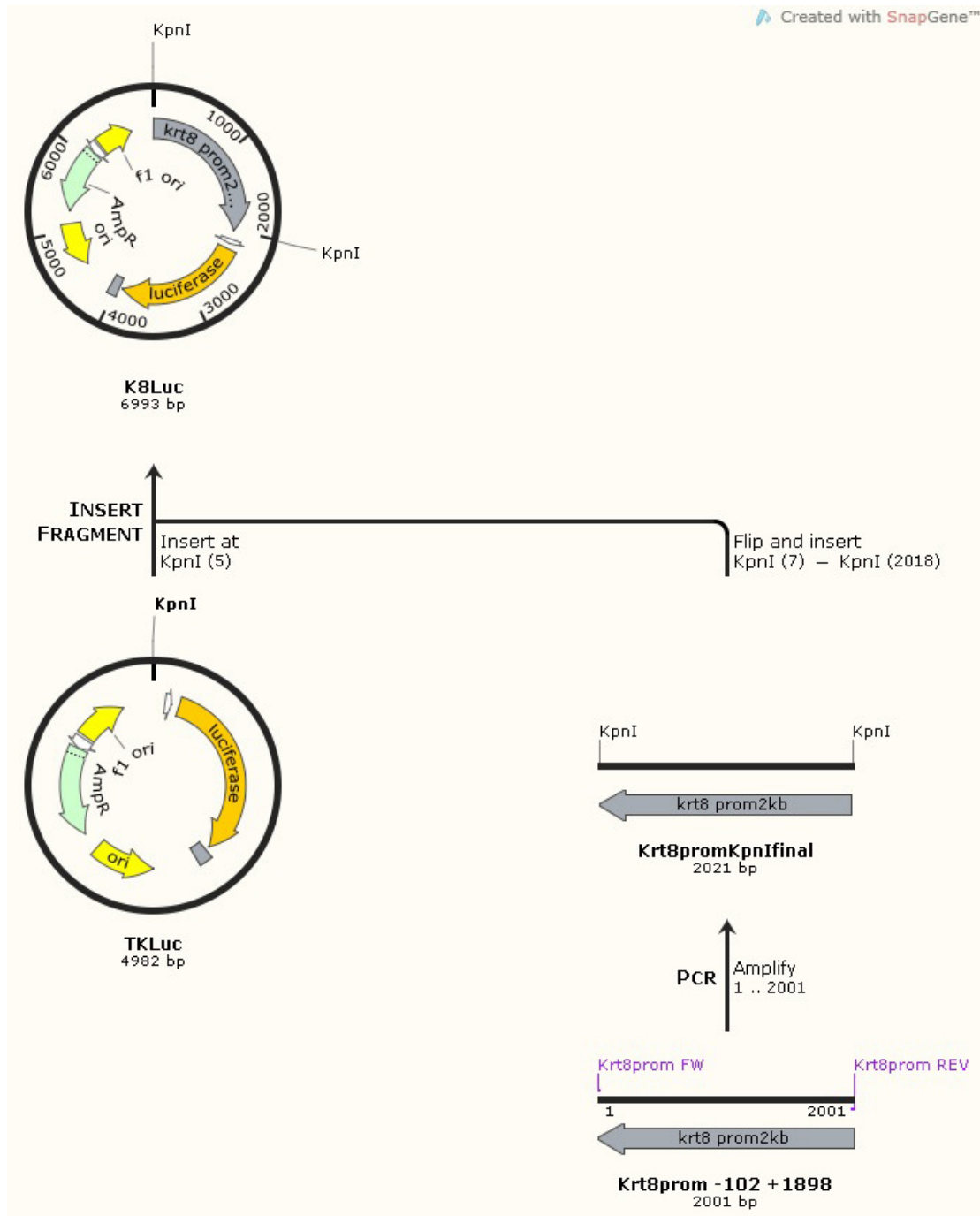
Με κλασσικές μεθόδους μοριακής βιολογίας (δεν περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα διατριβή) κατασκευάσαμε πλασμίδια που περιέχουν ανέπαφες ρυθμιστικές περιοχές μεγέθους 2 kb πριν από την αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης των *Krt8* και *Krt18* (βλέπε Εικόνα 53), πίσω από το γονίδιο της λουσιφεράσης.

Κλωνοποιήθηκαν οι συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές των *Krt8* και *Krt18* (περιγράφονται στη συνέχεια) από γενωμικό DNA που απομονώθηκε από ποντίκι

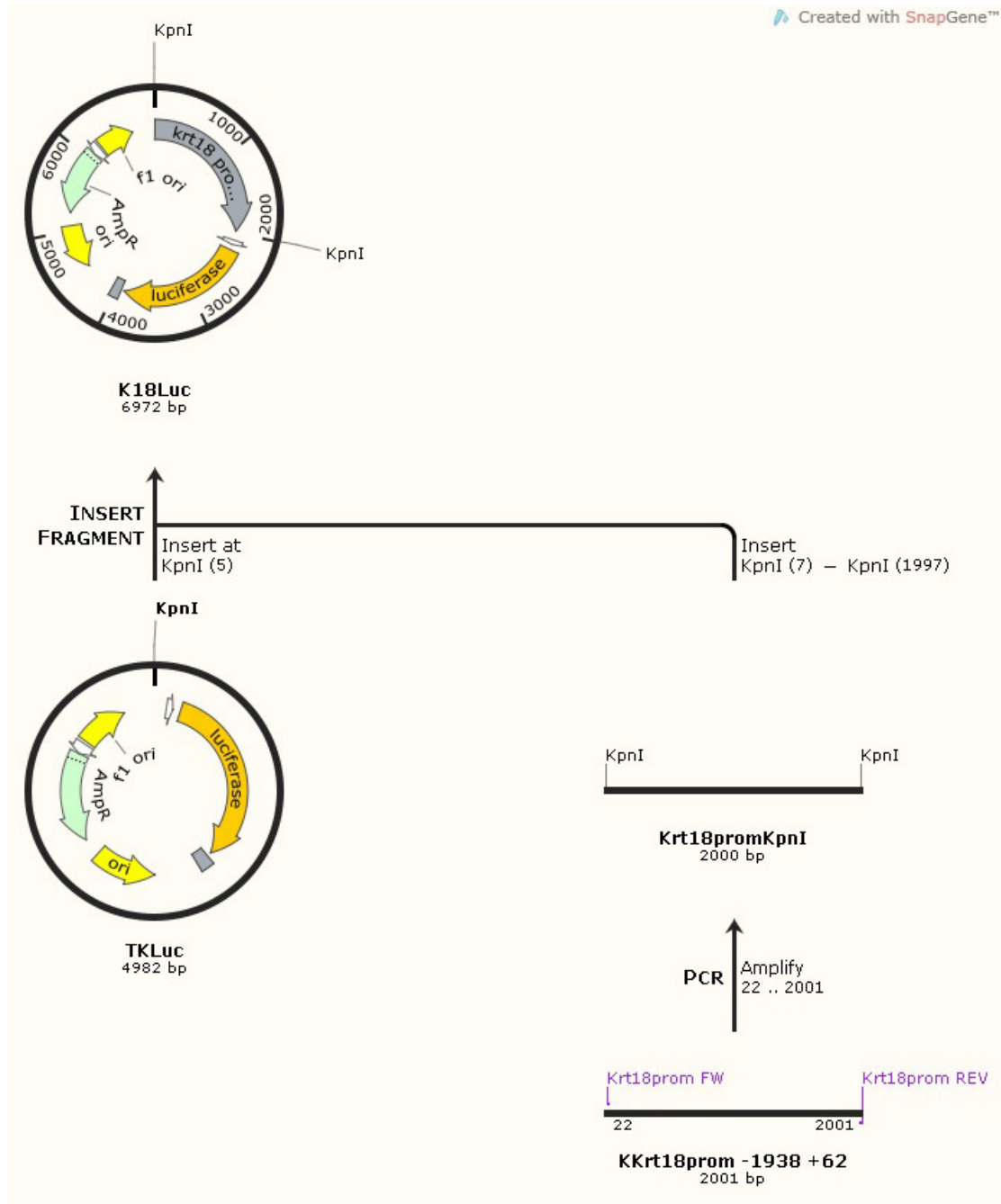
WT (C57/B16) με ειδικές αλληλουχίες εκκινητές (primers), που σχεδιάστηκαν ειδικά για την κλωνοποίησή των συγκεκριμένων περιοχών με απόλυτη ακρίβεια και μεγάλη πιστότητα. Για το λόγο αυτό επίσης χρησιμοποιήθηκε και ειδικό ένζυμο πολυμεράσης. Οι αλληλουχίες εκκινητές για την κλωνοποίηση των *Krt8* και *Krt18* από το γενομικό DNA σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να προστεθεί και στα 2 άκρα των 2 kb κλώνων η περιοριστική θέση *KpnI*. Στη συνέχεια με αντίδραση λιγάσης ενσωματώθηκαν στοχευμένα στον πλασμιδιακός φορέας “pGL3-Basic luciferase” (Promega), ο οποίος περιέχει μία αλληλουχία ελάχιστου υποκινητή του γονιδίου της κινάσης θυμιδίνης του οργανισμού HSV(TK; -120 +57).

Σύμφωνα με τη στρατηγική που περιγράφεται στις Εικόνες M1 και M2 ενσωματώθηκαν οι εξής 2 kb περιοχές στον pGL3-Basic φορέα:

- Για τη μελέτη του γονιδίου *Krt8*: -102 +1898 (chr15:101,834,675–101,836,675; NCBI37/mm9 assembly; το ATG βρίσκεται στην “minus” αλυσίδα). Η κατασκευή που προέκυψε ονομάστηκε “Krt8luc”.
- Για τη μελέτη του γονιδίου *Krt18*: -1938 +62 (chr15:101,856,705–101,858,705; NCBI37/mm9 assembly; το ATG βρίσκεται στην “plus” αλυσίδα). Η κατασκευή που προέκυψε ονομάστηκε “Krt18luc”.



Εικόνα M1. Στρατηγική κλωνοποίησης για την κατασκευή του “K8luc”.



Εικόνα M2. Στρατηγική κλωνοποίησης για την κατασκευή του “K8luc”.

11.2 Κατασκευή μεταλλαγμένων γενετικών κατασκευών για τη μελέτη του ρόλου συγκεκριμένων κB θέσεων στη ρύθμιση των Krt8 και Krt18.

11.2.1 Μεταλλαξιγένεση *in vitro* σε στοχευμένες θέσεις

Για τη δημιουργία κλώνων που περιέχουν στοχευμένες μεταλλάξεις στην 2-kb ρυθμιστική περιοχή των Krt8 και Krt18, με στόχο να κατασταθούν ανενεργές συγκεκριμένες κB θέσεις, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης. Οι συγκεκριμένες μεταλλαγμένες γενετικές κατασκευές ονομάστηκαν “μ2Krt8luc” και “μ2Krt18luc” για τα “Krt8luc” και “Krt18luc”, αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες κB θέσεις “NFκBsite6” και “NFκBsite8” των “Krt8luc” και “Krt18luc” οι οποίες μεταλλάχθηκαν, οι αλληλουχίες που προέκυψαν και η στρατηγική μεταλλαξιγένεσης περιγράφονται στις Εικόνες 50, 51 και 53 και στον Συμπληρωματικό Πίνακα 3.

Το σύστημα που προτιμήθηκε είναι το QuickChange site-directed mutagenesis Lightning (Agilent Technologies). Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ειδικά στελέχη βακτηρίων “XL10-Gold ultracompetent”. Τα βακτήρια αυτά έχουν Hte φαινότυπο, παρουσιάζοντας αυξημένα επίπεδα επιδεκτικότητας σε μετασχηματισμό μεγάλων μορίων DNA ή μορίων DNA από αντίδραση συνένωσης (ligation), σε σύγκριση με τα περισσότερα στελέχη *E. coli*. Επιπλέον έχουν τροποποιηθεί γενετικά ώστε να μην έχουν δράση ενδονουκλεασών (*endA1*) και ανασυνδυασμού (*recA*). Επιπλέον περιλαμβάνει την *Pfu Fusion* DNA πολυμεράση, η οποία αντιγράφει και τους δύο κλώνους του πλασμιδίου με υψηλή ακρίβεια -6 φορές μεγαλύτερη από την *Taq* DNA πολυμεράση- και χωρίς να εκτοπίζει το μεταλλαγμένο ζεύγος εναρκτήριων αλληλουχιών (primers). Η περιγραφή του συστήματος διαγραμματικά φαίνεται στην Εικόνα M3.

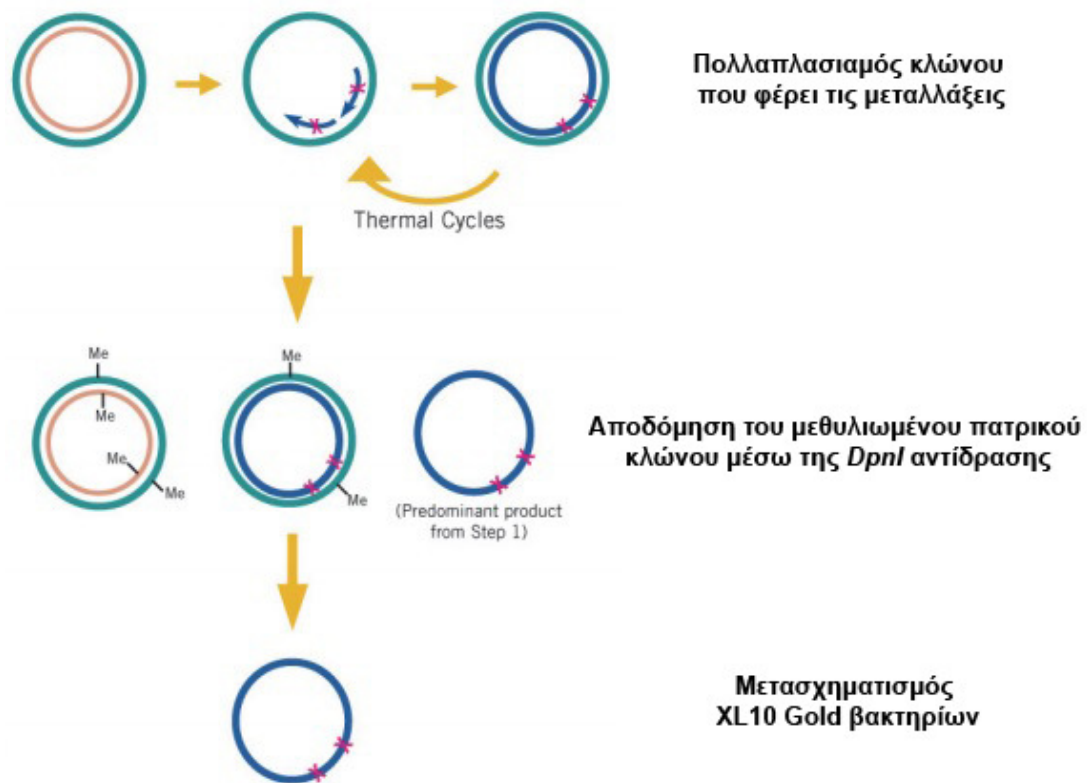
Οι εναρκτήριες αλληλουχίες (primers) έχουν σχεδιαστεί σε ειδική πλατφόρμα σε δικτυακό τόπο της εταιρείας με τέτοιο τρόπο ώστε να πλαισιώνουν την αλληλουχίες όπου πρόκειται να υπάρξει αντικατάσταση νουκλεοτιδίων.

Ενσωμάτωση των εναρκτήριων αλληλουχιών κατά την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) δημιουργεί ένα πλασμίδιο που φέρει το μεταλλαγμένο DNA με κομμένα άκρα (nicks).

Μετά τον πολλαπλασιασμό από την PCR, ακολουθεί πέψη με την ενδονουκλεάση Dpn I, που πέπτει ειδικά μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA. Τα

περισσότερα βακτηριακά στελέχη μεθυλιώνουν το DNA κατά την αντιγραφή, οπότε η πέψη αυτή σκοπό έχει να απαλλάξει το δείγμα από το πατρικό DNA που φέρει τη δεσμίνη άγριου τύπου.

Με το απαλλαγμένο από τις πατρικές προσμίξεις μεταλλαγμένο DNA, μετασχηματίζονται δεκτικά κύτταρα και από τις αποικίες που προκύπτουν απομονώνεται πλασμιδιακό DNA, με κλασσικές μεθόδους μοριακής βιολογίας (δεν περιγράφονται στην παρούσα διατριβή).



Εικόνα M3. Μεθοδολογία στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης μέσω του συστήματος QuickChange Lightning Site-directed Mutagenesis.

11.3 Επιμόλυνση κυττάρων με γενετικές κατασκευές και μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοζιδάσης

Οι πλασμιδιακοί φορείς που αναφέρθηκαν παραπάνω και οι υπόλοιποι που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες μας, επιμολύνθηκαν στα κύτταρα HEK293 με τη μέθοδο της πολυαιθυλενιμίνης (PEI) (οι συνθήκες καλλιέργειας και χειρισμού κυτταρικών σειρών δεν περιγράφονται αναλυτικά στην παρούσα διατριβή).

Περίληπτικά, χρησιμοποιήθηκαν για πιάτα καλλιέργειας 24-θέσεων, 0.1 μg των πλασμιδιακών κατασκευών της λουσιφεράσης και 0.5 μg των πλασμιδιακών κατασκευών CMV-p65 ή control (φορέας pBluescript). Επίσης, 0.2 μg του φορέα CMV-βGal για την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης που χρησιμοποιήθηκε για την ομαλοποίηση των μετρήσεων. Μετά από 48 ώρες λύνονται τα κύτταρα με το σύστημα Reporter Lysis Buffer (Promega) και ακολουθήθηκε η μεθοδολογία της μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης σε συγκεκριμένο υπόστρωμα μέσω χημειοφωταύγειας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως περιγράφεται στο (Kaltezioti, Kouroupi et al. 2010). Η μεθοδολογία μέτρησης της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης πραγματοποιήθηκε βιοχημικά, όπως περιγράφεται στο (Kaltezioti, Kouroupi et al. 2010).

12 Ηλεκτρονική μικροσκοπία και ανοσοσήμανση με σωματίδια χρυσού

Για τη μελέτη της υπερδομής των μυοκαρδιοκυττάρων όπως η οργάνωση και μορφολογία των εμβόλιμων δίσκων, των μιτοχονδρίων και των μυοϊνιδίων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία δειγμάτων από καρδιές ποντικών. Όσων αφορά τις αναλύσεις σε τομές μυοκαρδίου, οι μεθοδολογίες ακολουθήθηκαν όπως έχει περιγραφεί (Rickelt, Moll et al. 2011) και μέρος της μικροσκοπίας πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Έρευνας για τον Καρκίνο της Γερμανίας (DKFZ). Οι αναλύσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των απομονωμένων μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετική μονάδα.

12.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία τομών μυοκαρδίου

Μεθοδολογία

Έπειτα από την απομόνωση της καρδιάς, τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια και ξεπλένεται με PBS. Ακολουθεί μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα κακωδυλικού νατρίου (pH 7.2) που περιέχει 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂ και 2,5 % γλουταραλδεΐδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Έπειτα από διαδοχικές πλύσεις στο ίδιο διάλυμα, πραγματοποιήθηκε επόμενο βήμα μονιμοποίησης με 2 % OsO₄ σε διάλυμα κακωδυλικού για 2 ώρες στον πάγο. Ακολούθησαν πλυσίματα με καθαρό νερό και χρώση βαρέων μετάλλων με 0.5 % οξικό ουρανύλιο σε καθαρό νερό για ολόκληρη νύχτα στους 4 °C. Έπειτα από τρεις πλύσεις σε νερό, τα δείγματα αφυδατώθηκαν με διαδοχικούς εμποτισμούς αιθανόλης και οξείδιο του προπυλενίου, πριν τον εγκλεισμό τους στο υλικό Epon.

Οι τομές πραγματοποιήθηκαν σε εξειδικευμένο μικροτόμο (Reichert-Jung microtome, Ultracut, Leica). Ακολούθησε χρώση με 2 % οξικό ουρανύλιο σε μεθανόλη για 15 λεπτά, ακολουθούμενου από πλυσίματα και τελικό εμποτισμό σε κιτρικό μόλυβδο σε καθαρό νερό για 5 min. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για τις φωτογραφίες είναι στα 80 kV, είναι το EM 900 (Carl Zeiss).

12.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία απομονωμένων μιτοχονδρίων

Μεθοδολογία

Τα απομονωμένα μιτοχόνδρια από τις καρδιές ποντικού μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 0.1 M κακωδυλικού νατρίου (pH 7.4) που περιέχει 1,25 % γλουταραλδεΐδη για 1 ώρα σε RT. Στη συνέχεια τα μιτοχόνδρια φυγοκεντρήθηκαν στα 12000 x g για 5 λεπτά στους 4 °C και διατηρήθηκαν σε διάλυμα 0.1 M κακωδυλικού νατρίου μέχρι την ανάλυση.

12.3 Ανοσοσήμανση με σωματίδια χρυσού

Μεθοδολογία

Για τις μελέτες του υποκυτταρικού εντοπισμού της κερατίνης 8 πραγματοποιήθηκε συνδυασμός ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με μεθόδους ανοσοσήμανσης με σωματίδια χρυσού.

Χρησιμοποιήθηκαν τομές κρυοτόμου του μυοκαρδίου, οι οποίες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα PBS που περιέχει 2 % φορμαλδεΰδη για 5–7 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εμποτισμός των τομών σε διάλυμα PBS με 0.1 % σαπονίνης (3–5 min) για τη διαπερατότητα του ιστού ακολουθούμενου από επώαση με το πρώτο αντίσωμα για 2 ώρες το λιγότερο. Το αντίσωμα που τελικά χρησιμοποιήθηκε για την κερατίνη, μετά από δοκιμές αντισωμάτων, είναι το anti-Keratin 8 (Troma-I) (DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) και για τη δεσμοπλακίνη το anti-Desmoplakin (cat.# 65146) (Progen Biotechnik).

Μετά από 3 πλυσίματα τα δείγματα επώαστηκαν με τα δεύτερα αντισώματα, στα οποία είναι προσδεδεμένα σωματίδια χρυσού μεγέθους 1.4 nm (Nanogold, Biotrend) για 4 h. Τα δείγματα στη συνέχεια πέρασαν από επόμενο βήμα μονιμοποίησης σε διάλυμα κακωδυλικού νατρίου (pH 7.2) που περιέχει 2,5 % γλουταραλδεΰδη για 15 λεπτά σε RT. Ακολουθεί, πλύσιμο στο ίδιο διάλυμα και διπλή επώαση σε διάλυμα 50 mM HEPES (pH 5.8) με 200 mM σουκρόζη για 10 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το βήμα ενίσχυσης σήματος (silver enhancement) (Nanoprobes) για 7 με 10 λεπτά, 2 πλυσίματα σε 250 mM θειοθειϊκού νατρίου σε διάλυμα 50 mM HEPES (pH 5.8) για 5 λεπτά το καθένα και 2 σύντομα πλυσίματα σε καθαρό νερό.

Έπειτα ακολουθεί το τελευταίο βήμα μονιμοποίησης με 0.2 % OsO₄ σε διάλυμα κακωδυλικού για 30 λεπτά στον πάγο, τα δείγματα αφυδατώνονται και εγκλείονται στο υλικό Epon. Έπειτα πραγματοποιούνται τομές και χρώσεις συμβατικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για τις φωτογραφίες είναι στα 80 kV, είναι το EM 900 (Carl Zeiss).

13 Απομόνωση και λειτουργική ανάλυση καρδιακών μιτοχονδρίων

13.1 Απομόνωση μιτοχονδρίων του μυοκαρδίου

Για τις μελέτες της λειτουργίας των καρδιακών μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκε απομόνωση ανέπαφων (λειτουργικά ενεργών) μιτοχονδρίων από καρδιές ποντικών.

Μεθοδολογία

Οι καρδιές απομονώθηκαν, ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν στο «Διάλυμα Ομογενοποίησης» (homogenization buffer, *HB*). Η ομογενοποίηση της καρδιάς πραγματοποιήθηκε σε σύστημα γυάλινου δοχείου (glass potter) με ένα μηχανικά ελεγχόμενο έμβολο Teflon στις 1200 rpm, 8 φορές, στον πάγο. Μετά την πρώτη φυγοκέντρηση στις 1000 x g, 5 λεπτά, το υπερκείμενο τοποθετήθηκε για επόμενη φυγοκέντρηση στις 12000 x g, 10 min.

Οι πελέτες (κατακρημνισμένα ιζήματα φυγοκέντρησης) επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε *HB* και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 min. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε μία ακόμα φορά. Τέλος, οι πελέτες επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1 ml διαλύματος *MAITE* και φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 2 min. Οι μιτοχονδριακές πελέτες επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 100 μl πειραματικού διαλύματος (experimental buffer, *EB*). Όλη η μεθοδολογία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία πάγου. Η μιτοχονδριακή πρωτεΐνης υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

Διαλύματα

HB: 0.075 M σουκρόζη, 0.225 M σορβιτόλη, 1mM EGTA, 0.1 % ορός σαλβουμίνης βοός χωρίς λιπαρά οξέα (BSA), 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) (10 ml/gr ιστού).

MAITE: 100 mM KCl, 75 mM σορβιτόλη, 25 mM σουκρόζη, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, pH 7.4.

EB: 137 mM KCL, 10 mM Tris-MOPS, 2 mM KH₂PO₄, 20 mM EGTA-Tris.

13.2 Ανάλυση μιτοχονδριακής κατανάλωσης οξυγόνου

Για την ανάλυση των λειτουργικών χαρακτηριστικών των καρδιακών μιτοχονδρίων και συγκεκριμένα των ιδιοτήτων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, ακολουθήθηκε η στρατηγική ανάλυσης της κατανάλωσης οξυγόνου σε συγκεκριμένες συνθήκες.

Μεθοδολογία

Απομονωμένα λειτουργικώς ενεργά μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικιού, σε ποσότητα μιτοχονδριακής πρωτεΐνης 150 µg επώαστηκαν σε 300 µl EB που περιείχαν 5 mM γλουταμινικό - 2.5 mM μηλικό οξύ. Η κατανάλωση οξυγόνου μετρήθηκε με ειδικό σύστημα που περιέχει ηλεκτρόδιο τύπου “Clark” (Oxytherm System, Hansatech Instruments. Τα βασικά επίπεδα κατανάλωσης O₂ καταγράφηκαν αρχικά και στη συνέχεια μετά το πέρας 3ών λεπτών προστέθηκαν στο διάλυμα μιτοχονδρίων 400 µM ADP (“State-III” φάση). Έπειτα από άλλα 3 λεπτά προστέθηκε 1 µM ολιγομυκίνης (“State-IV” φάση). Η καταγραφή της κατανάλωσης οξυγόνου ήταν συνεχής και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε γραφήματα nMol O₂ / sec.

Διαλύματα

HB: 0.075 M σουκρόζη, 0.225 M σορβιτόλη, 1mM EGTA, 0.1 % ορός αρβουμίνης βοός χωρίς λιπαρά οξέα (BSA), 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) (10 ml/gr ιστού).

13.3 Μετρήσεις γλουταθειόνης

Μεθοδολογία

Οι μετρήσεις γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκαν με βιοχημική μέθοδο χρωματομετρίας. Απομονωμένα λειτουργικώς ενεργά μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικιού, σε ποσότητα μιτοχονδριακής πρωτεΐνης 200 µg επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50 µl 1 % (w/v) sulfosalicylic acid (SSA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση με συνθήκες 12000 x g, 4 °C και στη συνέχεια επόμενη φυγοκέντρηση με συνθήκες 12000 x g, 4 °C. Τα υπερκείμενα αποθηκεύθηκαν στους -80 °C.

Οι μετρήσεις των επιπέδων της ολικής γλουταθειόνης (GSx) πραγματοποιήθηκαν αφού επώαστηκαν 10 µl δείγματος (διαλυμένου σε 90 µl καθαρό

νερό) σε 100 μl διάλυμα αντίδρασης (reaction buffer). Η απορρόφηση του φωτός καταγράφηκε στα 405 nm κάθε 30 δευτερόλεπτα, μέσω ειδικού σπεκτροφωτόμετρου, παράλληλα με τα πρότυπα δείγματα της GSSG. Οι μετρήσεις ομαλοποιήθηκαν βάσει των μετρήσεων της καμπύλης αναφοράς.

Για τον υπολογισμό των επιπέδων της GSSG, προστέθηκε 1 μl του “2-vinylpyridine plus” σε 26 μl του δείγματος και επιπλέον 0.2 M Tris (40 μl). Το διάλυμα επώαστηκε για 1h στους 4 °C. Τα επίπεδα της GSSG υπολογίστηκαν όπως περιγράφηκε για τα επίπεδα της GSx με παράλληλη μέτρηση πρότυπων δειγμάτων GSSG που χειρίστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο. Τα επίπεδα της GSH υπολογίστηκαν μέσω της φόρμουλας: $GSX = GSH + 2 \times GSSG$.

Διαλύματα

Διάλυμα αντίδρασης γλουταθειόνης: 0.1 M sodium phosphate pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.4 mM NADPH, 0.3 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) και αναγωγή γλουταθειόνης (1 U/ml).

13.4 Απομόνωση και μέτρηση νουκλεοτιδίων πυριδίνης

Μεθοδολογία

Οι μετρήσεις νουκλεοτιδίων πυριδίνης πραγματοποιήθηκαν με βιοχημική μέθοδο χρωματομετρίας. Τα νουκλεοτίδια πυριδίνης απομονώθηκαν από απομονωμένα λειτουργικώς ενεργά μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικίου, σε ποσότητα μιτοχονδριακής πρωτεΐνης 400 μg. Το διάλυμα απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση περιείχε 100 μl 0.1 M KOH (για το NADH), ή 0.1 M HCl (για το NAD⁺) σε αιθανόλη:νερό (1:1). Έπειτα από 20 λεπτά στον πάγο, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε συνθήκες 20,000 x g, 4 °C. Τα υπερκείμενα αποθηκεύθηκαν στους -80 °C μέχρι τις μετρήσεις.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν υπολογίζοντας την απορρόφηση του φωτός στα 360 nm μέσω σπεκτροφωτόμετρου (Perkin Elmer). Τα δείγματα σε όγκο 20 μl προστέθηκαν σε 480 μl διαλύματος αντίδρασης που περιέχει 100 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 10 mM γαλακτικό οξύ (για τις NAD⁺ μετρήσεις), ή 4 mM Na-Pyruvate (για τις μετρήσεις NADH) και 20 units/ml δεϋδρογενάση του γαλακτικού οξέος. Οι

μεταβολές στην απορρόφηση ως $Abs \times min^{-1}$ σχετίστηκαν με βάση τις καμπύλες αναφοράς που υπολογίστηκαν μετρώντας γνωστές συγκεντρώσεις NADH ή NAD^+ .

Διαλύματα

Διάλυμα απομόνωσης: 100 μ l 0.1 M KOH (για το NADH), ή 0.1 M HCl (για το NAD^+) σε αιθανόλη:νερό (1:1).

Διάλυμα αντίδρασης νουκλεοτιδίων πυριδίνης: 100 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 10 mM γαλακτικό οξύ (για τις NAD^+ μετρήσεις), ή 4 mM Na-Pyruvate (για τις μετρήσεις NADH) και 20 units/ml δεϋδρογενάση του γαλακτικού οξέος.

13.5 Ποσοτικοποίηση επιπέδων ATP

Μεθοδολογία

Οι μετρήσεις των επιπέδων ATP των καρδιακών μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Απομονωμένα λειτουργικώς ενεργά μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικίου, σε ποσότητα μιτοχονδριακής πρωτεΐνης 100 μ g χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις, χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα “ATP detection assay system ATPlite” (PerkinElmer), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα επίπεδα του ATP ομαλοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης.

14 Ανάλυση ιστολογίας

14.1 Εγκλεισμός καρδιάς σε παραφίνη και τομές σε μικροτόμο

Με τη διαδικασία αυτή μονιμοποιείται ο προς εξέταση ιστός ώστε να διατηρείται σε μεγάλο βαθμό η δομή του και να επιτρέπεται η η περαιτέρω ανάλυση λεπτών τομών (έως 4-5 μ m) με την βοήθεια μικροτόμου παραφίνης.

Μεθοδολογία

Αρχικά, μονιμοποιούνται οι ιστοί και στη συνέχεια εγκλείονται στην παραφίνη σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια. Προτού αφαιρεθεί η καρδιά μετά τη διάνοιξη του στέρνου, πραγματοποιείται διοχέτευση PBS προκειμένου να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο ποσοστό αίματος που περιέχουν. Στη συνέχεια αφαιρείται προσεκτικά η καρδιά και πλένεται με PBS στους 4°C. Η μονιμοποίηση γίνεται στο μονιμοποιητικό διάλυμα formalin 10 % (Sigma, HT-50-1-128), για διάστημα που ποικίλλει ανάλογα με το πάχος του από 5 έως 16 h. Μετά τη μονιμοποίηση, ακολουθεί έκπλυση του ιστού με PBS, ώστε να απομακρυνθούν ενεργά υπολείμματα του μέσου μονιμοποίησης.

Ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση του ιστού, με μια σειρά από διαδοχικές επώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH) και στη συνέχεια ξυλόλης, ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση της παραφίνης. Η πορεία των επώσεων είναι η εξής:

- EtOH 70% (x 2), RT, 30 min
- EtOH 85% (x 2, RT, 30 min
- EtOH 95% (x 2, RT, 30 min
- EtOH 100% (x 2, RT, 30 min

Στη συνέχεια ο αφυδατωμένος ιστός επώζεται 2 φορές σε 100 % ξυλόλη, σε απαγωγό, για 20 λεπτά (RT). Ακολουθεί επώση σε διάλυμα ξυλόλης/παραφίνης (1:1), στους 65 °C για 45 min. Τελικά ο ιστός εμποτίζεται σε 100 % παραφίνη (x 3) στους 65 °C και επώζεται για 20 λεπτά ανά εμβάπτιση. Η τελευταία επώση με την παραφίνη πραγματοποιείται στο ειδικό δοχείο για εγκλεισμό του ιστού σε παραφίνη. Οι εγκλεισμένοι ιστοί φυλάσσονται στους 4°C.

14.2 Τομές σε μικροτόμο παραφίνης.

Οι τομές τοποθετούνται σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες, οι οποίες είναι θετικά φορτισμένες με πολυλυσίνη. Αρχικά θερμαίνεται δοχείο που περιέχει αποστειρωμένο νερό του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 40-45 °C. Η τελική θερμοκρασία επιλέγεται ώστε οι τομές παραφίνης να απλώνονται μέσα στο νερό, αλλά να μην ξεκολλάνε από την περιβάλλουσα παραφίνη. Κόβονται 3-10 συνεχόμενες τομές πάχους 5 μm. Οι τομές μεταφέρονται προσεκτικά στο δοχείο με το

νερό, όπου απλώνονται και στη συνέχεια τοποθετούνται, στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Το υπόλοιπο δείγμα φυλάσσεται στους 4 °C μέχρι να ξαναχρησιμοποιηθεί, ενώ οι τομές παραμένουν μέχρι να στεγνώσουν και στη συνέχεια φυλάσσονται σε RT.

14.3 Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των ιστών

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

Μεθοδολογία

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές του ιστού προθερμαίνονται στους 65 °C για 30 λεπτά προκειμένου να λιώσει η παραφίνη. Ακολουθεί αποπαραφινοποίηση των ιστών μέσα σε ένα γυάλινο δοχείο με ξυλόλη όπου και παραμένουν για 30 λεπτά στους 58 °C. Έπειτα οι ιστοί ενυδατώνονται σταδιακά με εμβάπτιση σε μια σειρά από διαδοχικά ελαττούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης, ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση του υδατικού διαλύματος μέσα στους ιστούς. Η πορεία των επώσεων είναι η εξής:

- EtOH 100 % (x 2), RT, 5 min
- EtOH 70 % (x 2), RT, 5 min
- EtOH 50 % (x 2), RT, 5 min
- EtOH 30 % (x 2), RT, 5 min
- PBS 1x , RT, 5 min

14.4 Χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη

Για τη χρώση τομών προϋποτίθεται η αποπαραφινοποίηση των ιστών, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε. Η αιματοξυλίνη βάφει τους πυρήνες ιώδεις, ενώ η εωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα ροζ.

Μεθοδολογία

Οι τομές επωάζονται σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1 λεπτό σε RT, ακολουθούν 3 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, επώαση σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1 λεπτό σε RT και άλλες 3 πλύσεις με νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αντίστροφη πορεία αφυδάτωσης με εμβαπτίσεις σε αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλες και ξυλόλη. Τέλος, οι τομές εγκλείονται με το υλικό DPX, το οποίο διατηρεί την μορφολογία του ιστού και τη ένταση των χρωμάτων.

14.5 Χρώση με Masson's trichrome

Για την ανίχνευση της εναπόθεσης κολλαγόνου σε τομές ιστού, προχωρήσαμε στην ανάλυση ίνωση με χρώση Masson's. Το συγκεκριμένο σύστημα χρώσης με τριχρωμία Masson's που χρησιμοποιήθηκε (Bio-Optica Milano SpA), βάφει τους πυρήνες καφέ, το κυτταρόπλασμα ροζ και το κολλαγόνο σκούρο πράσινο.

15 Ανάλυση επιπέδων νέκρωσης μυοκαρδίου μέσω χρώσης Evans Blue

Η μελέτη εκφυλισμού του καρδιακού ιστού λόγω νέκρωσης πραγματοποιήθηκε με την *in vivo* μεθοδολογία χρώσης με Evans Blue. Η χρωστική αυτή διαχέεται στις περιοχές του μυοκαρδίου όπου το σαρκόλειμμα είναι διαταραγμένο, υποδηλώνοντας νέκρωση των κυττάρων.

Μεθοδολογία

Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια ηλικίας 4ων μηνών, τα οποία ζυγίστηκαν και στα οποία ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με Evans Blue Dye (20 mg/ml σε PBS) σε τελική συγκέντρωση 0.25 mg ανά 10 g σώματος. 24 ώρες μετά οι καρδιές απομονώθηκαν και ακολούθησε εγκλεισμός τους στο υλικό OCT (Becton Dickinson and Company)

και καταψύχθηκαν για τομές κρουτομού. Η χρωστική Evans Blue Dye είναι φθορίζουσα και σήμα διέγερσης στο μήκος κύματος 594 nm. Αφού πραγματοποιήθηκαν κρουτομές (10 μm) αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού

16 Ηλεκτροφορητική Ανάλυση Πρωτεϊνών και ανοσοαποτύωση κατά Western

Μεθοδολογία

16.1 Ομογενοποίηση

Για τη μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης απομονώθηκαν τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Αρχικά οι ιστοί ομογενοποιούνται με μεθόδους λειοτρίβησης σε υγρό άζωτο. Ο κονιορτοποιημένος ιστός μεταφέρονται σε ομογενοποιητή Potter-Elvehjem (τεφλόν-γυαλί) και ομογενοποιούνται με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος στους 4 °C. Στη συνέχεια ακολουθεί εφαρμογή υπερήχων (3 x 5') και φυγοκέντρωση στους 4°C, για 30 λεπτά, στα 10.000 g. Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών στο υπερκείμενο, με τη μέθοδο Bradford.

16.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, με κλασσικές βιοχημικές μεθόδους (δεν αναλύονται λεπτομερώς στην παρούσα διατριβή). Κυρίως χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου συγκεντρώσεων 10-15 % στις μελέτες μας. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιήθηκε NNN'-N'-τετραμεθυλοδιαμίνη (TEMED). Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το ιοντικό απορρυπαντικό θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) και η διθειοθρεϊτόλη (DTT). Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά. Τελικά, τα πολυπεπίδια τα οποία αναλύονται στην SDS-PAGE, έχουν αποκτήσει καθαρό αρνητικό φορτίο και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

16.3 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε ειδικές μεμβράνες, προκειμένου να γίνει ανίχνευση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πολυπεπτιδίων στη μεμβράνη (συνήθως τύπου PVDF). Η μεμβράνη επώαζεται με διάλυμα δέσμησης των κενών επιτόπων της μεμβράνης (blocking), σε 5 % γάλα διαλυμένο σε PBS-Tween-20 0,05 % για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση με το πρώτο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, για ολόκληρη νύχτα στους 4 °C (ή εναλλακτικά για 3 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T . Οι πλύσεις είναι σημαντικές καθ'όλη τη μεθοδολογία για την επιτυχή ανοσοαποτύπωση. Τέλος πραγματοποιείται επώαση με δεύτερο αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής του πρώτου αντισώματος. Στο δεύτερο αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη η υπεροξειδάση, ένα ένζυμο με τη δράση του οποίου επιτυγχάνεται χημειοφωταύγεια. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν κυρίως συστήματα χημειοφωταύγειας των εταιριών Amersham και Pierce σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών τους.

Διαλύματα

Διάλυμα Ομογενοποίησης: 10 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% Triton X-100, 1% SDS, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, Διάλυμα αναστολέων πρωτεϊνολυτικών (Sigma P8340).

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (5X, Running Buffer): 15,1 g Tris base, 94 g Γλυκίνη, 5 g SDS, ddH₂O μέχρι 1 lt

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer): 7 μέρη d-H₂O : 2 μέρη μεθανόλη : 1 μέρος Western buffer 10X.

Western buffer 10X: 29 gr γλυκίνη, 58 gr Tris, 3,7 gr SDS, dH₂O μέχρι 1 l.

Διάλυμα PBS 10 x (για 1 lt) : 1.4 M NaCl , 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM K₂HPO₄, d H₂O έως 1 L. Ρύθμιση pH στο 7,4 με HCl.

Λίστα αντισωμάτων

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

Από εταιρεία “Santa Cruz Biotechnology Inc”:

- anti-Desmin (Y-20, cat.# sc-7559)
- anti-Keratin 18 (N-16, cat.# sc-31700)

Από εταιρεία “Progen Biotechnik”:

- anti-Keratin 8 (cat.#65130)
- anti-Keratin 18 (cat.# 61028 and GP-CK18)

Από εταιρεία “DSHB, Developmental StudiesHybridoma Bank, University of Iowa”:

- anti-Keratin 8 (Troma-I)

Από εταιρεία “Ambion, Invitrogen”:

- anti-GAPDH (AM4300)

17 Ανοσοφθορισμός

Για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης και το χαρακτηρισμό συγκεκριμένης τοπολογίας πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν στρατηγικές ανοσοφθορισμού. Με μεθόδους ανοσοφθορισμού για παραπάνω από μία πρωτεΐνη ταυτόχρονα επιτυγχάνεται ο χαρακτηρισμός του προτύπου εντόπισης πρωτεϊνών και ο ενδεχόμενος συνεντοπισμός τους.

17.1 Έγκλειση ιστών και κρυτομέζ

Μεθοδολογία

Κατά το χειρουργείο εξαγωγής του μυοκαρδίου των ποντικών, οι καρδιές υποβλήθηκαν σε διοχέτευση διαλύματος PBS για την απομάκρυνση του μεγάλου ποσοστού κυττάρων του αίματος. Ακολουθείται η μέθοδος εγκλεισμού στο ειδικό υλικό “OCT” (Becton Dickinson and Company), το οποίο διατηρεί τις δομές του ιστού και δεν αλλοιώνει τις αντιγονικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Οι ιστοί αφαιρούνται, εκπλένονται με παγωμένο PBS και τοποθετούνται σε ειδικές μήτρες με τον κατάλληλο προσανατολισμό.

Ακολουθεί κάλυψη του ιστού με το OCT που έχει την ιδιότητα να βρίσκεται σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία δωματίου αλλά στερεοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ο ιστός στο OCT στερεοποιείται σε ατμούς υγρού αζώτου (N_2). Οι παγωμένοι, μη μονιμοποιημένοι ιστοί μπορούν έτσι να αποθηκευτούν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο ιστός στο καλούπι OCT παρουσιάζει αυξημένες ιδιότητες σκληρότητας για την πραγματοποίηση σε ειδικό κρυοτόμο με σταθερή θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Οι τομές είναι συνήθως πάχους 10-15 μm και τοποθετούνται σε ειδικές θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες πολυλυσίνης.

17.2 Επώαση των τομών με πρώτα αντισώματα

Μεθοδολογία

Το πρώτο βήμα είναι η μονιμοποίηση των τομών του ιστού. Η μονιμοποίηση γίνεται μέσω εμποτισμού τους σε διάλυμα 100 % παγωμένης ακετόνης (ή 70 % μεθανόλης / 30 % αιθανόλης) για 20 λεπτά στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μετά από 3 πλυσίματα σε PBS, για 5 λεπτά σε RT, ακολουθεί εμποτισμός των τομών σε 5 % αλβουμίνη από ορό βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) ώστε να δεσμευτούν από την οαλβουμίνη οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων (blocking).

Οι τομές επωάζονται με διάλυμα πρώτων αντισωμάτων (βλέπε λίστα πρώτων αντισωμάτων παρακάτω) σε συγκεκριμένες αραιώσεις. Τα αντισώματα προστίθενται σε 2.5% BSA σε PBS+0.05% Tween-20. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 4⁰C για 16-18 ώρες, υπό ανάδευση, ή 3-4 ώρες σε RT.

Στη συνέχεια, ο ιστός ξεπλένεται με PBS-0.01% Tween-20 (3 x 5') και ακολουθεί επώαση με το ανάλογο δευτερογενές αντίσωμα (έναντι της Fc περιοχής του πρώτου) το οποίο είναι συνδεδεμένο με κατάλληλη φθορίζουσα ουσία. Κυρίως χρησιμοποιήθηκαν δεύτερα αντισώματα (Alexafluor-488, -555, -568, -594 and -647) (Molecular Probes, Life Technologies Corporation) σε αραιώση 1:1500 σε διάλυμα BSA 2,5% σε PBS-Tween-20 0.05% για 1 ώρα σε RT.

Ο ιστός ξεπλένεται με PBS- Tween-20, 0.01% (3 x 5') και μία πλύση με PBS (1 x 5'). Ακολουθεί χρώση με DAPI ή Hoechst 33382 (1:1000) για να σημειθούν οι πυρήνες (3 λεπτά σε RT) και πλύσεις με PBS (3 x 5'). Οι τομές επικαλύπτονται με ειδικό υλικό (mounting medium, Dako, Agilent), το οποίο διατηρεί την ένταση του φθορισμού σε υψηλά επίπεδα και για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τέλος, πραγματοποιείται παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα φίλτρα.

Λίστα αντισωμάτων

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

Από εταιρεία “Santa Cruz Biotechnology Inc”:

- anti-Desmin (Y-20, cat.# sc-7559)
- anti-Dystrophin (H300, cat.# sc-15376)
- anti-Keratin 18 (N-16, cat.# sc-31700)

Από εταιρεία “Progen Biotechnik”:

- anti-Desmoplakin (cat.# 65146)

- anti-Plakoglobin (cat.# 65105)
- anti-Desmoglein 2 (Dsg2) (cat.#61002)
- anti-Vimentin (cat.# 65113)
- anti-Desmin (cat.# 10519)
- anti-Keratin 8 (cat.#65130)
- anti-Keratin 18 (cat.# 61028 and GP-CK18)

Από εταιρεία “BD Transduction Laboratories, Becton Dickinson and Company”:

- anti-β- Catenin (cat.# 610154)
- anti-N-Cadherin (cat.# 610921)

Από εταιρεία “Cell Signaling Technology”:

- anti-β-Catenin (cat.# 9562)

Από εταιρεία “Sigma-Aldrich Co LLC”:

- anti-α-Actinin (Actn2) (cat.# A2543 and cat.# A7811)

Από εταιρεία “Zymed, Invitrogen”:

- anti-Connexin 43 (cat.# 71-0700)

Από εταιρεία “ Cell Signaling ”:

- anti-Desmin (cat.# 4024)

Από εταιρεία “DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa”:

- anti-Keratin 8 (Troma-I)

17.3 Ανάλυση συνεστιακής μικροσκοπίας

Η ανάλυση και εξαγωγή εικόνων από τις μελέτες ανοσοφθορισμού, πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, στο μοντέλο TCS SP5 (Leica TCS SP Confocal Laser Scanning Microscope). Η επεξεργασία των ρυθμίσεων πραγματοποιήθηκε με το εξειδικευμένο πρόγραμμα τρισδιάστατης ανάλυσης εικόνας (Leica LAS-AF, Leica) με το οποίο είναι εξοπλισμένο το μικροσκόπιο. Στην ίδια πλατφόρμα ή στην πλατφόρμα Image J, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση και επεξεργασία των διαδοχικών συνεστιακών εικόνων που λαμβάνονται στην περιοχή του ιστού που ενδιαφέρει.

Οι φωτογραφίες ελήφθησαν σε θερμοκρασία 23–24 °C Για να αποφευχθεί η επικάλυψη της εικόνας του φθορισμού που προέρχεται από διαφορετικά μήκη κύματος στην περίπτωση του διπλού ανοσοφθορισμού, οι εικόνες για την κάθε χρώση προκύπτουν από την σάρωση κάθε φθορίζουσας ουσίας χωριστά, ενώ ο συνδυασμός των χρώσεων γίνεται ηλεκτρονικά. Το λογισμικό Leica LAS-AF παρείχε επιπλέον τη δυνατότητα λήψης εικόνων με ταυτόχρονη απεικόνιση της τρίτης διάστασής των τομών, με σκοπό την απεικόνιση κατά τον κατακόρυφο άξονα.

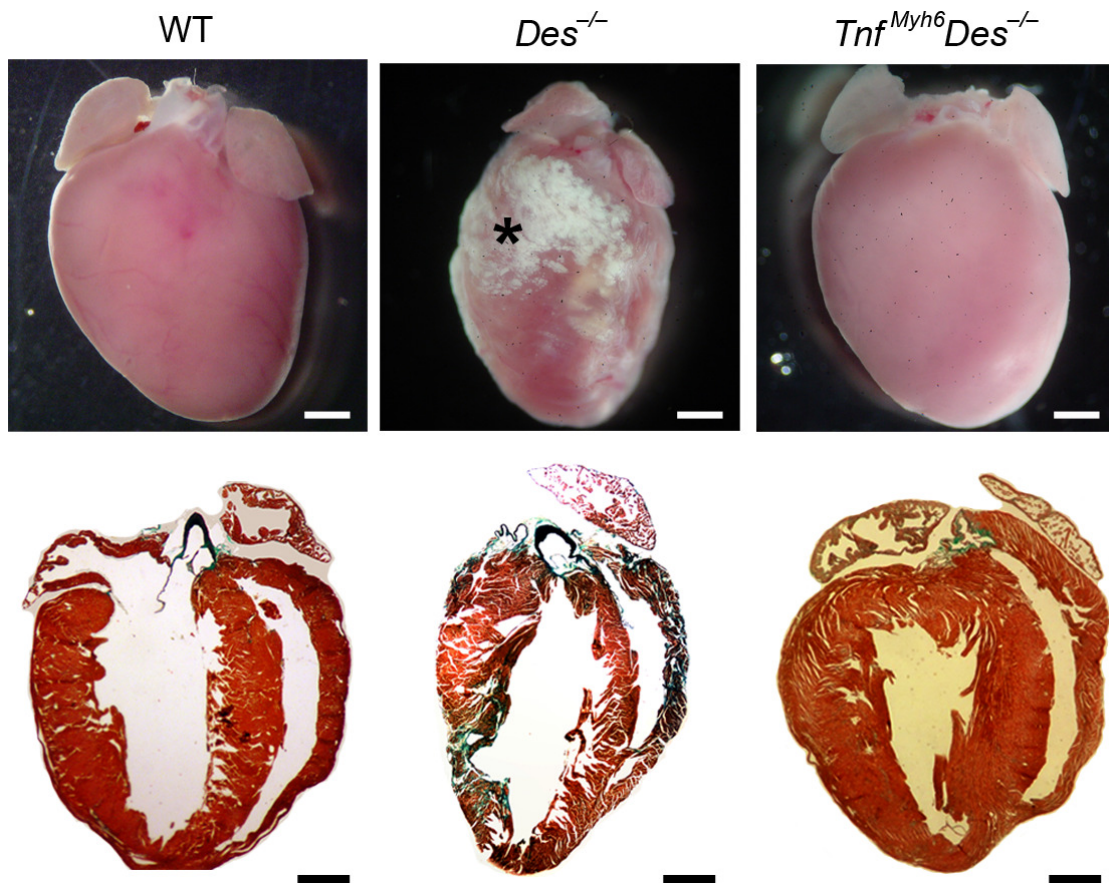
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1 Η καρδιο-ειδική υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α οδηγεί σε βελτίωση του παθολογικού φαινοτύπου του μοντέλου έλλειψης δεσμίνης.

1.1 Η εναπόθεση ασβεστίου και οι εκτεταμένες περιοχές ίνωσης του $Des^{-/-}$ μοντέλου εξαλείφονται έπειτα από υπερέκφραση του TNF-α.

Μορφολογική ανάλυση του μυοκαρδίου των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών (διασταύρωση των μοντέλων MHCsTNFα και $Des^{-/-}$) δείχνει την εξάλειψη της εναπόθεσης ασβεστίου σε εκτεταμένες περιοχές των κοιλιών (Εικόνα 13), χαρακτηριστικό της παθολογίας στο μοντέλο $Des^{-/-}$ (Milner, Weitzer et al. 1996). Η συνολική καρδιακή μορφολογία ομοιάζει με αυτήν των WT ποντικών, με τη διαφορά εμφάνισης σχετικής τάσης για υπερτροφία και αύξησης μεγέθους των κόλπων.

Ιστολογική ανάλυση με χρώση Ηωσίνης/Αιματοξυλίνης δείχνει τη σημαντική βελτίωση στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ συγκριτικά με το $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο (Εικόνα 13), στο επίπεδο της λέπτυνσης των τοιχωμάτων, της διάτασης και του εκφυλισμού του ιστού. Ελαφρά εικόνα υπερτροφίας του $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκαρδίου είναι η μοναδική παρατήρηση σε σχέση με την ιστολογία του αγρίου τύπου (WT) μυοκαρδίου.



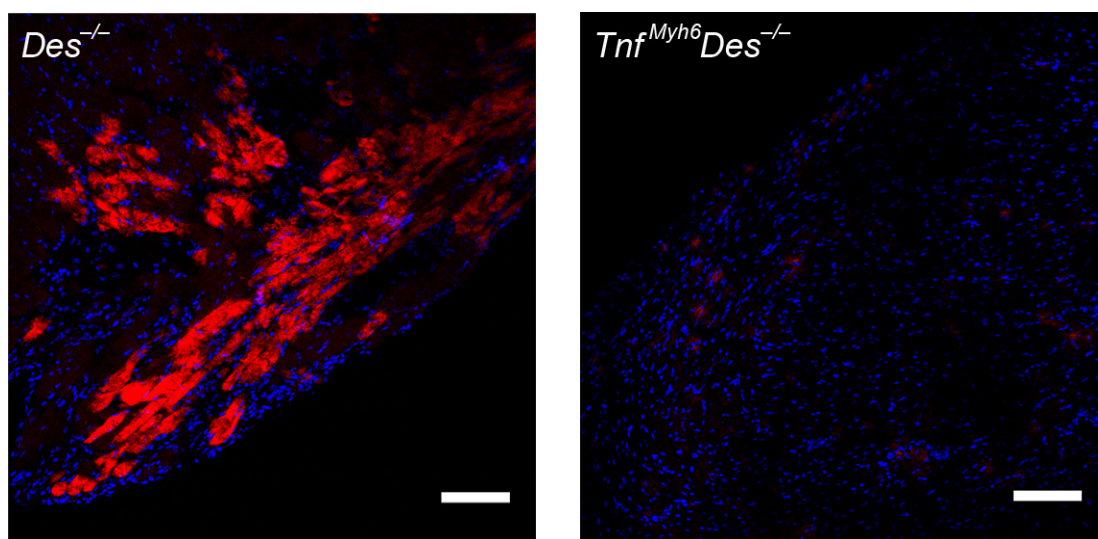
Εικόνα 13. Μορφολογική και ιστολογική ανάλυση του μυοκαρδίου των WT, *Des*^{-/-} και *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-} ποντικών. Η εναπόθεση ασβεστίου στην καρδιά του *Des*^{-/-} ποντικού επισημαίνεται με αστερίσκο. Μπάρες κλίμακας: 1 mm.

Ανάλυση της καρδιακής εναπόθεσης κολλαγόνου με ιστολογική χρώση Masson's των WT, *Des*^{-/-} και *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-} μοντέλων, καταδεικνύει την εξάλειψη της καρδιακής «ίνωσης αναπλήρωσης» (replacement fibrosis) στο *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-} μυοκάρδιο. Το *Des*^{-/-} μυοκάρδιο χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες περιοχές ίνωσης αναπλήρωσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13, χαρακτηριστικό του μεγέθους του εκφυλισμού του ιστού (Milner, Weitzer et al. 1996). Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση διακρίνεται «διάμεση ίνωση» (interstitial fibrosis) στο *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-} μυοκάρδιο, επίσης χαρακτηριστικό του MHCsTNFa μοντέλου.

1.2 Ο εκφυλισμός του μυοκαρδίου και η κυτταρική νέκρωση από την ενεργοποίηση φλεγμονοδών κυττάρων στο $Des^{-/-}$ μοντέλο ελαττώνεται σημαντικά στο μοντέλο υπερέκφρασης TNF- α .

Σε συνέχεια της παρατήρησης της εξάειψης της εκτεταμένης καρδιακής ίνωσης στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε σύγκριση με το $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, περαιτέρω μελέτες αποδεικνύουν τη σημαντική ελάττωση του εκφυλισμού του καρδιακού ιστού ως απόκριση της υπερέκφρασης του παράγοντα TNF- α .

Ανάλυση της νέκρωσης των καρδιακών κυττάρων με τη μέθοδο χρώσης Evans Blue και μετέπειτα μελέτη μικροσκοπίας φθορισμού, δείχνει τις εκτεταμένες περιοχές κυτταρικού θανάτου στο $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο (Εικόνα 14). Αντίθετα, σε τομές του $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκαρδίου παρατηρείται σημαντική μείωση των περιοχών νέκρωσης, αποδεικνύοντας τη βελτίωση των ποσοστών κυτταρικού θανάτου μέσω νέκρωσης λόγω της έλλειψης της δεσμίνης, έπειτα από υπερέκφραση του TNF- α .

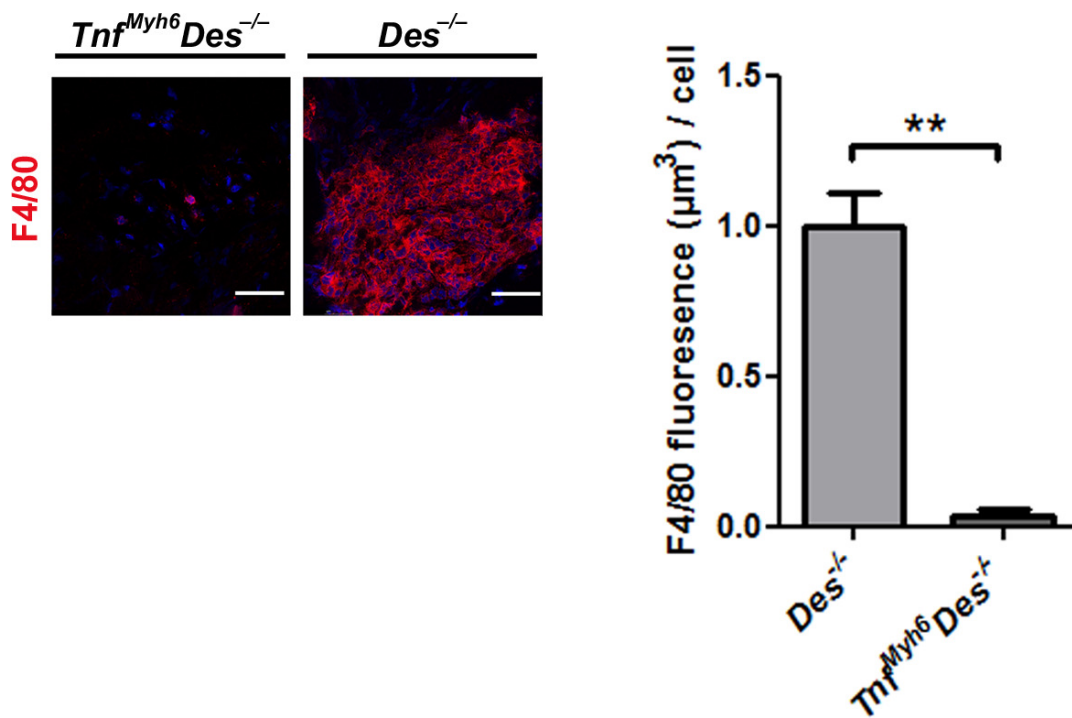


Εικόνα 14. Ο εκφυλισμός των κυττάρων του μυοκαρδίου του $Des^{-/-}$ μειώνεται σημαντικά έπειτα από καρδιο-ειδική υπερέκφραση TNF- α . Ανάλυση νέκρωσης μέσω χρώσης Evans Blue σε κρυοτομές μυοκαρδίου $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$ ποντικών ηλικίας 4^{ov} μηνών. Μπάρες κλίμακας: 100 μ m.

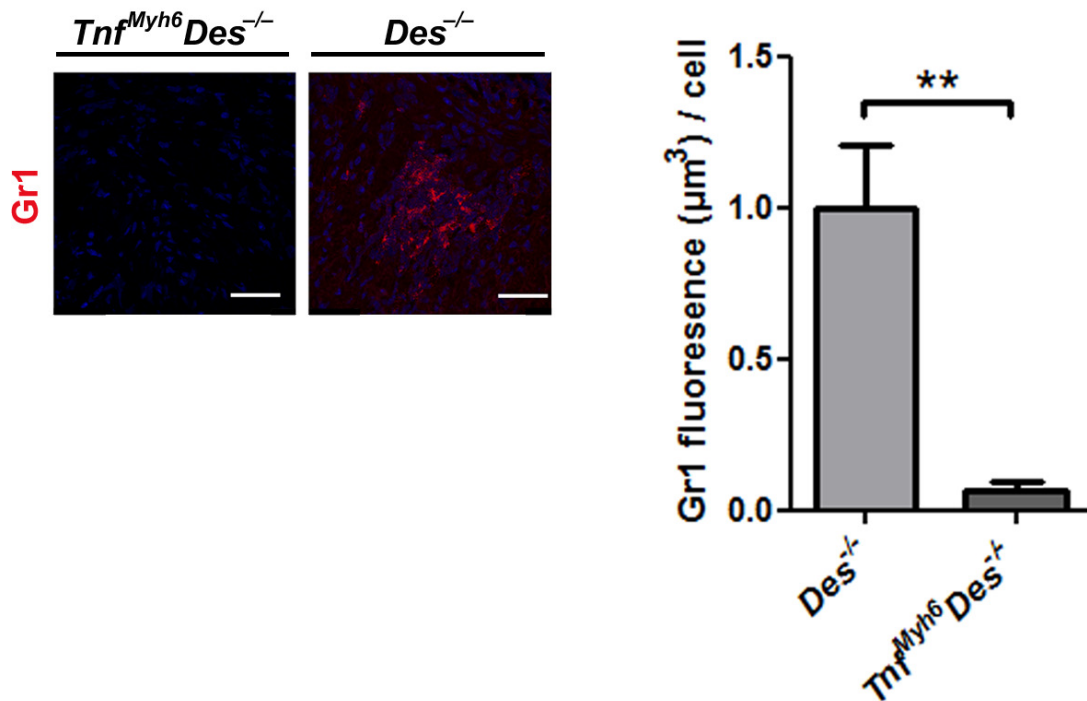
Κεντρικό χαρακτηριστικό της καρδιακής παθολογίας που προκαλείται λόγω της έλλειψης του δικτύου της δεσμίνης είναι η ανοσολογική απόκριση που οδηγεί στον κυτταρικό εκφύλιση (Psarras, Mavroidis et al. 2010). Σε συνέπεια των παραπάνω

αποτελεσμάτων που δείχνουν μείωση του εκφυλισμού του μυοκαρδίου στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο σε σχέση με το $Des^{-/-}$, αποδείχτηκε επιπλέον σημαντική μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης, με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού για βασικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που ενεργοποιούνται κατά την ανοσολογική απόκριση (Εικόνα 15). Συγκεκριμένα, με χρώση ανοσοφθορισμού για τα μακροφάγα (Gr1) και τα ουδετερόφιλα (F4/80), πληθυσμοί οι οποίοι έχει βρεθεί να εμπλέκονται στην απόκριση ανοσολογικής αντίδρασης και τον καρδιακό εκφυλισμό στο μοντέλο $Des^{-/-}$ (Psarras, Mavroidis et al. 2010), εμφανίζονται να μειώνονται σημαντικά (όπως παρουσιάζεται και στα γραφήματα ποσοτικοποίησης των περιοχών φθορισμού της Εικόνας 15) σχεδόν ολοκληρωτικά στο μυοκάρδιο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών ηλικίας 21^{ος} ημερών.

α



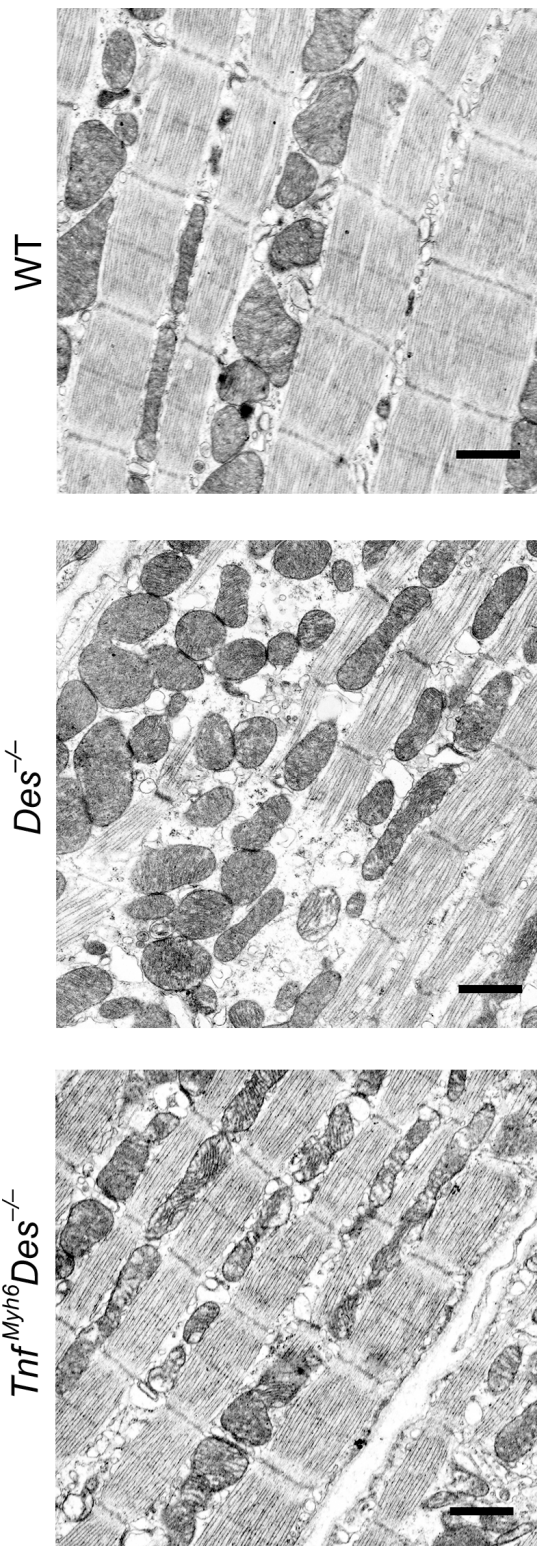
β



Εικόνα 15. Η επαγωγή ανοσολογικής αντίδρασης λόγω της έλλειψης της δεσμίνης απουσιάζει στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο. Ανοσοφθορισμός για (α) μακροφάγα (F4/80) και (β) ουδετερόφιλά (Gr1) σε τομές καρδιακού ιστού ποντικών ηλικίας 21 ημερών. Στα γραφήματα παρουσιάζεται αυτοματοποιημένη ογκομετρική ποσοτικοποίηση του φθορισμού μέσω της πλατφόρμας Imaris (Bitplane) των σειρών φωτογραφιών συνεστιακής μικροσκοπίας, ως προς τον αριθμό των κυττάρων (μέτρηση DAPI-θετικών περιοχών μέσω της ίδιας πλατφόρμας). Μπάρες κλίμακας: 50 μm . Two-sided P-values: $** < 0.01$ (unpaired t-test).

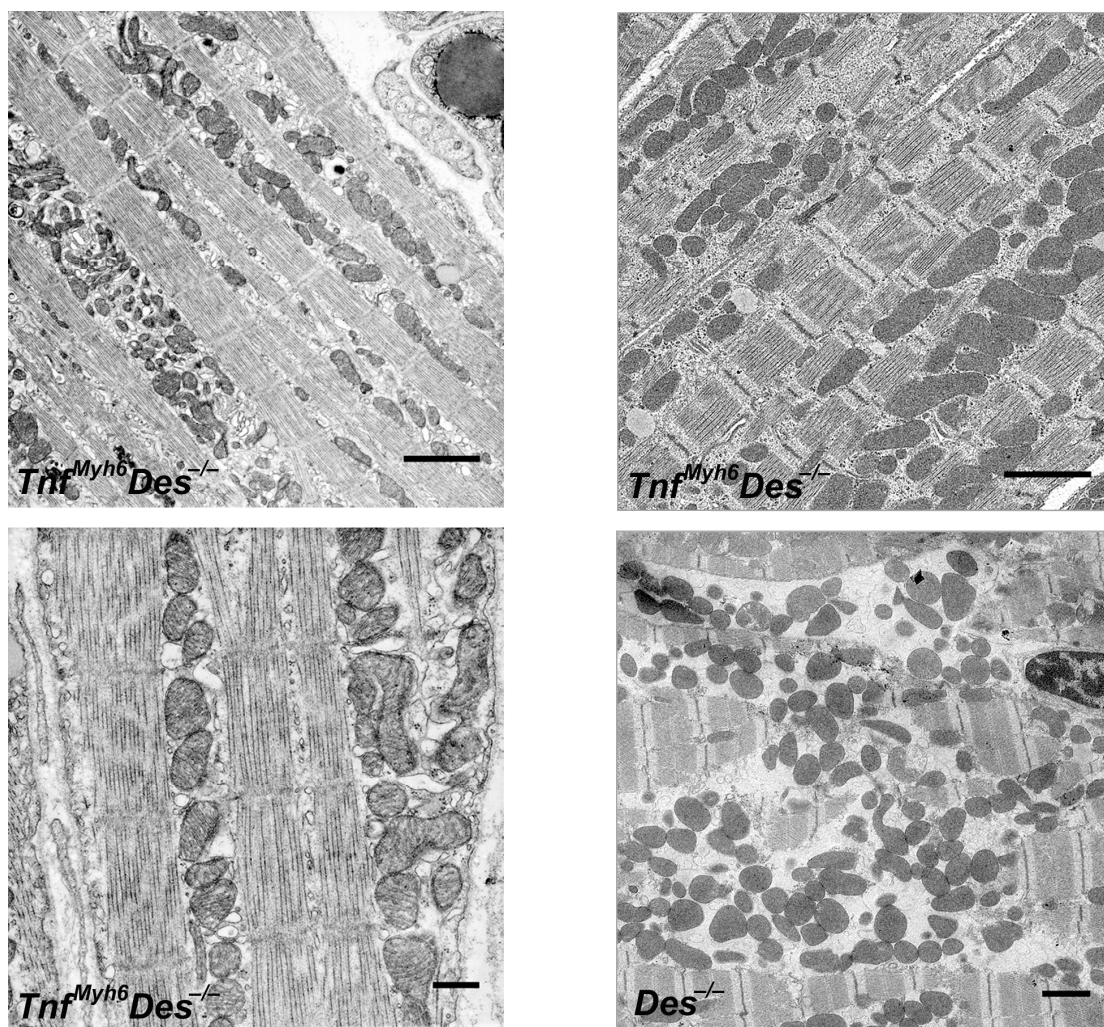
1.3 Τα χαρακτηριστικά της υπερδομής των $Des^{-/-}$ καρδιοκυττάρων παρουσιάζουν βελτίωση έπειτα από υπερέκφραση του παράγοντα TNF- α

Αναλύθηκε η υπερδομή των καρδιοκυττάρων των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Οι σημαντικές ανωμαλίες της δομής των μυοϊνιδίων, των πυρήνων, των εμβόλιμων δίσκων αλλά κυρίως των μιτοχονδρίων του $Des^{-/-}$ μυοκαρδίου, όπως αυτά περιγράφονται στη βιβλιογραφία (βλέπε κεφάλαιο «Εισαγωγή»), βελτιώνονται σε σημαντικά στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο (Εικόνες 16 και 17).



Εικόνα 16. Οι δομικές ανωμαλίες των μυοϊνιδίων και των μιτοχονδρίων των *Des^{-/-}* καρδιοκυττάρων απουσιάζουν σε μεγάλο βαθμό από τα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* καρδιοκύτταρα. Ηλεκτρονική μικροσκοπία καρδιακών τομών WT, *Des^{-/-}* και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Οι εκτεταμένες περιοχές με ανωμαλίες στην οργάνωση και μορφολογία των μιτοχονδρίων και των μυοϊνιδίων παρουσιάζονται στο *Des^{-/-}* μυοκάρδιο. Μπάρες κλίμακας: 1 μm.

Οι ασυνέχειες των μυοϊνιδίων, η συσσωμάτωση και ο αυξημένος αριθμός κατά περιοχές των μιτοχονδρίων, χαρακτηριστικά του $Des^{-/-}$, δεν είναι εμφανή στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο. Διαταραχές στη μορφολογία, εκτός της οργάνωσης, των μιτοχονδρίων, όπως ανωμαλίες της μιτοχονδριακής μήτρας και των εσωτερικών πτυχωσέων, παρουσιάζονται επίσης μειωμένες στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε σύγκριση με τα $Des^{-/-}$ καρδιοκύτταρα. Ωστόσο, είναι πιθανό να παρατηρούνται σχετικές διαταραχές στην οργάνωση και μορφολογία των υπερδομών των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκυττάρων σε σχέση με τα WT, αλλά σε σημαντικά μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τα $Des^{-/-}$ καρδιοκύτταρα (Εικόνες 16 και 17).



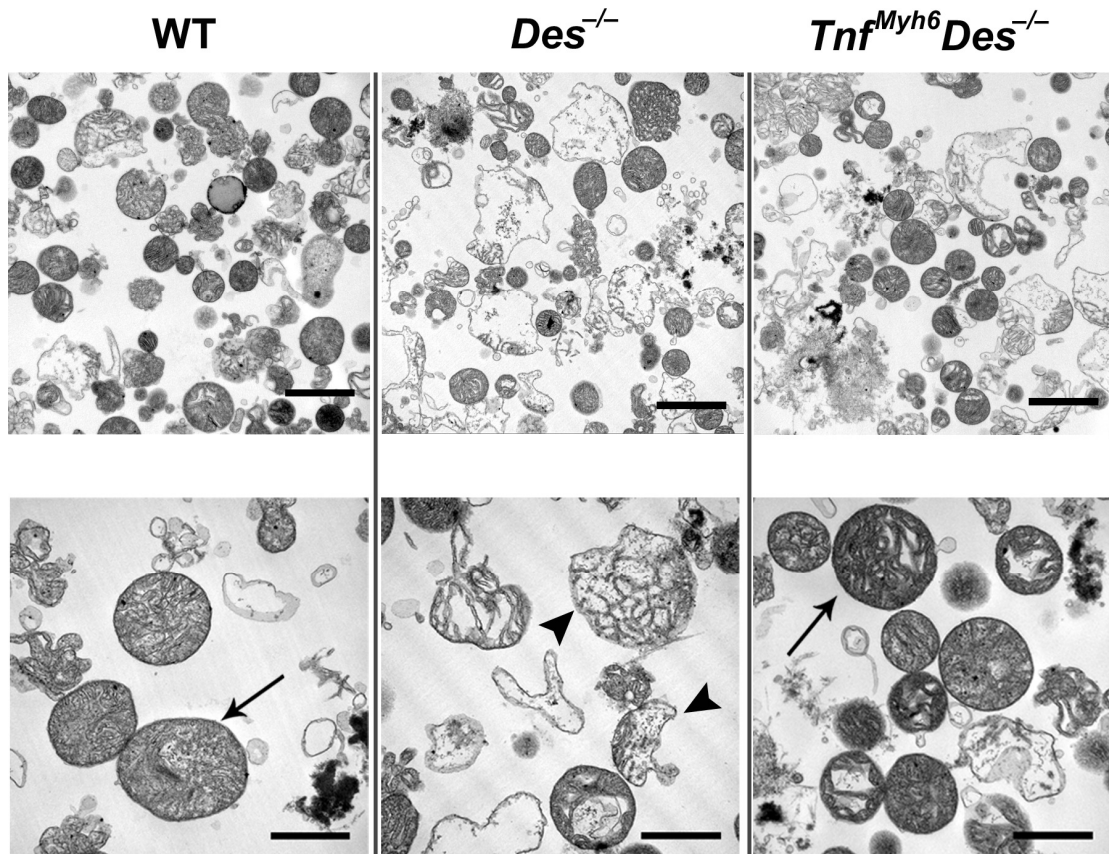
Εικόνα 17. Τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκύτταρα παρουσιάζουν βελτιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με αυτά των $Des^{-/-}$ καρδιοκυττάρων.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία καρδιακών τομών WT, $Des^{-/-}$ και $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Μπάρες κλίμακας: 2 μm .

1.4 Οι λειτουργικές ιδιότητες των καρδιακών μιτοχονδρίων είναι βελτιωμένες στο $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο έπειτα από υπερέκφραση του TNF- α

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η οργάνωση και η μορφολογία των μιτοχονδρίων που παρουσιάζουν ανωμαλίες στα $Des^{-/-}$ καρδιοκύτταρα, είναι σε μεγάλο βαθμό βελτιωμένα στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκύτταρα. Σε συνέχεια των ευρημάτων αυτών, προχωρήσαμε στη μελέτη λειτουργικών χαρακτηριστικών των καρδιακών μιτοχονδρίων των ζωικών μοντέλων μας.

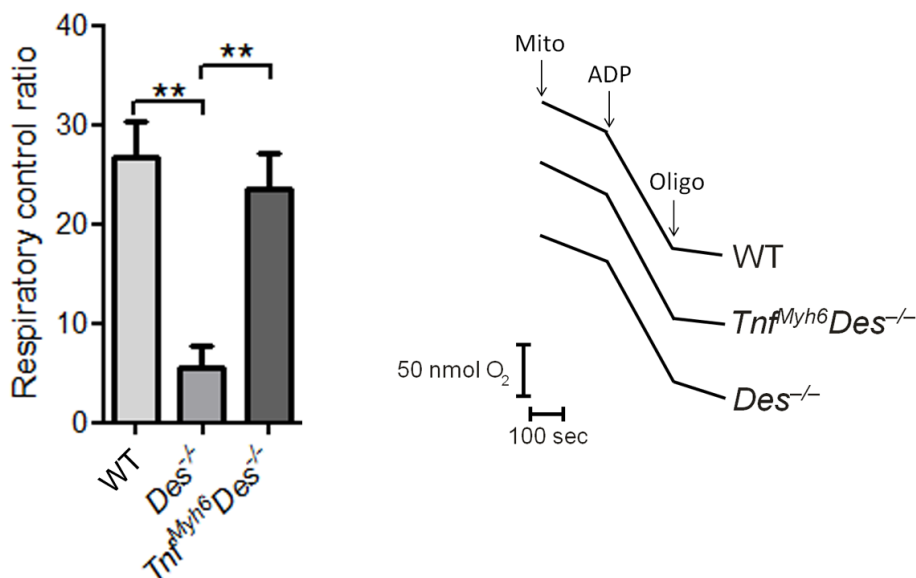
Συγκεκριμένα, αρχικά μελετήσαμε σε βάθος τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των καρδιακών μιτοχονδρίων των μοντέλων μας, με συνδυασμό απομόνωσης ανέπαφων καρδιακών μιτοχονδρίων και ηλεκτρονική μικροσκοπία (Εικόνα 18). Τα απομονωμένα μιτοχόνδρια των WT καρδιών παρουσιάζονται με φυσιολογική μορφολογία και ηλεκτρονικά συμπαγείς δομές (μιτοχόνδρια «Κλάσης-I», σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά (Scorrano, Ashiya et al. 2002), βέλη στην Εικόνα 18), ενώ τα μιτοχόνδρια από τις $Des^{-/-}$ καρδιές εμφανίζονται ακανόνιστου σχήματος, με εμφανώς διατταραγμένη μιτοχονδριακή μήτρα και σε πολλές περιπτώσεις με μερικώς ή ολικώς διαρρηγμένη μεμβράνη (μιτοχόνδρια «Κλάσης-III» ή «Κλάσης-IV», σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά (Scorrano, Ashiya et al. 2002), κεφαλές βελών στην Εικόνα 18) σε συμφωνία με τα αποτελέσματα ατης προηγούμενης παραγράφου, όπου μελετήθηκαν τομές του μυοκαρδίου. Αντίθετα τα μιτοχόνδρια από καρδιές $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών είναι εμφανώς βελτιωμένα σε σύγκριση με τα $Des^{-/-}$ και ομοιάζουν περισσότερο στα WT μιτοχόνδρια.



Εικόνα 18. Μορφολογική ανάλυση απομονωμένων καρδιακών μιτοχονδρίων. Μελέτες απομονωμένων καρδιακών μιτοχονδρίων από WT, *Des*^{-/-} και *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-} ποντίκια ηλικίας 3ών μηνών, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τα μιτοχόνδρια των *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-} καρδιών παρουσιάζουν βελτιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με αυτά των *Des*^{-/-}. Μπάρες κλίμακας: 2 μm (πάνω σειρά), 1 μm (κάτω σειρά).

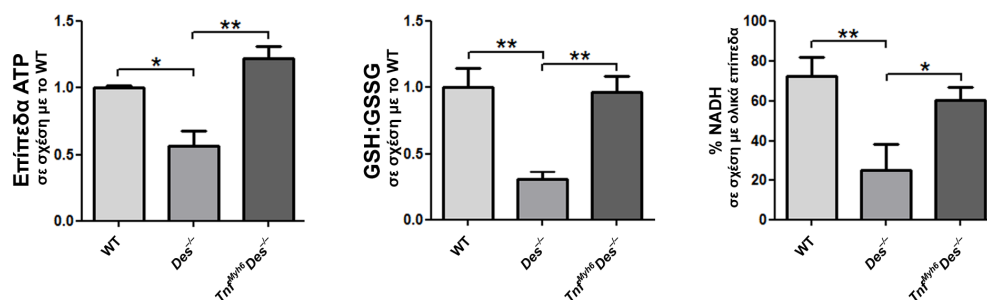
Κυρίως όμως εστίασαμε τις μελέτες μας στις ιδιότητες της αναπνευστικής αλυσίδας των καρδιακών μιτοχονδρίων που αποτελεί κυρίαρχη λειτουργία και αντιπροσωπεύει σε μεγάλο βαθμό τη γενικότερη εικόνα των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους. Μετρήσαμε την κατανάλωση οξυγόνου από απομονωμένα καρδιακά μιτοχόνδρια με τη μέθοδο της οξυγραφίας χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο τύπου «Clark» και αναλύσαμε τις ιδιότητες των βασικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι ιδιότητες της αναπνευστικής αλυσίδας των *Des*^{-/-} μιτοχονδρίων παρουσιάζονται σημαντικά διαταραγμένες σε σχέση με τις ιδιότητες των WT μιτοχονδρίων (Εικόνα 19), όπως δείχνουν οι μετρήσεις του λόγου “State-III/State-IV” (Respiratory Control Ratio, RCR), ο οποίος περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 19. Αντίθετα, τα *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-} μιτοχόνδρια εμφανίζουν σημαντική βελτίωση στο λόγο RCR, κοντά στα

επίπεδα των WT μιτοχονδρίων, παρουσιάζοντας φυσιολογικά λειτουργικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 19. Μελέτη ιδιοτήτων αναπνευστικής αλυσίδας μέσω μετρήσεων ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου. Μετρήσεις του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου με χρήση ηλεκτροδίου τύπου «Clark» σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στο γράφημα μέτρησης ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου (δεξιά), σε διάλυμα που περιέχει 5mM Γλουταμινικό οξύ - 5mM Μηλικό οξύ, προστέθηκαν 150 μg απομονωμένων μιτοχονδρίων (βέλος, “Mito”) και έπειτα από 3 min προστέθηκαν 400 μM ADP (“State-III”). Έπειτα από 3 min προστέθηκε 1 μM ολιγομυκίνης (βέλος, “Oligo”) (“State-IV”). Ο λόγος “State-III/State-IV” αναλύθηκε και παρουσιάζεται στο γράφημα (αριστερά).

Επιπλέον, μελετήθηκαν οι ιδιότητες των οξειδοαναγωγικών διεργασιών και τα επίπεδα του ATP των καρδιακών μιτοχονδρίων των μοντέλων μας, παρέχοντας επιπλέον πληροφορίες για το λειτουργικό προφίλ οξειδοαναγωγικής ικανότητάς τους (Εικόνα 20). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μορφολογικής ανάλυσης και της οξυγραφίας, τα απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιές *Des*^{-/-} εμφανίζουν διαταραχές στα επίπεδα του ATP και της αναγωγικής ικανότητας, όπως μετρήθηκε από τα επίπεδα των ανηγμένων σε σχέση με τις οξειδωμένες μορφές της γλουταθειόνης (GSH) και των νουκλεοτιδίων πυριδίνης (NADH) (Εικόνα 20).



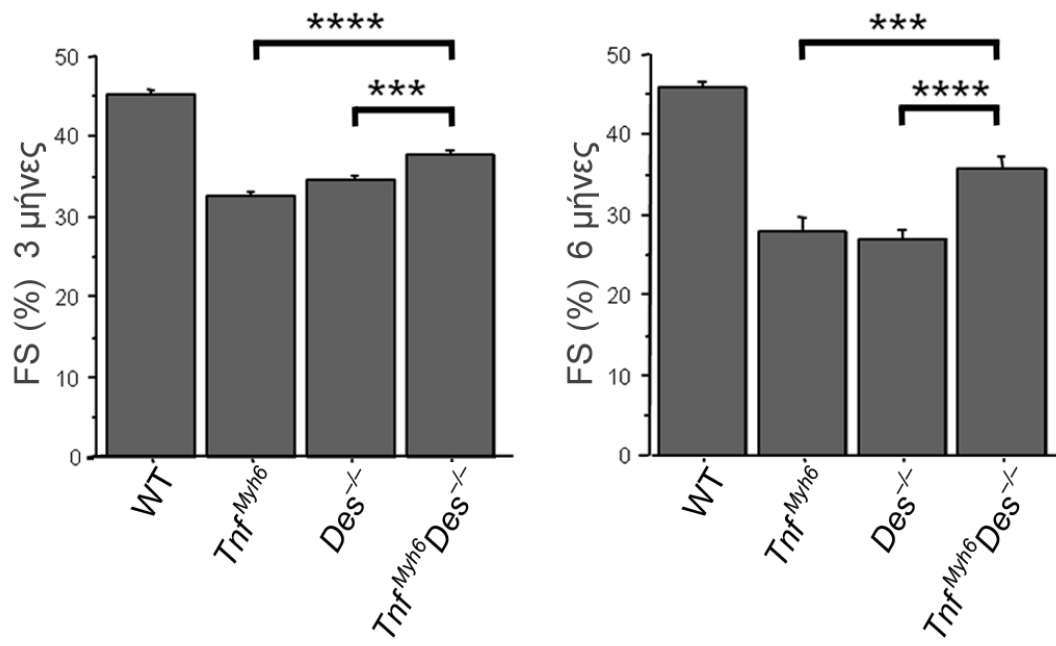
Εικόνα 20. Μελέτη επιπέδων ATP και οξειδωαναγωγικών ιδιοτήτων καρδιακών μιτοχονδρίων. Βιοχημική ανάλυση των επιπέδων ATP και οξειδωαναγωγικών ιδιοτήτων σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των επιπέδων του ATP (αριστερά), του λόγου της ανηγμένης (GSH) προς την οξειδωμένη (GSSG) μορφή της γλουταθειόνης (μέση) και του ποσοστού της ανηγμένης μορφής των νουκλεοτιδίων πυριδίνης (NADH) ως προς τα συνολικά τους επίπεδα (δεξιά). Two-sided P-values: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 (one way ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test).

1.5 Η υπερέκφραση του TNF- α επιφέρει σημαντική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας στο *Des*^{-/-} μυοκάρδιο

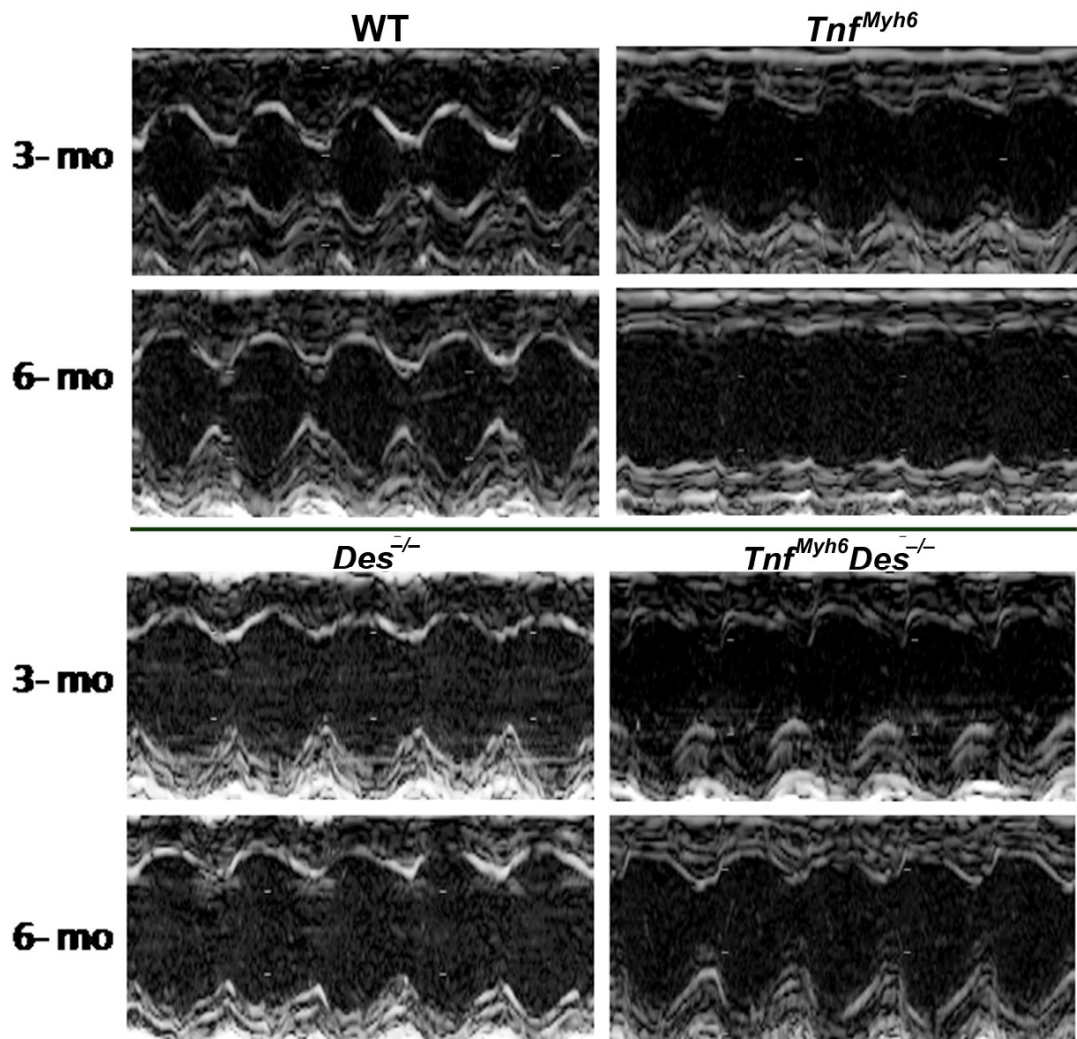
Μέσω υπερηχογραφίας (M-Mode 2D-Directed echocardiography) μετρήθηκαν παράμετροι καρδιακής λειτουργίας των μοντέλων WT, *Des*^{-/-}, MHCsTNFa (αποκαλούμενα και ως “*Tnf^{Myh6}*”) και *Tnf^{Myh6}Des*^{-/-} σε ηλικία 3 και 6 μηνών.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης καταδεικνύουν τη στατιστικά σημαντική βελτίωση του ποσοστού συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (Fractional Shortening, FS %) του *Tnf^{Myh6}Des*^{-/-} μυοκαρδίου σε σύγκριση με το *Des*^{-/-} και στις δύο ηλικιακές ομάδες που μελετήθηκαν (3 και 6 μηνών ποντίκια). Στον Συμπληρωματικό Πίνακα 1 παρουσιάζεται αναλυτικά η μελέτη ηχοκαρδιογραφίας, με όλες τις παραμέτρους που μετρήθηκαν και τον αριθμό των πειραματικών δειγμάτων.

α



β



Εικόνα 21. Η καρδιακή λειτουργία των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών είναι σημαντικά βελτιωμένη σε σύγκριση με τα MHCsTNFα και $Des^{-/-}$. (α) Ποσοστό συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (Fractional Shortening, FS %) ποντικών ηλικίας 3ών κι 6 μηνών μέσω ανάλυσης ηχοκαρδιογραφίας. Two-sided P-value: **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001 (oneway ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test). (β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ηχοκαρδιογραφημάτων μέσω ανάλυσης υπερηχογραφίας (M-Mode 2D-Directed).

1.6 Η διάταση και η λέπτυνση των τοιχωμάτων του μυοκαρδίου βελτιώνονται στο $Tnf-\alpha Des^{-/-}$ σε σύγκριση με το $Des^{-/-}$ μοντέλο.

Οι μετρήσεις με τη μέθοδο υπερηχογραφίας (M-Mode 2D-Directed echocardiography) ανέδειξαν επιπλέον τη σημαντική μείωση της διάτασης του $Tnf^{Myh6} Des^{-/-}$ μυοκαρδίου σε σύγκριση με το $Des^{-/-}$. Οι ηχοκαρδιογραφικές παράμετροι μέτρησης της τελοσυστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (Left Ventricular End Diastolic Diameter, LVESD) και της τελοδιαστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (Left Ventricular End Diastolic Diameter, LVEDD) εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά μειωμένοι στο $Tnf^{Myh6} Des^{-/-}$ σε σύγκριση με το $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο 3ών μηνών ποντικών (Εικόνα 39 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1).

2 Η απουσία του δικτύου της δεσμίνης οδηγεί σε βελτίωση παθολογικών χαρακτηριστικών του μοντέλου καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF- α .

2.1 Η καρδιακή λειτουργία είναι σημαντικά βελτιωμένη στο $Tnf^{Myh6} Des^{-/-}$ σε σύγκριση με το MHCsTNF α μοντέλο.

Η σύγκριση του $Tnf^{Myh6} Des^{-/-}$ με το MHCsTNF α μοντέλο δείχνει τη βελτίωση του συνολικού φαινοτύπου καρδιακής δυσλειτουργίας που προκαλείται από την καρδιο-ειδική υπερέκφραση του παράγοντα TNF- α , στο γενετικό υπόβαθρο έλλειψης της δεσμίνης.

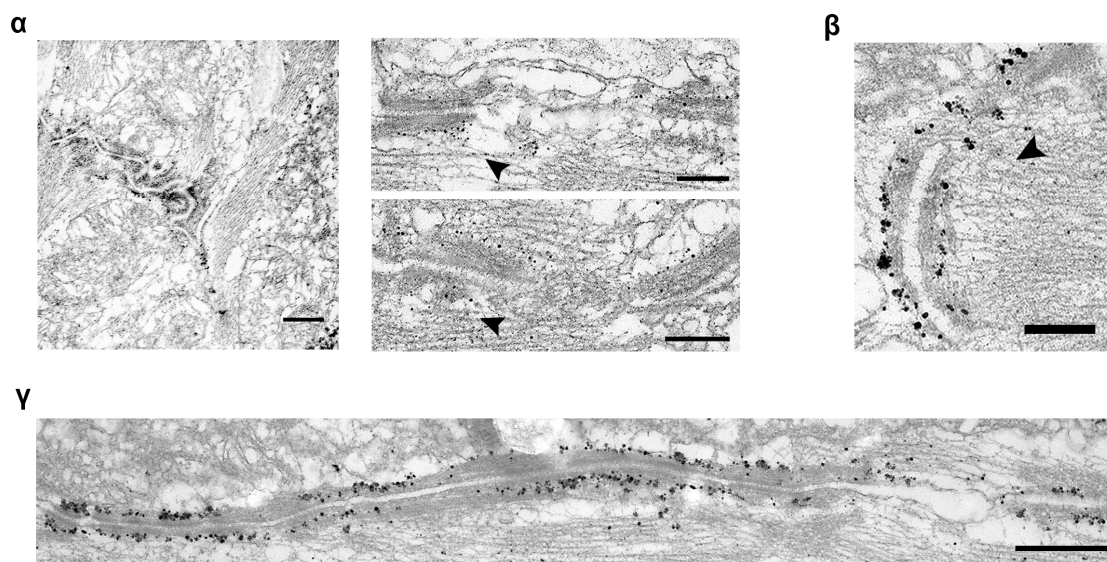
Ανάλυση των ηχοκαρδιογραφικών παραμέτρων (2D-Directed M-Mode echocardiography) καταδεικνύει τη στατιστικά σημαντική βελτίωση του ποσοστού συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (FS %) στο $Tnf^{Myh6} Des^{-/-}$ σε σύγκριση με το MHCsTNF α μυοκάρδιο (37.69 και 32.62, αντίστοιχα)(P-value<0.01) σε ποντίκια ηλικίας 3ών μηνων. Σε αντίστοιχες αναλύσεις ποντικών ηλικίας 6 μηνών, η διαφορά τους στο ποσοστό του FS είναι ακόμα μεγαλύτερη (35.73 και 27.92, αντίστοιχα) (P-value<0.001)(Εικόνα 21 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1).

2.2 Οι εμβόλιμοι δίσκοι των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκυττάρων παρουσιάζουν φυσιολογικά μορφολογικά και δομικά χαρακτηριστικά

Πρωτεΐνες των εμβόλιμων δίσκων, όπως η δεσμοπλακίνη των δεσμοσωμάτων και η β-κατενίνη των συνδέσμων προσκόλλησης (adherens junction) εμφανίζουν διαταραγμένο πρότυπο εντόπισης και λείπουν από τις χαρακτηριστικές περιοχές εντόπισής τους στους εμβόλιμους δίσκους σε καρδιακές τομές των MHCsTNFa ποντικών (Panagoroulou, Davos et al. 2008).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση πως στις μελέτες ανοσοφθορισμού για το πρότυπο εντόπισης των παραπάνω πρωτεϊνών των εμβόλιμων δίσκων, βρέθηκε πως οι εμβόλιμοι δίσκοι των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών εμφανίζουν σημαντικά βελτιωμένη δομή, σε σύγκριση με τα MHCsTNFa. Οι πρωτεΐνες δεσμοπλακίνη και η β-κατενίνη εντοπίζονται φυσιολογικά στους εμβόλιμους δίσκους, σε καρδιακές τομές των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών σε αντίθεση με τα MHCsTNFa (Εικόνα 33). Το ίδιο συμβαίνει και με άλλες πρωτεΐνες των εμβόλιμων δίσκων όπως η πλακογλοβίνη και η N-καντχερίνη (N-cadherin)(Εικόνα 33).

Επιπλέον, μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με σήμανση ανοσοχρυσού για την πρωτεΐνη δεσμοπλακίνη στα καρδιοκύτταρα των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών, παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές δομές των εμβόλιμων δίσκων με φυσιολογική εντόπιση της δεσμοπλακίνης στις δομές πλακών των εμβόλιμων δίσκων (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Η δεσμοπλακίνη παρουσιάζει φυσιολογική εντόπιση στους εμβόλιμους δίσκους των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκυττάρων. Ηλεκτρονική μικροσκοπία και χρώση ανοσοχρυσού για τη δεσμοπλακίνη (μαύρες κουκίδες)

καρδιακών τομών *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Μπάρες κλίμακας: 500 nm (α, αριστερά), 200 nm (α, δεξιά), 200 nm (β), 1 μm (γ).

3 Η υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α στο μυοκάρδιο οδηγεί στην ενεργοποίηση ομάδων γονιδίων που σχετίζονται με την αναδόμηση του ιστού και τον κυτταρικό θάνατο.

Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μέσω τεχνολογίας μικροσυστοιχειών DNA, υποδεικνύει διαφορές στο πρότυπο ολικής έκφρασης στο μυοκάρδιο μεταξύ των MHCsTNFα και WT ποντικών.

Οι διαφορές στην έκφραση απεικονίζονται συνοπτικά στην ανάλυση της Εικόνας 23. Συγκεκριμένα, 1285 γονίδια εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο έκφρασής τους (Εικόνα 23) (Fold change, FC ≥ 2, P-value < 0.05), στα MHCsTNFα σε σχέση με τα WT ποντίκια. Στον Πίνακα 2 περιγράφονται τα γονίδια με την πιο σημαντική διαφορά στην έκφρασή τους.

Μετα-ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχειών DNA, δείχνει πως τα γονίδια των οποίων η έκφραση αλλάζει σημαντικά, εμπλέκονται σε διεργασίες κυρίως αναδόμησης ιστού και κυτταρικού θανάτου.

Test Description

Selected Test : T Test unpaired
 P value computation: Asymptotic
 Multiple Testing Correction: Benjamini-Hochberg

Result Summary

	P all	P < 0.05	P < 0.02	P < 0.01	P < 0....	P < 0....
FC all	28145	2105	614	87	0	0
FC > 1.1	23340	2103	613	87	0	0
FC > 1.5	11292	1911	586	86	0	0
FC > 2.0	5646	1285	460	71	0	0
FC > 3.0	2319	591	268	51	0	0
Expecte...		1407	562	281	140	28

Εικόνα 23. Αποτελέσματα μελέτης γονιδιακής έκφραση του μυοκαρδίου των MHCsTNF α σε σύγκριση με τα WT ποντίκια. Ανάλυση μικροσυστοιχειών DNA δείχνει τη στατιστικά σημαντική μεταβολή μορίων ως προς τη γονιδιακή τους έκφραση, στο μυοκάρδιο των MHCsTNF α σε σύγκριση με τα WT ποντίκια ηλικίας 3ών μηνών. Στον πίνακα ανάλυσης στατιστικής σημαντικότητας παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των στατιστικά σημαντικών γονιδίων σε σχέση με τη διαφορά έκφρασης (Fold Change, FC). Unpaired t-test, ασυμπτωτικός υπολογισμός P-value και διόρθωση βάσει του Benjamini-Hochberg τεστ.

Διαφορά έκφρασης	MHCsTNF α : WT	Γονίδιο	Όνομα γονιδίου
481,2808	+	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)
122,1463	+	Ang	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
71,14441	+	Gsta1 /// Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya) /// glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)
58,0829	-	Serpina1a /// Serpina1b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1a
57,84542	-	Slc22a3	solute carrier family 22 (organic cation transporter)
52,87146	-	Gdpd3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3
45,31677	+	Lgals3	lectin, galactose binding, soluble 3
45,09963	+	Krt8	keratin 8
41,44472	+	Tnni1	troponin I, skeletal, slow 1
31,87093	-	Ifi202b	interferon activated gene 202B

Πίνακας 2. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μυοκαρδίου MHCsTNF α σε σύγκριση με τα WT ποντίκια. Παρουσιάζονται τα 10 γονίδια με τις μεγαλύτερες αλλαγές έκφρασης.

4 Στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο επάγονται γονίδια που δηλώνουν ελάττωση των διεργασιών αναδόμησης του ιστού, σε σύγκριση με το MHCsTNFa.

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του καρδιακού ιστού μεταξύ των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και MHCsTNFa ποντικών, μέσω της τεχνολογίας των μικροσυστοιχειών DNA, αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές στο μεταγράφομα των δύο μοντέλων.

Τα γονίδια που εμφανίζονται να εκφράζονται σημαντικά λιγότερο στο μυοκάρδιο των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών σε σύγκριση με τα MHCsTNFa, είναι η δεσμίνη, όπως αναμένεται και μόρια που συμμετέχουν κυρίως σε διεργασίες ανοσοαπόκρισης και αναδιοργάνωσης του ιστού, όπως προκύπτει από τη μετα-ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχειών DNA. Τα δέκα γονίδια με τις μεγαλύτερες μεταβολές στην έκφρασή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Διαφορά έκφρασης	$Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$: Tnf^{Myh6}	Γονίδιο	Όνομα γονιδίου
19,521786	-	Des	desmin
19,171381	+	Gdpd3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3
12,904938	-	Stbd1	starch binding domain 1
12,441276	-	2310014F07Rik	RIKEN cDNA 2310014F07 gene
11,597324	+	Psca	prostate stem cell antigen
11,13319	+	Arrdc3	Arrestin domain containing 3, mRNA (cDNA clone IMAGE:5344962)
8,841095	-	Galc	galactosylceramidase
7,0558996	+	Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
5,6518307	+	Nfia	nuclear factor I/A
5,414059	+	Retnla	resistin like alpha

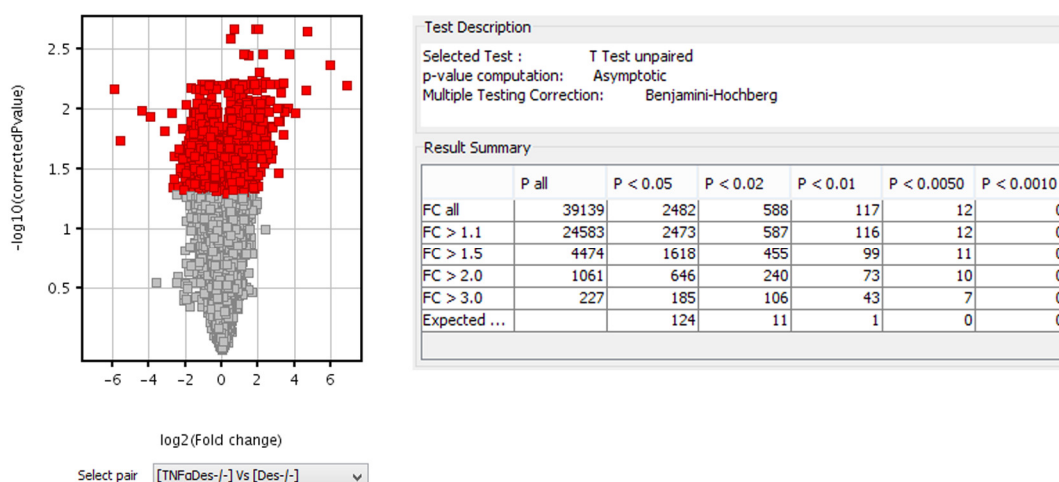
Πίνακας 3. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μυοκαρδίου $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε σύγκριση με τα Tnf^{Myh6} ποντίκια. Παρουσιάζονται τα 10 γονίδια με τις μεγαλύτερες αλλαγές έκφρασης.

5 Ελλείψη του κυτταροσκελετού της δεσμίνης, η υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α οδηγεί στην ενεργοποίηση ομάδων γονιδίων που σχετίζονται με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την προστασία από τον κυτταρικό θάνατο.

5.1 Στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο επάγονται γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και την προστασία από τον κυτταρικό θάνατο.

Από τη σύγκριση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιών σε σχέση με τις $Des^{-/-}$, μέσω της τεχνολογίας μικροσυστοιχειών DNA, προκύπτουν σημαντικές αλλαγές στο μεταγράφομα του $Des^{-/-}$ μυοκαρδίου έπειτα από υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α.

Απεικονιστικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης μικροσυστοιχειών DNA παρουσιάζονται στην Εικόνα 24 όπου φαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση 646 γονιδίων (α': "Heatmap", α'': "MvA scatter plot") (Fold change, $FC \geq 2$). Συγκεκριμένα, η έκφραση 440 γονιδίων αυξάνεται σημαντικά ($FC \geq 2$), ενώ 206 παρουσιάζουν μείωση επιπέδων έκφρασής τους ($FC \leq 2$) (Εικόνα 24). Στον Συμπληρωματικό Πίνακα 2 περιγράφεται η λίστα με τα 40 γονίδια που παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαφορά στην έκφρασή τους.



Εικόνα 24. Αποτελέσματα μελέτης γονιδιακής έκφραση του μυοκαρδίου των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε σύγκριση με τα $Des^{-/-}$ ποντίκια. Ανάλυση μικροσυστοιχειών DNA δείχνει τη στατιστικά σημαντική μεταβολή μορίων ως προς τη γονιδιακή τους έκφραση, στο μυοκάρδιο των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε σύγκριση με τα $Des^{-/-}$ ποντίκια ηλικίας

3ών μηνών. Διάγραμμα ανάλυσης στατιστικής σημαντικότητας (significance analysis plot) (αριστερά) όλων των αποτελεσμάτων (n=39,139) σε σχέση με τα γονίδια με διαφορά έκφρασης FC>2 (κόκκινο, n= 2,482). Στον πίνακα (δεξιά) παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των στατιστικά σημαντικών γονιδίων σε σχέση με τη διαφορά έκφρασης (Fold Change, FC). Unpaired t-test, ασυμπτωτικός υπολογισμός P-value και διόρθωση βάσει του Benjamini-Hochberg τεστ.

Μετα-ανάλυση των αποτελεσμάτων μελέτης διαφορικής έκφρασης μεταξύ των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$ καρδιών, οδηγεί σε σημαντικά συμπεράσματα ως προς τη συμμετοχή διεργασιών που ενδεχομένως σχετίζονται με την καρδιοπροστατευτική δράση του παράγοντα TNF-α στο $Des^{-/-}$ μυοκάρδιο. Συγκεκριμένα, μετα-ανάλυση των γονιδίων που εμφανίζονται να επάγονται στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, φαίνεται πως σχετίζονται με προστασία από κυτταρικό θάνατο, αντιοξειδωτικές διεργασίες και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Εικόνα 25). Μεγάλος αριθμός μορίων από τη λίστα των επαγόμενων γονιδίων στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, συνδέονται άμεσα σε δίκτυα αλληλεπίδρασης μορίων, τα οποία αναφέρονται σε βιολογικές λειτουργίες όπως «κυτταρικός θάνατος» (Εικόνες 25 και 26), «κυτταρικός πολλαπλασιασμός» (Εικόνες 25 και 26) και «κυτταρική σηματοδότηση και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις» (Εικόνα 25). Επιπλέον, μετα-ανάλυση των γονιδίων με αυξημένη έκφραση στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο αντιστοιχεί τα μόρια αυτά σε γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με κυτταρικό θάνατο, αναδιαμόρφωση ιστού και αντιοξειδωτικές διεργασίες.

Top Bio Functions

Diseases and Disorders

Name	p-value	# Molecules
Cancer	2,27E-13 - 1,09E-03	174
Cardiovascular Disease	5,74E-12 - 8,55E-04	54
Inflammatory Disease	2,82E-11 - 9,25E-04	72
Neurological Disease	6,12E-10 - 7,43E-04	86
Immunological Disease	2,36E-09 - 1,09E-03	69

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecules
Cell Death	5,10E-15 - 1,09E-03	147
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1,02E-10 - 9,25E-04	77
Cellular Movement	1,24E-09 - 1,09E-03	84
Cell Morphology	4,58E-09 - 1,09E-03	69
Cellular Development	1,21E-08 - 1,09E-03	110

Physiological System Development and Function

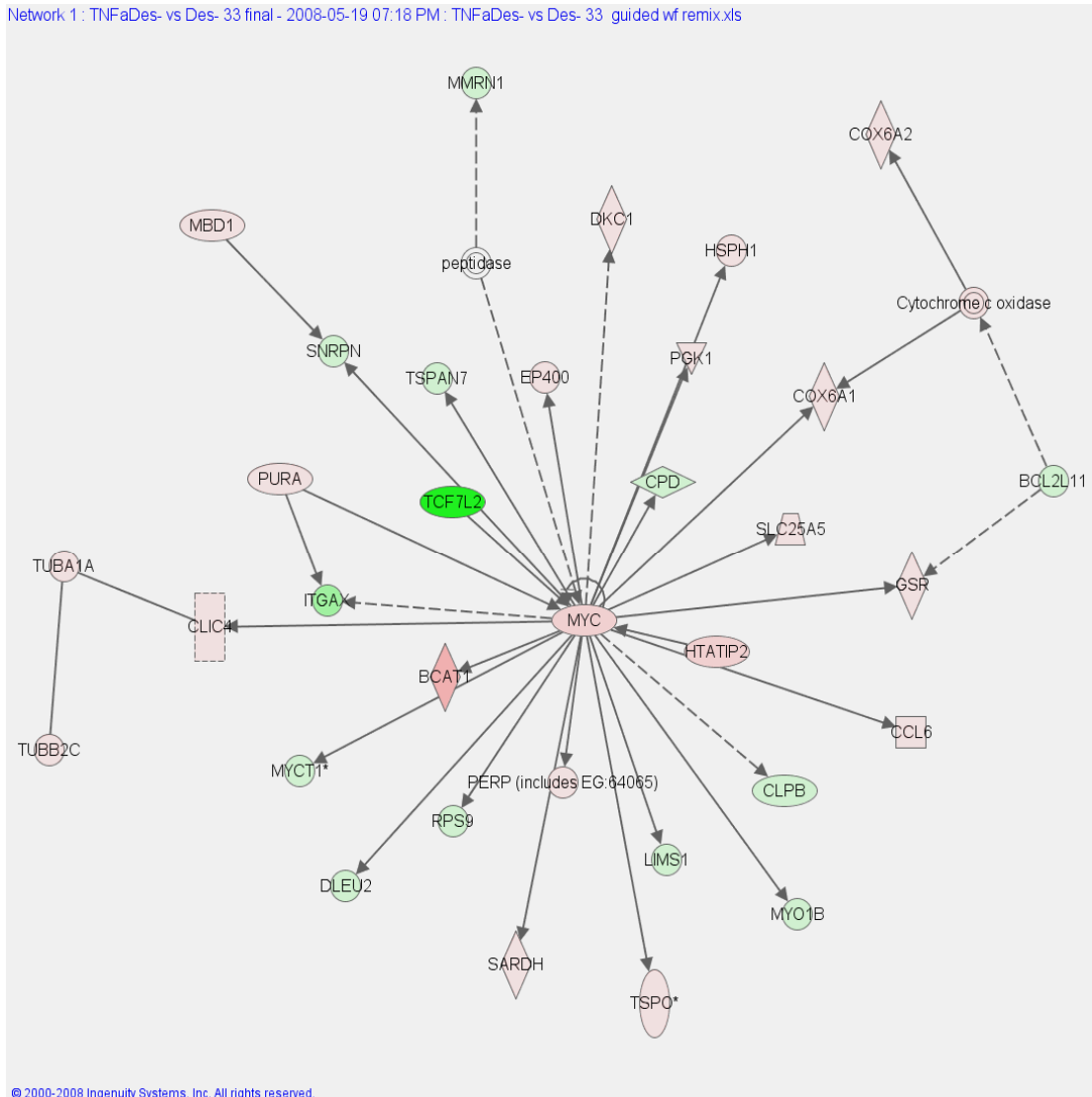
Name	p-value	# Molecules
Tissue Development	1,02E-10 - 8,95E-04	65
Tissue Morphology	7,51E-09 - 9,83E-04	81
Organismal Survival	9,28E-09 - 6,33E-06	70
Hematological System Development and Function	7,79E-08 - 1,06E-03	88
Immune Response	1,85E-06 - 9,23E-04	68

Εικόνα 25. Μετα-ανάλυση αποτελεσμάτων σύγκρισης γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του καρδιακού μεταγραφώματος των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$.

Αντίστοιχα, τα μόρια των οποίων η έκφραση παρουσιάζεται μειωμένη στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο σε σχέση με το $Des^{-/-}$, σχετίζονται με δίκτυα αλληλεπίδρασης και σηματοδοτικά μονοπάτια που αναφέρονται σε «ανοσοαπόκριση» και «αναδιοργάνωση ιστού» (Εικόνα 25 και Συμπληρωματικός Πίνακας 2).

a

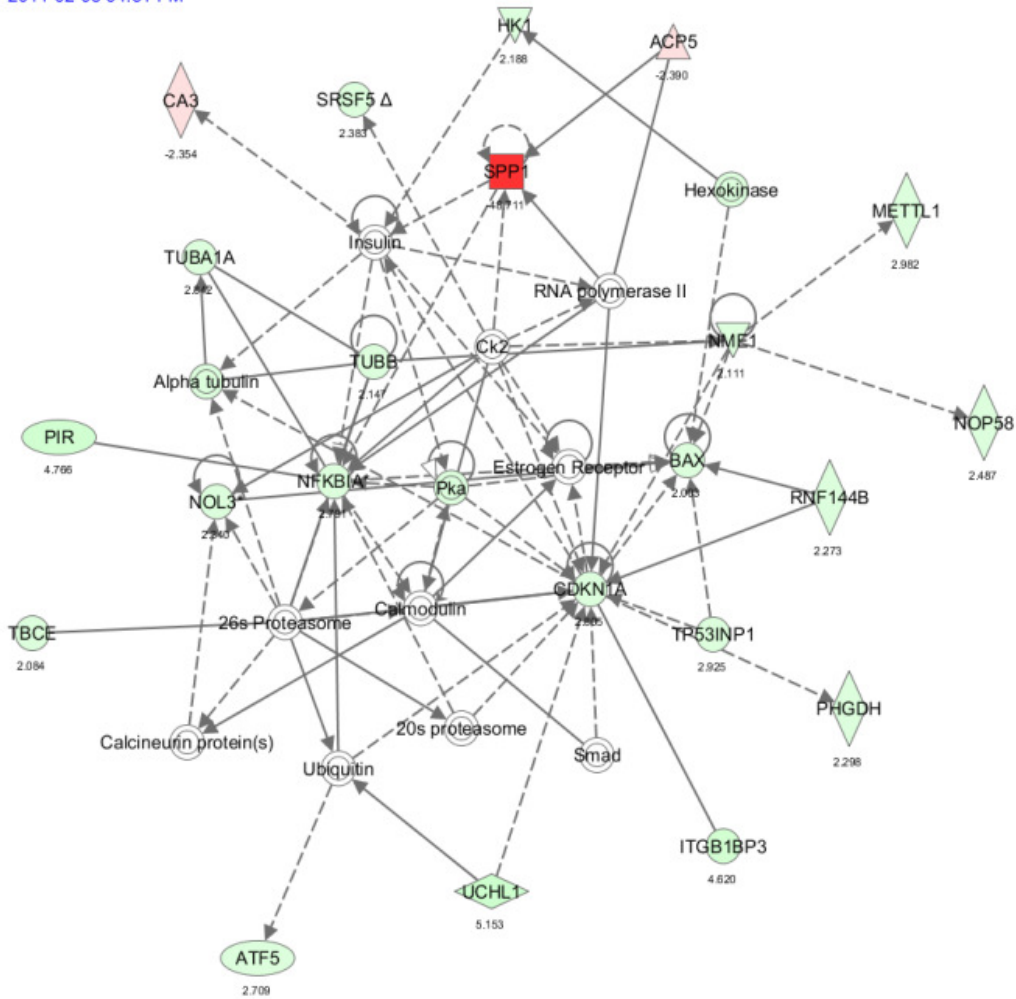
Network 1 : TNFaDes- vs Des- 33 final - 2008-05-19 07:18 PM : TNFaDes- vs Des- 33 guided wf remix.xls



© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

β

Network 4 : Partek TNFaDes-- vs Des-- FC - 2011-02-08 04:51 PM : Partek TNFaDes-- vs Des-- FC2 overall : Partek TNFaDes-- vs Des-- FC - 2011-02-08 04:51 PM



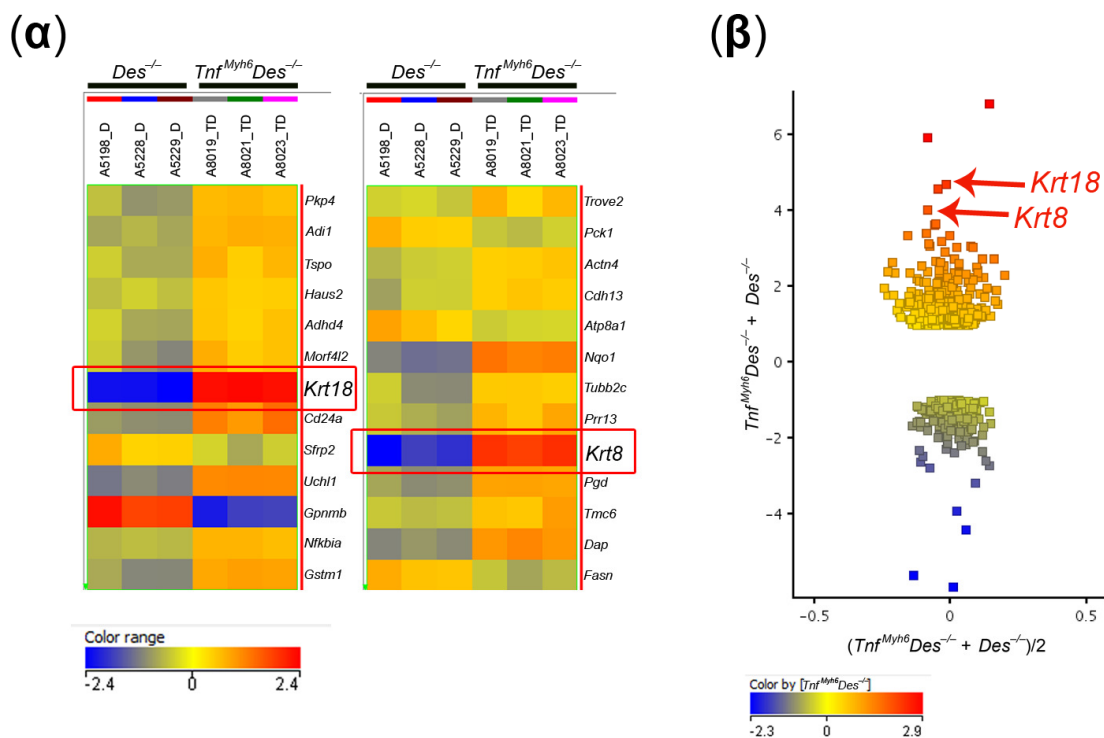
© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Εικόνα 26. Μετα-ανάλυση και ανάλυση δικτύου αλληλεπιδράσεων των μορίων με διαφορά έκφρασης της ανάλυσης γονδιακής έκφρασης μεταξύ του καρδιακού μεταγραφώματος των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$. Δίκτυο αλληλεπίδρασης μορίων που σχετίζονται με τις διεργασίες (α) κυτταρικού θανάτου και (β) κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω μετα-ανάλυσης των αποτελεσμάτων (Ingenuity Pathway Analysis, IPA). Παρουσιάζονται τα μόρια των οποίων επάγεται η έκφραση (α. κόκκινο, β. πράσινο) και μειώνεται η έκφραση (α. πράσινο, β. κόκκινο), κατά τη σύγκριση του καρδιακού μεταγραφώματος μεταξύ $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$ ποντικών.

5.2 Στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο επάγονται γονίδια ενδιάμεσων ινιδίων των κυττάρων ιστού απλών επιθηλίων.

Μεταξύ των τριών πρώτων γονιδίων των οποίων η έκφραση αυξάνεται στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$ καρδιών, βρίσκονται δύο κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων, η κερατίνη 8 (*Krt8*) και η κερατίνη 18 (*Krt18*) (16.44 και 25.96 FC αντίστοιχα, $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ προς $Des^{-/-}$, ανάλυση “Genespring GX12”) (two-sided P-value < 0.5) (Unpaired t-test and Benjamini-Hochberg correction).

Στην εικόνα 27 απεικονίζονται τα παραπάνω γονίδια σε γραφήματα ανάλυσης (α΄: κόκκινα παραλληλόγραμμα σε “Heatmap” γράφημα, α΄΄: κόκκινα βέλη σε “MVA scatter plot” γράφημα). Στο γράφημα τύπου “Heatmap” φαίνονται τα βιολογικά δείγματα (n=3) που χρησιμοποιήθηκαν στον υβριδισμό των μικροσυστοιχειών DNA και το επίπεδο έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων ομοιάζει μεταξύ των διαφορετικών μοντέλων. Στο γράφημα τύπου “MVA scatter plot” δηλώνεται πως τα γονίδια *Krt8* και *Krt18* εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επαγωγή στις $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιές σε σχέση με τις $Des^{-/-}$ και μάλιστα μεταξύ των τριών πρώτων σε διαφορά έκφρασης.



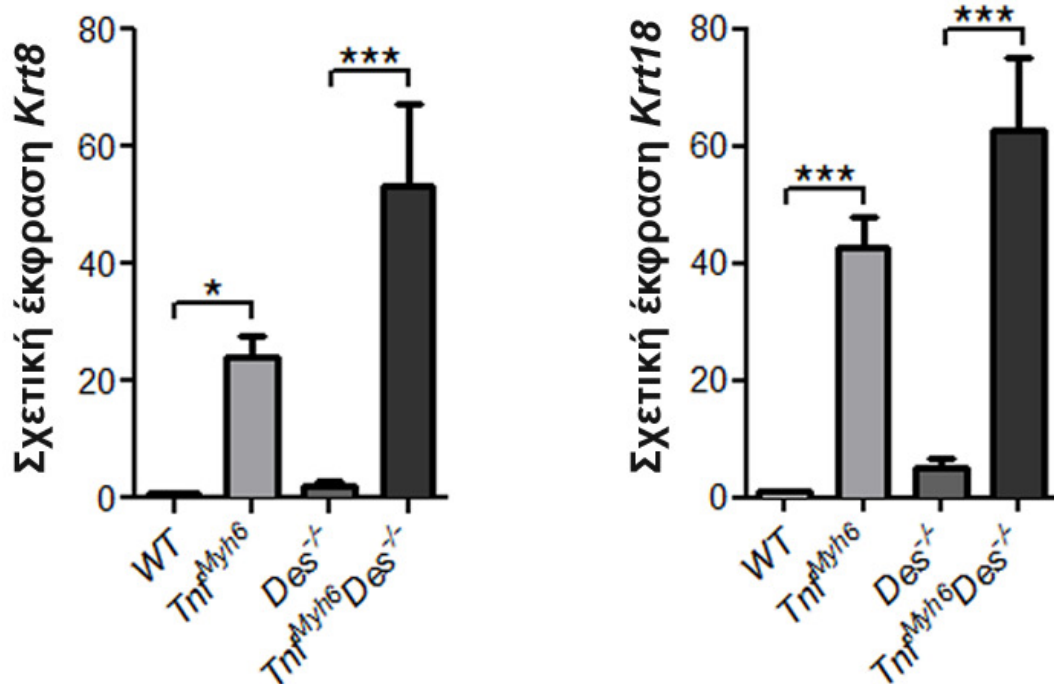
Εικόνα 27. Τα γονίδια *Krt8* και *Krt18* παρουσιάζουν την εντονότερη μεταβολή έκφρασης, στη σύγκριση μεταγαφωμάτων μεταξύ $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$. (α)

Γράφημα σε μορφή “Heatmap” της ανάλυσης μικροσυστοιχειών DNA. (β) Γράφημα σε μορφή “MnA scatter plot” της ανάλυσης μικροσυστοιχειών DNA (two-sided P-value < 0.5) (Unpaired t-test and Benjamini-Hochberg correction).

6 Τα γονίδια της κερατίνης 8 και κερατίνης 18 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α και σχηματίζουν πρωτεΐνες.

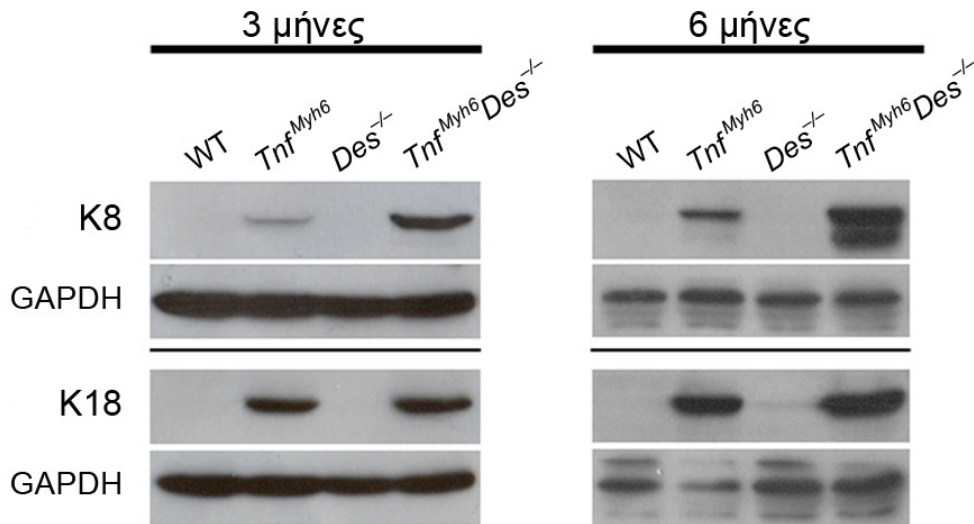
Η έκφραση των *Krt8* και *Krt18*, τα οποία δείχθηκε πως επάγονται στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο μέσω της ανάλυσης με μικροσυστοιχείς DNA, πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο της Real-Time PCR σε ολικό RNA από καρδιές των μοντέλων της μελέτης μας.

Συγκεκριμένα, ανάλυση μέσω Real-Time PCR έδειξε πως στις καρδιές υπερέκφρασης TNF-α (MHCsTNFα και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μοντέλα) τα γονίδια *Krt8* και *Krt18* εκφράζονται σε ιδιαίτερα μεγάλα επίπεδα. Στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο η έκφραση των *Krt8* και *Krt18* παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα (53.2 και 62.7 FC αύξηση αντίστοιχα, σε σύγκριση με το WT μυοκάρδιο) (Εικόνα 28). Ακολουθεί το MHCsTNFα μυοκάρδιο (24.5 και 42.2 FC αύξηση αντίστοιχα, σε σύγκριση με το WT μυοκάρδιο), ενώ στο *Des^{-/-}* μυοκάρδιο, επιπλέον, φαίνεται να εκφράζονται τα γονίδια *Krt8* και *Krt18*, σε χαμηλά επίπεδα (3.2 και 8.7 FC αύξηση αντίστοιχα, σε σύγκριση με το WT μυοκάρδιο)(Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Τα γονίδια *Krt8* και *Krt18* εκφράζονται σε μεγάλα επίπεδα στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης *TNF-α*. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω RT-PCR σε ολικό mRNA από καρδιές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το WT. Για την ομαλοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου της β-ακτίνης. (Two-sided P-values: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 . One-way ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test).

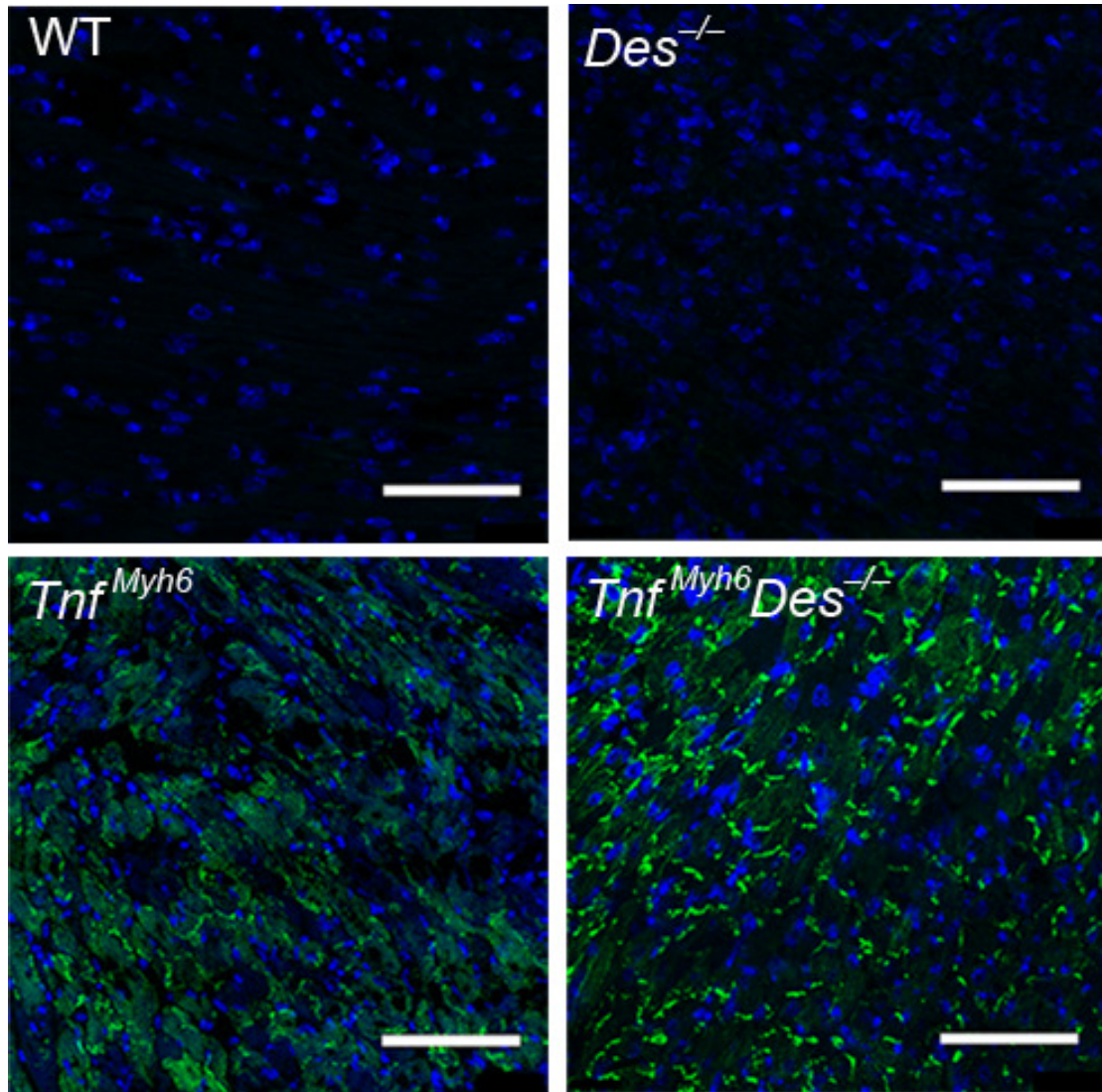
Επιπλέον πιστοποιήθηκε ο σχηματισμός πρωτεϊνικών μορίων της κερατίνης 8 και κερατίνης 18 στο μυοκάρδιο των ποντικών MHCsTNFα και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}*, μέσω ανάλυσης υβριδισμού κατά Western από ολικά καρδιακά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται στο MHCsTNFα και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο, σε υψηλά επίπεδα (Εικόνα 29), ενώ δεν ανιχνεύεται έκφρασή τους στο μυοκάρδιο των WT και *Des^{-/-}* ποντικών. Όμοιο πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης παρουσιάζεται σε ποντίκια ηλικίας 3ών και 6 μηνών (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Οι K8/K18 σχηματίζουν πρωτεϊνικά μόρια στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α . Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε καρδιακά εγχυλίσματα ποντικών ηλικίας 3ών και 6 μηνών. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης GAPDH χρησιμοποιήθηκαν ως επίπεδα αναφοράς.

7 Οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκτείνονται στο μεγαλύτερο τμήμα του μυοκαρδίου υπερέκφρασης TNF- α και καθόλου στο WT μυοκάρδιο.

Οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α σε υψηλά επίπεδα, ενώ επιπλέον κατέχουν χαρακτηριστικά μεγάλο μέρος των καρδιακών τομών, όπως φαίνεται μέσω μελετών ανοσοφθορισμού ειδικά για τις πρωτεΐνες αυτές. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, η κερατίνη 8 (ομοίως για την κερατίνη 18) εκφράζεται σχεδόν σε όλη την επιφάνεια των καρδιακών τομών των MHCsTNF α και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μοντέλων, ενώ δεν ανιχνεύεται καθόλου έκφραση στο WT μυοκάρδιο, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα υβριτισμού κατά Western (Εικόνα 29).

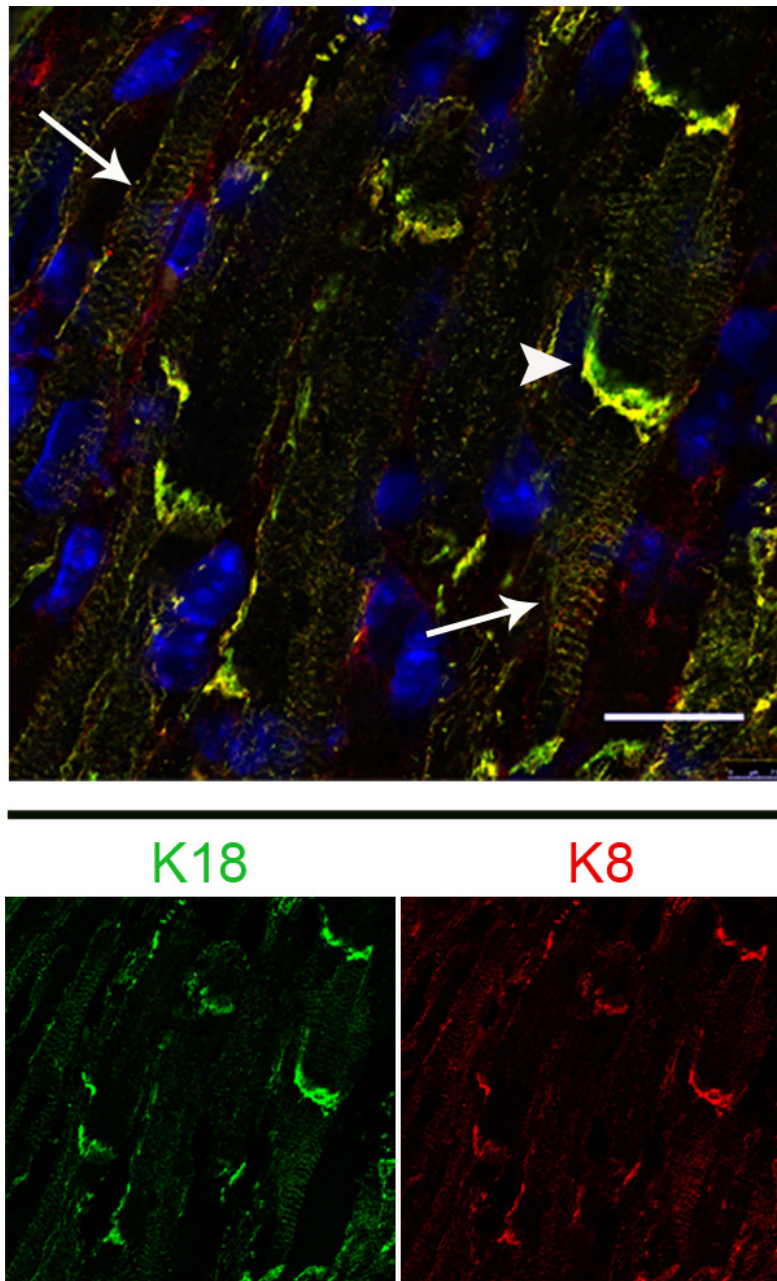


Εικόνα 30. Η έκφραση της πρωτίνης K8 εκτείνεται σε μεγάλο τμήμα του καρδιακού ιστού των μυοκαρδίων υπερέκφρασης TNF- α . Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της K8 (πράσινο) με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού σε καρδιακές κρυστομές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Η K8 παρουσιάζεται σχεδόν σε ολόκληρη την επιφάνεια της καρδιακής τομής των μυοκαρδίων υπερέκφρασης TNF- α . Μπάρες κλίμακας: 100 μ m.

8 Οι K8 και K18 σχηματίζουν ένα κυτταροσκελετικό δίκτυο με χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.

8.1 Οι πρωτεΐνες K8 και K18 συνεντοπίζονται απόλυτα και σχηματίζουν δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων.

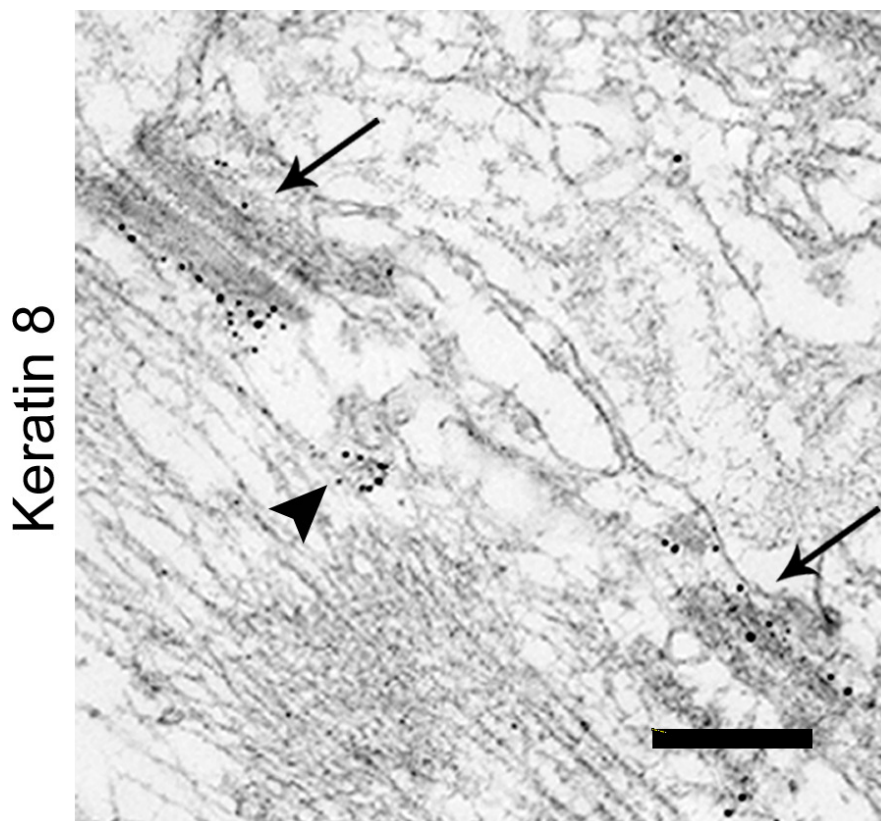
Η έκφραση των πρωτεϊνών K8 και K18 οδηγεί επιπλέον σε σχηματισμό δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31 οι K8 και K18 πρωτεΐνες συνεντοπίζονται απόλυτα στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο (ομοίως στο MHCsTNFa μυοκάρδιο, αποτελέσματα δεν δείχνονται).



Εικόνα 31. Οι πρωτεΐνες K8/K18 συνεντοπίζονται απόλυτα και εντοπίζονται στους εμβόλιμους δίκους και σε γραμμωτές δομές των μυοκαρδιοκυττάρων των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών. Μελέτη διπλού ανοσοφθορισμού για τις K8 και K18 πρωτεΐνες σε καρδιακές τομές *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών ηλικίας 3ών μηνών δείχνουν τον συνεντοπισμό τους και την εντόπισή τους στους εμβόλιμους δίσκους (κεφαλή βέλους) και στα κοσταμερή (βέλη) των καρδιοκυττάρων. Μπάρα κλίμακας: 20 μm.

Ο συνεντοπισμός των K8 και K18 αποτελεί έμμεση ένδειξη σχηματισμού κυτταροσκελετικού δικτύου. Με τη μέθοδο ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αναλύεται σε βάθος η τοποθέτηση της πρωτεΐνης K8 και τα χαρακτηριστικά του

δικτύου K8/K18 στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (Εικόνα 32). Μέσω της μεθόδου αυτής είναι δυνατό να αποδειχθεί ο σχηματισμός δομών που ανταποκρίνονται στα χαρακτηριστικά δικτύων ενδιάμεσων ινιδίων. Πράγματι, η K8 εντοπίζεται σε δομές χαρακτηριστικές δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων, δηλώνοντας το σχηματισμό K8/K18 δικτύου στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (βέλη, Εικόνα 32).



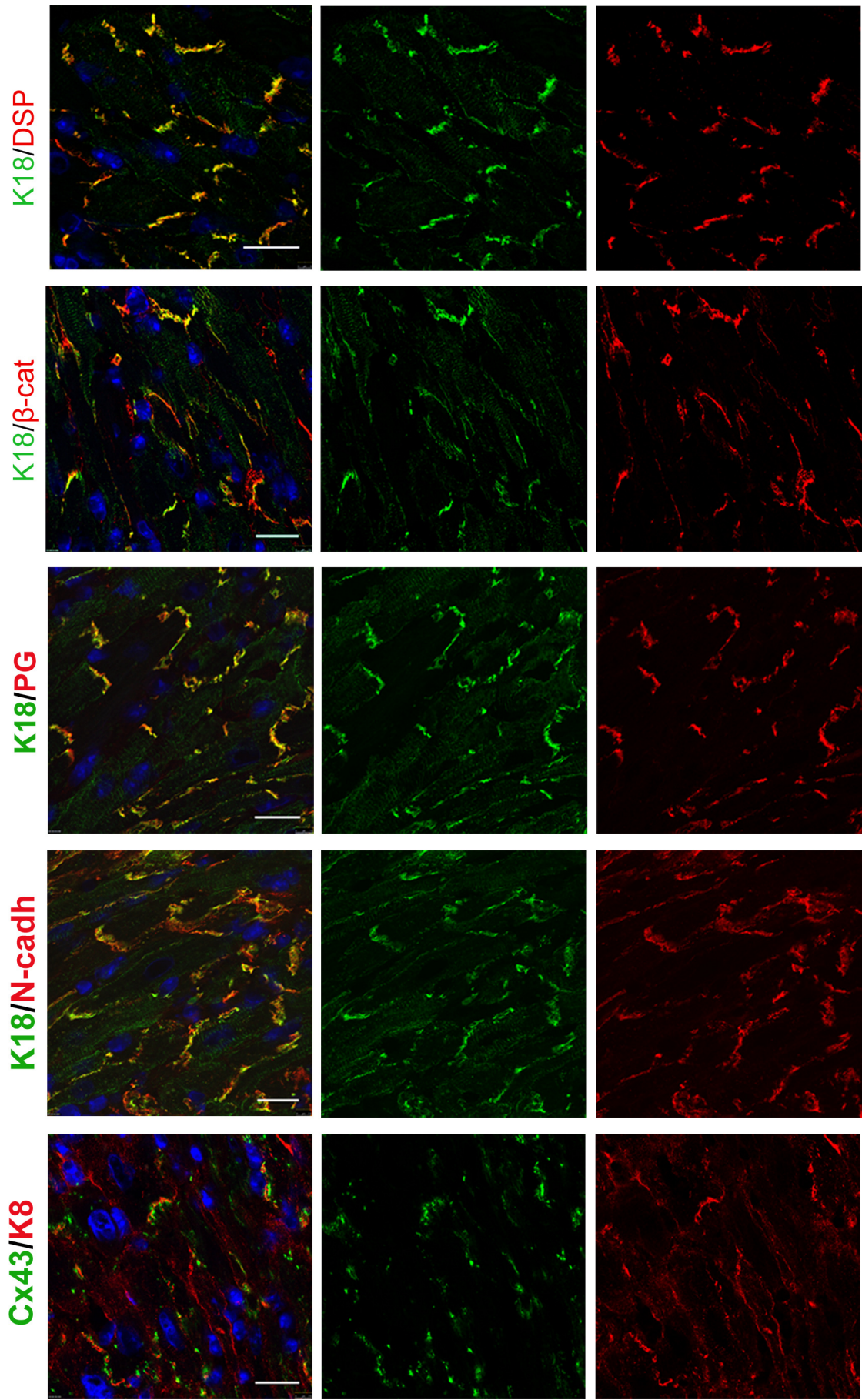
Εικόνα 32. Οι K8/K18 σχηματίζουν δίκτυα ενδιάμεσων ινιδίων στα καριοκύτταρα των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σε συνδυασμό με σήμανση με ανοσοχρυσό δείχνει τον εντοπισμό της K8 (μαύρες κουκίδες) σε περιοχές που φαίνονται οι χαρακτηριστικές δομές ενδιάμεσων ινιδίων (κεφαλή βέλους) και στις πλάκες των εμβόλιμων δίσκων (βέλη), των καρδιοκυττάρων των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών. Μπάρα κλίμακας: 300 nm.

8.2 Το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται ειδικά στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων.

Στην Εικόνα 33 φαίνεται η ειδική εντόπιση της K8 στις πλάκες των εμβόλιμων δίσκων των καρδιοκυττάρων, μέσω της μεθόδου ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Με ανάλυση ανοσοφθορισμού για τις K8 και K18, σε συνδυασμό με πρωτεΐνες των εμβόλιμων δίσκων, αναδεικνύεται περαιτέρω η ειδική εντόπιση των K8/K18 στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων. Συγκεκριμένα, η K18 συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό με βασικές πρωτεΐνες των δεσμοσωμάτων (δεσμοπλακίνη, πλακογλοβίνη, Εικόνα 33) και των συνδέσμων προσκόλλησης (β-κατενίνη, N-καντχερίνη, Εικόνα 33) (ομοίως για την K8, αποτελέσματα δεν δείχνονται). Ανοσοφθορισμός για την K18 και της κοννεξίνης 43 των χασματοσυνδέσμων, δείχνει γειτονική εντόπιση και όχι απόλυτη συνεντόπιση (Εικόνα 33).

Οι παραπάνω αναλύσεις καταδεικνύουν τον ειδικό εντοπισμό του δικτύου K8/K18 στις δομές των δεσμοσωμάτων και συνδέσμων προσκόλλησης των εμβόλιμων δίσκων που συνιστούν τη λεγόμενη “area composita”.

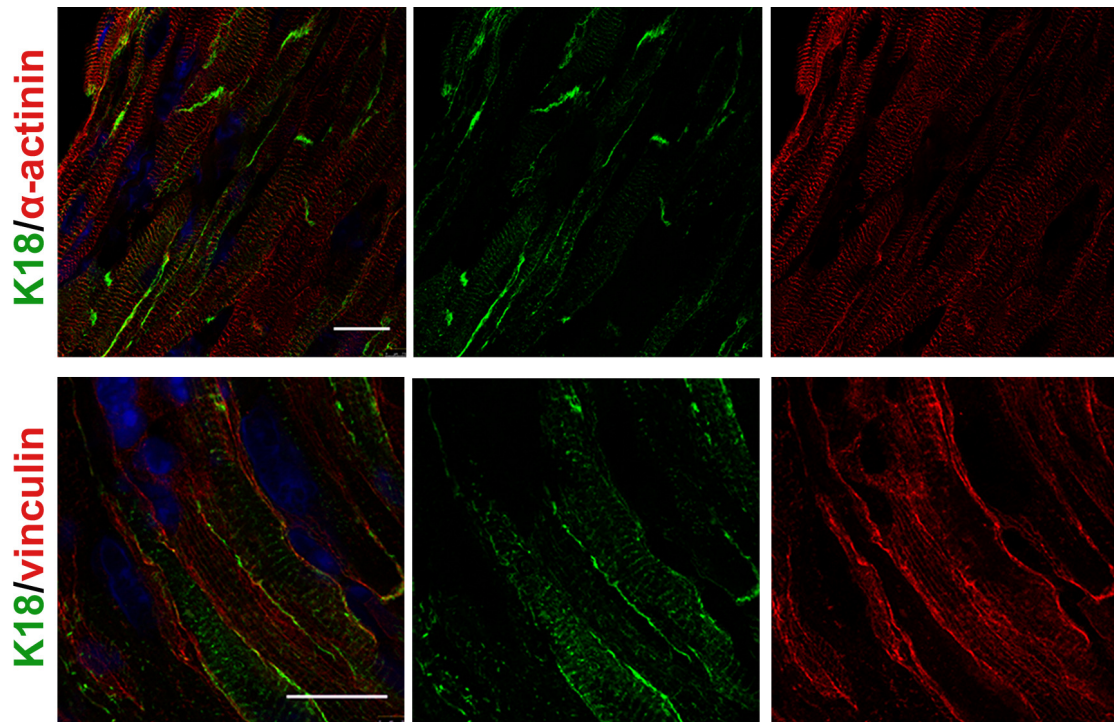


Εικόνα 33. Το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται ειδικά στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών. Μελέτες ανοσοφθορισμού για την K18 (η οποία συνεντοπίζεται απόλυτα με την K8) δείχνουν πως συνεντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους με πρωτεΐνες συστατικά τους, όπως η δεσμοπλακίνη (DSP), β-κατενίνη (β-cat), πλακογλοβίνη (PG) και N-καντχερίνη (N-cadh). Αντίθετα, με την πρωτεΐνη κοννεξίνη 43 (Cx43) δεν παρουσιάζει απόλυτο συνεντοπισμό στους εμβόλιμους δίσκους. Μπάρες κλίμακας: 20 μm.

8.3 Το δίκτυο K8/K18 εκτείνεται στο σαρκόπλασμα στο επίπεδο των M-ζωνών των κοσταμερών.

Εκτός από την ειδική εντόπιση του δικτύου K8/K18 στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων, εμφανίζεται και σε δομές γράμμωσης των μυοϊνιδίων των καρδιοκυττάρων (Εικόνα 34). Η μελέτη των χαρακτηριστικών του προτύπου αυτού εντόπισης του δικτύου K8/K18 στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, πραγματοποιήθηκε με μεθόδους ανοσοφθορισμού για συγκεκριμένες πρωτεΐνες στα επίπεδα του σαρκοπλάσματος και του σαρκειλήμματος.

Συγκεκριμένα, ανοσοφθορισμός για την K8 με την πρωτεΐνη του σαρκοπλάσματος στο επίπεδο των ζ-ζωνών α-ακτινίνη, φαίνεται πως το δίκτυο K8/K18 δεν εντοπίζεται στις ζ-ζώνες, αλλά παραπλεύρως πιθανόν στις M-ζώνες (Εικόνα 34). Επιπλέον φαίνεται το δίκτυο K8/K18 να εκτείνεται από το σαρκόπλασμα στο επίπεδο της α-ακτινίνης, αλλά κυρίως στο επίπεδο των κοσταμερών του σαρκειλήμματος, όπου η α-ακτινίνη δεν ανιχνεύεται. Το τελευταίο είναι σε συμφωνία με την ανάλυση ανοσοφθορισμού της K8 με την βινκουλίνη που εντοπίζεται στο επίπεδο του σαρκειλήμματος. Το δίκτυο K8/K18 φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στο επίπεδο των κοσταμερών της πλασματικής μεμβράνης, χωρίς όμως να συνεντοπίζεται με τη βινκουλίνη, προτείνοντας επίσης την τοποθέτηση του δικτύου K8/K18 στις M-ζώνες (Εικόνα 34).

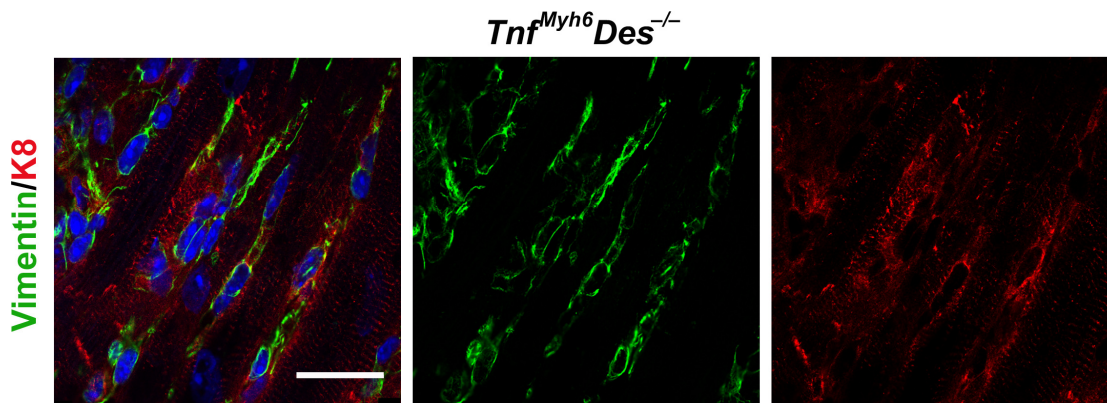


Εικόνα 34. Το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται στα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών. Μελέτες ανοσοφθορισμού για την K18 με την πρωτεΐνη των Z-γραμμών α-ακτινίνη (α-actinin) και των κοσταμερών βινκουλίνη (vinculin) δείχνουν πως εντοπίζεται στις M-γραμμές των κοσταμερών των καρδιοκυττάρων. Μπάρες κλίμακας: 20 μm.

8.4 Το δίκτυο K8/K18 εκφράζεται στα μυοκαρδιοκύτταρα και όχι στους ινοβλάστες των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών.

Οι μελέτες με τις μεθόδους της ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και ανοσοφθορισμού για ειδικές πρωτεΐνες δομών των καρδιοκυττάρων που παρουσιάζονται στις Εικόνες 32–35, προτείνουν την έκφραση και σχηματισμό του δικτύου K8/K18 ειδικά στα καρδιοκύτταρα του μυοκαρδίου υπερέκφρασης TNF-α.

Επιπλέον απόδειξη για το παραπάνω αποτελεί το γεγονός πως το δίκτυο K8/K18 δεν σχηματίζεται στον έταιρο υποπληθυσμό κυττάρων του μυοκαρδίου, τους καρδιακούς ινοβλάστες. Ανοσοφθορισμός για την K8 και τη βιμεντίνη, πρωτεΐνη ειδική για τους καρδιακούς ινοβλάστες, δείχνει την απόλυτη έλλειψη έκφρασης του δικτύου K8/K18 στους καρδιακούς ινοβλάστες (Εικόνα 35).



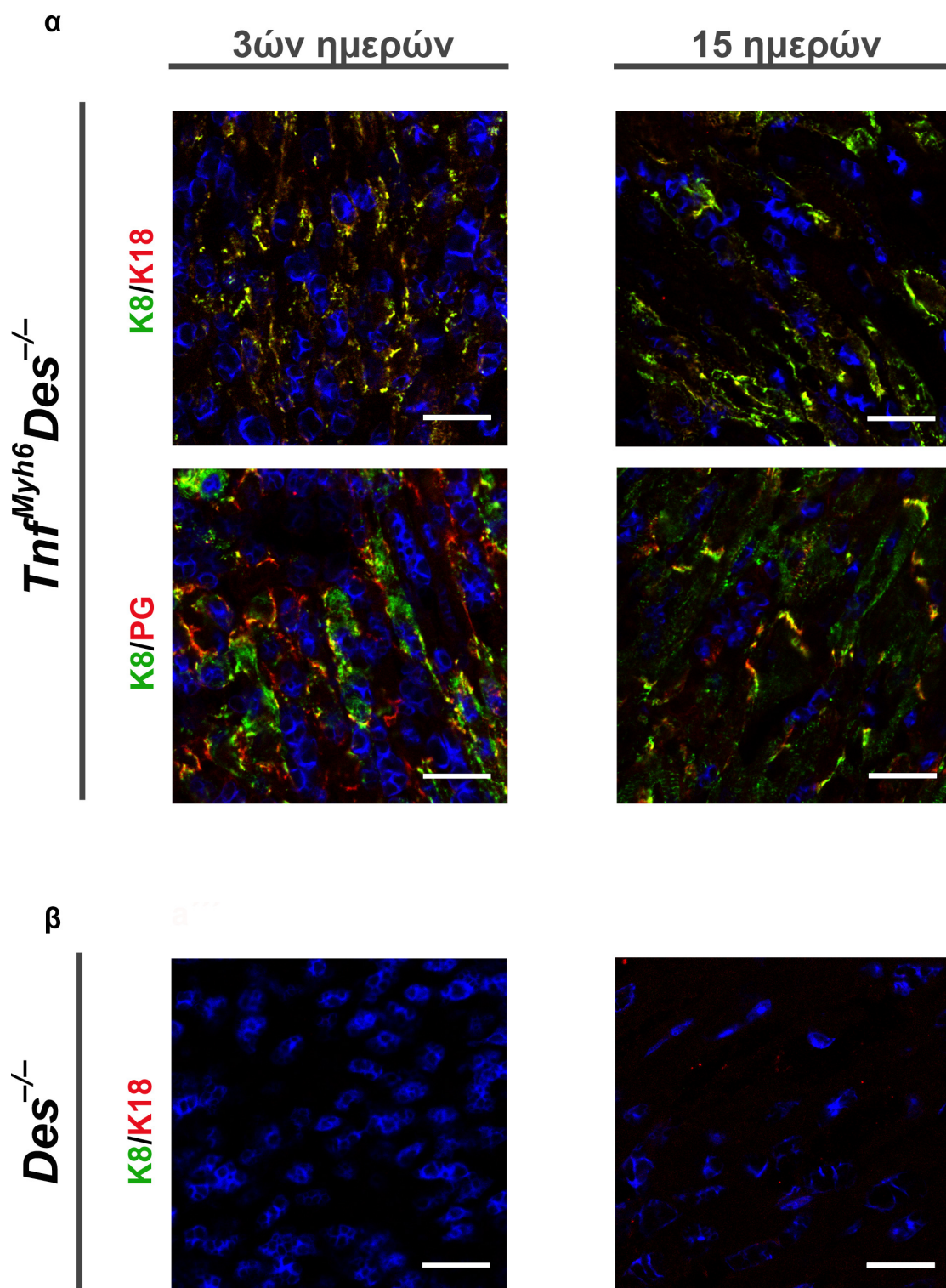
Εικόνα 35. Οι K8/K18 εκφράζονται ειδικά στα καρδιοκύτταρα και όχι στους καρδιακούς ινοβλάστες στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α. Μελέτες ανοσοφθορισμού για την K18 με την ειδική πρωτεΐνη των ινοβλαστών βιμεντίνη (vimentin) δείχνει την ειδική έκφρασή της στα καρδιοκύτταρα σε *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντίκια. Μπάρες κλίμακας: 20 μm.

9 Το δίκτυο K8/K18 εκφράζεται στα καρδιοκύτταρα νωρίς κατά τη γέννηση του ποντικιού.

Οι παραπάνω μελέτες περιγράφουν την έκφραση των πρωτεϊνών K8/K18 στο μυοκάρδιο ενήλικων ποντικών για πρώτη φορά. Για να απαντήσουμε στο ερώτημα πότε περίπου αρχίζει να εκφράζεται το δίκτυο K8/K18 στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α αναλύσαμε ποντίκια ηλικίας από 3 έως 15 ημέρες μετά την γέννησή τους.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 36 οι πρωτεΐνες K8/K18 εκφράζονται από τις πρώτες μέρες ζωής του νεογνού στο *TnfMyh6Des^{-/-}* μυοκάρδιο. Επίσης, παρουσιάζουν απόλυτο συνεντοπισμό μεταξύ τους και παράλληλο πρότυπο εντόπισης με πρωτεΐνες των εμβόλιμων δίσκων. Χαρακτηριστικά εντοίζονται πλαγίως των καρδιοκυττάρων κατά τις πρώτες ημέρες προτού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των ώριμων δομών των εμβόλιμων δίσκων (3^η ημέρα μετά τη γέννηση), ενώ στη συνέχεια εμφανίζουν το χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίκους, όταν οι δομές τους έχουν σχεδόν πλήρως διαμορφωθεί τη 15^η ημέρα μετά τη γέννηση.

Αντίθετα στο *Des^{-/-}* μυοκάρδιο δεν ανιχνεύσαμε έκφραση των K8/K18 έως και τη 15^η ημέρα έπειτα από τη γέννησή τους, ενώ όπως έχει ήδη περιγραφεί παρουσιάζεται έκφραση K8/K18 στο *Des^{-/-}* μυοκάρδιο στο ενήλικο ζώο που έχει αναπτύξει καρδιακή παθολογία.



Εικόνα 36. Οι K8/K18 εκφράζονται στα καρδιοκύτταρα του μυοκαρδίου υπερέκφρασης TNF- α από νωρίς κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννηση. Ανοσοφθορισμός για τις K8/K18 καρδιακών τομών από νεογνά ποντίκια ηλικίας 3ών ακι 15 ημερών δείχνουν την έκφραση της K8/K18 από νωρίς κατά τη γέννηση του *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικιού (**α**). Αντίθετα δεν παρουσιάζεται έκφραση των K8/K18 στο μυοκάρδιο νεογνών των *Des^{-/-}* ποντικιών (**β**). Μπάρες κλίμακας: 20 μm .

10 Το δίκτυο K8/K18 εμφανίζει μεγαλύτερη ειδικότητα εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε σύγκριση με το MHCsTNFα μυοκάρδιο.

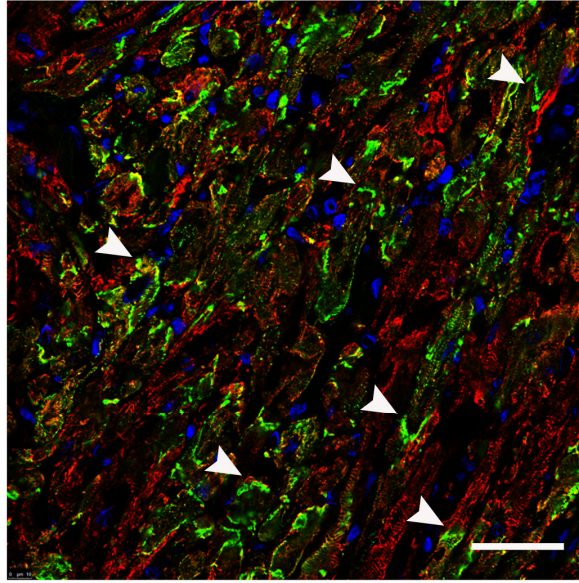
Μελέτες για το πρότυπο εντόπισης του δικτύου K8/K18 στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο έδειξαν την ειδική εντόπισή του στους εμβόλιμους δίσκους και σαρσκοπλασματικά έως το επίπεδο των κοσταμερών των καρδιοκυττάρων. Οι σχετικές μελέτες στο MHCsTNFα μυοκάρδιο αποκαλύπτουν παρόμοια χαρακτηριστικά για το πρότυπο εντόπισης του δικτύου K8/K18 και στο συγκεκριμένο μοντέλο (Εικόνα 37). Το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους των MHCsTNFα καρδιοκυττάρων, σε μικρότερο όμως βαθμό συγκριτικά με την πιστότητα εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκυττάρων (Εικόνες 33-35 και 37).

11 Το δίκτυο K8/K18 εμφανίζει μεγαλύτερη ειδικότητα εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους σε σύγκριση με τη δεσμίνη στο MHCsTNFα μυοκάρδιο.

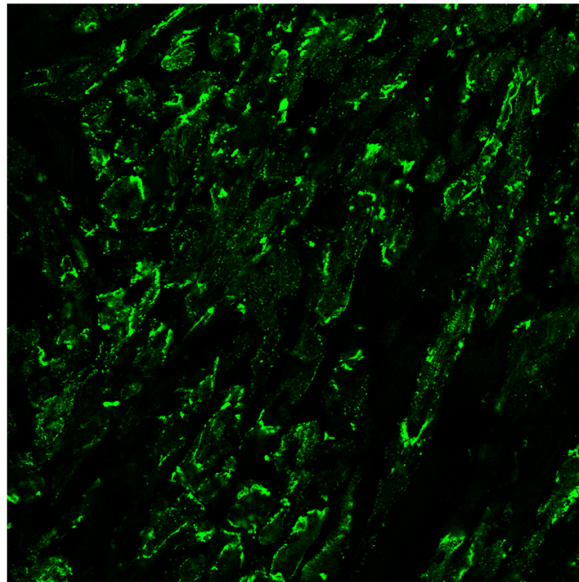
Στο MHCsTNFα μυοκάρδιο σχηματίζονται δύο τύποι κυτταροσκελετικών δικτύων ενδιάμεσων ινιδίων, αυτά της δεσμίνης και του K8/K18. Ανάλυση των χαρακτηριστικών του προτύπου έκφρασης των πρωτεϊνικών δικτύων αυτών δείχνει πως οι K8/K18 παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη ειδικότητα για τους εμβόλιμους δίσκους σε σύγκριση με τη δεσμίνη, η οποία έχει δειχθεί πως παρουσιάζει διαταραγμένο δίκτυο στο MHCsTNFα μυοκάρδιο, όπου σχηματίζει συσσωματώματα και χάνει το χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισής της στους εμβόλιμους δίσκους (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Μέσω ανοσοφθορισμού για τη δεσμίνη και την K8 φαίνεται πως το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται σε δομές εμβόλιμων δίσκων, από όπου η δεσμίνη απουσιάζει (κεφαλές βελών, Εικόνα 37).

Tnf^{Myh6}

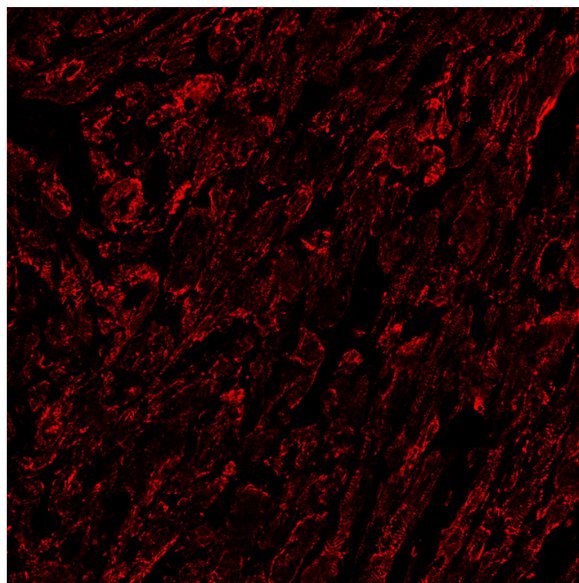
K8/Desmin



K8



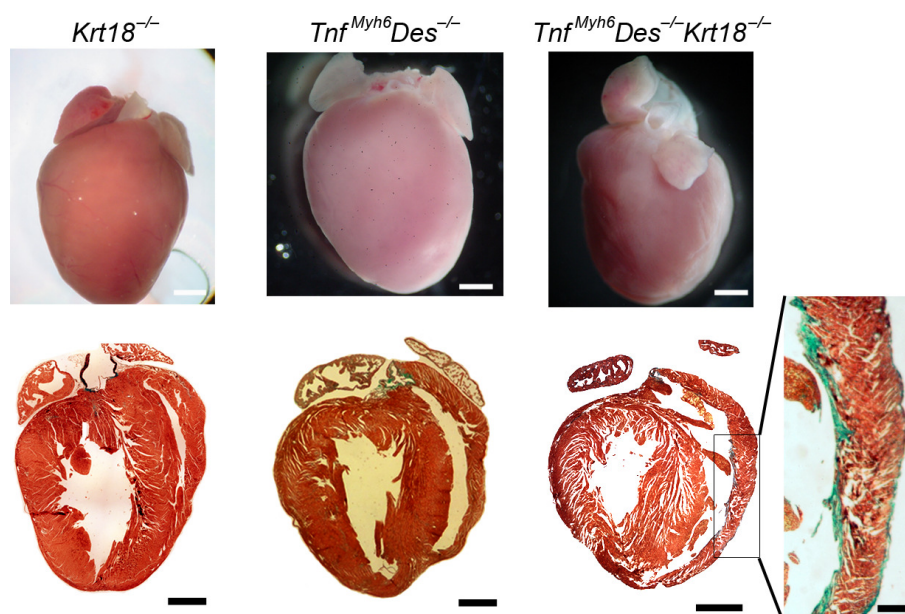
Desmin



Εικόνα 37. Το δίκτυο K8/K18 παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδικότητα εντοπισμού στους εμβόλιμους δίσκους σε σύγκριση με τη δεσμίνη στο MHCsTNFα μυοκάρδιο. Ανοσοφθορισμός για τις K8 και δεσμίνη σε καρδιακές τομές MHCsTNFα ποντικών δείχνουν τον εντοπισμό του δικτύου K8/K18 στους εμβόλιμους δίσκους όπου απουσιάζει σε μεγάλο βαθμό το δίκτυο της δεσμίνης. Μπάρα κλίμακας: 40 μm.

12 Το δίκτυο K8/K18 παρουσιάζει καρδιοπροστατευτική δράση στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντίκια.

Για τη μελέτη των λειτουργικών χαρακτηριστικών του δικτύου K8/K18 στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, δημιουργήθηκε το μοντέλο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$, με ελεγχόμενες διασταυρώσεις του $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ με το $Krt18^{-/-}$ γενετικό μοντέλο (Magin, Schroder et al. 1998). Απώλεια του δικτύου K8/K18 οδηγεί σε σημαντική χειροτέρευση της καρδιακής λειτουργίας του $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μοντέλου.

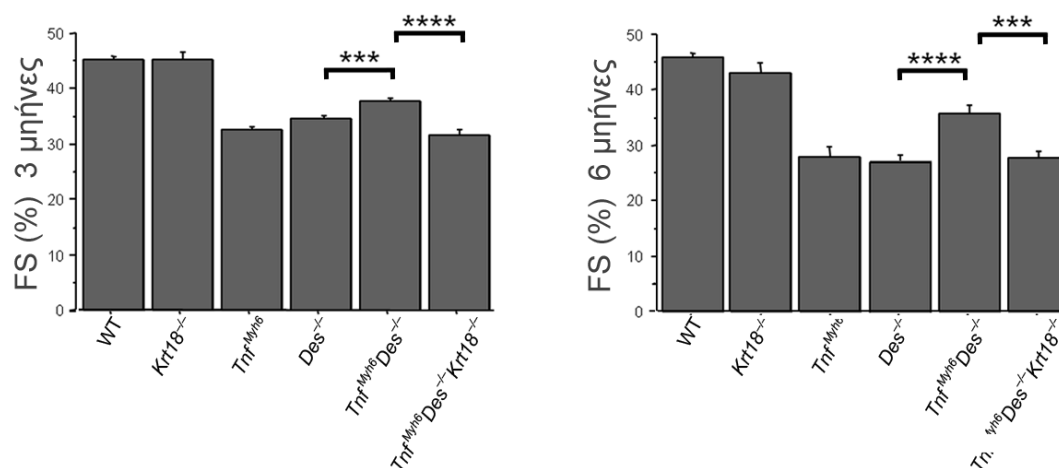


Εικόνα 38. Η έλλειψη του δικτύου K8/K18 προκαλεί ιστολογικές ανωμαλίες στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο. Μορφολογική (πάνω) και ιστολογική ανάλυση με χρώση Masson (κάτω) δείχνει ινωτικές περιοχές, εκτός της διάμεση ίνωσης, στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ μυοκάρδιο που απουσιάζουν από το $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο. Μπάρα κλίμακας: 1 mm (μεγέθυνση: 250 μm).

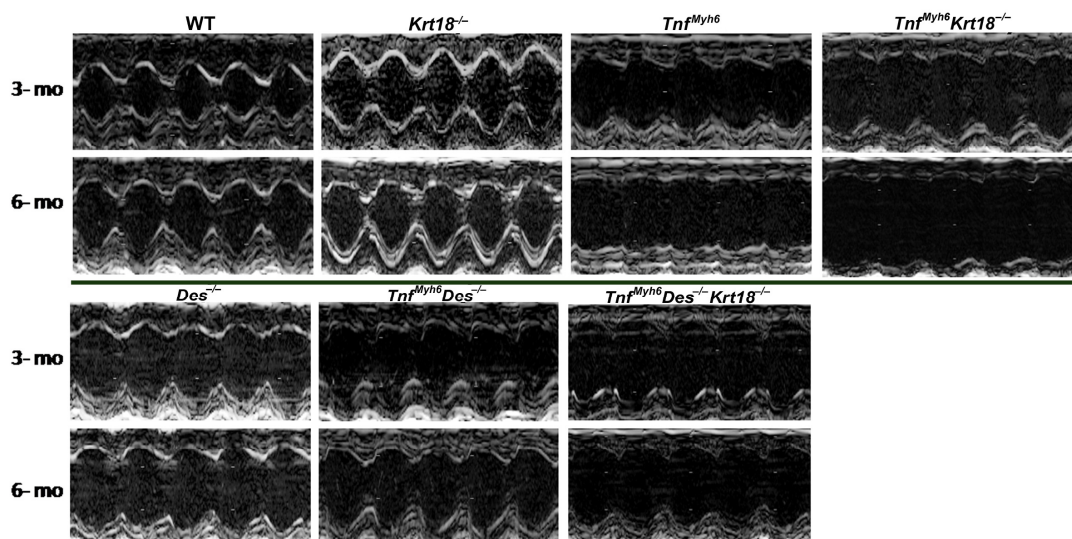
Μορφολογικά οι $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ δεν εμφανίζουν ασβεστίνωση ή κάποιο εμφανές παθολογικό πρότυπο, αλλά ιστολογικά φαίνεται ένας διατακτικός φαινότυπος, με λέπτυνση των τοιχωμάτων και ινωτικές περιοχές με «ίνωση αναπλήρωσης» επιπλέον της διάμεσης ίνωσης (Εικόνα 38).

Μέσω ανάλυσης ηχοκαρδιογραφίας (2D-Directed M-Mode echocardiography) καταδεικνύεται η στατιστικά σημαντική ελάττωση του ποσοστού συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (FS) στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε σύγκριση με το $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο σε ποντίκια ηλικίας 3ών μηνών (31.64 και 37.69, αντίστοιχα)(P-value<0.01) (Εικόνα 39 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1). Σε ηλικία 6 μηνών η χειρότερηση της καρδιακής λειτουργίας είναι ακόμα μεγαλύτερου βαθμού (27.68 και 35.73, στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε σύγκριση με το $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, αντίστοιχα)(P-value<0.01).

α



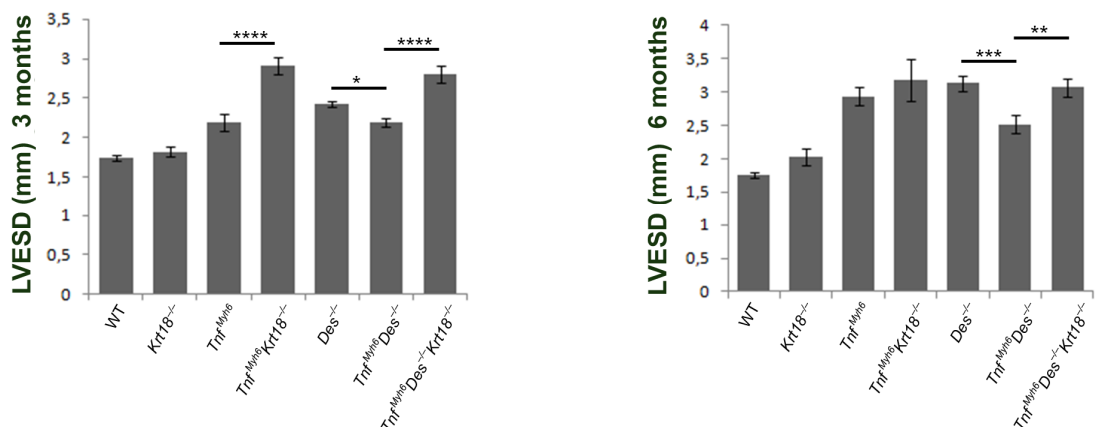
β



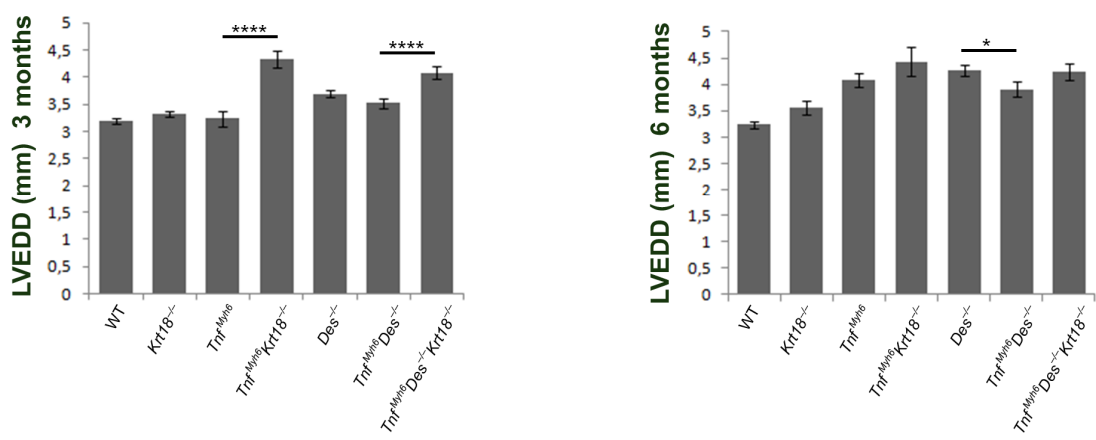
Εικόνα 39. Η καρδιακή λειτουργία των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών χειροτερεύει στην έλλειψη του δικτύου K8/K18. (α) Ποσοστό συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (Fractional Shortening, FS %) ποντικών ηλικίας 3ών κι 6 μηνών μέσω ανάλυσης ηχοκαρδιογραφίας. Two-sided P-value: $**<0.01$, $***<0.001$, $****<0.0001$ (oneway ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test). (β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες των ηχοκαρδιογραφημάτων μέσω ανάλυσης υπερηχογραφίας (M-Mode 2D-Directed).

Επιπλέον στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται στην αύξηση της διάτασης της καρδιάς του $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε σύγκριση με το $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μοντέλο. Οι ηχοκαρδιογραφικές παράμετροι μέτρησης της τελοσυστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (Left Ventricular End Diastolic Diameter, LVEDS) και της τελοδιαστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (Left Ventricular End Diastolic Diameter, LVEDD) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ μοντέλο, αποδεικνύοντας αυξημένη διάταση μυοκαρδίου (Εικόνα 40).

(α)



(β)



Εικόνα 40. Το μυοκάρδιο των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ ποντικών παρουσιάζει αυξημένη διάταση σε σύγκριση με τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$. Μετρήσεις της τελοσυστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVESD) (α) και της τελοδιαστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVEDD) (β) όπου φαίνεται η στατιστικά σημαντική αύξησή τους στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε σύγκριση με το μυοκάρδιο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ σε ηλικίες 3ών κι 6 μηνών μέσω ανάλυσης ηχοκαρδιογραφίας. Two-sided P-value: **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001 (oneway ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test).

13 Η έλλειψη του δικτύου K8/K18 οδηγεί σε αύξηση της διάτασης του MHCsTNFα μυοκαρδίου.

Η έλλειψη του δικτύου K8/K18 στο MHCsTNFα μυοκάρδιο ($Tnf^{Myh6}Krt18^{-/-}$ μοντέλο), δεν οδηγεί σε σημαντικές διαφορές της καρδιακής λειτουργίας, όπως

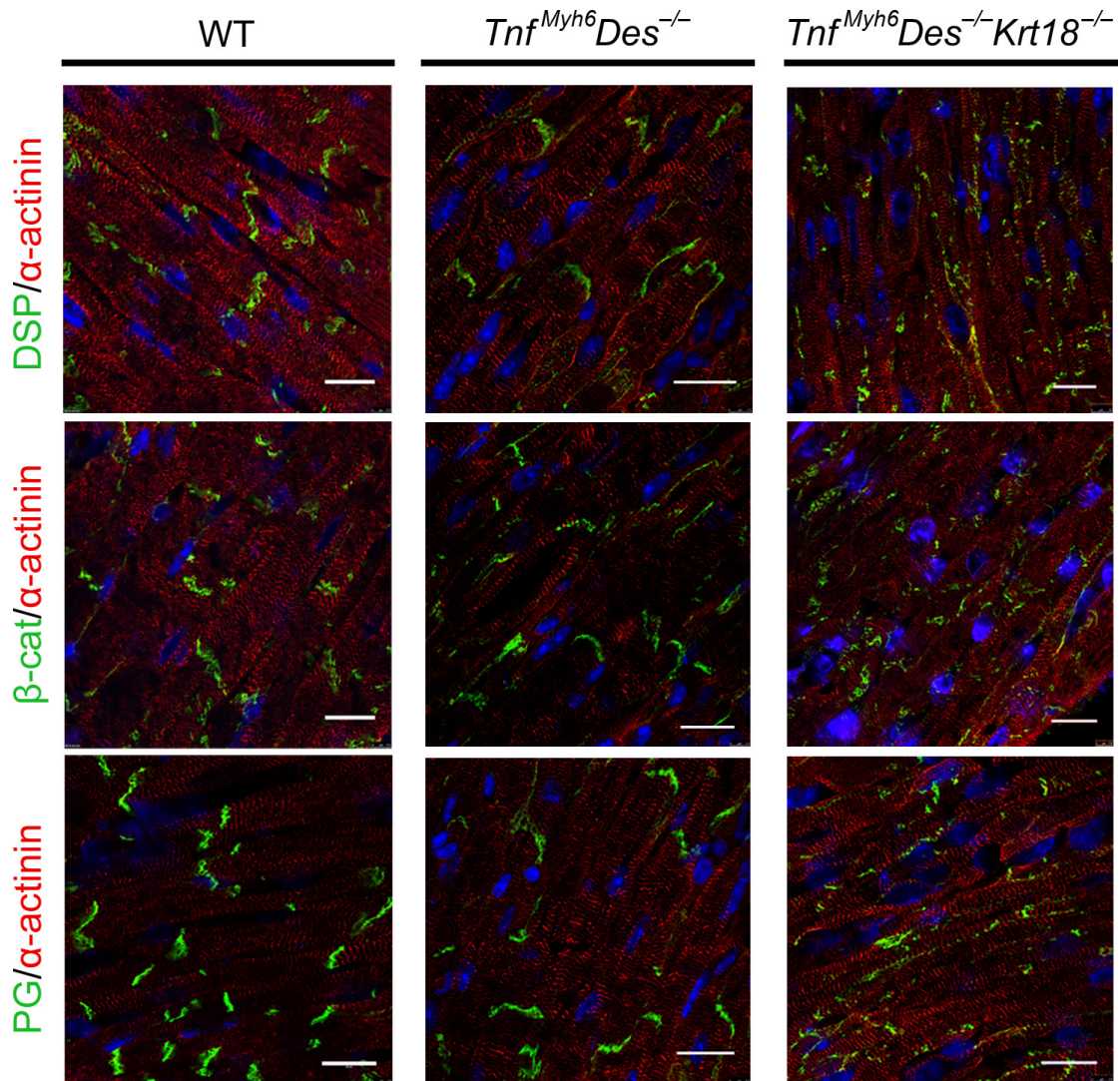
φαίνεται από την ηχοκαρδιογραφική ανάλυση και συγκεκριμένα από τις μετρήσεις του ποσοστού συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (Fractional Shortening, FS %) (Εικόνα 39).

Ωστόσο, το μυοκάρδιο του $Tnf^{Myh6}Krt18^{-/-}$ ποντικού παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη διάταση σε σύγκριση με το MHCsTNFα. Συγκεκριμένα, ανάλυση ηχοκαρδιογραφίας για τους δείκτες της τελοσυστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVESD) και της τελοδιαστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVEDD) δείχνει τη στατιστικά σημαντική αύξηση της διάτασης στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε σύγκριση με τα MHCsTNFα ποντίκια ηλικίας 3ών μηνών (2.91 και 2.19, αντίστοιχα)(P-value<0.0001)(Εικόνα 40 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1). Σε ποντίκια ηλικίας 6 μηνών τα $Tnf^{Myh6}Krt18^{-/-}$ ποντίκια εμφανίζουν επίσης αυξημένη διάταση σε σύγκριση με τα MHCsTNFα, αλλά χωρίς η διαφορά να καλύπτει τα κριτήρια στατιστικής σημαντικότητας (Συμπληρωματικός Πίνακας 1).

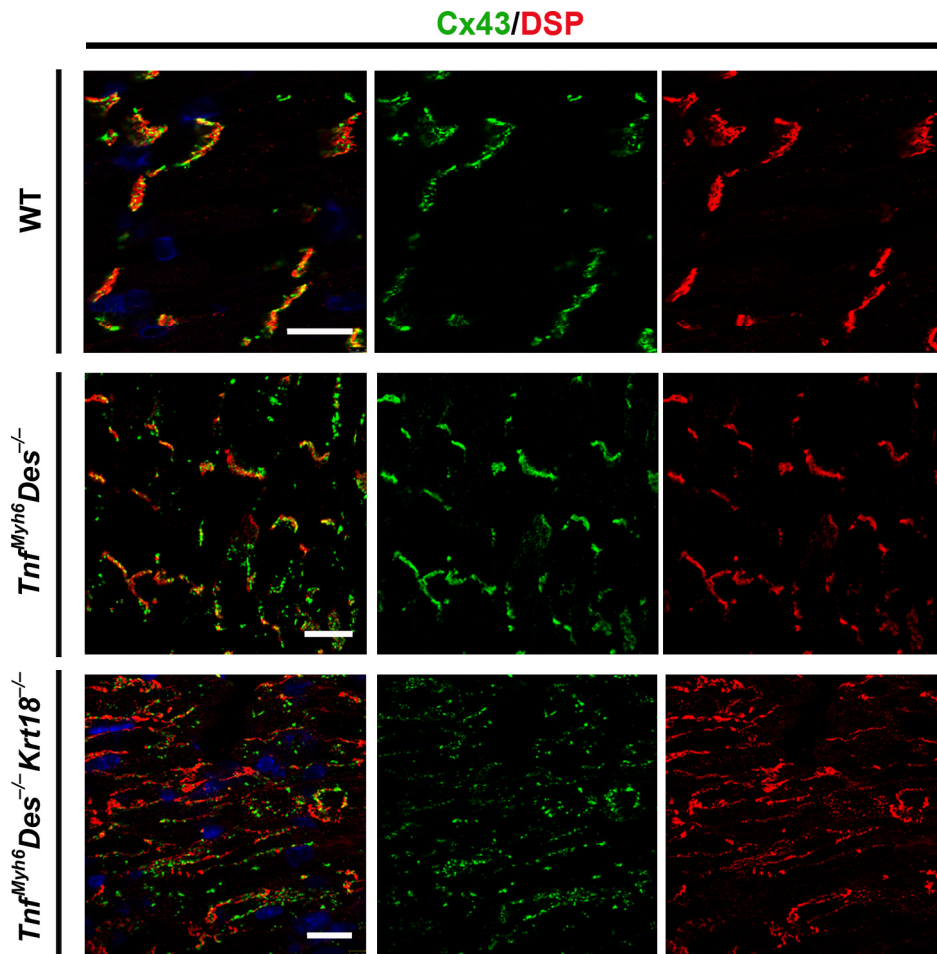
14 Η καρδιοπροστατευτική δράση του δικτύου K8/K18 περιλαμβάνει την διατήρηση οργάνωσης και δομής των εμβόλιμων δίσκων.

Για τη μελέτη των μηχανισμών καρδιοπροστασίας του δικτύου K8/K18 στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κυτταρικών και υποκυτταρικών χαρακτηριστικών του μυοκαρδίου του $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ μοντέλου.

Μελέτες μέσω ανοσοφθορισμού για τα χαρακτηριστικά των δομών των εμβόλιμων δίσκων στα καρδιοκύτταρα των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ ποντικών, δείχνουν σημαντικές ανωμαλίες. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες των δεσμοσωμάτων (δεσμοπλακίνη, πλακογλοβίνη) και των συνδέσμων προσκόλλησης (β-κατενίνη) εμφανίζουν διαταραγμένο πρότυπο εντόπισης στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ καρδιοκύτταρα σε σχέση με τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$, παρουσιάζοντας αδυναμία στόχευσης στις δομές των εμβόλιμων δίσκων (Εικόνα 41). Ελαττωματική παρουσιάζεται και η εντόπιση της πρωτεΐνης κονεξίνης 43 στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$, σε σύγκριση με τα WT και $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ καρδιοκύτταρα (Εικόνα 42). Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζονται πλευρικά των καρδιοκυττάρων σε δομές που δεν ομοιάζουν με συμπαγείς δομές εμβόλιμων δίσκων, δηλώνοντας τη διατάραξη της δομής και οργάνωσης των εμβόλιμων δίσκων στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ μυοκάρδιο.



Εικόνα 41. Η τοπολογία πρωτεϊνών των εμβόλιμων δίσκων εμφανίζεται διαταραγμένη στα καρδιοκύτταρα των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* σε σύγκριση με τα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}*. Μελέτες ανοσοφθορισμού για τις πρωτεΐνες-συστατικά τω εμβόλιμων δίσκων, όπως η δεσμοπλακίνη (DSP), β -κατενίνη (β -cat) και πλακογλοβίνη (PG) σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 3-μηνών. Η πρωτεΐνη των μυοϊνιδίων α -ακτινίνη (α -actinin) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας της τομής. Μπάρες κλίμακας: 20 μ m.

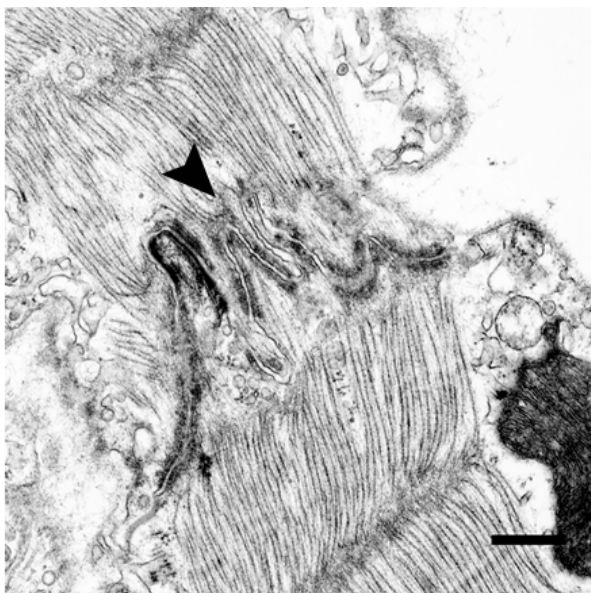


Εικόνα 42. Η πρωτεΐνη κονεξίνη 43 των εμβόλιμων δίσκων εμφανίζεται διαταραγμένη στα καρδιοκύτταρα των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε σύγκριση με τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$. Μελέτες ανοσοφθορισμού για τις πρωτεΐνες κονεξίνη 43 (Cx43) και δεσμοπλακίνη (DSP) δείχνει τη διατάραξη των δομών των εμβόλιμων δίσκων στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ καρδιοκύτταρα, σε αντίθεση με τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και WT καρδιοκύτταρα. Μπάρες κλίμακας: 20 μ m.

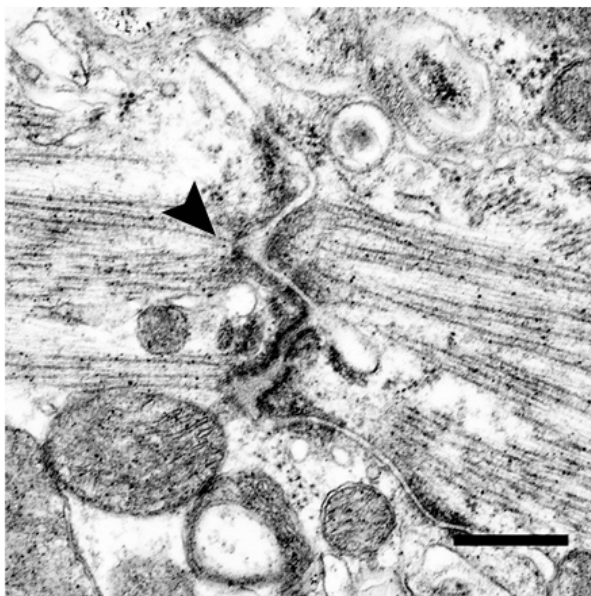
Επιπλέον η ελαττωματική οργάνωση των δομών των εμβόλιμων δίσκων στο $TnfMyh6Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ μυοκάρδιο αποδεικνύεται και από μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Στην Εικόνα 43 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές δομές εμβόλιμων δίσκων για τα καρδιοκύτταρα των ποντικών WT, $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$. Στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ καρδιοκύτταρα οι εμβόλιμοι δίσκοι παρουσιάζουν σημαντική αποδιοργάνωση, με κομμάτια δομών εμβόλιμων δίσκων πλευρικά των καρδιοκυττάρων, ασυνέχειες και γενικότερες δομικές ανωμαλίες, συγκριτικά με τις χαρακτηριστικές δομές φυσιολογικών εμβόλιμων δίσκων των WT και $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκυττάρων (Εικόνες 43 και 44). Επιπλέον στην Εικόνα 44

φαίνεται η ελαττωματική στόχευση των πλακών (συμπαγείς σκούρες δομές) πλαγίως των καρδιοκυττάρων, σε δομές που πιθανόν είναι διαταραγμένοι εμβόλιμοι δίσκοι (κεφαλές βελών).

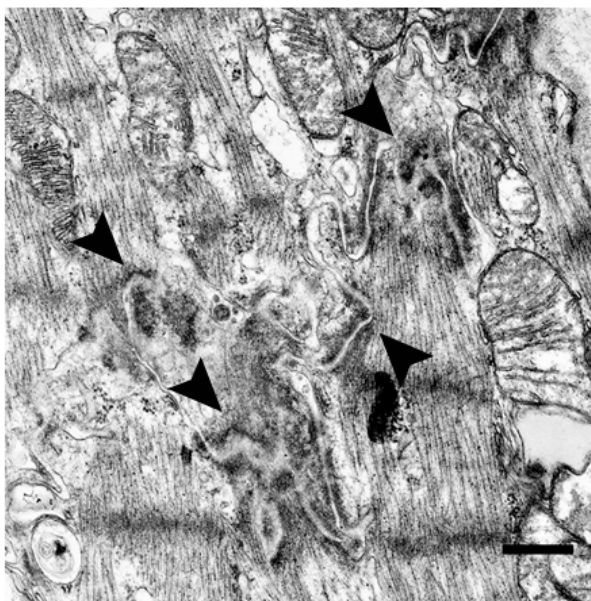
WT



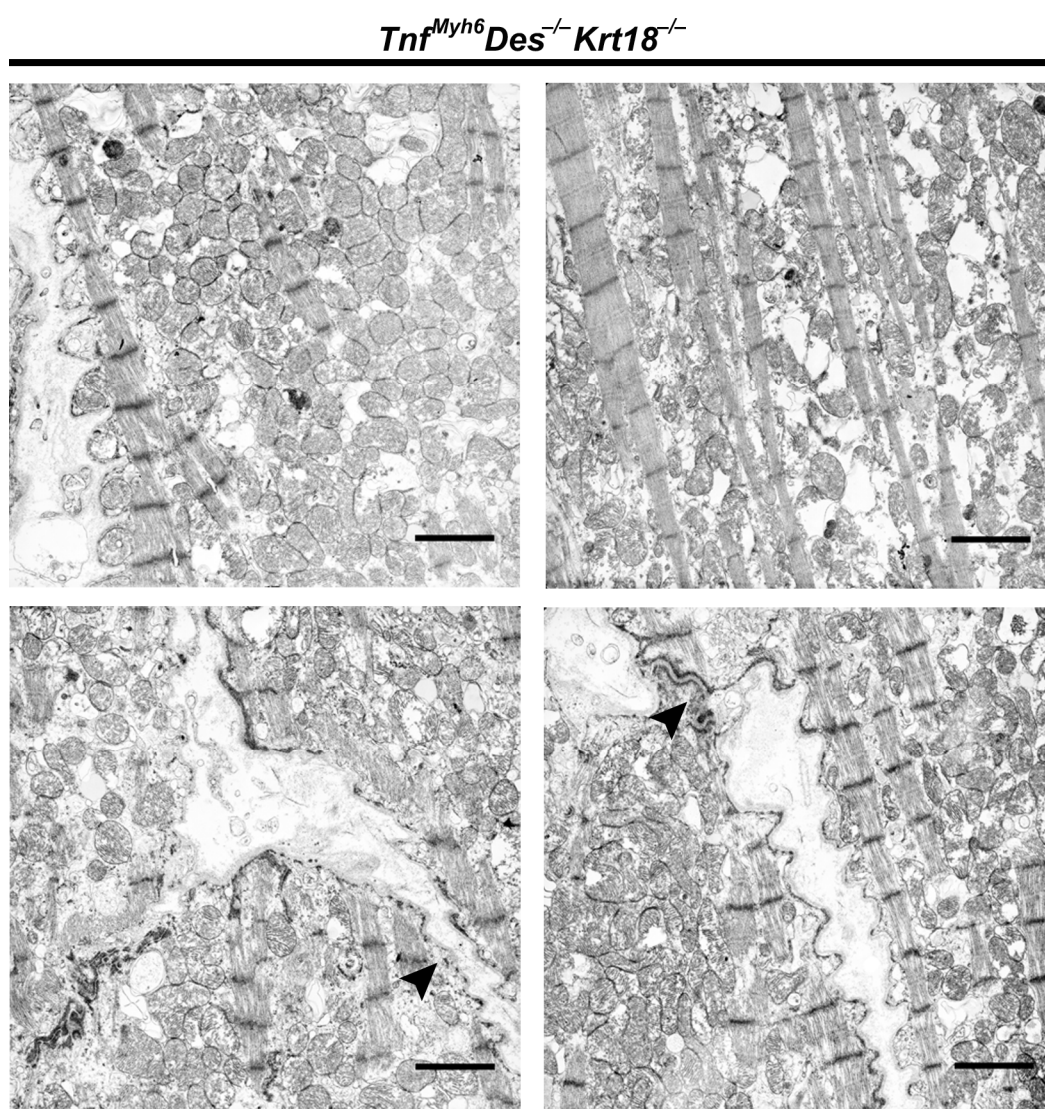
Tnf^{Myh6}*Des*^{-/-}



Tnf^{Myh6}*Des*^{-/-}*Krt18*^{-/-}



Εικόνα 43. Η δομή των εμβόλιμων δίσκων είναι διαταραγμένη στα καρδιοκύτταρα των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε σύγκριση με τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Η χαρακτηριστική δομή των εμβόλιμων δίσκων όπως φαίνεται στα WT και $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιοκύτταρα παρουσιάζεται διαταραγμένη στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ (κεφαλές βέλους). Μπάρες κλίμακας: 500 nm.



Εικόνα 44. Ανάλυση υπερδομής των καρδιοκυττάρων των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ ποντικών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Παρουσιάζονται οι εκτεταμένες ανωμαλίες των εμβόλιμων δίσκων (κεφαλές βέλους). Επιπλέον αναδεικνύονται οι

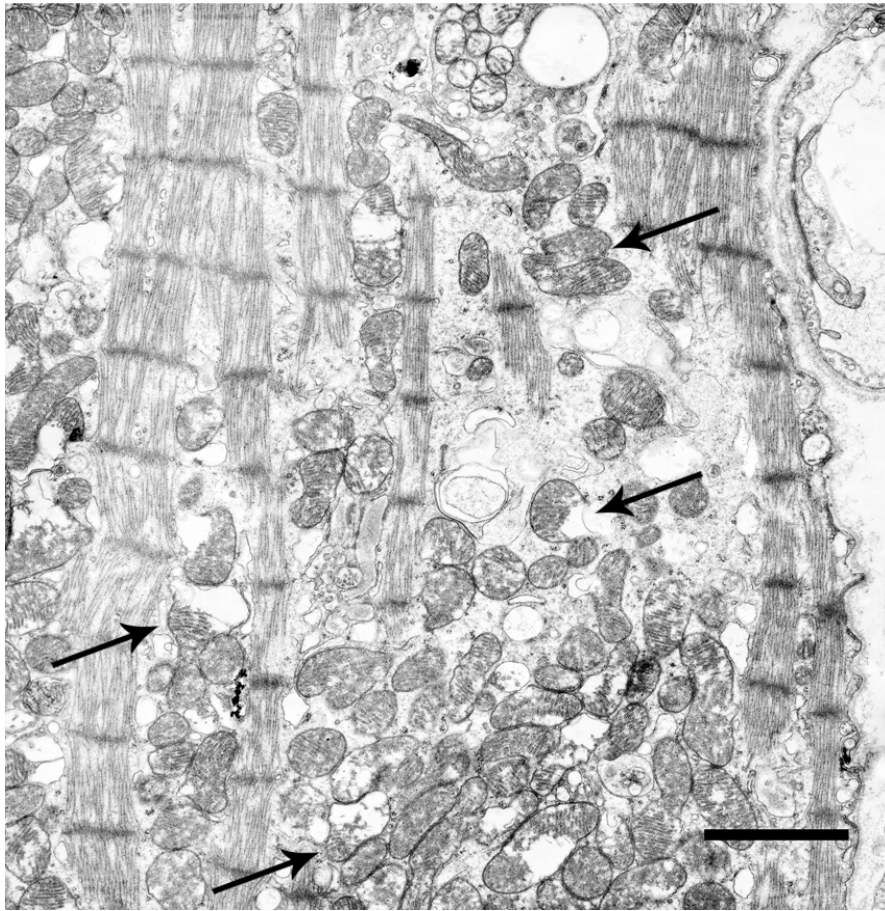
ανώμαλη μορφολογία των δομών των μυοϊνιδίων και μιτοχονδρίων. Μπάρες κλίμακας: 2 μm .

15 Η ρύθμιση της δομής και της οργάνωσης των μιτοχονδρίων συμμετέχει στην καρδιοπροστατευτική δράση του δικτύου K8/K18.

Η μελέτη των υποκυτταρικών χαρακτηριστικών των καρδιοκυττάρων του $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ μυοκαρδίου μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, αναδεικνύει επιπλέον δομικές ανωμαλίες στο επίπεδο της οργάνωσης των μιτοχονδρίων και των μυοϊνιδίων.

Συγκεκριμένα, ανωμαλίες στη δομή, οργάνωση και μορφολογία των μιτοχονδρίων μυοκάρδιο αποτελούν κεντρικό χαρακτηριστικό στην υπερδομή των καρδιοκυττάρων των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ ποντικών (Εικόνες 44 και 45). Τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται αποδιοργανωμένα και σε συσσωματώματα, με διαταραγμένες μεμβράνες και ανωμαλίες στη σύσταση της μιτοχονδριακής μήτρας (βέλη, Εικόνα 45). Επίσης, τα μυοϊνίδια εμφανίζουν ασυνέχειες και ανώμαλη μορφολογία στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ καρδιοκύτταρα.

Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}



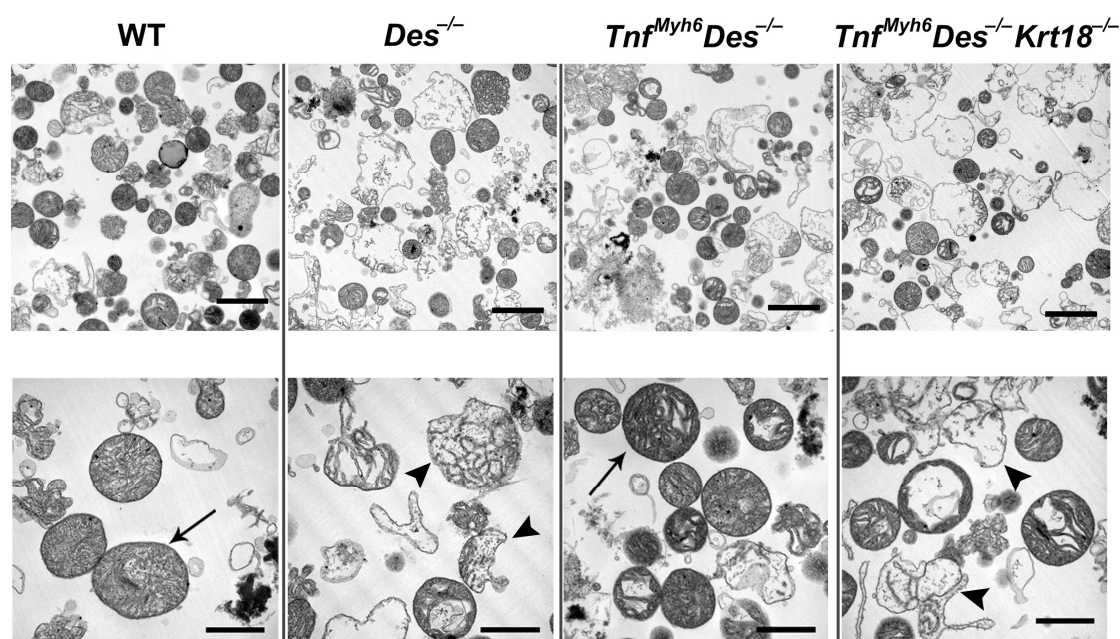
Εικόνα 45. Τα μιτοχόνδρια των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* καρδιοκυττάρων παρουσιάζουν εκτεταμένες δομικές και μορφολογικές ανωμαλίες. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε καρδιακές τομές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Η χαρακτηριστική δομή των εμβόλιμων δίσκων όπως φαίνεται στα WT και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* καρδιοκύτταρα παρουσιάζεται διαταραγμένη στα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* (κεφαλές βέλους). Μπάρες κλίμακας: 2 μ m.

16 Το δίκτυο K8/K18 συμμετέχει στη διατήρηση των λειτουργικών ιδιοτήτων των καρδιακών μιτοχονδρίων στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο.

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η οργάνωση και η μορφολογία των μιτοχονδρίων παρουσιάζουν εκτεταμένες ανωμαλίες στα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}*, σε αντίθεση με τα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* καρδιοκύτταρα. Η μελέτη λειτουργικών

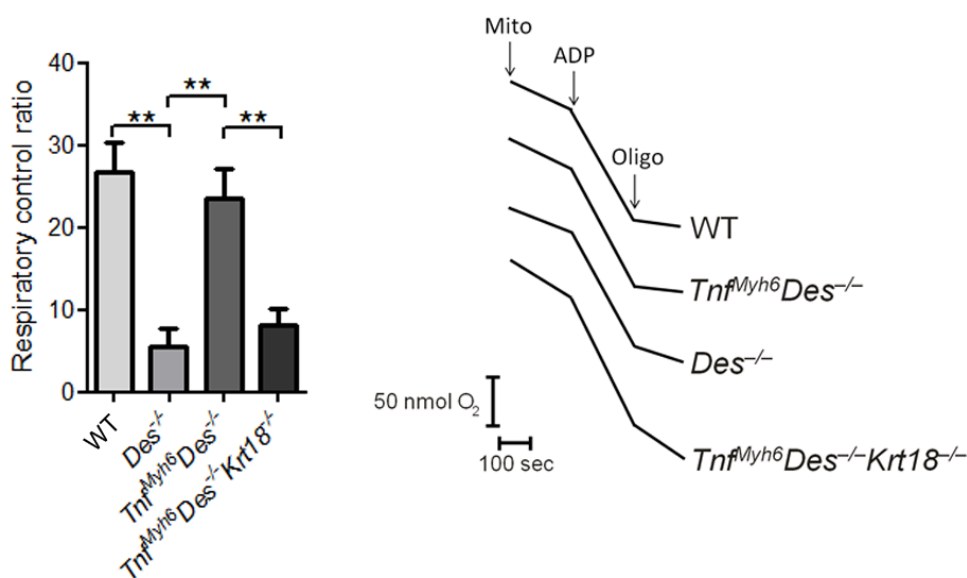
χαρακτηριστικών των καρδιακών μιτοχονδρίων δείχνει ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης της μιτοχονδρίων από το δίκτυο K8/18, καθώς η έλλειψη του δικτύου K8/K18 προκαλεί διαταραχές στις λειτουργικές ιδιότητες των καρδιακών μιτοχονδρίων του *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκαρδίου

Συγκεκριμένα, η σε βάθος ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των καρδιακών μιτοχονδρίων, με συνδυασμό απομόνωσης ανέπαφων καρδιακών μιτοχονδρίων και ηλεκτρονική μικροσκοπία (Εικόνα 46), υποστηρίζει τα αποτελέσματα των μορφολογικών ανωμαλιών στα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* καρδιοκυττάρων, που συζητήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Τα μιτοχόνδρια από τις *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* καρδιές εμφανίζονται ακανόνιστου σχήματος, με εμφανώς διαταραγμένη μιτοχονδριακή μήτρα και σε πολλές περιπτώσεις με μερικώς ή ολικώς διαρρηγμένη μεμβράνη (μιτοχόνδρια «Κλάσης-III» ή «Κλάσης-IV», σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά (Scorrano, Ashiya et al. 2002), κεφαλές βελών στην Εικόνα 46), όπως τα μιτοχόνδρια των *Des^{-/-}* καρδιοκυττάρων. Η σύγκριση των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* με τα εμφανώς βελτιωμένα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* (βέλη στην Εικόνα 46) καρδιακά μιτοχόνδρια υποστηρίζουν έμμεσα έναν μηχανισμό ρύθμισής τους από το δίκτυο K8/K18.



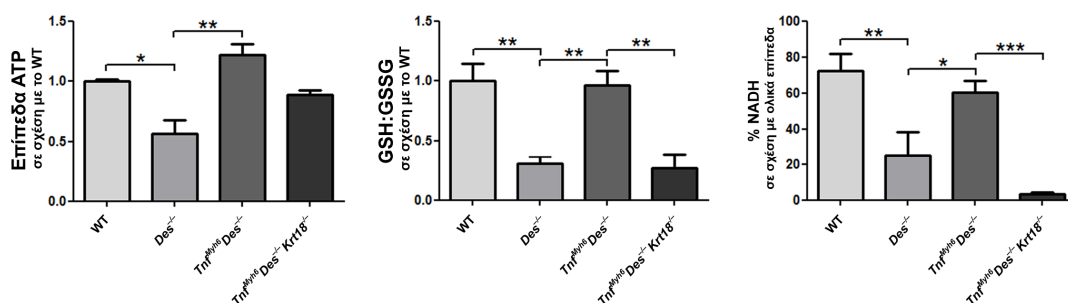
Εικόνα 46. Μορφολογική ανάλυση απομονωμένων καρδιακών μιτοχονδρίων. Μελέτες απομονωμένων καρδιακών μιτοχονδρίων από WT, *Des^{-/-}*, *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* ποντίκια ηλικίας 3ών μηνών, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τα μιτοχόνδρια των TNF *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* καρδιών παρουσιάζουν βελτιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με αυτά των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* και *Des^{-/-}*. Μπάρες κλίμακας: 2 μ m (πάνω σειρά), 1 μ m (κάτω σειρά).

Οι μελέτες των ιδιοτήτων της αναπνευστικής αλυσίδας αναδεικνύει τις λειτουργικές διαταραχές των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ καρδιακών μιτοχόνδριων. Μετρήσαμε την κατανάλωση οξυγόνου από απομονωμένα καρδιακά μιτοχόνδρια με τη μέθοδο της οξυγραφίας χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο τύπου «Clark» και αναλύσαμε τις ιδιότητες των βασικών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι ιδιότητες της αναπνευστικής αλυσίδας των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ μιτοχόνδριων παρουσιάζονται σημαντικά διαταραγμένες σε σχέση με τις ιδιότητες των WT και $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μιτοχόνδριων (Εικόνα 47), όπως δείχνουν οι μετρήσεις του λόγου “State-III/State-IV” (Respiratory Control Ratio, RCR), ο οποίος περιγράφεται στη λεζάντα της Εικόνας 47. Αντίθετα, όπως έχει ήδη συζητηθεί στην αντίστοιχη παράγραφο, τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μιτοχόνδρια εμφανίζουν φυσιολογικό λόγο RCR, κοντά στα επίπεδα των WT μιτοχόνδριων, παρουσιάζοντας φυσιολογικά λειτουργικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 47. Μελέτη ιδιοτήτων αναπνευστικής αλυσίδας μέσω μετρήσεων ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου. Μετρήσεις του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου με χρήση ηλεκτροδίου τύπου «Clark» σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στο γράφημα μέτρησης ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου (δεξιά), σε διάλυμα που περιέχει 5mM Γλουταμινικό οξύ - 5mM Μηλικό οξύ, προστέθηκαν 150 μg απομονωμένων μιτοχόνδριων (βέλος, “Mito”) και έπειτα από 3 min προστέθηκαν 400 μM ADP (“State-III”). Έπειτα από 3 min προστέθηκε 1 μM ολιγομυκίνης (βέλος, “Oligo”) (“State-IV”). Ο λόγος “State-III/State-IV” αναλύθηκε και παρουσιάζεται στο γράφημα (αριστερά).

Επιπλέον, μελετήθηκαν οι ιδιότητες των οξειδοαναγωγικών διεργασιών και τα επίπεδα του ATP των καρδιακών μιτοχονδρίων των μοντέλων μας, παρέχοντας επιπλέον πληροφορίες για το λειτουργικό προφίλ οξειδοαναγωγικής ικανότητάς τους (Εικόνα 48). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μορφολογικής ανάλυσης και της οξυγραφίας, τα απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιές $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ εμφανίζουν διαταραχές στα επίπεδα του ATP και της αναγωγικής ικανότητας, όπως μετρήθηκε από τα επίπεδα των ανηγμένων σε σχέση με τις οξειδωμένες μορφές της γλουταθειόνης (GSH) και των νουκλεοτιδίων πυριδίνης (NADH) (Εικόνα 48).



Εικόνα 48. Μελέτη επιπέδων ATP και οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων καρδιακών μιτοχονδρίων. Βιοχημική ανάλυση των επιπέδων ATP και οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιές ποντικών ηλικίας 3ών μηνών. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των επιπέδων του ATP (αριστερά), του λόγου της ανηγμένης (GSH) προς την οξειδωμένη (GSSG) μορφή της γλουταθειόνης (μέση) και του ποσοστού της ανηγμένης μορφής των νουκλεοτιδίων πυριδίνης (NADH) ως προς τα συνολικά τους επίπεδα (δεξιά). Two-sided P-values: $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ (one way ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test).

Οι διαταραχές στη λειτουργία των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}$ σε αντίθεση με τα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ καρδιακά μιτοχόνδρια προτείνουν έμμεσα έναν μηχανισμό ρύθμισής της μιτοχονδριακής λειτουργίας από το δίκτυο K8/K18 στο $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ μυοκάρδιο.

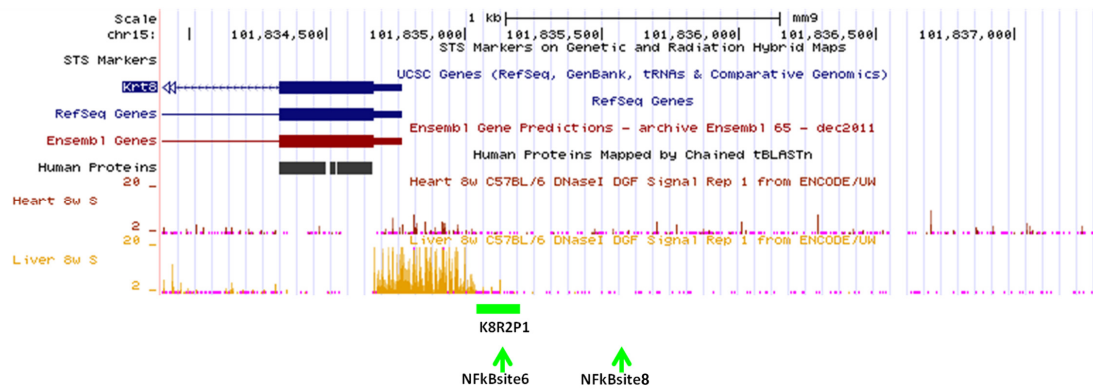
17 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στο μηχανισμό εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στο μυοκάρδιο.

17.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στο μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης του *Krt8* κατά την εκτοπική του έκφραση στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο.

Για τη μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της εκτοπικής έκφρασης των γονιδίων *Krt8* και *Krt18* πραγματοποιήθηκε συνδυασμός βιοπληροφορικής ανάλυσης και της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης από καρδιές ποντικών.

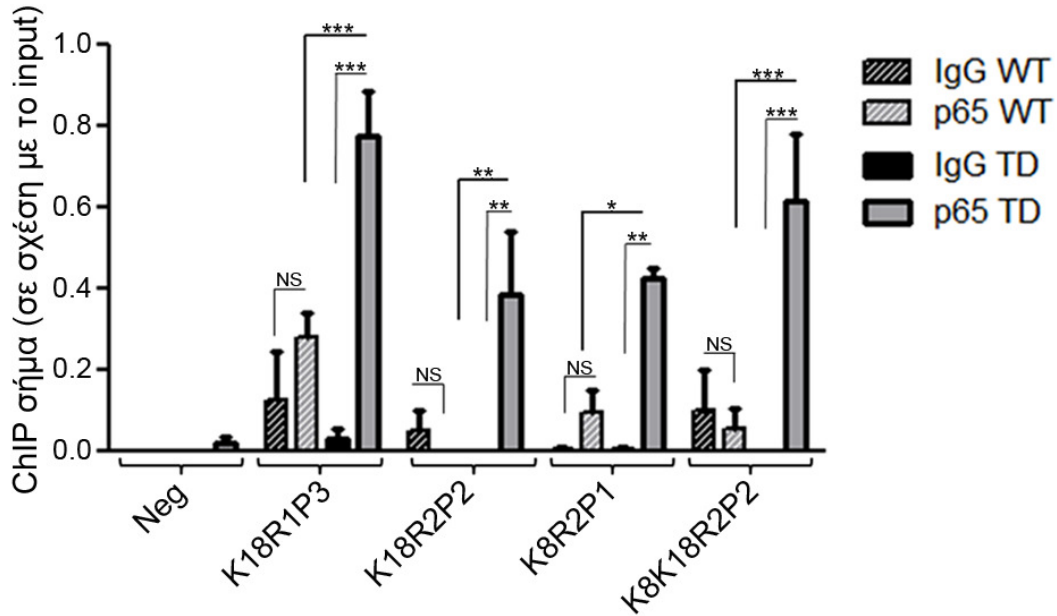
Η στρατηγική βιοπληροφορικής ανάλυσης περιλάμβανε την εκμετάλλευση δεδομένων του δικτύου ENCODE (ENCODE Consortium(Myers RM 2011; Rosenbloom, Sloan et al. 2013)) και την ενσωμάτωσή τους στην πλατφόρμα “UCSC Genome browser”, παράλληλα με την ανάλυση πιθανών θέσεων πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες “MatInspector Genomatix” (Συμπληρωματικός Πίνακας 3). Μέσω της ανάλυσης με την πλατφόρμα ENCODE/UCSC ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές ανοιχτής χρωματίνης στο γενετικό τόπο του *Krt8*, όπως δείχνουν τα πειράματα υπερευαισθησίας στη DNAάση (DNase Hypersensitivity) (Εικόνα 49). Οι περιοχές αυτές αντιστοιχούν σε πιθανές περιοχές γονιδιακής ρύθμισης, προσφέροντας τις κατάλληλες επιγενετικές συνθήκες για πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών για τους ιστούς του ήπατος (κίτρινο χρώμα, Εικόνα 49), όπου είναι βιβλιογραφικά γνωστό πως το *Krt8* εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό και της καρδιάς (κόκκινο χρώμα, Εικόνα 49), όπου το *Krt8* δεν εκφράζεται καθόλου, προσφέρει σημαντική πληροφορία για τον υποθετικό μηχανισμό εκτοπικής ρύθμισης του *Krt8* στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (αποτελέσματα ενήλικου ποντικίου ηλικίας 8 εβδομάδων). Στις συγκεκριμένες γενετικές περιοχές στοχεύθηκε η περαιτέρω μελέτη για συμμετοχή μεταγραφικών παραγόντων στη γονιδιακή ρύθμιση του *Krt8*.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ενδεχόμενη συμμετοχή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στη μεταγραφική ρύθμιση του *Krt8*. Η πλατφόρμα “MatInspector Genomatix” χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη πιθανών θέσεων πρόσδεσης του συγκεκριμένου παράγοντα σε περιοχές ρύθμισης του *Krt8*, περιορίζοντας επιπλέον τις περιοχές πιθανής ρύθμισης από τον παράγοντα αυτό. Στον Συμπληρωματικό Πίνακα 3 και στην Εικόνα 49 συνοψίζονται οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης του NF-κB στις περιοχές ρύθμισης του *Krt8*.



Εικόνα 49. Περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο γενετικό τόπο του γονιδίου *Krt8*. Βιοπληροφορική ανάλυση για τη ρύθμιση του *Krt8* στο ήπαρ (κίτρινο) και την καρδιά (κόκκινο) ενήλικου ποντικίου, μέσω της πλατφόρμας ENCODE. Στην εικόνα παροσιάζονται τα στοιχεία έναρξης της μεταγραφής-μετάφρασης και το πρώτο εξόνιο και ιντρόνιο στην αλληλουχία του *Krt8* όπως παρουσιάζονται στην πλατφόρμα UCSC (*Mus musculus*; NCBI37/mm9). Επισημαίνονται οι θέσεις πρόβλεψης για την πρόσδεση του παράγοντα p65 NF-κB μέσω του εργαλείου βιοπληροφορικής Genomatix (NFkBsite1 και NFkBsite8, πράσινο) και η θέση που βρέθηκε να προσδένει τον μεταγραφικό παράγοντα p65 NF-κB μέσω ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (“K8R2P1”, πράσινο).

Την παραπάνω στρατηγική με μέσα βιοπληροφορικής ανάλυσης, ακολούθησε μελέτη ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης από καρδιές WT και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}*, για την υπομονάδα p65 του παράγοντα NF-κB. Οι μελέτες αυτές δείχνουν συγκεκριμένα μια περιοχή στον εγγύς υποκινητή του *Krt8* όπου ο NF-κB φαίνεται να προσδένεται συμμετέχοντας στο μηχανισμό μεταγραφής του *Krt8* (Εικόνα 50). Επιπλέον στην περιοχή αυτή εμπεριέχεται και μια θέση πιθανής πρόσδεσης του NF-κB, όπως προέκυψε από τη μελέτη “MatInspector Genomatix” (Συμπληρωματικός Πίνακας 3). Είναι σημαντικό πως η πρόσδεση του παράγοντα NF-κB στην περιοχή αυτή του υποκινητή του *Krt8* συμβαίνει μόνο στο μυοκάρδιο του *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* και όχι στο WT μυοκάρδιο, ενισχύοντας τη συμμετοχή του στην εκτοπική έκφραση του γονιδίου αυτό στην *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* καρδιά.

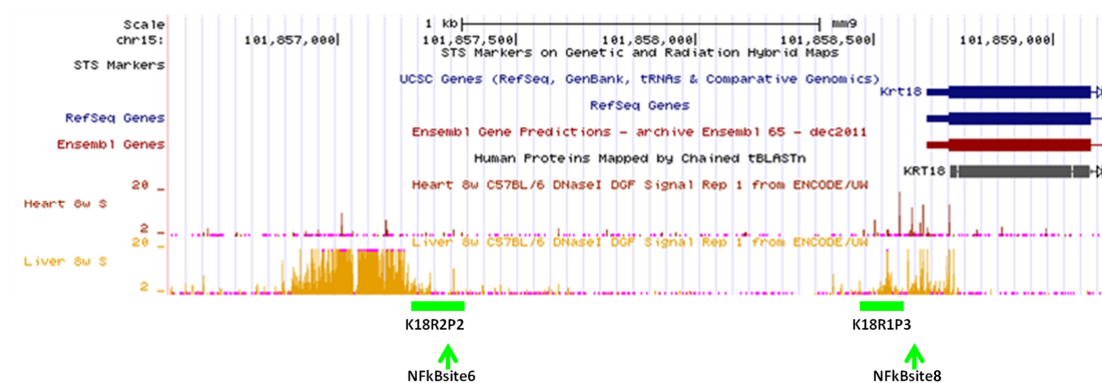


Εικόνα 50. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στη ρύθμιση της εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης για τον παράγοντα p65 NF-κB σε καρδιές WT και *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών ηλικίας 4^{ων} μηνών. Οι περιοχές “K8R2P1” για το *Krt8*, “K18R1P3” και “K18R2P2” για το *Krt18* και “K8K18R2P2” ανταποκρίνονται σε περιοχές θετικής πρόσδεσης για τον p65 NF-κB (στατιστικά σημαντικές διαφορές στην *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* χρωματίνη σε σχέση με το control αντίδρασης IgG και στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο σε σχέση με το WT χρωματίνη). Οι περιοχές αυτές αναλύονται στις Εικόνες 49, 51 και 52 και στον Συμπληρωματικό Πίνακα 3. Two-sided P-values: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 . (Two-way ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test).

17.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB συμμετέχει στο μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης του *Krt18* κατά την εκτοπική του έκφραση στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο.

Στην προηγούμενη παράγραφο περιγράφεται αναλυτικά η στρατηγικά που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του μηχανισμού γονιδιακής ρύθμισης για την εκτοπική έκφραση του *Krt8* στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο. Ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία, μελετήθηκε και ο μηχανισμός γονιδιακής ρύθμισης για την εκτοπική ρύθμιση του *Krt18* στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, δείχνουν δύο περιοχές στη γενετική περιοχή του *Krt18* όπου η χρωματίνη είναι ανοιχτή στο ήπαρ (κίτρινο χρώμα, Εικόνα 51) σε αντίθεση με την καρδιά (κόκκινο χρώμα, Εικόνα 51) και στις οποίες επίσης υπάρχουν πιθανές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα NF-κB (Συμπληρωματικός Πίνακας 3, Εικόνα 51), όπως προκύπτει από την ανάλυση “MatInspector Genomatix”. Με τη μέθοδο ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης από καρδιές ποντικών, αποδεικνύεται πως ο παράγοντας NF-κB προσδένεται στις περιοχές αυτές του εγγύς και του μακρινού υποκινητή του *Krt18*, μόνο στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* και όχι στο WT μυοκάρδιο (Εικόνα 51).

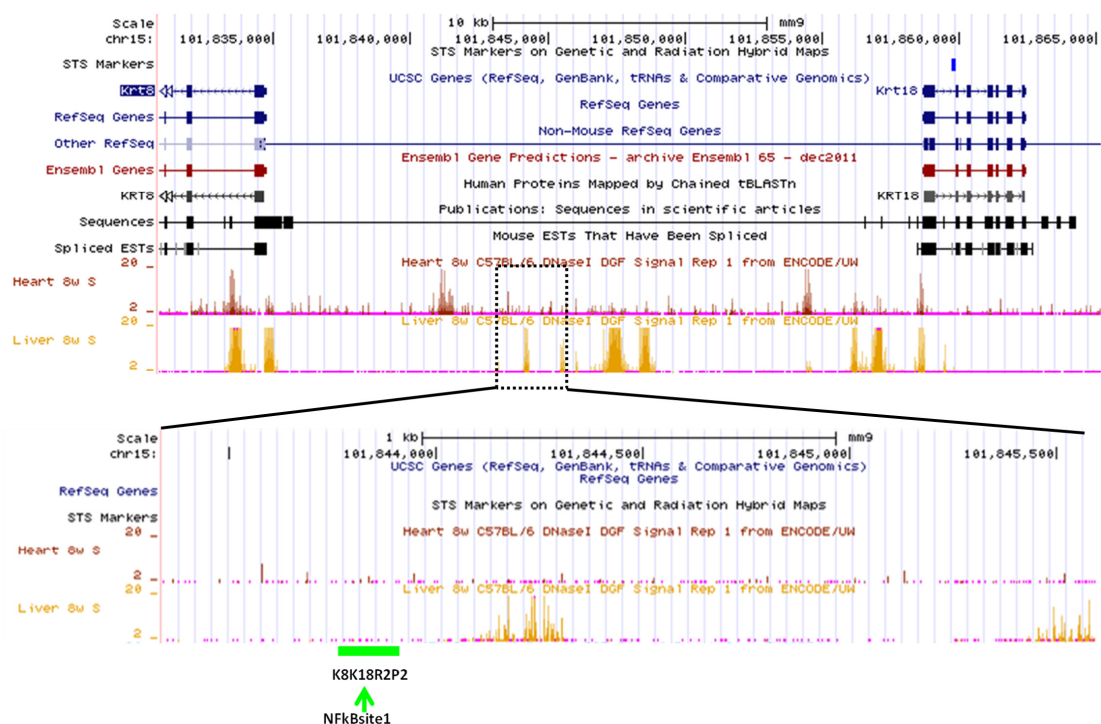


Εικόνα 51. Περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο γενετικό τόπο του γονιδίου *Krt18*. Βιοπληροφορική ανάλυση για τη ρύθμιση του *Krt18* στο ήπαρ (κίτρινο) και την καρδιά (κόκκινο) ενήλικου ποντικίου, μέσω της πλατφόρμας ENCODE. Στην εικόνα παροσιάζονται τα στοιχεία έναρξης της μεταγραφής-μετάφρασης και το πρώτο εξώνιο στην αλληλουχία του *Krt18* όπως παρουσιάζονται στην πλατφόρμα UCSC (*Mus musculus*; NCBI37/mm9). Επισημαίνονται οι θέσεις πρόβλεψης για την πρόσδεση του παράγοντα p65 NF-κB μέσω του εργαλείου βιοπληροφορικής Genomatix (NFkBsite6 και NFkBsite8, πράσινο) και οι θέσεις που βρέθηκαν να προσδένουν τον μεταγραφικό παράγοντα p65 NF-κB μέσω ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (“K18R2P2” και “K18R1P3”, πράσινο).

17.3 Ρυθμιστική περιοχή μεταξύ των *Krt8* και *Krt18* γενετικών τόπων σχετίζεται με τον παράγοντα NF-κΒ και εμφανίζει ενδεχόμενη συμμετοχή στην εκτοπική τους έκφραση στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο.

Σε συνέχεια της στρατηγικής που περιγράφεται αναλυτικά στην αντίστοιχη παράγραφο, για τη μελέτη του μηχανισμού γονιδιακής ρύθμισης της εκτοπικής έκφρασης του *Krt8* και *Krt18* στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο, βρέθηκε μια περιοχή πρόσδεσης από τον παράγοντα NF-κΒ σε γενετικό τόπο μεταξύ των γονιδίων *Krt8* και *Krt18*.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 52, ο NF-κΒ φαίνεται να προσδένεται στην περιοχή K8K18R2P2 στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο, σε αντίθεση με το WT. Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί σε γενετικό τόπο περίπου 12 kb από το σημείο έναρξης μεταγραφής του *Krt8* και περίπου 13 kbp από το σημείο έναρξης μεταγραφής του *Krt18* (Εικόνα 52). Στην περιοχή αυτή επίσης βρίσκεται θέση πιθανής πρόσδεσης του NF-κΒ, όπως όπως προκύπτει από την ανάλυση “MatInspector Genomatix” (Συμπληρωματικός Πίνακας 3, Εικόνα 52). Επιπλέον στην περιοχή αυτή η χρωματίνη περιέχει χαρακτηριστικά γενετικής ρύθμισης στο ήπαρ (κίτρινο χρώμα, Εικόνα 52), τα οποία απουσιάζουν σε ενήλικο ιστό καρδιάς (κόκκινο χρώμα, Εικόνα 52). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν συνολικά στο συμπέρασμα πως ο NF-κΒ συμμετέχει στη γονιδιακή ρύθμιση των *Krt8* και *Krt18* πιθανόν και μέσω της πρόσδεσής του σε αυτήν την απομακρυσμένη περιοχή μεταξύ των δύο γονιδίων στο χρωμόσωμα 15.



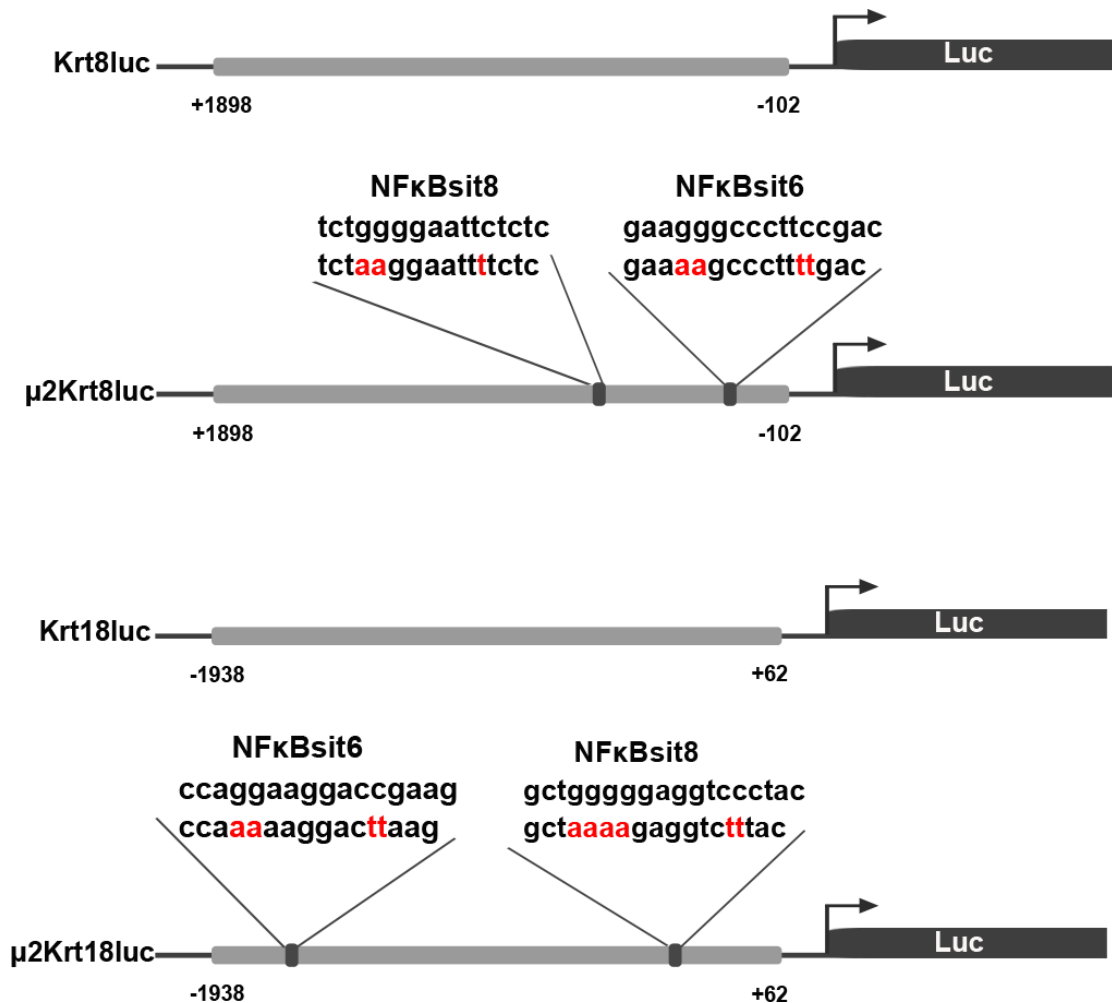
Εικόνα 52. Περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο γενετικό τόπο μεταξύ των γονιδίων *Krt18* και *Krt18*. Βιοπληροφορική ανάλυση για τη ρύθμιση των *Krt8* και *Krt18* στο ήπαρ (κίτρινο) και την καρδιά (κόκκινο) ενήλικου ποντικίου, μέσω της πλατφόρμας ENCODE. Στην εικόνα παροσιάζονται τα στοιχεία των *Krt18* και *Krt18* όπως παρουσιάζονται στην πλατφόρμα UCSC (*Mus musculus*; NCBI37/mm9). Στο κάτω τμήμα της εικόνας παρουσιάζεται με μεγαλύτερη μεγέθυνση η περιοχή που επισημαίνεται μεταξύ των δύο γονιδίων. Παρουσιάζεται η θέση πρόβλεψης για την πρόσδεση του παράγοντα p65 NF-κB μέσω του εργαλείου βιοπληροφορικής Genomatix (NFkBsite1, πράσινο) και η περιοχή στην οποία βρέθηκε να προσδένει ο μεταγραφικός παράγοντας p65 NF-κB μέσω ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (“K8K18R2P2”, πράσινο).

18 Η έκφραση των γονιδίων *Krt8* και *Krt18* ρυθμίζεται από τον παράγοντα NF-κB *in vitro*.

Σε συνέχεια της βιοπληροφορικής ανάλυσης και των *in vivo* πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τον p65 NF-κB όπου παρουσιάζεται πως ο παράγοντας NF-κB συμμετέχει στην ρύθμιση της εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο, αναλύσαμε τις ιδιότητες των στοιχείων ρύθμισης των γονιδίων αυτών σε *in vitro* σύστημα μελέτης.

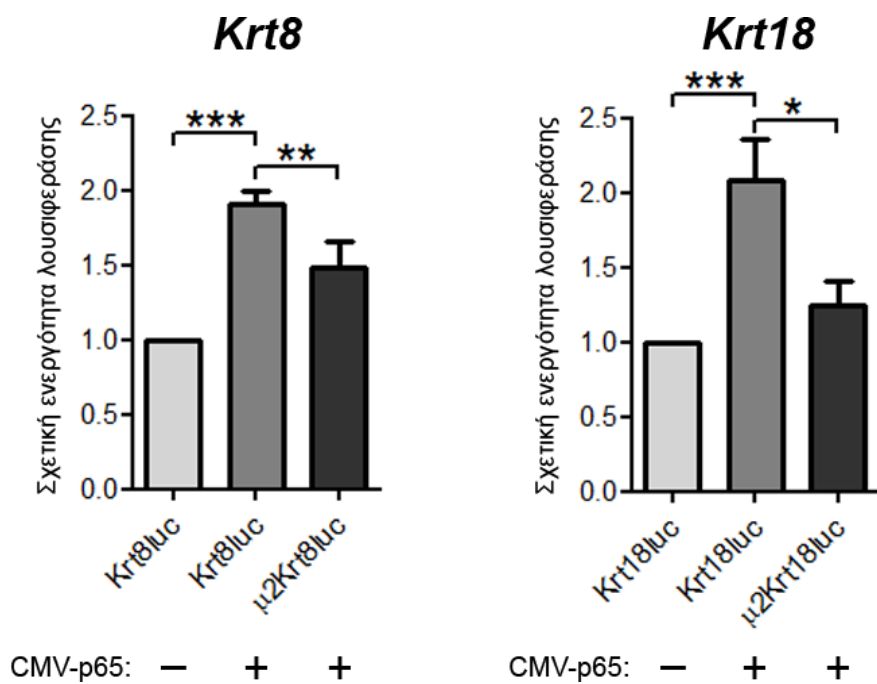
Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκε μοριακή στρατηγική σχηματισμού γενετικών κατασκευών για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* σε συστήματα κυτταρικών σειρών, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Με σκοπό τη μελέτη ενός ρεαλιστικού συστήματος κλωνοποιήθηκε ένα μεγάλο τμήμα της αλληλουχίας των *Krt8* και *Krt18* πίσω από το σημείο έναρξης της μετάφρασης, μεγέθους 2 kb, το οποίο περιλαμβάνει τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων όπως φαίνεται και από τις Εικόνες 49, 51 και 53. Τα στοιχεία αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή γενετικών κατασκευών που εκφράζουν το γονίδιο της πρωτεΐνης λουσιφεράσης, υπό τον έλεγχο των στοιχείων αυτών (K8Luc και K18Luc για τα *Krt8* και *Krt18*, αντίστοιχα, Εικόνα 53). Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* από τον παράγοντα NF-κB μελετήθηκε στη συνέχεια στην κυτταρική σειρά HEK293. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως ο παράγοντας p65

NF-κB επάγει την έκφραση κατά 23 % και 40 % για τα *Krt8* και *Krt18* αντίστοιχα (P-value<0.05) (Εικόνα 54). Για τον έλεγχο της πιστότητας των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα που πιστοποίησαν την ενεργότητα της πλασμιδιακής κατασκευής υπερέκφρασης του p65 που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες μας και άλλες στρατηγικές ελέγχου (Εικόνα 54).

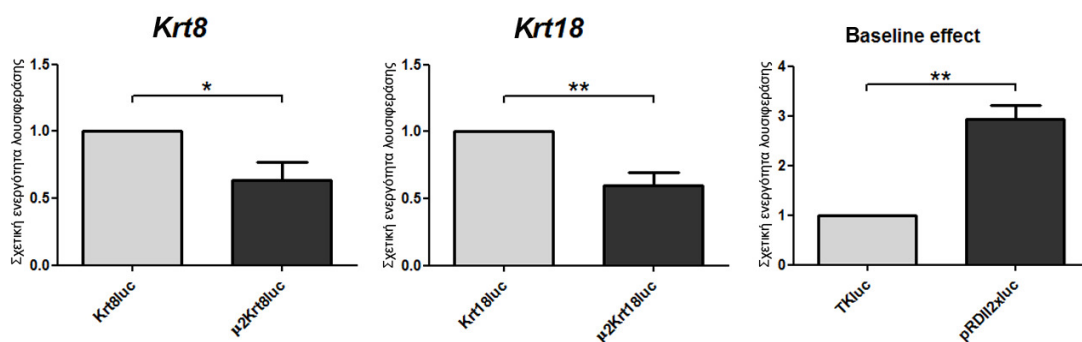


Εικόνα 53. Γενετικές κατασκευές μελέτης ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης με το σύστημα της λουσιφεράσης. Παρουσιάζονται τα μεγέθη των ρυθμιστικών περιοχών των *Krt8* και *Krt18* από την αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης (+1898 -102 για το *Krt8* και -1938 +62 για το *Krt18*) που κλωνοποιήθηκαν στο 5' του γονιδίου της λουσιφεράσης (“K8luc” κατασκευή για το *Krt8* και “K18luc” για το *Krt18*). Επίσης παρουσιάζεται η στρατηγική μεταλλαγμένης (κόκκινο) στα παραπάνω πλασμίδια για τη δημιουργία των μεταλλαγμένων κατασκευών (“μ2K8luc” κατασκευή για το K8luc και “μ2K18luc” για το *Krt18*).

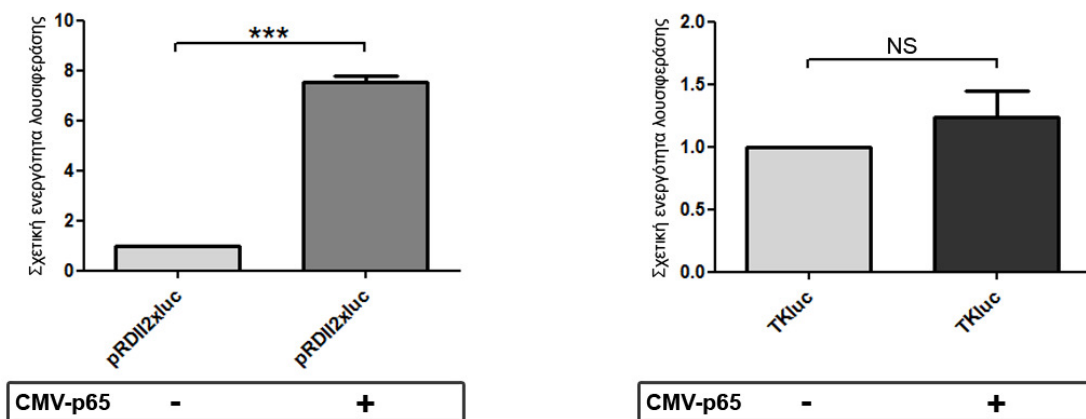
α



β



γ



Εικόνα 54. Ο παράγοντας p65 NF-κB συμμετέχει στην επαγωγή των *Krt8* και *Krt18 in vitro*. (α) Πειράματα μελέτης ρύθμισης έκφρασης μέσω του συστήματος της λουσιφεράσης, δείχνουν πως το πλασμίδιο υπερέκφραση p65 (CMV-p65) οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης των *Krt18* και *Krt18* στα HEK293 κύτταρα. Οι μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες κB θέσεις όπως αναλύεται στο κείμενο επιφέρουν μείωση της επαγωγής των *Krt18* και *Krt18*. (β) Πειράματα έκφρασης λουσιφεράσης χωρίς την υπερέκφραση p65 (CMV-p65), που δείχνουν πως οι μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες θέσεις μειώνουν την επαγωγή των *Krt18* και *Krt18*, κατά τη ρύθμισή τους από τους ενδογενείς παράγοντες του κυτταρικού συστήματος. (γ) Πειράματα έκφρασης λουσιφεράσης για την πιστοποίηση της ικανότητας ρύθμισης του πλασμιδίου CMV-p65, με χρήση του θετικού μάρτυρα (“pRDII2xluc”), ο οποίος φέρει 2 αντίγραφα της θέσης πρόσδεσης του NF-κB του εγγύς υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης-β του ανθρώπου, πριν από το γονίδιο της λουσιφεράσης (αριστερά). Πειράματα λουσιφεράσης για την πιστοποίηση της μη επαγωγής από το CMV-p65 του αρχικού πλασμιδίου (“TKluc”) που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των πλασμιδίων λουσιφεράσης. Ομαλοποίηση των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης της έκφρασης του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης. Two-sided P-values: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test).

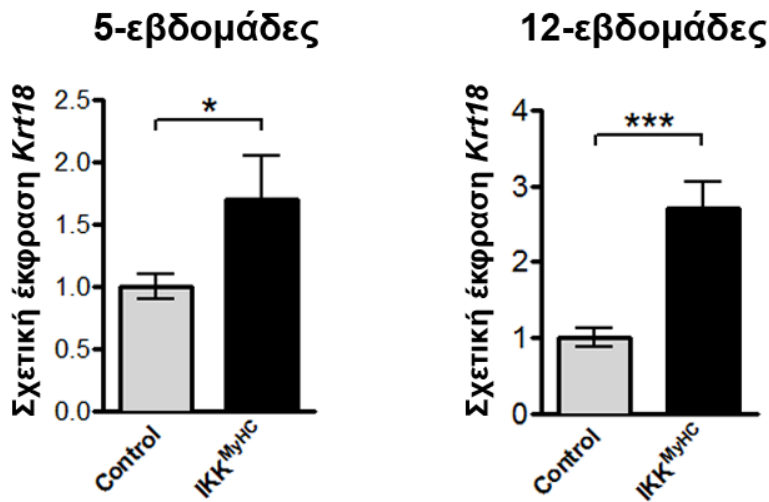
Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν γενετικές κατασκευές όμοιες με τις K8Luc και K18Luc αλλά με συγκεκριμένες μεταλλάξεις που καθιστούν ανενεργές τις θέσεις πρόσδεσης του NF-κB, στις συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης που βρέθηκαν να προσδέεται ο NF-κB από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (NfkBSite6 και NfkBSite8 για το *Krt8*, NfkBSite6 και NfkBSite8 για το *Krt18*, όπως παρουσιάζονται στις Εικόνες 49 και 51). Η στρατηγική κατασκευής των μεταλλαγμένων γενετικών κατασκευών παρουσιάζεται στην Εικόνα 53. Πειράματα μελέτης ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης μέσω του συστήματος της λουσιφεράσης με τις μεταλλαγμένες κατασκευές έδειξαν πως οι συγκεκριμένες θέσεις παίζουν ρόλο στην επαγωγή των *Krt8* και *Krt18* από τον παράγοντα NF-κB. Το συμπέρασμα αυτό προϋπτει καθώς στις ίδιες συνθήκες, μειώθηκε στατιστικά σημαντικά η επαγωγή του *Krt8* κατά και η επαγωγή του *Krt18*, στις μεταλλαγμένες κατασκευές από το πλασμίδιο υπερέκφρασης p65 (Εικόνα 54). Επιπλέον, η συμμετοχή των θέσεων αυτών στην επαγωγή των *Krt8* και *Krt18* επιβεβαιώθηκε στο ίδιο σύστημα μόνο από τη ρύθμιση των ενδογενών παραγόντων (Εικόνα 54).

19 Τα γονίδια *Krt8* και *Krt18* εκφράζονται στο μυοκάρδιο γενετικού μοντέλου με καρδιο-ειδική έκφραση συνεχώς ενεργοποιημένου IKK2.

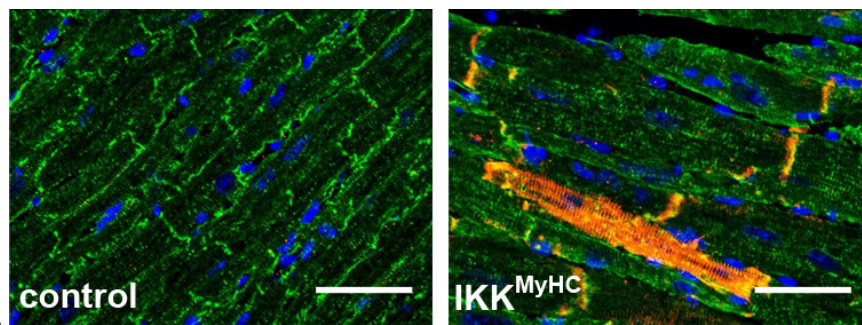
Σε συνέχεια των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και μελέτης γονιδιακής ρύθμισης *in vitro* μέσω του συστήματος της λουσιφεράσης, προχωρήσαμε σε εναλλακτική *in vivo* στρατηγική επιβεβαίωσης της συμμετοχής του παράγοντα NF-κΒ στην εκτοπική έκφραση των *Krt8* και *Krt18* στα μυοκάρδιο. Συγκεκριμένα μελετήσαμε την έκφραση των K8 και K18 σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού με καρδιο-ειδική έκφραση ενός τροποποιημένου μορίου IKK2, της υπέθυνης κινάσης για την ενεργοποίηση του κανονικού μονοπατιού NF-κΒ, ώστε να είναι συνεχώς ενεργοποιημένο (μοντέλο IKK^{MyHC}) (Maier, Schips et al. 2012). Στα καρδιοκύτταρα του μοντέλου αυτού η γενετική κατασκευή IKK2-CA (constitutively active IKK2) διατηρεί ενεργό το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κΒ, ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα λόγω συνεχούς φωσφορυλίωσης του IκΒ από τον IKK2.

Μέσω ανάλυσης γονιδιακής έκφραση με RT-PCR και πρωτεϊνικής έκφρασης και τοπολογίας μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού βρήκαμε πως στα καρδιοκύτταρα του IKK^{MyHC} μοντέλου εκφράζονται οι K8/K18 και παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή (Εικόνα 55 και 56), όπως στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α. Μελετήθηκε η έκφραση του *Krt18* σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, 5-εβδομάδες και 12-εβδομάδες μετά την ενεργοποίηση του διαγονιδίου, με την τελευταία ομάδα να αντιπροσωπεύει ποντίκια με έντονο φαινότυπο καρδιακής παθολογίας, σε αντίθεση με αυτά της πρώτης ομάδας, δεδομένου ότι ο φαινότυπος παρυσιάζεται κατά την 6^η-8^η εβδομάδα (Maier, Schips et al. 2012). Η έκφραση του γονιδίου *Krt18* βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένο σε σύγκριση με την ομάδα control και στις δύο ομάδες (Εικόνα 55).

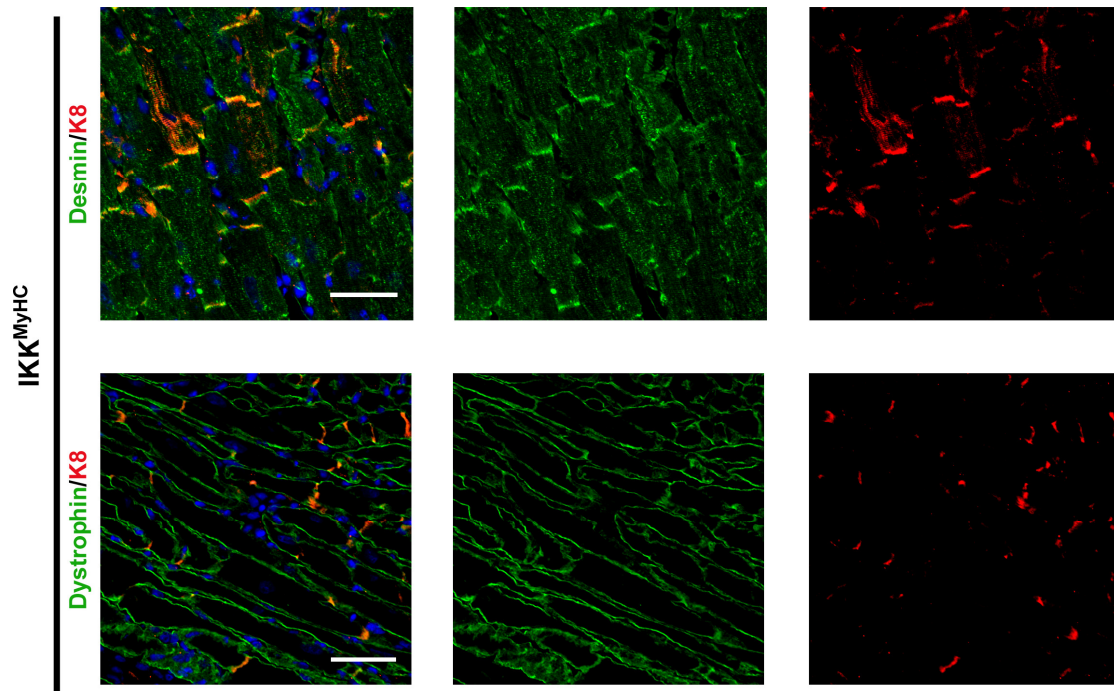
α



β



Εικόνα 55. Το δίκτυο K8/K18 εκφράζεται στο μυοκάρδιο του μοντέλου IKK^{MyHC} και εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων. (α) RT-PCR ανάλυση σε RNA από καρδιές IKK^{MyHC} ποντικών 5-εβδομάδες και 12-εβδομάδες έπειτα από την διακοπή δοξυκυκλίνης, η οποία παρεμποδίζει την έκφραση του διαγονιδίου. Για την ομαλοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς Ribosomal protein L13 (*Rpl13*). Two-sided P-values: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 (unpaired t-test) (β) Ανοσοφθορισμός για την K8 (κόκκινο) και α-ακτινίνη (πράσινο) παρουσιάζει τον εντοπισμό της K8 στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή καρδιοκυττάρων των IKK^{MyHC} ποντικών και μηδενική έκφραση στο μυοκάρδιο της ομάδας control. Μπάρα κλίμακας: 50 μm .

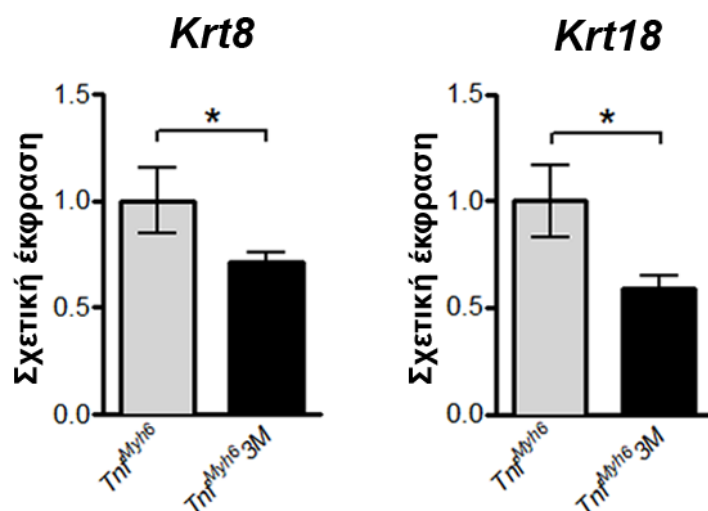


Εικόνα 56. Το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων του μοντέλου IKK^{MyHC} . Ανοσοφθορισμός για την K8 (κόκκινο) και τη δεσμίνη ή τη δυστροφίνη (πράσινο) παρουσιάζει τον εντοπισμό της K8 στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή καρδιοκυττάρων των IKK^{MyHC} ποντικών. Μπάρα κλίμακας: 50 μm .

20 Παρεμπόδισμός του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF- κ B *in vivo* οδηγεί σε μείωση των επιπέδων εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στο MHCsTNF α μυοκάρδιο.

Επιπλέον του *in vivo* μοντέλου IKK^{MyHC} , ακολουθήσαμε αντίθετα τη στρατηγική παρεμπόδισης του σηματοδοτικού μονοπατιού NF- κ B στο μυοκάρδιο *in vivo*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο ποντικού “3M” (Brown, McGuinness et al. 2005) με καρδιο-ειδική έκφραση μεταλλαγμένου μορφού I κ B α , ώστε δεν επιτρέπεται η φωσφορυλίωσή του και επομένως η ενεργοποίηση του μονοπατιού NF- κ B. Τα ποντίκια αυτά διασταυρώθηκαν με το MHCsTNF α στο οποίο περιγράφηκε παραπάνω η έκφραση υψηλών επιπέδων των *Krt8* και *Krt18* στο μυοκάρδιο. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 57, το μυοκάρδιο των μοντέλων Tnf^{Myh6} 3M παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης *Krt8*

και *Krt8* κατά 29 % και 41 %, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το MHCsTNF α (P-value<0.05).



Εικόνα 57. Τα επίπεδα εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* μειώνονται στο *Tnf^{Myl6}3M* σε σύγκριση με το στο MHCsTNF α μυοκάρδιο. RT-PCR για τα *Krt8* και *Krt18* σε RNA από καρδιές ποντικών 4^{ov} εβδομάδων. Η έκφραση των γονιδίων μειώνεται στα TNF α 3M σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα των MHCsTNF α ποντικών. Για την ομαλοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς β -ακτίνη. Two-sided P-values: *<0.05, **<0.01, ***<0.001 (unpaired t-test).

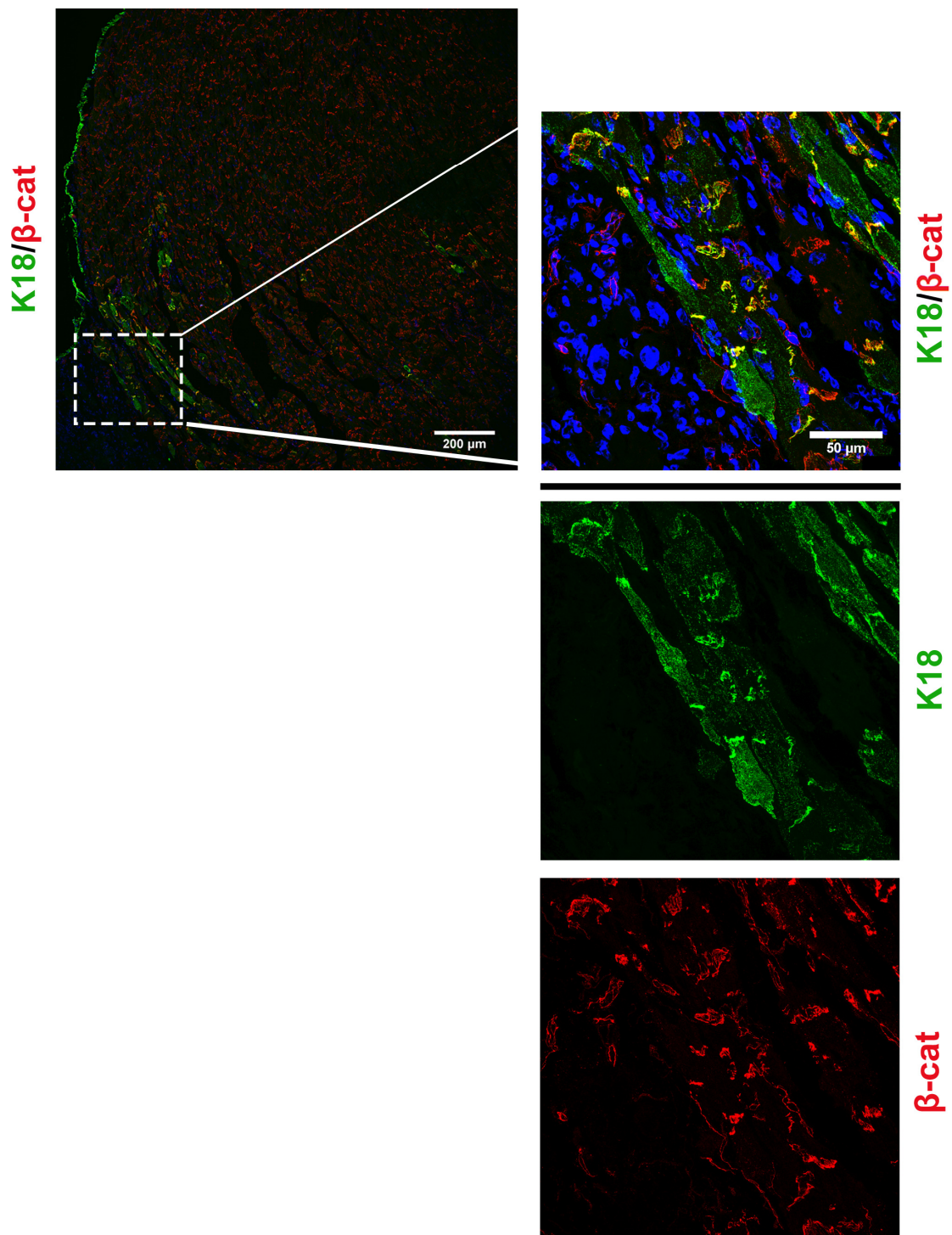
21 Οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στο *Des^{-/-}* μυοκάρδιο.

Ένα σημαντικό ερώτημα είναι εάν η εκτοπική έκφραση των K8/K18 στα καρδιοκύτταρα συμβαίνει γενικά σε καταστάσεις καρδιομυοπάθειας και δεν περιορίζεται στο μοντέλο καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης TNF- α .

Οι μελέτες ανοσοφθορισμού σε καρδιακές τομές ποντικών *Des^{-/-}*, αποκαλύπτουν πως οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται επίσης στο μοντέλο αυτό, σε σημαντικά χαμηλότερα όμως επίπεδα σε σύγκριση με την έκφρασή τους στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α .

Στην Εικόνα 58 φαίνεται πως η κερατίνη 8 (αντίστοιχα για την K18, αποτελέσματα δεν δείχνονται) εκφράζεται σε νησίδες καρδιοκυττάρων, σε διάφορες περιοχές του ενδοκαρδίου (Εικόνα 58). Σημειώνεται πως οι K8/K18 εκφράζονται επιπλέον γειτονικά σε περιοχές εκφυλισμού του μυοκαρδίου λόγω συγκέντρωσης φλεγμονοδών κυττάρων (Εικόνα 58) (Psarras, Mavroidis et al. 2010). Επιπλέον, το πρότυπο εντόπισης των K8/K18 παρουσιάζει τα ίδια ακριβώς χαρακτηριστικά με αυτό του μυοκαρδίου υπερέκφρασης TNF- α , όπως περιγράφονται στις αντίστοιχες παραγράφους.

Τα αποτελέσματα των μεθόδων ανοσοφθορισμού για την έκφραση των K8/K18 στο *Des*^{-/-} μυοκάρδιο, έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης μέσω Real-Time PCR, όπου παρουσιάζεται έκφραση των *Krt8* και *Krt18* RNA στο *Des*^{-/-} μυοκάρδιο σε χαμηλότερα όμως επίπεδα αυτής των μυοκαρδίων υπερέκφρασης TNF- α (Εικόνα 28).



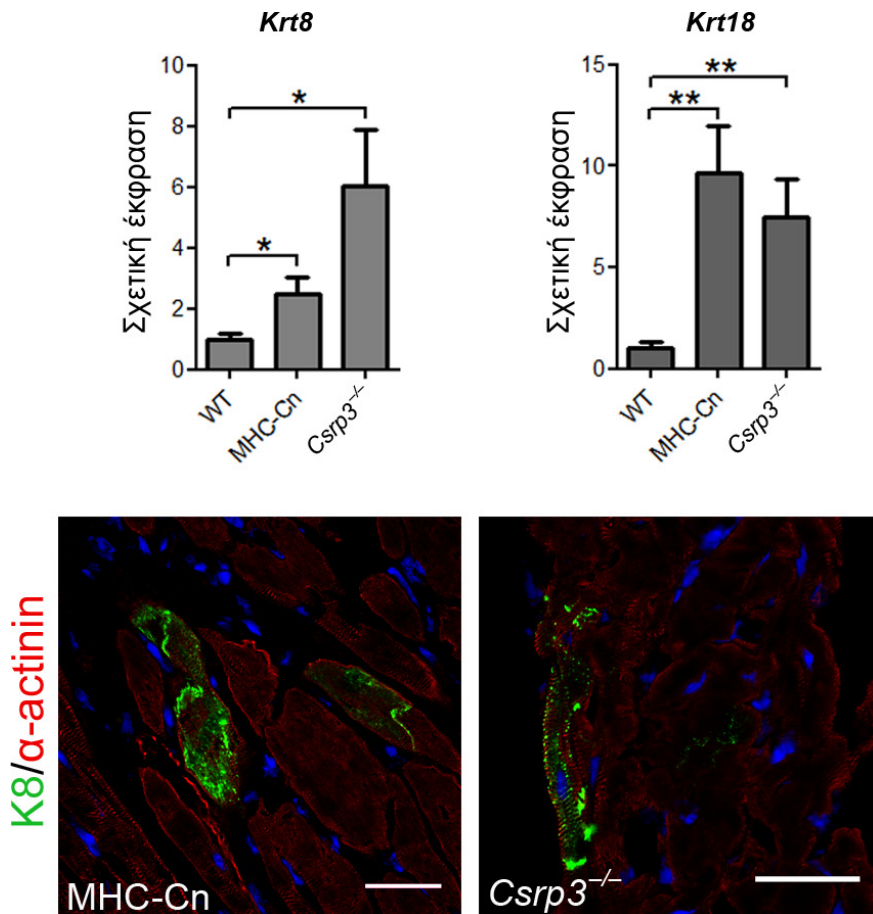
Εικόνα 58. Η **K18** εκφράζεται στο μυοκάρδιο έλλειψης δεσμίνης. Ανοσοφθορισμός για την K18 (πράσινο) δείχνει την έκφρασή της σε νησίδες κυττάρων του ενδοκαρδίου και σε περιοχές γειτονικά των τμημάτων εκφυλισμού των καρδιοκυττάρων. Μπάρες κλίμακας: όπως παρουσιάζονται στην εικόνα.

22 Οι K8 και K18 εκφράζονται εκτοπικά στα καρδιοκύτταρα γενετικών μοντέλων καρδιομυοπάθειας.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, προκύπτει επιπλέον το ερώτημα εάν η εκτοπική έκφραση των K8/K18 στα καρδιοκύτταρα συμβαίνει γενικότερα σε άλλα γενετικά μοντέλα καρδιομυοπάθειας.

Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε τα ευρέως διαδεδομένα –και ανεξάρτητα με τα παραπάνω– μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας έλλειψης του γονιδίου της πρωτεΐνης Muscle LIM Protein (“*Cspr3*^{-/-}”) (Arber, Hunter et al. 1997) και της καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης της καλσινευρίνης (calcineurin) (μοντέλο “MHC-Cn”) (Molkentin, Lu et al. 1998). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως τα συγκεκριμένα μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας αποτελούν δύο από τα πλέον γνωστά και εδραιωμένα μοντέλα καρδιομυοπάθειας και χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς μηχανισμούς παθοφυσιολογίας.

Πειράματα γονιδιακής έκφρασης μέσω RT-PCR έδειξαν την εκτοπική έκφραση σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα και των δύο γονιδίων *Krt8* και *Krt18* στο μυοκάρδιο των *Cspr3*^{-/-} και MHC-Cn, σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (Εικόνα 59). Επιπροσθέτως, με ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης βρέθηκε πως σχηματίζεται πρωτεΐνη και πως το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται τους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων (Εικόνα 59), παρουσιάζοντας το ίδιο πρότυπο εντόπισης που περιγράφηκε παραπάνω για το δίκτυο K8/K18 στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α.

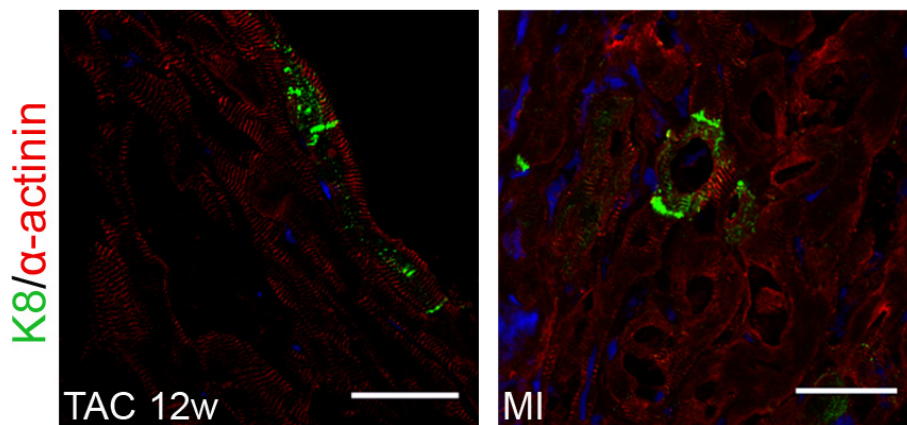
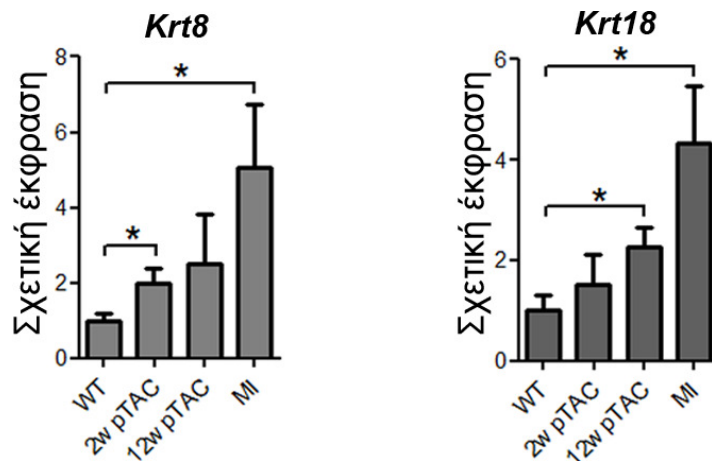


Εικόνα 59. Οι K8/K18 εκφράζονται εκτοπικά στα καρδιοκύτταρα γενετικών μοντέλων καρδιομυοπάθειας. RT-PCR ανάλυση (πάνω) για τα γονίδια *Krt8* και *Krt18* σε RNA από καρδιές των μοντέλων καρδιακής ανεπάρκειας έλλειψης του γονιδίου της πρωτεΐνης Muscle LIM Protein (“*Csrp3*^{-/-}”) και της καρδιο-ειδικής υπερέκφρασης της καλσινευρίνης (“MHC-Cn”). Παρουσιάζεται η σχετική έκφραση σε σύγκριση με την ομάδα control ποντικών. Γονίδιο αναφοράς: *Rpl3*. Two-sided P-values: *<0.05, **<0.01 (unpaired t-test). Ανοσοφθορισμός (κάτω) για την K8 (πράσινο) και την α-ακτινίνη (κόκκινο) παρουσιάζει την έκφραση της K8 σε νησίδες καρδιοκυττάρων και συγκεκριμένα σε δομές εμβόλιμων δίσκων και κοσταμερών. Μπάρες κλίμακας: 20 μm.

23 Οι K8 και K18 εκφράζονται εκτοπικά στα καρδιοκύτταρα μοντέλων πειραματικά προκλυόμενης καρδιακής βλάβης.

Τα αποτελέσματά μας παρουσιάζουν την εκτοπική έκφραση των K8 και K18 στα καρδιοκύτταρα γενετικών μοντέλων καρδιομυοπάθειας, με πιο έντονα επίπεδα έκφρασης το μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας από καρδιο-ειδική υπερέκφραση του TNF- α . Προχωρήσαμε, στη συνέχεια, στη μελέτη ζωικών μοντέλων με καρδιακές βλάβες ή καρδιακή ανεπάρκεια που έχει προκληθεί πειραματικά. Συγκεκριμένα μελετήσαμε δύο διαφορετικά και από τα πιο διαδεδομένα μοντέλα πειραματικά προκλυόμενης καρδιακής βλάβης. Το πρώτο είναι ποντίκια αγρίου τύπου (WT) στα οποία έχει πραγματοποιηθεί χειρουργικά μόνιμη περίσφυξη της αορτής (transverse aortic constriction, TAC) για 2 εβδομάδες και 12 εβδομάδες. Το δεύτερο μοντέλο είναι WT ποντίκια στα οποία προκλήθηκε χειρουργικά ισχαιμία (myocardial infarction, MI), μέσω μόνιμης απολίνωσης της αριστερής πρόσθιας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας για 4 εβδομάδες.

Πειράματα γονιδιακής έκφρασης μέσω RT-PCR παρουσιάζουν την εκτοπική έκφραση σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα και των δύο γονιδίων *Krt8* και *Krt18* στο μυοκάρδιο των TAC και MI μοντέλων, σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (Εικόνα 60). Επιπλέον, με μεθόδους ανοσοφθορισμού βρέθηκε πως σχηματίζεται πρωτεΐνη και πως το δίκτυο K8/K18 εντοπίζεται τους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων (Εικόνα 60), παρουσιάζοντας το ίδιο πρότυπο εντόπισης όπως περιγράφηκε παραπάνω για το δίκτυο K8/K18 στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α .



Εικόνα 60. Οι K8/K18 εκφράζονται εκτοπικά στα καρδιοκύτταρα μοντέλων πειραματικά προκλυόμενης καρδιακής ανεπάρκειας. RT-PCR ανάλυση (πάνω) για τα γονίδια *Krt8* και *Krt18* σε RNA από καρδιές των πειραματικών μοντέλων καρδιακής ανεπάρκειας μέσω περίσφυξης της αορτής TAC για 2 εβδομάδες και 12 εβδομάδες (“2-w pTAC” και “4-w pTAC”, αντίστοιχα) και μέσω του μοντέλου ισχαιμίας MI (“MI”). Παρουσιάζεται η σχετική έκφραση σε σύγκριση με την ομάδα control ποντικών. Γονίδιο αναφοράς: *Rpl3*. Two-sided P-values: * <0.05 , ** <0.01 (unpaired t-test). Ανοσοφθορισμός (κάτω) για την K8 (πράσινο) και την α -ακτινίνη (κόκκινο) παρουσιάζει την έκφραση της K8 σε νησίδες καρδιοκυττάρων και συγκεκριμένα σε δομές εμβόλιμων δίσκων και κοσταμερών. Μπάρες κλίμακας: 20 μm .

24 Η εκτοπική έκφραση του δικτύου K8/K18 είναι καρδιοπροστατευτική στο μοντέλο καρδιακής βλάβης από περίσφυξη της αορτής.

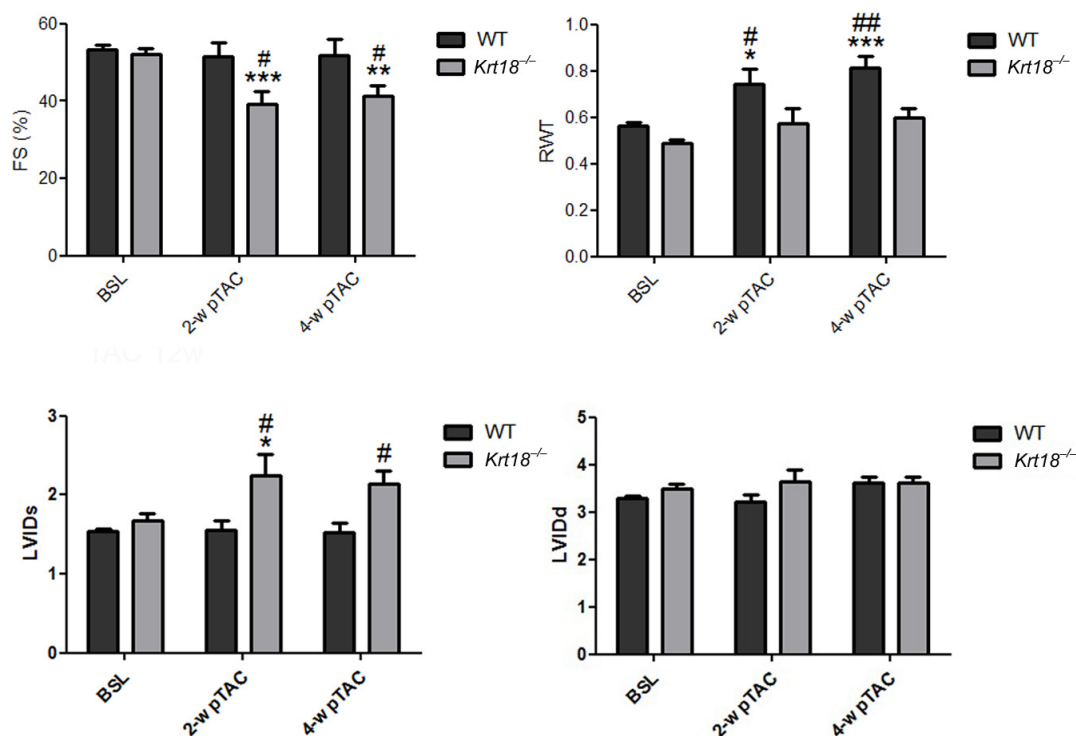
Σημαντική είναι η ερώτηση της ενδεχόμενης δράσης του δικτύου στα πειραματικά μοντέλα πρόκλησης καρδιακής βλάβης. Στην προηγούμενη παράγραφο παρουσιάστηκε η εκτοπική έκφραση των K8/K18 στο μυοκάρδιο ποντικών στα οποία έχει προκληθεί καρδιακή βλάβη χειρουργικά μέσω περίσφυξης της αορτής (TAC) για 2 εβδομάδες και 12 εβδομάδες.

Προχωρήσαμε στη μελέτη του ρόλου του δικτύου K8/K18 στο μοντέλο καρδιακής βλάβης TAC, με τη χρήση των ποντικών έλλειψης του γονιδίου *Krt18* (*Krt18^{-/-}*) (Magin, Schroder et al. 1998). Τα ποντίκια *Krt18^{-/-}* και η αντίστοιχη ομάδα αναφοράς αγρίου τύπου (WT) υποβλήθηκαν σε χειρουργείο περίσφυξης της αορτής TAC και μελετήθηκαν ηχοκαρδιογραφικά πριν το χειρουργείο (baseline, BSL), 2 εβδομάδες και 4 εβδομάδες μετά το χειρουργείο. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το εύρημα πως τα *Krt18^{-/-}* ποντίκια παρουσίασαν καρδιακή δυσλειτουργία και χαρακτηριστικά καρδιακής ανεπάρκειας από την 2^η εβδομάδα μετά το χειρουργείο (Εικόνα 61 και Συμπληρωματικός Πίνακας 4).

Η καρδιακή λειτουργία των *Krt18^{-/-}* ποντικών είναι στατιστικά σημαντικά διαταραγμένη όπως φαίνεται από την ανάλυση του ποσοστού συστολικής βράχυνσης της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (Fractional Shortening, FS %) στις 2 και 4 εβδομάδες σε σχέση με την ημέρα του χειρουργείου (BSL). Επιπροσθέτως, η υπερηχοκαρδιογραφική ανάλυση έδειξε πως τα *Krt18^{-/-}* ποντίκια έχουν αναπτύξει διάταση του μυοκαρδίου από τη 2^η εβδομάδα μετά το χειρουργείο, όπως φαίνεται από τις σημαντικές διαφορές στην τελοσυστολική διάμετρο αριστερής κοιλίας (LVIDs) (Εικόνα 61 και Συμπληρωματικός Πίνακας 4). Αντίθετα, η καρδιακή λειτουργία των WT ποντικών δεν εμφανίζει διατάραξη της καρδιακής λειτουργίας την 2^η αλλά και την 4^η εβδομάδα μετά το χειρουργείο και οι διαφορές του ποσοστού FS της ομάδας αυτής με την *Krt18^{-/-}* είναι στατιστικά σημαντική και στις δύο χρονικές στιγμές ηχοκαρδιογραφικής ανάλυσης (Εικόνα 61 και Συμπληρωματικός Πίνακας 4).

Επιπροσθέτως, η ανάλυση ηχοκαρδιογραφίας έδειξε πως η έλλειψη του εκτοπικού δικτύου K8/K18 στη καρδιά οδηγεί σε ανικανότητα ανάπτυξης αντισταθμιστικής υπερτροφίας, του φυσιολογικού μηχανισμού απόκρισης του μυοκαρδίου στο στρες της πίεσης υπερφόρτωσης, χαρακτηριστικό των μοντέλων TAC. Σε αντίθεση με τα *Krt18^{-/-}* ποντίκια, οι καρδιές των WT ποντικών αναπτύσσουν αντισταθμιστική υπερτροφία που φαίνεται από την 2^η εβδομάδα στις

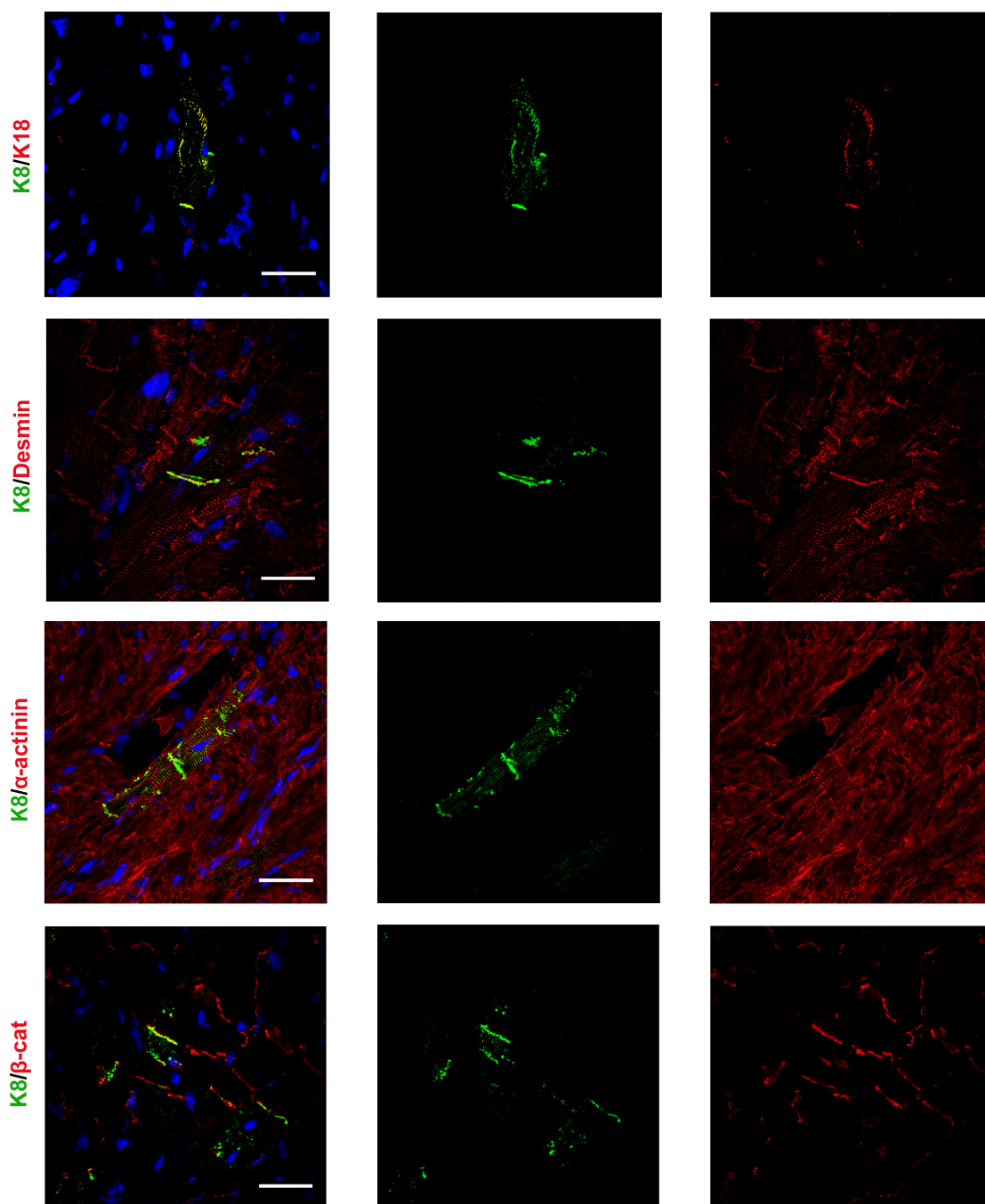
μετρήσεις του σχετικού πάχους του τοιχώματος (relative wall thickness, RWT) (Εικόνα 61 και Συμπληρωματικός Πίνακας 4).



Εικόνα 61. Η έλλειψη της εκτοπικής έκφρασης του K8/K18 δικτύου οδηγεί σε ανικανότητα προσαρμογής στο στρες πίεσης υπερφόρτωσης και στην εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας. Ανάλυση ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου *Krt18*^{-/-} ποντικών και της αντίστοιχης ομάδας αναφοράς αγρίου τύπου (WT) ηλικίας 4^{ov} μηνών, έπειτα από χειρουργείο περίσφυξης της αορτής TAC. Μέτρηση του ποσοστού εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (Fractional Shortening, FS %), του σχετικού πάχους του τοιχώματος (relative wall thickness, RWT), της τελοσυστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVIDs) και της τελοδιαστολικής διαμέτρου αριστερής κοιλίας (LVIDd), στις 2 (2w pTAC) και 4 (4w pTAC) εβδομάδες σε σχέση με την ημέρα του χειρουργείου (BSL). Two-sided P-values: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 relative to BSL; # <0.05 , ## <0.01 σε σχέση με το WT (FS γράφημα) και σε σχέση με το *Krt18*^{-/-} (RWT γράφημα) (two-way ANOVA, Bonferroni-Dunn post-hoc test).

Στη συνέχεια ελέγξαμε το μυοκάρδιο των ποντικών της ομάδας WT της μελέτης ηχοκαρδιογραφίας έπειτα από χειρουργείο περίσφυξης αορτής TAC για έκφραση του δικτύου K8/K18. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα της

καρδιοπροστασίας του δικτύου K8/K18 που βρέθηκε μελετώντας το μοντέλο *Krt18^{-/-}*, οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται στα μυοκάρδιο των WT έπειτα από TAC (Εικόνα 62). Επιπλέον, σχηματίζουν δίκτυο K8/K18 που εντοπίζεται στα καρδιοκύτταρα και συγκεκριμένα στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή, παρουσιάζοντας το χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης του εκτοπικού K8/K18 στην καρδιά (Εικόνα 62).



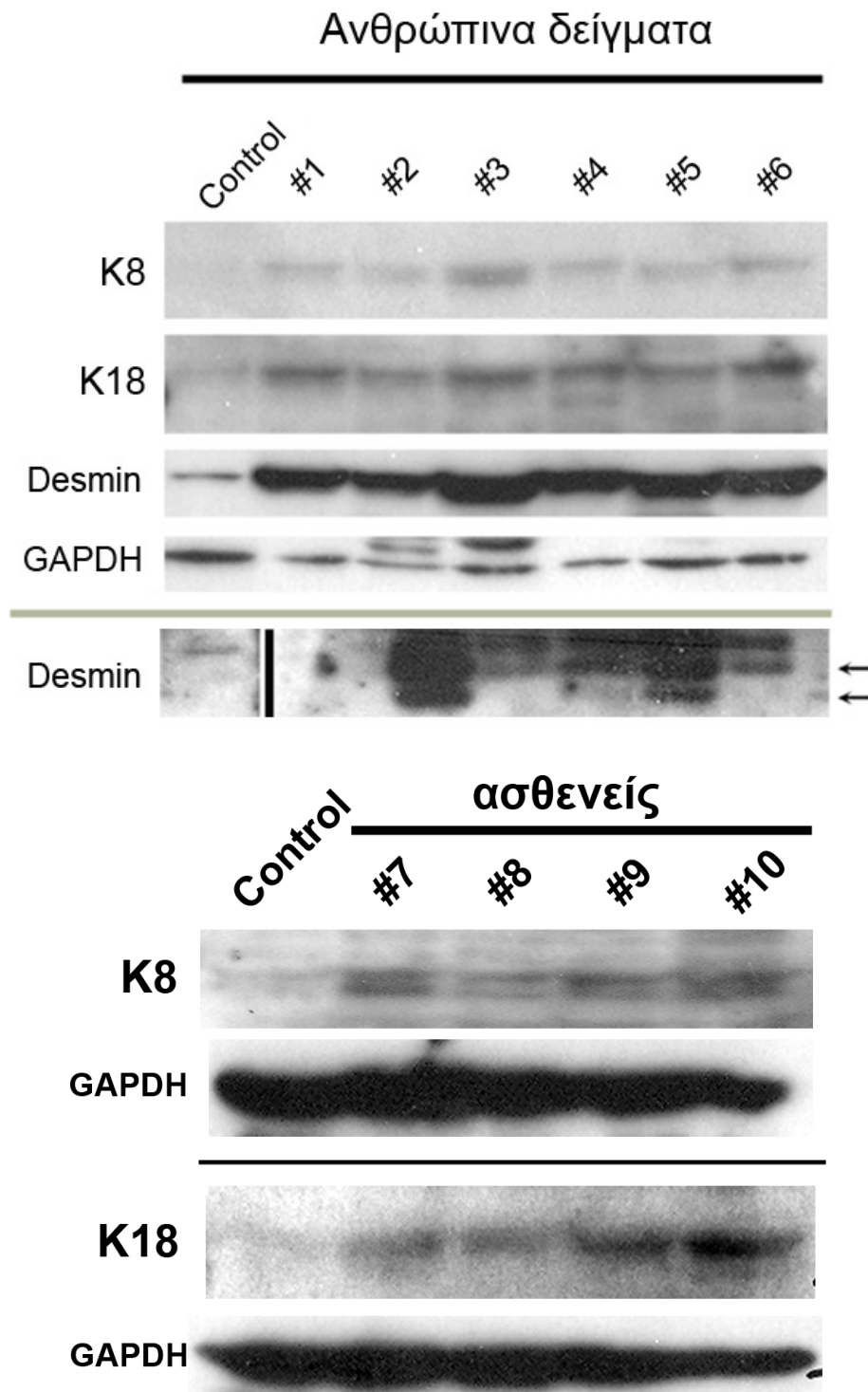
Εικόνα 62. Οι K8/K18 εκφράζονται εκτοπικά στο μυοκάρδιο WT ποντικών έπειτα από περίσφυξη αορτής TAC και σχηματίζουν δίκτυο που εντοπίζεται

στους εμβόλιμους δίσκους και τα κοσταμερή των καρδιοκυττάρων. Ανοσοφθορισμός της K8 με τις K18, δεσμίνη, α-ακτινίνη και β-κατενίνη σε καρδιακές τομές WT ποντικών 8 εβδομάδες μετά από χειρουργείο περίσφυξης αορτής. Σημειώνεται πως οι παραπάνω τομές ανήκουν στα ζώα WT της μελέτης ηχοκαρδιογραφίας της Εικόνας 61. Μπάρες κλίμακας: 20 μm.

25 Οι πρωτεΐνες K8 και K18 εκφράζονται στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.

Οι μελέτες στα πλαίσια της διατριβής αυτής έδειξαν πως οι πρωτεΐνες ενδιαμέσων ινιδίων K8 και K18 εκφράζονται στα καρδιοκύτταρα πειραματικών μοντέλων με καρδιακή ανεπάρκεια, ως απόκριση στον παράγοντα TNF-α. Επιπρόσθετα δείξαμε πως το φαινόμενο αυτό επεκτείνεται και σε άλλα γενετικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας αλλά και σε πειραματικά μοντέλα προκλυόμενης καρδιακής βλάβης. Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της ενδεχόμενης έκφρασης των K8/K18 στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.

Μελέτη ανοσοαποτύπωσης και υβριδισμού κατά Western ολικών εκχυλισμάτων πρωτεϊνών από δείγματα μυοκαρδίου έπειτα από μεταμόσχευση δείχνει πως οι K8 και K18 εκφράζονται στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου (Εικόνα 63). Στα καρδιακά δείγματα από φυσιολογικό ανθρώπινο μυοκάρδιο εμφανίζεται σημαντικά μειωμένο επίπεδο έκφρασης των K8 και K18, σε σύγκριση με τα δείγματα ασθενών, σχεδόν σε αμελητέα επίπεδα, η οποία πιθανόν προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα μικρών αγγείων του καρδιαγγειακού συστήματος (Jahn, Fouquet et al. 1987; Jahn, Kreuzer et al. 1993). Είναι σημαντικό να τονίζουμε στο σημείο αυτό πως στο φυσιολογικό ανθρώπινο μυοκάρδιο και συγκεκριμένα στα καρδιοκύτταρα, δεν παρατηρείται έκφραση κερατινών (Moll, Franke et al. 1982; Gown and Vogel 1984; Kuruc and Franke 1988). Τα επίπεδα έκφρασης των K8 και K18 διαφέρουν μεταξύ των δειγμάτων ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, εμφανίζοντας όμως σχηματισμό πρωτεϊνών σημαντικά μεγαλύτερου βαθμού συγκριτικά με το φυσιολογικό δείγμα υγιούς μυοκαρδίου. Η διαφοράς αυτές ενδεχομένως να εμφανίζονται λόγω διαφορετικού προτύπου εκτοπικής έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών ανάλογα των χαρακτηριστικών παθολογίας και κυτταρικού στρες σε κάθε περίπτωση.



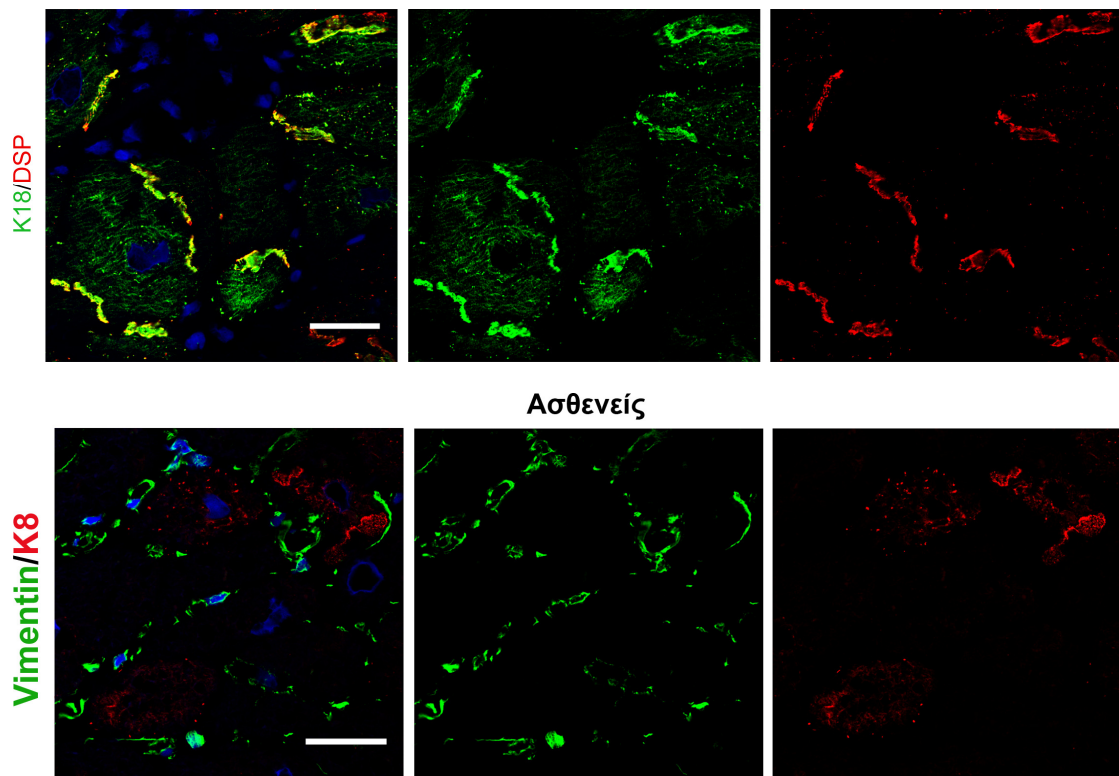
Εικόνα 63. Οι πρωτεΐνες K8/K18 εκφράζονται εκτοπικά στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Μελέτη ανοσοαποτύπωσης και υβριδισμού κατά Western ολικών εκχυλισμάτων πρωτεϊνών από δείγματα ανθρώπινου μυοκαρδίου έπειτα από μεταμόσχευση (δείγματα ασθενών #1–#10) και από φυσιολογικό ανθρώπινο μυοκάρδιο (control). Παρουσιάζεται η

έκφραση των K8 και K18 στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Παρουσιάζεται επιπλέον ανοσοαποτύπωση για τη δεσμίνη (πάνω εικόνα) στα ίδια δείγματα και τα προϊόντα πρωτεολυτικής της πέψης (βέλη). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GAPDH χρησιμοποιήθηκαν ως επίπεδα αναφοράς.

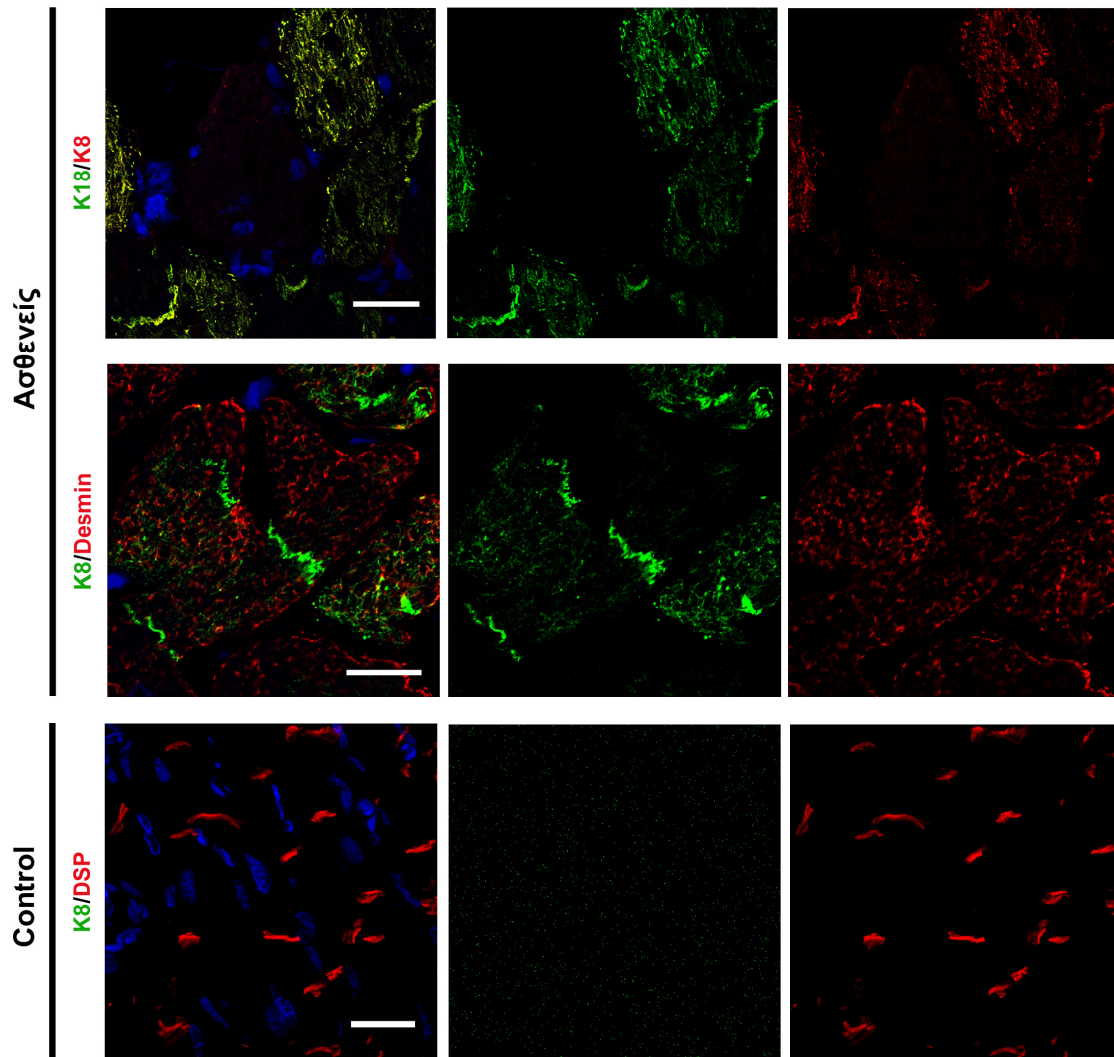
26 Στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια σχηματίζεται δίκτυο K8/K18 με χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων.

Οι πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων K8 και K18 εκφράζονται στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου και σχηματίζουν δίκτυο κυτταροσκελετού με χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης στα καρδιοκύτταρα.

Μελέτες ανοσοφθορισμού για τις K8 και K18 δείχνουν πως οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται απόλυτα, προτείνοντας τη δημιουργία δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων K8/K18 (Εικόνα 64 και 65). Η έκφραση του δικτύου K8/K18 είναι ειδική για τα καρδιοκύτταρα, καθώς δεν ανιχνεύεται έκφραση στους καρδιακούς ινοβλάστες του μυοκαρδίου ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (Εικόνα 64). Το δίκτυο K8/K18 εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων, το οποίο αποδεικνύεται μέσω μελετών ανοσοφθορισμού για την K8 με την δεσμοπλακίνη των δεσμοσωμάτων (Εικόνα 64) και με την β-κατενίνη των συνδέσμων προσκόλλησης. Επιπλέον, οι K8/K18 εντοπίζονται σε κυτταροπλασματικές δομές των καρδιοκυττάρων, πιθανον δομές κοσταμερών. Το χαρακτηριστικό πρότυπο στις δομές αυτές παρουσιάζεται είτε στικτό, είτε ινώδες (Εικόνα 64 και 65), ενδεχομένως αντικατοπτρίζοντας διαφορεικό επίπεδο ωρίμανσης του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων (Bader, Jahn et al. 1988). Στις μελέτες ανοσοφθορισμού δεν ανιχνεύεται έκφραση των K8/K18 στα καρδιοκύτταρα του φυσιολογικού ανθρώπινου μυοκαρδίου (Εικόνα 65), σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Moll, Franke et al. 1982; Gown and Vogel 1984; Kuruc and Franke 1988).



Εικόνα 64. Το δίκτυο K8/K18 εκφράζεται εκτοπικά στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και εντοπίζεται κυρίως στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων. Μελέτη ανοσοφθορισμού για την K18 (πράσινο) και τη δεσοπλακίνη (DSP, κόκκινο) (πάνω) και για την K8 (κόκκινο) και τη βιμεντίνη (πράσινο) (κάτω) σε τομές μυοκαρδίου ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η βιμεντίνη είναι πρωτεΐνη που εκφράζεται μόνο στους καρδιακούς ινοβλάστες και καθόλου στα καρδιοκύτταρα. Μπάρες κλίμακας: 30 μm.



Εικόνα 65. Το δίκτυο K8/K18 εκφράζεται εκτοπικά στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και εντοπίζεται κυρίως στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων. Μελέτες ανοσοφθορισμού σε τομές μυοκαρδίου ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου (πάνω σειρές) και φυσιολογικού ανθρώπινου μυοκαρδίου (κάτω σειρά). Στο φυσιολογικό μυοκάρδιο δεν ανιχνεύεται έκφραση K8. Μπάρες κλίμακας: 30 μm (μεσαία σειρά 20 μm).

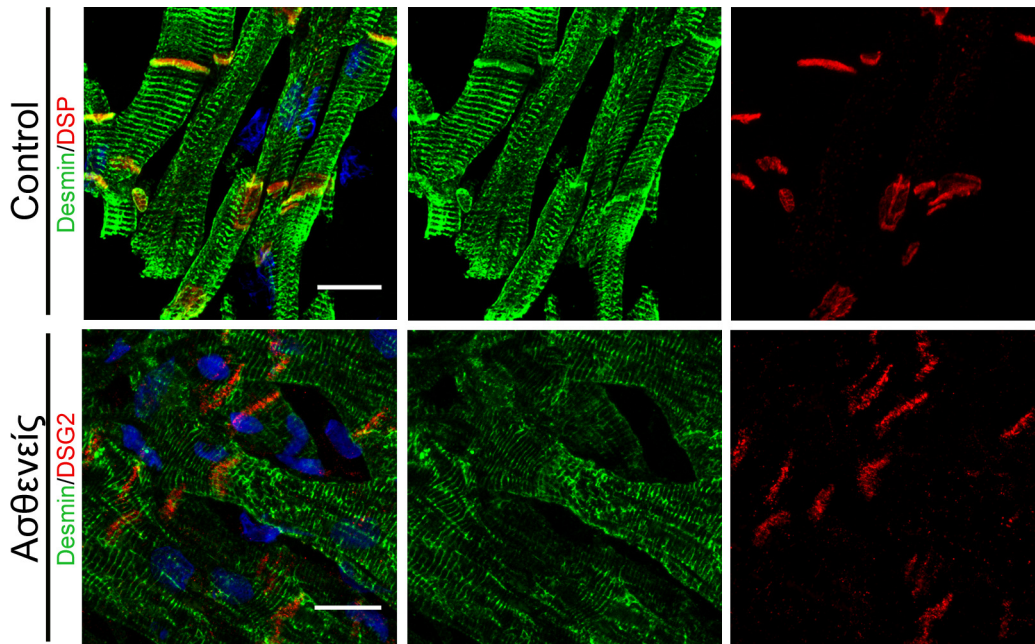
Το πρότυπο εντόπισης του δικτύου στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματά μας στις μελέτες με τα πειραματικά μοντέλα υπερέκφρασης TNF- α στο μυοκάρδιο ποντικών, όπως και των υπολοίπων γενετικών και πειραματικών μοντέλων καρδιακής ανεπάρκειας που περιγράφεται στις προηγούμενες παραγράφους.

27 Το δίκτυο της δεσμίνης είναι διαταραγμένο στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.

Το δίκτυο κυτταροσκελετού της δεσμίνης εμφανίζεται διαταραγμένο στο μυοκάρδιο ποντικών με καρδιακή ανεπάρκεια, όπως έχει δειχθεί στο μοντέλο υπερέκφρασης TNF-α (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Με δεδομένο το παραπάνω μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά του δικτύου της δεσμίνης στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τη δεσμίνη δείχνει πως στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τα επίπεδα της δεσμίνης είναι αυξημένα (Εικόνα 63), πιθανόν λόγω αδυναμίας αποδόμησής της και σχηματισμού συσσωματωμάτων, όπως συμβαίνει στο μοντέλο MHCsTNFα (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Επιπλέον στα δείγματα ασθενών, το πρωτεϊνικό μόριο της δεσμίνης είναι σε κάποιο βαθμό κομμένο στο συγκεκριμένο σημείο πέψης (θέση D263) από την κασπάση-6, εμφανίζοντας τα χαρακτηριστικά προϊόντα πέψης με μεγέθη 24 kDa και 29 kDa (βέλη, Εικόνα 63). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το κόψιμο της δεσμίνης στο μοντέλο ποντικού MHCsTNFα (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Τα προϊόντα πέψης της δεσμίνης από την κασπάση-6 εμφανίζονται στα περισσότερα από τα δείγματα ασθενών που μελετήθηκαν, ενώ δεν ανιχνεύονται καθόλου στο δείγμα του υγιούς ανθρώπινου μυοκαρδίου (Εικόνα 63).

Επιπροσθέτως, το πρότυπο εντόπισης του δικτύου της δεσμίνης εμφανίζεται διαταραγμένο, καθώς δεν εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (Εικόνα 66). Όπως φαίνεται με μεθόδους ανοσοφθορισμού, η δεσμίνη συνεντοπίζεται χαρακτηριστικά στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων με την πρωτεΐνη των δεσμοσωμάτων δεσμογεΐνη στα δείγματα φυσιολογικού μυοκαρδίου (Εικόνα 66). Αντίθετα, σε καρδιακές τομές ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια η δεσμίνη δεν εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους μαζί με τη δεσμοπλακίνη (Εικόνα 66), ενώ εμφανίζει γενικότερα ανωμαλίες στο πρότυπο εντόπισής της.



Εικόνα 66. Το δίκτυο K8/K18 ανιχνεύεται με μεγαλύτερη ειδικότητα στους εμβόλιμους δίσκους σε σύγκριση με το διαταραγμένο δίκτυο δεσμίνης στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια. Μελέτες ανοσοφθορισμού σε τομές φυσιολογικού ανθρώπινου μυοκαρδίου (πάνω σειρά) και σε μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου (κάτω σειρά). Μπάρες κλίμακας: 20 μm .

28 Το δίκτυο K8/K18 εμφανίζει μεγαλύτερη ειδικότητα εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους σε σύγκριση με τη δεσμίνη στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια.

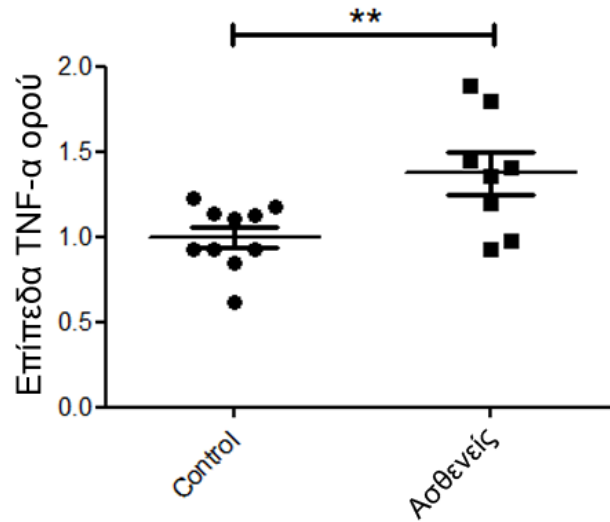
Το δίκτυο της δεσμίνης εμφανίζεται διαταραγμένο στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, με το δίκτυο K8/K18 να εμφανίζει μεγαλύτερη ειδικότητα για τους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων σε σύγκριση με τη δεσμίνη. Σε καρδιακές τομές ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, μελέτες ανοσοφθορισμού για την K8 παράλληλα με τη δεσμίνη, δείχνουν το δίκτυο K8/K18 σε δομές εμβόλιμων δίσκων όπου η δεσμίνη εμφανώς απουσιάζει (Εικόνα 65). Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα στο πειραματικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας MHCsTNF α ,

όπου φαίνεται το δίκτυο K8/K18 να εντοπίζεται στους εμβόλιμους δίσκους των καρδιοκυττάρων με ιδιαίτερη πιστότητα, σε αντίθεση με τη δεσμίνη (Εικόνα 37).

29 Οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια της μελέτης μας παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα TNF-α.

Στις μελέτες των ανθρώπινων παθολογικών δειγμάτων της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυοκαρδίου ασθενών έπειτα από μεταμόσχευση καρδιάς (βλέπε κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι»). Για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων μας στα πειραματικά ζωικά μοντέλα υπερέκφρασης TNF-α στο μυοκάρδιο, μελετήσαμε τα επίπεδα του παράγοντα TNF-α των συγκεκριμένων ασθενών.

Συγκεκριμένα αναλύσαμε με τη μέθοδο ELISA τα επίπεδα του παράγοντα TNF-α στον ορό του αίματος των ασθενών σε σύγκριση με αντίστοιχα δείγματα από μία ομάδα ανθρώπων χωρίς συναφές παθολογικό ιστορικό, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς (control). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν πως τα επίπεδα του παράγοντα TNF-α είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένα στον ορό του αίματος των ασθενών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control (Εικόνα 67). Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Levine, Kalman et al. 1990; Mann 2003), καθώς θεωρείται δεδομένη η επαγωγή έκφρασης του TNF-α και άλλων στρες-επαγόμενων κυτταροκινών σε ασθενείς με βλάβες του μυοκαρδίου και καρδιακή ανεπάρκεια, όπως αναλύεται εκτενώς στο αντίστοιχο κεφάλαιο της «Εισαγωγής».



Εικόνα 67. Τα επίπεδα του παράγοντα TNF-α είναι αυξημένα στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Ανάλυση ELISA σε δείγματα ορού του αίματος των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στις μελέτες μας, σε σύγκριση με αντίστοιχα δείγματα από μία ομάδα ανθρώπων χωρίς συναφές παθολογικό ιστορικό (control). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επίπεδα διαφοράς σε σχέση με την ομάδα control. Two-sided P-values: **<math><0.01</math> (unpaired t-test).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1 Ο παράγοντας TNF-α παρουσιάζει καρδιοπροστατευτική δράση.

Το γεγονός πως η γονιδιακή έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών δεν σχετίζεται με έναν μόνο συγκεκριμένο τύπο καρδιακής βλάβης αλλά αντίθετα παρατηρείται σε όλες σχεδόν τις μορφές καρδιακών βλαβών (Mann 2003), προτείνει πως τα μόρια αυτά αποτελούν μέρος ενός ενδογενούς συστήματος απόκρισης της καρδιάς στο στρες γενικά (βλέπε και κεφάλαιο «Εισαγωγή»). Έτσι, αντίστοιχα με το ρόλο που έχουν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ως δραστικά μόρια στην έμφυτη ανοσία, η οποία είναι υπεύθυνος μηχανισμός πρώιμης προειδοποίησης που επιτρέπει στον οργανισμό να διαχωρίσει άμεσα τα ξένα από τα δικά του στοιχεία (Hoffmann, Kafatos et al. 1999), η έκφρασή τους στο μυοκάρδιο μπορεί να επιτρέψει την άμεση απόκριση στην ιστική βλάβη. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να αποτελεί μέρος ενός πρώιμου προειδοποιητικού συστήματος το οποίο ρυθμίζει τις ομοιοστατικές αποκρίσεις που ακολουθούν τη βλάβη στην καρδιά (Mann 2003).

Οι πρώτες ενδείξεις που υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο των κυτταροκινών στην καρδιά προέρχονται από τις φυλογενετικές μελέτες των επονομαζόμενων πρωτόγονων κυτταροκινών, όπως οι TNF και IL-1. Η ενεργότητα των TNF και IL-1 παρουσιάζεται και στα πρωτοστόμια σπονδυλωτά (αννελίδες) και στα δευτεροστόμια ασπόνδυλα (εχινόδερμα) (Raftos, Cooper et al. 1991). Αυτό υποδηλώνει πως οι κυτταροκίνες αυτές εμφανίστηκαν κατά το τέλος της περιόδου του Καμβρίου, πριν το διαχωρισμό των κύριων ζωικών φύλων σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα. Η εξέλιξη των κυτταροκινών ήταν πιθανόν απαραίτητη για την ανάπτυξη μεγάλων οργανισμών που απαιτούσαν διακυτταρικούς διακινητές μηνυμάτων όπως οι κυτταροκίνες, ώστε να ρυθμίζουν πολύπλοκες κυτταρικές διεργασίες (Mann 2003). Η παρατήρηση πως οι πρωτόγονες κυτταροκίνες όπως οι TNF και IL-1 έχουν συντηρηθεί από τη φύση σε όλο το ζωικό βασίλειο για περίπου 600.000 εκατομμύρια χρόνια, σε συνδυασμό με το γεγονός πως οι ίδιες κυτταροκίνες εκφράζονται σε όλες τις μορφές βλάβης στην καρδιά, προτείνει πως αυτά τα μόρια μπορεί να παρέχουν επιβιωτικά πλεονεκτήματα στους οργανισμούς (Mann 2003). Παρόλα αυτά, το παραπάνω επιχείρημα δεν αποτελεί απόδειξη για την ενδεχόμενη κυτταροπροστατευτική δράση των κυτταροκινών στο μυοκάρδιο.

2 Η υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α βελτιώνει την καρδιομυοπάθεια που οφείλεται στην έλλειψη της δεσμίνης.

Στην παρούσα μελέτη προτείνεται ένας νέος μηχανισμός καρδιοπροστασίας κατά την υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α στο μυοκάρδιο έλλειψης του γονιδίου της δεσμίνης, μέσω εκτοπικής έκφρασης και σχηματισμού εναλλακτικού δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων.

Το μοντέλο υπερέκφρασης του παράγοντα TNF-α στο μυοκάρδιο που χρησιμοποιήθηκε είναι το MHCsTNFα ποντίκι (Li, Moody et al. 2000), στο οποίο ο TNF-α εκφράζεται ειδικά στα καρδιομυοκύτταρα υπό τη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της άλφα- βαριάς αλυσίδας μυοσίνης (α -myosin heavy chain, Myh6). Τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα TNF-α στο συγκεκριμένο διαγονιδιακό μοντέλο είναι ιδιαίτερα υψηλά, περίπου 250-350 pg/ml από την 4^η – 8^η εβδομάδα ζωής, καθιστώντας το μοντέλο αυτό ως ένα με τα μεγαλύτερα επίπεδα υπερέκφρασης TNF-α στο μυοκάρδιο (Li, Moody et al. 2000).

Στην παρούσα βιβλιογραφία είναι γενικότερα εδραιωμένη η θεώρηση πως η απορυθμισμένη ή η συνεχής υπερέκφραση κυτταροκινών επαγόμενων από το στρες όπως ο TNF-α, σε ανώτερα των φυσιολογικών επίπεδα, δρα μόνο ως καταστροφικός παράγοντας για το μυοκάρδιο (Finkel, Oddis et al. 1992; Yokoyama, Vaca et al. 1993; Sivasubramanian, Coker et al. 2001; Mann 2003). Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, αντίθετα, καταδεικνύουν πως η υπερέκφραση του TNF-α σε υψηλά επίπεδα στο μυοκάρδιο (MHCsTNFα μοντέλο) είναι καρδιοπροστατευτική στη καρδιομυοπάθεια που προκαλείται λόγω της έλλειψης του γονιδίου της δεσμίνης, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την εκτοπική έκφραση του εναλλακτικού κυτταροσκελετού K8/K18.

Από την άλλη πλευρά, έκφραση βραχείας περιόδου ή χαμηλών επιπέδων του TNF-α στην καρδιά έχει προταθεί πως είναι ευεργετική και ενεργοποιεί προσαρμοστικές διεργασίες σε απόκριση στο στρες, από μελέτες κέρδους λειτουργίας (gain of function) (Nakano, Knowlton et al. 1998; Pinz, Wax et al. 2008) και απώλειας της λειτουργίας (loss of function) (Yoshida, Taga et al. 1996; Kurrelmeyer, Michael et al. 2000). Καρδιο-ειδική υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α σε χαμηλά επίπεδα (MHCsTNF3 διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού) οδηγεί σε προστασία των μυοκαρδιοκυττάρων από το μοντέλο βλάβης μέσω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης *ex vivo* (Burchfield, Dong et al. 2010), ενώ δεν αναπτύσσεται διάταση ή δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, σε αντίθεση με μελέτες στα διαγονιδιακά μοντέλα υπερέκφρασης TNF-α σε υψηλά επίπεδα (MHCsTNF) (Sivasubramanian, Coker et al. 2001).

Οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί πίσω από τη καρδιοπροστατευτική αυτή δράση των χαμηλών επιπέδων έκφρασης TNF-α στην καρδιά παραμένουν ασαφείς, παρά την πρόσφατη πρόοδο στο συγκεκριμένο ερευνητικό τομέα (Burchfield, Dong et al. 2010). Ο προτεινόμενος μηχανισμός της παρούσας μελέτης, μέσω σχηματισμού του εναλλακτικού δικτύου κυτταροσκελετού K8/K18 στα μυοκαρδιοκύτταρα, είναι πιθανόν να συμμετέχει επίσης στην καρδιοπροστατευτική δράση των χαμηλών επιπέδων έκφρασης TNF-α και επομένως είναι σημαντικό να αξιολογηθεί ερευνητικά.

3 Το δίκτυο των ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης είναι κυρίαρχης σημασίας για το μηχανισμό παθοφυσιολογίας του TNF-α.

Παρότι στο μοντέλο ποντικού $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ παρατηρείται σημαντική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας συγκριτικά με τα μοντέλα μυοκαρδιοπάθειας MHCsTNFα και $Des^{-/-}$, τα επίπεδα υπερέκφρασης του TNF-α είναι ιδιαίτερα υψηλά (Li, Moody et al. 2000) και υπερκαλύπτουν τους προστατευτικούς μηχανισμούς απόκρισης, με αποτέλεσμα ακόμα και το μοντέλο αυτό να μην παρουσιάζει απόλυτα φυσιολογική βιωσιμότητα. Μετά την ηλικία των 14 μηνών παρατηρείται θνησιμότητα σε κάποιο ποσοστό (μέσος όρος επιβίωσης ~14 μήνες) στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντίκια, τα οποία όμως εμφανίζουν σημαντικά βελτιωμένο προσδόκιμο ζωής συγκριτικά με τα MHCsTNFα ποντίκια, σχεδόν κατά το διπλάσιο (μέσος όρος επιβίωσης ~7 μήνες). Το τελευταίο συνάδει και με τα αποτελέσματα της ανάλυσης ηχοκαρδιογραφίας, όπου φαίνεται η καρδιακή λειτουργία στα $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ να είναι σημαντικά βελτιωμένη σε σχέση με τα MHCsTNFα ποντίκια, στους 3 μήνες και ακόμα πιο έντονη στους 6 μήνες (βλέπε κεφάλαιο «Αποτελέσματα»).

Πιθανή εξήγηση για τη μη φυσιολογική βιωσιμότητα των $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ ποντικών θα μπορούσε να αποτελεί και η ενδεχόμενη συστηματική δράση του κυκλοφορούντα TNF-α σε άλλους ιστούς ή όργανα, όπως έχει προταθεί για τη δυσλειτουργία της σύσπασης του διαφράγματος στο MHCsTNFα μοντέλο (Li, Moody et al. 2000). Επιπροσθέτως, οι εμβόλιμοι δίσκοι είναι σημαντικά αποδιοργανωμένοι στο MHCsTNFα μυοκάρδιο, όπου η δεσμοπλακίνη, η β-κατενίνη και η κοννεξίνη-43 εντοπίζονται εκτός περιοχής εμβόλιμων δίσκων και πλαγίως των μυοκαρδιοκυττάρων (Panagoroulou, Davos et al. 2008), ενώ αντίθετα στα

Tnf^{Myh6}Des^{-/-} μυοκαρδιοκύτταρα εντοπίζονται φυσιολογικά στους εμβόλιμους δίσκους. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η υπερέκφραση του παράγοντα TNF- α , ακόμα και σε υψηλά επίπεδα, μπορούν να επιφέρουν θετικές αποκρίσεις στο μυοκάρδιο σε περιβάλλον έλλειψης του δικτύου της δεσμίνης, τονίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον πρωταρχικό ρόλο της τροποποίησης του δικτύου δεσμίνης στην ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας, η οποία ενδεχομένως καλύπτει κάθε επιδιορθωτικό μηχανισμό απόκρισης.

Έχουμε πρόσφατα δείξει πως κεντρικό μηχανισμό κατά την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας από τον παράγοντα TNF- α αποτελεί η διατάραξη του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Η δεσμίνη πρωτεολύεται από την κασπάση-6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή της από τους εμβόλιμους δίσκους και τη δημιουργία συσσωματωμάτων που περιέχουν δεσμίνη στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α . Η παρούσα μελέτη τονίζει τον κεντρικό ρόλο του φυσιολογικού καρδιακού δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων στην ανάπτυξη και τη ρύθμιση της παθολογίας του μυοκαρδίου γενικά, ενώ διαπιστώνεται η σημαντικότητα του κυτταροσκελετού ενδιάμεσων ινιδίων στην καρδιακή φυσιολογία, καθώς σχηματίζεται εναλλακτικό δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων K8/K18 με στόχο να καλύψει την έλλειψη του φυσιολογικού δικτύου των μυοκαρδιοκυττάρων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα πως η εκτοπική έκφραση και ο σχηματισμός του δικτύου K8/K18 στα μυοκαρδιοκύτταρα συμβαίνει και στο MHCsTNF α μυοκάρδιο, εκτός από το *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* όπου συμμετέχει στην επαγόμενη από τον TNF- α καρδιοπροστασία. Στα MHCsTNF α μυοκαρδιοκύτταρα, όπου η δεσμίνη είναι παρούσα, το δίκτυο K8/K18 εμφανίζεται αποδιοργανωμένο, παρουσιάζει μειωμένο εντοπισμό στους εμβόλιμους δίσκους και σχηματίζει συσσωματώματα, σε σύγκριση με τα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκαρδιοκύτταρα (Εικόνες 33-35 και 37). Εξήγηση για τα διαφορετικά χαρακτηριστικά του K8/K18 δικτύου μεταξύ των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* και MHCsTNF α μυοκαρδιοκυττάρων, θα μπορούσε να αποτελεί η έντονη εμφάνιση του διαταραγμένου δικτύου της δεσμίνης και η κυρίαρχη εμφάνιση των συσσωματωμάτων δεσμίνης στο MHCsTNF α μυοκάρδιο, όπως και οι σοβαρές κυτταρικές ανωμαλίες που προκύπτουν από αυτά. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τη μικρότερων επιπέδων έκφραση των K8 και K18 στο MHCsTNF α σε σύγκριση με το *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (Εικόνες 28 και 29), ενδεχομένως επηρεάζουν σημαντικά τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του καρδιακού δικτύου K8/K18.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση πως το δίκτυο K8/K18 παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα εντοπισμού στους εμβόλιμους δίσκους των MHCsTNF α μυοκαρδιοκυττάρων, σε σχέση με τα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* (Εικόνες 33-35 και 37), πιθανώς

λόγω της παρεμπόδισης της λειτουργίας του δικτύου K8/K18 από την παρουσία του διαταραγμένου δικτύου της δεσμίνης.

Όπως δείχνουν και τα αποτελέσματα ανάλυσης του MHCsTNF α μυοκαρδίου με έλλειψη του δικτύου K8/K18 (*Tnf^{Myh6}Krt18^{-/-}* μοντέλο), οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες του K8/K18 δεν είναι έκδηλες παρουσία του διαταραγμένου δικτύου της δεσμίνης, με τα βασικά μορφολογικά και κυτταρικά χαρακτηριστικά να ομοιάζουν μεταξύ των δύο μοντέλων, όπως και η γενικότερη καρδιακή λειτουργία (Εικόνα 39 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1). Παρόλα αυτά, η έλλειψη του δικτύου K8/K18 στο MHCsTNF α μυοκάρδιο επιφέρει στατιστικά σημαντική αύξηση της διάτασης του μυοκαρδίου, όπως αποκαλύπτεται από τις μελέτες ηχοκαρδιογραφίας (Εικόνα 40 και Συμπληρωματικός Πίνακας 1). Συγκεκριμένα, οι τιμές των LVEDD και LVESD παραμέτρων εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά αυξημένες στα *Tnf^{Myh6}Krt18^{-/-}* ποντίκια ηλικίας 3 μηνών, συγκριτικά με τα MHCsTNF α (LVEDD: 4.33 mm συγκριτικά με 3.24 mm; LVESD: 2.91 mm συγκριτικά με 2.19 mm αντίστοιχα), ενώ στην ηλικία των 6 μηνών επίσης παρατηρείται αύξηση της διάτασης, η οποία δεν καλύπτει όμως τα κριτήρια της στατιστικής σημαντικότητας.

4 Οι κερατίνες 8 και 18 ως στρες-επαγόμενες πρωτεΐνες στην καρδιακή παθοφυσιολογία.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία παρουσιάζει τη δυνατότητα του ενήλικου μυοκαρδιοκυττάρου να εκφράζει τις πρωτεΐνες κερατίνη 8 και κερατίνη 18, σε γενετικά και πειραματικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας ποντικού αλλά και στο ανθρώπινο παθολογικό μυοκάρδιο. Δείξαμε πως το φαινόμενο αυτό είναι κοινό χαρακτηριστικό απόκρισης, καθώς συμβαίνει σε διαφορετικά μοντέλα μυοκαρδιοπάθειας. Είναι σημαντικό πως η εκτοπική αυτή έκφραση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών K8 και K18 αντικατοπτρίζεται επίσης στο σχηματισμό δικτύου ετεροπολυμερών με ειδικά χαρακτηριστικά προτύπου εντόπισης. Επιπλέον, προτείνουμε για πρώτη φορά έναν μηχανιστικό ρόλο για τον παράγοντα TNF- α , ο οποίος όπως συζητήθηκε αποτελεί γνωστό στρες-επαγόμενο μόριο στην καρδιακή παθοφυσιολογία (Mann 2003), στη ρύθμιση της εκτοπικής έκφρασης των μη-καρδιακών αυτών πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων στο μυοκάρδιο. Τέλος, η μελέτη αυτή αποδεικνύει έναν νέο μηχανισμό καρδιοπροστασίας μέσω της εκτοπικής έκφρασης του δικτύου K8/K18 σε ένα γενετικό μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας *in vivo*

αλλά και στο μοντέλο πειραματικά προκαλούμενης καρδιακής ανεπάρκειας μέσω περίσφιξης της αορτής (TAC).

Οι κερατίνες εκδηλώνουν ένα δυναμικό προφίλ έκφρασης κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Omary, Ku et al. 2009). Σημαντικό είναι το εύρημα πως μπορεί να συμβούν αλλαγές ως προς το πρότυπο έκφρασής τους ως απόκριση στο στρες, όπως οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά την εμβρυογένεση. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με την αναγέννηση, την αποδιαφοροποίηση ή trans-διαφοροποίηση, ή μπορεί να αντιπροσωπεύουν στρες-επαγόμενες πρωτεΐνες για να επιδιορθώσουν βλάβες και να προστατέψουν τα κύτταρα (Omary, Ku et al. 2009; Pan, Hobbs et al. 2013). Για παράδειγμα, *de novo* έκφραση της K7, και σε μικρότερο βαθμό της K19, έχει βρεθεί σε χολοστατικές ηπατικές διαταραχές του ανθρώπου (cholestatic liver disorders) και έπειτα από υπερβολικές βλάβες από το αλκοόλ (Ku, Strnad et al. 2007). Επιπλέον, οι K8 και K18 υπερεκφράζονται σημαντικά, μαζί με τις K20 και K19, έπειτα από βλάβη του παγκρέατος (Zhong, Zhou et al. 2004), ενώ αυξημένη ή *de novo* έκφραση των K7, K17 και K19 έχει παρατηρηθεί σε χρόνια βλάβη των νεφρών (Moll, Hage et al. 1991).

Επιπρόσθετα με το προφίλ έκφρασής τους, τα επίπεδα έκφρασης και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των κερατινών μπορούν επίσης να επηρεαστούν από τις συνθήκες του στρες (βλέπε κεφάλαιο «Εισαγωγή»). Για παράδειγμα, αυξημένη φωσφορυλίωση των κερατινών αποτελεί δείκτη βλάβης ιστών και ανάπτυξης παθολογίας στο ήπαρ του ποντικίου και του ανθρώπου (Ku, Strnad et al. 2007) και στα “goblet” κύτταρα του εντέρου του ποντικίου (Zhou, Cadrin et al. 2006). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως η έκφραση των κερατινών απλών επιθηλίων μπορεί να αυξηθεί έως 3 φορές και πιθανόν να συμμετάσχει στην κυτταροπροστασία των K8/K18 στο ήπαρ, έπειτα από συγκεκριμένες συνθήκες στρες (Ku, Strnad et al. 2007). Υπερέκφραση κερατινών ως απόκριση σε βλάβη έχει παρατηρηθεί στο ήπαρ ποντικού (Cadrin, Hovington et al. 2000) επίσης κατά την χολολιθίαση (Tao, Toivola et al. 2003). Επιπρόσθετα, επαγωγή των K8 και K18 συμβαίνει επίσης σε ασθενείς με κίρρωση χολής (Fickert, Trauner et al. 2003). Εναλλακτικά, αποδόμηση των K8 και K18 μπορεί επίσης να επαχθεί από το στρες, όπως παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά A549 έπειτα από έκθεσή τους σε μηχανικό στρες (Fickert, Trauner et al. 2003), αλλά είναι λίγα αυτά που γνωρίζουμε από *in vivo* μελέτες σχετικά με τις διεργασίες αυτές και τη συσχέτισή τους με διάφορους ιστούς και ασθένειες. Επιπλέον, κατά τη πειραματική παγκρεατίτιδα όπου η ακτίνη και η τουμπουλίνη πρωτεολύονται δραματικά, οι K8, K18 και K19 είναι εξαιρετικά ανθεκτικές στην αποδόμηση (Zhong and Omary 2004), προτείνοντας έναν διαφορετικό ρόλο για τον κυτταροσκελετό ενδιάμεσων ινιδίων συγκριτικά με αυτόν των μικροσωληνίσκων και των ινιδίων ακτίνης, στη βάση της απόκρισής τους σε βλάβες.

Η αποσαφήνιση των μηχανισμών γονιδιακής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* είναι μεγάλης σημασίας, ιδιαίτερα στο μοντέλο της παρούσας μελέτης, της εκτοπικής τους δηλαδή έκφρασης στο μυοκάρδιο. Το παραπάνω είναι επίσης προφανές, λόγω της ιδιαίτερα λειψής γνώσης για τους μηχανισμούς ιστο-ειδικής έκφρασης των γονιδίων αυτών και για την συντονισμένη ρύθμιση του ζεύγους πρωτεϊνών Τύπου I και Τύπου II ενδιαμέσων ινιδίων (Maurer, Nelson et al. 2008). Το μοναδικό αυτό *in vivo* σύστημα της επαγόμενης από τον TNF-α εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στα ενήλικα μυοκαρδιοκύτταρα μπορεί να αξιοποιηθεί περαιτέρω στην αποσαφήνιση των πολύπλοκων μηχανισμών της γονιδιακής τους ρύθμισης, αλλά και άλλων γονιδίων κερατινών απλών επιθηλίων ή ενδιαμέσων ινιδίων γενικότερα. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση των κύριων μηχανισμών διατήρησης της ιστο-ειδικότητας, του εξειδικευμένου προτύπου έκφρασης κατά την ανάπτυξη και των διαφορικών προτύπων έκφρασης σε διάφορους τύπους καρκίνων ανάλογα με την επιθετικότητά τους.

5 Ο παράγοντας TNF-α οδηγεί στην εκτοπική έκφραση των K8 και K18 στο μυοκάρδιο.

Η άμεση συμμετοχή του TNF-α στην εκτοπική έκφραση των K8 και K18 στο μυοκάρδιο, ή η έμμεση λόγω των μηχανισμών απόκρισης στη δράση του TNF-α ως στρες-επαγόμενου μορίου στην καρδιά, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη. Θα μπορούσε για παράδειγμα να είναι αποτέλεσμα απόκρισης στην αναδόμηση του ιστού ή στην απόπτωση, διεργασίες που χαρακτηρίζουν το μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF-α (Sivasubramanian, Coker et al. 2001; Haudek, Taffet et al. 2007). Σημαντική ένδειξη για την ενδεχόμενη άμεση συμμετοχή του TNF-α στο μηχανισμό εκτοπικής έκφρασης των K8 και K18 αποτελεί το εύρημα της μελέτης αυτής πως η έκφραση των γονιδίων *Krt8* και *Krt18* ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ο οποίος είναι ευρέως γνωστό πως ενεργοποιείται από τον TNF-α. Επιπλέον, τα αποτελέσματα από την μελέτη του IKK^{MyHC} μοντέλου προτείνουν την ενεργοποίηση των *Krt8* και *Krt18* άμεσα από τη σηματοδότηση του NF-κB, καθώς εκφράζονται στο IKK^{MyHC} μυοκάρδιο πριν την εκδήλωση του πλήρους παθολογικού φαινοτύπου (4-εβδομάδες έπειτα από την ενεργοποίηση του διαγονιδίου) (Εικόνα 55).

Τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής, οδηγούν στην υπόθεση που ήδη συζητήθηκε, πως οι πρωτεΐνες K8 και K18 εμφανίζουν τη δυνατότητα να δρουν ως στρες-επαγόμενα καρδιοπροστατευτικά μόρια στο μυοκάρδιο και πως ο TNF-α, ο

οποίος είναι γνωστό στρες-επαγόμενο μόριο στο μυοκάρδιο (Levine, Kalman et al. 1990), επάγει τη μεταγραφική τους έκφραση μέσω του NF-κB. Επομένως, μέσω ενός μηχανισμού “feedback-loop”, οι κύριοι στρες-επαγόμενοι ρυθμιστές στο μυοκάρδιο οδηγούν στην επαγωγή άλλων μορίων, ώστε να αυξηθεί η ομάδα των στρες-επαγόμενων μορίων με στόχο την κυτταροπροστασία στο μυοκάρδιο. Ενδιαφέρον αποτελεί η υπόθεση πως ο TNF-α οδηγεί στην επαγωγή του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων K8/K18, με στόχο να αντικαταστήσει δομικά και λειτουργικά το φυσιολογικό δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων των μυοκαρδιοκυττάρων, το οποίο είναι διαταραγμένο λόγω της δράσης του ίδιου του παράγοντα TNF-α (Panagoroulou, Davos et al. 2008).

Ακόμα ένα νέο εύρημα που προκύπτει από την παρούσα διατριβή, είναι η ρύθμιση των γονιδίων *Krt8* και *Krt18* από τον παράγοντα TNF-α, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Καθόσον γνωρίζουμε, η συγκεκριμένη είναι η πρώτη αναφορά έως τώρα που σχετίζει την έκφραση των *Krt8* και *Krt18*, αλλά και γενικότερα άλλων γονιδίων του κυτταροσκελετού ενδιάμεσων ινιδίων, με τον παράγοντα TNF-α. Όσον αφορά τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ο οποίος αποτελεί κοινό στόχο διαφόρων μονοπατιών του TNF-α, έχει συσχετιστεί με την επαγωγή των κερατινών-8/18/19/10 έπειτα από βλάβη του παγκρέατος (Zhong et al., 2004) και μαζί με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp-1 μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση του υποκινητή της κερατίνης-3 στο κουνέλι (Wu, Chen et al. 1994). Η ρύθμιση από τον NF-κB ωστόσο δεν αποδεικνύεται με συστηματική ανάλυση στις μελέτες αυτές. Αντίθετα, στην παρούσα διατριβή ακολουθήθηκαν στρατηγικές μελέτης γονιδιακής έκφρασης σε διάφορα *in vivo* και *in vitro* συστήματα, από βιοπληροφορική ανάλυση και ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης, έως χρήση εξειδικευμένων διαγονιδιακών μοντέλων. Από τα αποτελέσματά μας βρέθηκε για πρώτη φορά πως ο παράγοντας NF-κB συμμετέχει στη γονιδιακή ρύθμιση των *Krt8* και *Krt18*, προσδένοντας σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές τους.

Είναι ενδιαφέρον πως ο ρυθμιστικός αυτός ρόλος του TNF-α μονοπατιού αναφέρεται και στα δύο γονίδια, *Krt8* και *Krt18*, τα οποία θεωρείται πως ρυθμίζονται ανεξάρτητα σε μεταγραφικό επίπεδο, παρότι βρίσκονται κοντά σε χρωμοσωμικό επίπεδο. Απάντηση στο παραπάνω θα μπορούσε να αποτελεί το εύρημα πως ο NF-κB προσδένεται σε ρυθμιστικές περιοχές και των δύο γενετικών τόπων, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση και των δύο αυτών γονιδίων (Εικόνες 49-52). Μία άλλη κυτοκίνη, η IL-6, η οποία επίσης επάγεται κατά την καρδιακή ανεπάρκεια, όπως ο TNF-α, έχει δειχθεί πως συμμετέχει στην υπερέκφραση των K8 και K18 στο κόλον, ενώ στην ίδια μελέτη το δίκτυο K8/K18 προτείνεται πως συμμετέχει στην IL-6-επαγόμενη προστασία του εντερικού φραγμού σε περιπτώσεις όπου αυτός είναι διαταραγμένος (Wang, Srinivasan et al. 2007). Το εύρημα πως ο TNF-α συμμετέχει στην ρύθμιση της εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στα μυοκαρδιοκύτταρα είναι σημαντικό

επίσης γιατί το σύστημα αυτό των διαφοροποιημένων μυοκαρδιοκυττάρων χαρακτηρίζεται από ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο γονιδιακό προφίλ έκφρασης μέσω εξειδικευμένων μηχανισμών που διατηρούν την ιστοειδικότητα σε γονιδιακό επίπεδο.

6 Η δεσμίνη ως πιθανός ρυθμιστής της εκτοπικής έκφρασης των K8 και K18 στα μυοκαρδιοκύτταρα.

Επιπρόσθετα με τον παράγοντα TNF- α , η δεσμίνη επίσης προκύπτει πως ενδεχομένως σχετίζεται με τα επίπεδα εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στα μυοκαρδιοκύτταρα και με τις ιδιότητες του δικτύου που σχηματίζουν. Η υπόθεση αυτή συνάδει με το ρόλο της δεσμίνης ως κύριο μεταγραφικό ρυθμιστή στο σύστημα του μύος, η οποία προσδίδει και διατηρεί τα μυο-ειδικά χαρακτηριστικά (Weitzer, Milner et al. 1995). Στο *Des*^{-/-} μυοκάρδιο υπάρχει κάποιο επίπεδο έκφρασης των *Krt8* και *Krt18*, αλλά σημαντικά μικρότερο από αυτά των μυοκαρδίων υπερέκφρασης TNF- α , όπως προκύπτει από την ανάλυση μέσω RT-PCR (Εικόνα 28).

Ο σχηματισμός δικτύου K8/K18 στα μυοκαρδιοκύτταρα του *Des*^{-/-} ποντικίου παρουσιάζει το χαρακτηριστικό πρότυπο εντόπισης, όπως αυτο έχει περιγραφεί στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α (Εικόνα 58). Η έκφραση των K8 και K18 στο *Des*^{-/-} μυοκάρδιο είναι πιο εμφανής στα μεγαλύτερης ηλικίας ζώα, αλλά εντοπίζεται και σε μικρότερες ηλικίες, το οποίο πιθανώς σχετίζεται με τα επίπεδα επαγωγής του παράγοντα TNF- α κατά την ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας. Επιπλέον, η έκφραση των K8 και K18 εντοπίζεται αρκετά σε μυοκαρδιοκύτταρα γειτονικά σε περιοχές εκφυλισμού από φλεγμονώδη λεμφοκύτταρα, πιθανώς επίσης μπορεί να οφείλεται στην έκφραση του TNF- α από τα κύτταρα αυτά.

Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης των K8 και K18 στο *Des*^{-/-} μυοκάρδιο είναι πολύ μικρότερα σε σύγκριση με το μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α (Εικόνα 28) και μάλιστα μικρότερα από το όριο ανιχνευσιμότητας μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 29). Είναι ενδιαφέρον πως στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α όπου απουσιάζει η δεσμίνη (*Tnfr^{Myh6}Des*^{-/-} μοντέλο), η έκφραση των K8 και K18 φαίνεται μεγαλύτερη από το MHCsTNF α μυοκάρδιο σε μεταγραφικό (Εικόνα 28) και πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 29), ενώ είναι πιο έντονη στην περίπτωση της K8, πιθανόν αντικατοπτρίζοντας κάποιο επίπεδο παρεμπόδισης της έκφρασης των γονιδίων αυτών στο μυϊκό ιστό από τη δεσμίνη.

7 Οι επιθηλιακές κερατίνες K8/K18 εκφράζονται στο μυοκάρδιο.

Παρά το γεγονός πως είναι ιδιαίτερα σπάνιο, οι κερατίνες απλών επιθηλίων (Simple Epithelium Keratins, SEKs) έχουν προταθεί να εκφράζονται σε μη-επιθηλιακά συστήματα, επιπλέον της πρωτότυπης ιστοειδικής και εξαρτώμενης από το στάδιο διαφοροποίησής τους έκφρασης (βλέπε και κεφάλαιο «Εισαγωγή»). Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα κύτταρα λείου μυϊκού ιστού των αγγείων του ανθρώπινου ομφάλιου λώρου τα οποία εκφράζουν K8, K18 και K19 (Bader, Jahn et al. 1988; Bar, Bea et al. 2001). Επιπλέον, στο ενδοθήλιο του κερατοειδούς εκφράζεται το ζεύγος K8/K18, ενώ στο μη φυσιολογικό ενδοθήλιο του κερατοειδούς σε ασθενείς με οπίσθια πολυμορφική δυστροφία του κερατοειδούς υπάρχουν πολλαπλά στρώματα με κυρίαρχη την έκφραση των K7 και K19 επιπρόσθετα των K8 και K18 (Cockerham, Laver et al. 2002; Jirsova, Merjava et al. 2007). Άλλο παράδειγμα έκφρασης των SEKs λόγω παθολογικής κατάστασης, συγκεκριμένα των K8/K18, είναι στην αθηροσκλήρωση τη στεφανιαίας νόσου. Παρότι τα φυσιολογικά αγγεία δεν εκφράζουν τις K8 και K18, αυτές εκφράζονται στα κύτταρα λείου μυϊκού ιστού των αγγείων των αθηρωματικών πλακών (Jahn, Kreuzer et al. 1993). Σε αυτήν την περίπτωση, η έκφραση των κερατινών απαιτεί και την κυτταρική προσκόλληση σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας και μιτογόνο ερέθισμα (Moon, Yau et al. 2008). Είναι ενδιαφέρον πως η παρατηρούμενη έκφραση του δικτύου K8/K18 σε μη επιθηλιακά κυτταρικά συστήματα έχει προταθεί πως συμμετέχει σε έναν ενδεχόμενο μηχανισμό μεταστροφής σε επιθηλιακού τύπου φαινότυπο (Omary, Ku et al. 2009).

Ωστόσο, οι κερατίνες και συγκεκριμένα το ζεύγος K8/K18 δεν έχουν προταθεί ποτέ έως τώρα να εκφράζονται στο ενήλικο μυοκάρδιο. Στο σπάνιο αδενικό συστατικό του καρδιακού μυξώματος, ωστόσο, έχει βρεθεί να εκφράζονται οι K7/K20 (Lindner, Edah-Tally et al. 1999). Επιπλέον, κερατίνες έχουν βρεθεί να εκφράζονται στο μεσοθήλιο του εμβρυϊκού επικαρδίου ανθρώπου (Kuruc and Franke 1988) και σε δείγματα εμβρύου και ενήλικου ατόμου ποντικίου, αρουραίου και βοός (Chan, Edwards et al. 1988; Kuruc and Franke 1988; Perez-Pomares, Macias et al. 1998; Foley-Comer, Herrick et al. 2002).

Παρόλο που η έκφραση κερατινών συμβαίνει στο εμβρυϊκό μυοκάρδιο, περιορίζεται σε έμβρυα ηλικίας έως 16 ημερών, όπως έχει δειχθεί σε κουνέλια (van der Loop, Schaart et al. 1992), σε ανθρώπινα έμβρυα (Jerse and Zidar 2011), σε διάφορα μοντέλα ποντικίου (Thorey, Meneses et al. 1993) και εξαφανίζεται στα

ενήλικα άτομα. Το ενήλικο ή το νεογέννητο μυοκάρδιο δεν εκφράζει κερατίνες, όπως έχει αποδειχθεί έπειτα από επισταμένες μελέτες σε ανθρώπινους ιστούς (Moll, Franke et al. 1982; Osborn and Goebel 1983; Gown and Vogel 1984; Kuruc and Franke 1988; Jerse and Zidar 2011), σε ενήλικα και εμβρυικά (μετά την 16^η εμβρυική μέρα) δείγματα τρωκτικών και βοοειδών (Kuruc and Franke 1988), ακόμα και σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν κερατίνη-18 σε υψηλά επίπεδα (Abe and Oshima 1990).

Σημαντική είναι η παρατήρηση πως η έκφραση των K8/K18 στο εμβρυικό μυοκάρδιο και στο επικάρδιο χαρακτηρίζεται κυρίως από ένα στικτό πρότυπο, το οποίο περιορίζεται σε συγκεκριμένα συσσωματώματα που εντοπίζονται κυρίως στην κυτταρική περιφέρεια, κοντά στις πλάκες των δεσμοσωμάτων (Kuruc and Franke 1988). Αυτό το στικτό πρότυπο εμφανίζεται και σε περιπτώσεις έκφρασης των K8/K18 σε δείγματα από το ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή (Εικόνες 64 και 65), με περισσότερο έντονο όμως το πρότυπο έκφρασης ειδικά στους εμβόλιμους δίσκους και το σχηματισμό δομών δικτύων κυτταροσκελετού (Εικόνες 64 και 65). Από την άλλη, στα μοντέλα ποντικίου υπερέκφρασης TNF-α στο μυοκάρδιο, όπου οι K8/K18 επάγονται σε υψηλά επίπεδα, παρουσιάζουν εμφανώς ένα πρότυπο δομών δικτύου κυτταροσκελετού, με τα χαρακτηριστικά δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων και με εξειδικευμένο πρότυπο εντόπισης, το οποίο πιστοποιήθηκε επίσης μέσω της ανάλυσης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με ανοσο-εντόπιση με σωματίδια χρυσού (Εικόνα 32).

Υπάρχει μία αναφορά στη βιβλιογραφία η οποία προτείνει την έκφραση των K8 και K19, αλλά όχι της K18, σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα στον ενήλικο καρδιακό ιστό και τις εντοπίζει στις Z- και M-ζώνες των μυοϊνιδίων κυρίως στο επίπεδο των κοσταμερών (Ursitti, Lee et al. 2004). Ωστόσο στις μελέτες μας, οι κερατίνες 8, 18 και 19 δεν βρέθηκαν ποτέ να εκφράζονται στο μυοκάρδιο των ποντικίων αγρίου τύπου της ομάδας αναφοράς, ούτε σε χαμηλά επίπεδα, όλων των ατόμων που μελετήθηκαν διαφόρων γενετικών υποτύπων (C57, 129SV, C57/129SV, κ.ά.) και ηλικιών, από 15 ημερών έως και 18 μηνών (αποτελέσματα δεν δείχνονται).

Επιπλέον, τα πειράματά μας δείχνουν ένα εξειδικευμένο πρότυπο εντόπισης, στις M-ζώνες το πιθανότερο, εκτεινόμενα στο σαρκόπλασμα από το επίπεδο των μυοϊνιδίων έως τα κοσταμερή του σαρκειλήμματος (Εικόνα 34), ομοιάζοντας σε μικρό βαθμό με το προτεινόμενο πρότυπο της αναφοράς που συζητήθηκε. Η ειδική εντόπιση όμως του δικτύου K8/K18 στους εμβόλιμους δίσκους, η οποία είναι και η πιο χαρακτηριστική στην περίπτωσή μας, δεν αναφέρεται στη συγκεκριμένη εργασία (Ursitti, Lee et al. 2004), πιθανώς λόγω των σημαντικά μεγαλύτερων επιπέδων

έκφρασης K8/K18 στο μοντέλο μας, σε σύγκριση με το K8/K19 της αναφοράς και στις εξειδικευμένες ιδιότητες του K8/K18 δικτύου σε σχέση με το K8/K19.

Στα πλαίσια της διατριβής αυτής μελετήσαμε την έκφραση των K8 και K18 χρησιμοποιώντας αρκετούς διαφορετικούς κλώνους αντισωμάτων για κάθε μία πρωτεΐνη, καθώς και άλλες κερατίνες απλών επιθηλίων, πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων Τύπου I και Τύπου II όπως οι K4, K5, K7, K9, K19, K20 (αποτελέσματα δεν δείχνονται). Επιπλέον τα αποτελέσματα πιστοποιήθηκαν από ανεξάρτητα πειράματα σε εργαστήρια συνεργατών μας. Με την στρατηγική αυτή πιστοποιήσαμε τα ευρήματά μας (και ευρήματα της βιβλιογραφίας) όσον αφορά την απουσία των πρωτεϊνών αυτών στο φυσιολογικό μυοκάρδιο χωρίς κάποιου τύπου παθολογία. Αυτή η ασυμφωνία με την μελέτη των Ursitti et al., θα μπορούσε να εξηγηθεί από την έλλειψη μεγάλου αριθμού διαφορετικών κλώνων αντισωμάτων, από τη στενή ομοιότητα σε επίπεδο γενετικών αλληλουχιών των διαφορετικών κερατινών και άλλων ενδιάμεσων ινιδίων, ή ακόμα και από την ενδεχόμενη ενεργοποίηση στρεσογόνων παραγόντων που μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση των κερατινών, στο τεχνητό *in vitro* σύστημα των ενζυματικά διαχωρισμένων καρδιακών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε. Επιπρόσθετα, στη συγκεκριμένη αναφορά (Ursitti, Lee et al. 2004), δεν παρατίθενται δεδομένα από ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western για την έκφραση των K8/K19 στο μυοκάρδιο, ούτε από αναλύσεις ανοσοφθορισμού απευθείας σε καρδιακές τομές, ώστε να αξιολογηθούν με μεγαλύτερη πιστότητα τα ευρήματά της συγκεκριμένης μελέτης. Ανεξάρτητα από τον καρδιακό ιστό, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο κάποιου επιπέδου έκφρασης των K8/K19 στον πρόσθιο κνημιαίο σκελετικό μυ, ο οποίος προτείνεται ως ο μοναδικός μυϊκός ιστός που επηρεάζεται ήπια από την απουσία της κερατίνης-19 (Stone, O'Neill et al. 2007).

8 Οι κερατίνες K8 και K18 εκφράζονται στα μυοκαρδιοκύτταρα και όχι στους καρδιακούς ινοβλάστες του παθολογικού μυοκαρδίου.

Μελετήσαμε τον ενδεχόμενο σχηματισμό του δικτύου K8/K18 σε άλλους καρδιακούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς, επιπρόσθετα των μυοκαρδιοκυττάρων τα οποία δείξαμε πως εκφράζουν K8/K18 σε παθολογικές καταστάσεις. Ο μεγαλύτερος κυτταρικός καρδιακός υποπληθυσμός στο μυοκάρδιο εκτός των μυοκαρδιοκυττάρων,

είναι αυτός των καρδιακών ινοβλαστών. Οι ινοβλάστες γενικότερα, είναι κύτταρα που προκύπτουν από το μεσέγχυμα, τα οποία μπορεί να εκφράζουν κερατίνες (Burstain, Libby et al. 2008). Επομένως, μελετήσαμε τους καρδιακούς ινοβλάστες του μυοκαρδίου υπερέκφρασης TNF- α , ως προς την πιθανή έκφραση των K8/K18 λόγω της παρακρινούς δράσης του TNF- α από τα μυοκαρδιοκύτταρα. Σε τομές από καρδιές *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* ποντικών, οι ινοβλάστες φαίνεται πως δεν εκφράζουν K8/K18 (Εικόνα 35), υποστηρίζοντας τη καρδιο-ειδική έκφραση των K8/K18 στο παθολογικό μυοκάρδιο. Τα αποτελέσματα αυτά, συνάδουν με τις μελέτες στο ανθρώπινο παθολογικό μυοκάρδιο, όπου επίσης οι ινοβλάστες δεν εκφράζουν K8/K18 (Εικόνα 64).

Ωστόσο, σε μελέτες *in vitro* με πρωτογενείς καλλιέργειες καρδιακών ινοβλαστών που απομονώθηκαν από ενήλικα διαγονιδιακά ποντίκια υπερέκφρασης TNF- α βρέθηκαν σπάνια μεμονωμένα κύτταρα τα οποία εκφράζουν K8, κυρίως σε άμορφες στικτές δομές (αποτελέσματα δεν δείχνονται). Ενώ στις αντίστοιχες καλλιέργειες ινοβλαστών αγρίου τύπου νεογέννητων ποντικών, νεογέννητων αρουραίων και ενήλικων *Des^{-/-}* ποντικών δεν βρέθηκε ποτέ έκφραση K8/K18/K19 (αποτελέσματα δεν δείχνονται), το πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων που βρέθηκαν θετικά για την έκφραση της K8 (λιγότερο από το 1%) θα μπορούσε να σημαίνει πιθανή επαγωγή της έκφρασης K8/K18 λόγω του TNF- α , ή πιθανότερα να είναι ψευδώς θετικό αποτέλεσμα λόγω της πλαστικότητας των ινοβλαστών σε τέτοιου τύπου *in vitro* τεχνητά συστήματα καλλιέργειας.

9 Μεταστροφή του γονιδιακού προτύπου έκφρασης του μυοκαρδίου σε πρότυπο έκφρασης εμβρυικής καρδιάς.

Οι πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων K8 και K18 έχει προταθεί πως εκφράζονται κατά την εμβρυική ανάπτυξη του μυοκαρδίου, έως την εμβρυική μέρα 16, προτού αποσιωπηθεί η έκφρασή τους (van der Loop, Schaart et al. 1992; Thorey, Meneses et al. 1993; Jerse and Zidar 2011), όπως προαναφέρθηκε. Λαμβάνοντας ως δεδομένο το παραπάνω, ακόμα ένας υποθετικός μηχανισμός εξήγησης της εκτοπικής έκφρασης του δικτύου K8/K18 στο μυοκάρδιο, είναι η μεταστροφή του γονιδιακού προτύπου έκφρασης των ενήλικων μυοκαρδιοκυττάρων σε πρόγραμμα αντίστοιχο με αυτό του εμβρυικού μυοκαρδίου. Το φαινόμενο αυτό έχει προταθεί ως προσαρμοστικός μηχανισμός του μυοκαρδίου σε απόκριση στο στρες (Rajabi, Kassiotis et al. 2007).

Η μεταστροφή σε εμβρυικό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης είναι κοινό χαρακτηριστικό σε ζωικά μοντέλα καρδιακής υπερτροφίας και ανεπάρκειας (Parker, Packer et al. 1990) και προτείνεται ως ένας προστατευτικός μηχανισμός της καρδιάς από ανεπανόρθωτες λειτουργικές βλάβες και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου έπειτα από στρες (Rajabi, Kassiotis et al. 2007). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, η μεταστροφή σε εμβρυικό γονιδιακό πρότυπο έκφρασης στο ασθενικό μυοκάρδιο ανθρώπου προκύπτει από υποέκφραση γονιδίων του ενήλικου προτύπου έκφρασης, παρά από υπερέκφραση γονιδίων του εμβρυικού προτύπου έκφρασης (Razeghi et al., 2001).

Τα αποτελέσματά μας σχετικά με την επαγωγή της εκτοπικής έκφρασης των *Krt8* και *Krt18* στο μυοκάρδιο ως απόκριση στο στρες μέσω του TNF- α , ο οποίος επάγεται γενικά στην καρδιακή ανεπάρκεια (Levine, Kalman et al. 1990), θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην κατανόηση μακρόχρονων ερωτημάτων στην παθοβιολογία του μυοκαρδίου, σχετικά με τους μηχανισμούς επανενεργοποίησης του εμβρυικού προτύπου γονιδιακής έκφρασης στο ενήλικο μυοκάρδιο. Επιπλέον θα μπορούσαν να απαντηθούν ερωτήματα σχετικά με τους μηχανισμούς επαγωγής του εμβρυικού προτύπου έκφρασης από πολύ διαφορετικά ερεθίσματα όπως η υποξία, πίεση υπερφόρτωσης (pressure overload), αιμοδυναμική εκφόρτωση (hemodynamic unloading) και η επαναλαμβανόμενη –ή low-flow– ισχαιμία (Rajabi, Kassiotis et al. 2007).

10 Καρδιακές κερατίνες K8/K18 και ιδιότητες πολυδύναμων κυττάρων.

Σε συνέχεια της υπόθεσης ως προς τη μεταστροφή του προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε εμβρυικό γονιδιακό πρότυπο, μία άλλη μηχανιστική υπόθεση για τα μυοκαρδιοκύτταρα που εκφράζουν K8/K18 είναι η μετατροπή τους σε πολυδύναμου-τύπου κύτταρα (stem-like cells). Οι K8 και K18 έχει βρεθεί πως εκφράζονται σε μέτρια επίπεδα στα ανθρώπινα εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα (human embryonic stem cells, hES) και στα επιβλαστικά κύτταρα ποντικίου (mouse epiblast cells, EpiSC), ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα στα εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα ποντικίου (Maurer, Nelson et al. 2008), όπου εκφράζονται επιπλέον κατά τη διαφοροποίησή τους σε παλλόμενα μυοκαρδιοκύτταρα (Pal and Khanna 2005). Η έκφραση των κερατινών στα εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα μπορεί να ρυθμίζει την ευαισθησία

τους στην απόπτωση μέσω των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου και στο στρες (Maurer, Nelson et al. 2008).

Επιπλέον, τα μυοκαρδιοκύτταρα που εκφράζουν K8/K18 μπορεί να αντιπροσωπεύουν αποδιαφοροποιημένα ενήλικα μυοκαρδιοκύτταρα με ενδεχόμενες ιδιότητες πολυδύναμων κυττάρων, ή λιγότερο πιθανόν να είναι μυοκαρδιοκύτταρα του ενήλικου μυοκαρδίου εγκλωβισμένα σε εμβρυικό στάδιο. Εναλλακτικά, θα μπορούσαν να δηλώνουν μυοκαρδιοκύτταρα σε μια διαδικασία μετάπτωσής του σε επιθηλιακού τύπου κύτταρα. Τέλος, μπορεί να αντιπροσωπεύουν έναν εξειδικευμένο υποπληθυσμό κυττάρων, προερχόμενο από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα που μετατρέπονται σε μυοκαρδιοκύτταρα, ή δεξαμενή ενήλικων πολυδύναμων κυττάρων. Ωστόσο, ακόμα λιγότερο πιθανό να αποτελούν μέρος κάποιου από τους προτεινόμενους στη βιβλιογραφία πληθυσμούς πολυδύναμων κυττάρων του μυοκαρδίου (Laflamme and Murry 2011), λόγω του ιδιαίτερα μεγάλου αριθμού τους, ειδικά στο μυοκάρδιο ποντικού υπερέκφρασης TNF- α .

Τέλος, εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι το εύρημα των μελετών μας πως τα κύτταρα του επικαρδίου εκφράζουν τις K8/K18, τα οποία έχουν σχετιστεί με ιδιότητες πολυδύναμων κυττάρων στο μυοκάρδιο του μοντέλου zebrafish (Lepilina, Coon et al. 2006).

11 Το δίκτυο K8/K18 ρυθμίζει την οργάνωση των εμβόλιμων δίσκων.

Μία ιδιαίτερα σημαντική λειτουργία του δικτύου K8/K18, η οποία φαίνεται να χαρακτηρίζει και άλλα ζεύγη κερατινών, οφείλεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασής τους με τις διακυτταρικές δομές πρόσδεσης, τα δεσμοσώματα (Green and Gaudry 2000; Jamora and Fuchs 2002). Η αλληλεπίδραση αυτή είναι κρίσιμη και συμμετέχει στη σταθεροποίηση των δομών των δεσμοσωμάτων, στη σωστή τοποθέτηση των πρωτεϊνών-συστατικών των δομών αυτών, στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης και στην υποβοήθηση της διακυτταρικής μηχανικής και ιονικής επικοινωνίας.

Στα ηπατοκύτταρα, έλλειψη του δικτύου K8/K18 οδηγεί σε μεταβολές της κατανομής της πρωτεΐνης δεσμοπλακίνης στην επιφανειακή μεμβράνη, ενώ το πρότυπο φωσφορυλίωσης της περιοχής κεφαλής της K8 επηρεάζει την κατανομή της στα δεσμοσώματα (Loranger, Gilbert et al. 2006). Η K8 είναι απαραίτητη για τη

σωστή τοποθέτηση/διευθέτηση της δεσμοπλακίνης με τις κερατίνες και τη δεσμογλεΐνη, μέσω ενός ανάστροφου μηχανισμού εξαρτώμενου από τις φωσφοσερίνες (Loranger, Gilbert et al. 2006). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το εύρημα πρόσφατης εργασίας, η οποία δηλώνει ως κυρίαρχη λειτουργία των δικτύων κερατίνης αυτή της διατήρησης της κυτταρικής προσκόλλησης μέσω οργάνωσης των δεσμοσωμάτων, σε κερατινοκύτταρα γενετικά τροποποιημένου μοντέλου έλλειψης όλων των κερατινών (Kroger, Loschke et al. 2013). Η δεσμοπλακίνη των κερατινοκυττάρων στα οποία λείπουν όλες οι κερατίνες, παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα PKC- α -εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης, προκαλώντας την αποδιοργάνωσή της, ενώ και ο ρυθμός ενδοκυττάρωσής της είναι αυξημένος, καθιστώντας τα επιθηλιακά φύλλα πιο ευαίσθητα στο μηχανικό στρες (Kroger, Loschke et al. 2013).

Στην παρούσα εργασία, προτείνουμε έναν παρόμοιο μηχανισμό καρδιοπροστατευτικής δράσης για το δίκτυο K8/K18 στο μυοκάρδιο. Δείχνουμε πως οι πρωτεΐνες K8/K18 εκφράζονται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στο μυοκάρδιο έπειτα από υπερέκφραση του παράγοντα TNF- α και σχηματίζουν ένα δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων με κυρίαρχο πρότυπο εντόπισης στους εμβόλιμους δίσκους των μυοκαρδιοκυττάρων (Εικόνες 31-35) και δευτερευόντως στις M-ζώνες των μυοϊνιδίων. Αυτό το εξειδικευμένο πρότυπο εντόπισης, το οποίο είναι εντονότερο απουσία του δικτύου της δεσμίνης, προτείνει πως το καρδιακό δίκτυο K8/K18 κατέχει εξειδικευμένες λειτουργικές ιδιότητες.

Το ειδικό για τους εμβόλιμους δίσκους πρότυπο των K8/K18 χαρακτηρίστηκε επαρκώς μέσω μεθόδων ανοσοφθορισμού για διαφορετικές πρωτεΐνες-συστατικά των εμβόλιμων δίσκων των μυοκαρδιοκυττάρων, όπως η δεσμοπλακίνη, η πλακογλοβίνη, η β -κατενίνη, η N-καντχερίνη και η κοννεξίνη-43 (Εικόνα 33), αντιπροσωπεύοντας όλους τους τύπους δομών που χαρακτηρίζουν τη λεγόμενη “area composita” (Franke, Borgmann et al. 2006) και τις δομές διακυτταρικών συνδέσεων. Η υψηλή ειδικότητα του δικτύου K8/K18 για τους εμβόλιμους δίσκους υποδηλώνει την ιδιαίτερη λειτουργική του σημαντικότητα, καθώς η παρουσία του είναι αναγκαία για τη σωστή τοποθέτηση των πρωτεϊνών της area composita των εμβόλιμων δίσκων (Εικόνα 41). Επιπλέον, η κοννεξίνη-43, η οποία συμμετέχει στις λειτουργικά σημαντικές δομές των διακυτταρικών καναλιών των μυοκαρδιοκυττάρων, εμφανίζει διαταραγμένη εντόπιση ελλείψει του δικτύου K8/K18 (Εικόνα 42). Τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς η σωστή τοποθέτηση και λειτουργία των διακυτταρικών δομών των εμβόλιμων δίσκων είναι κυρίαρχης σημασίας για τη λειτουργία του μυοκαρδίου.

12 Το δίκτυο K8/K18 ρυθμίζει την οργάνωση και λειτουργία των μιτοχονδρίων προσδίδοντας καρδιοπροστασία.

Ένας άλλος σημαντικός ρόλος των ενδιάμεσων ινιδίων είναι η οργάνωση των κυτταρικών οργανιδίων και ιδιαίτερα των μιτοχονδρίων (Toivola, Tao et al. 2005; Capetanaki, Bloch et al. 2007). Τα μιτοχόνδρια, κεντρικοί τελεστές στον αποπτωτικό και νεκρωτικό θάνατο (Green and Kroemer 2005), φαίνεται να αλληλεπιδρούν φυσικά με τη δεσμίνη στα μυοκύτταρα του γραμμωτού μυός (Reipert, Steinbock et al. 1999), με τα νευροϊνίδια (Wagner, Lifshitz et al. 2003) και τη βιμεντίνη (Tang, Lung et al. 2008). Μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη βιμεντίνης φανέρωσε μια σημαντική σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών ενδιάμεσων ινιδίων και των μιτοχονδριακών δομών και λειτουργιών. Ωστόσο, τα πλέον καθοριστικά ευρήματα σχετικά με τη λειτουργική συσχέτιση μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων και των μιτοχονδρίων προήλθαν από τις μελέτες στα ποντίκια με έλλειψη της δεσμίνης. Τα μιτοχόνδρια του καρδιακού και σκελετικού μυός των ποντικών αυτών παρουσιάζουν ανώμαλο σχήμα και γενικότερη μορφολογία, μεταβολές σε διάφορες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες και διάφορες λειτουργικές διαταραχές, όπως μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου επαγόμενη από το ADP, μετατόπιση σύζευξης της αδενίνης και μειωμένη μέγιστη τιμή ρυθμού αναπνοής (Milner, Weitzer et al. 1996; Fountoulakis, Soumaka et al. 2005; Capetanaki, Bloch et al. 2007; Capetanaki Y, Papathanasiou S et al. 2015) (βλέπε κεφάλαιο «Εισαγωγή»).

Τα ενδιάμεσα ινίδια των κερατινών έχουν επίσης εμπλακεί στη ρύθμιση των μιτοχονδρίων σε διάφορα επίπεδα, υποστηρίζοντας τα ευρήματά μας σχετικά με τη συμμετοχή του καρδιακού δικτύου K8/K18 στη ρύθμιση της οργάνωσης αλλά και λειτουργίας των μιτοχονδρίων. Σε κύτταρα καλλιέργειας τα οποία επιμολύνθηκαν με μόρια της K18 που φέρουν τη μετάλλαξη R89C, η μορφολογία των μιτοχονδρίων εμφανίζεται διαταραγμένη (Kumemura, Harada et al. 2008). Επιπλέον, η Pirh2, η οποία έχει πρόσφατα περιγραφεί πως αλληλεπιδρά με το δίκτυο K8/18, προτείνεται πως επηρεάζει την κυτταρική διευθέτηση των μιτοχονδρίων, ρυθμίζοντας την οργάνωση του δικτύου ινιδίων K8/K18 (Duan, Yao et al. 2009). Διατάραξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Pirh2 και του K8/K18, είτε καταστέλλοντας την έκφραση της Pirh2 είτε μέσω ακτινοβολίας UV, οδηγεί σε μη φυσιολογική κυτταρική οργάνωση των μιτοχονδρίων και αυξημένη απόπτωση μέσω UV ακτινοβολίας (Duan, Yao et al. 2009). Παρόμοια, σε σκελετικό μυ τύπου γρήγορης συσταλτικότητας (fast-twitch), όπου οι K8/K19 έχουν προταθεί πως εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται συγκεντρωμένα σε κενά μεταξύ

του σαρκειλήμματος και παράπλευρων μυοϊνιδίων, στην απουσία της K19 (Krt19^{-/-} μοντέλο ποντικού) (Stone, O'Neill et al. 2007).

Επίσης σημαντική είναι η παρατήρηση των Tao et al, όπου η ανάλυση ηπάτων με έλλειψη, ή διατάραξη, του δικτύου K8/K18 δείχνει ανώμαλη διευθέτηση και οργάνωση των μιτοχονδρίων, τα οποία επίσης είναι σημαντικά μικρότερα συγκριτικά με τα μιτοχόνδρια αγρίου τύπου ηπάτων. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν πως οι κερατίνες εμπλέκονται, άμεσα ή έμμεσα, στη ρύθμιση της μορφολογίας και λειτουργίας των μιτοχονδρίων (Tao, Looi et al. 2009). Επομένως, οι διαταραχές των μιτοχονδρίων μπορεί να αποτελούν έναν σημαντικό μηχανισμό για την αποδεδειγμένη ευαισθησία σε ηπατικές βλάβες ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στις K8 και K18 (Toivola, Boor et al. 2015).

Στις μελέτες μας, μία από τις πιο σημαντικές παρατηρήσεις σχετικά με το λειτουργικό ρόλο του καρδιακού δικτύου K8/K18, είναι οι ανωμαλίες στη μορφολογία, την οργάνωση αλλά και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων στο μυοκάρδιο των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* ποντικών. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον πως η έλλειψη του εκτοπικού δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων K8/K18 στα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκαρδιοκύτταρα οδηγεί σε κοινές μιτοχονδριακές ανωμαλίες με τη χαρακτηριστική παθολογία που παρατηρείται στα μιτοχόνδρια του *Des^{-/-}* μυοκαρδίου (Milner, Mavroidis et al. 2000). Ενώ στα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκαρδιοκύτταρα τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν γενικά μια φυσιολογική εικόνα στο επίπεδο οργάνωσης και μορφολογίας τους (Εικόνα 16-18), στα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* ποντίκια τα μιτοχόνδρια είναι ιδιαίτερα διαταραγμένα, συγκεντρωμένα σε περιοχές βλαβών και εμφανίζουν μη φυσιολογική πυκνότητα ηλεκτρονίων και κατεστραμμένη μιτοχονδριακή μήτρα (Εικόνες 45 και 46).

Ενώ διαταραχές στα μιτοχόνδρια μπορεί να παρατηρηθούν επίσης σε εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε τομές των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκαρδιοκυττάρων, είναι σπάνιες και σε πολύ μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* μυοκαρδιοκύτταρα. Ωστόσο, μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε απομονωμένα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν πιο ξεκάθαρα τη βελτίωση της μορφολογίας των *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* σε σχέση με τα *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}Krt18^{-/-}* μιτοχόνδρια (Εικόνα 46). Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει επίσης τον σημαντικό ρόλο του κυτταροσκελετού της δεσμίνης στην οργάνωση και ρύθμιση των μιτοχονδρίων, εφόσον η έλλειψή της –ή η διατάραξή της στην περίπτωση του μυοκαρδίου υπερέκφρασης TNF-α– απαιτεί την εκτοπική επαγωγή εναλλακτικού κυτταροσκελετού με σκοπό να διατηρήσει σε κάποιο βαθμό τη σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων, μεταξύ άλλων.

Οι σε βάθος μελέτες μας της μιτοχονδριακής λειτουργίας συνετέλεσαν καθοριστικά στο χαρακτηρισμό των μηχανισμών καρδιοπροστασίας του δικτύου K8/K18 στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο (Εικόνες 47 και 48). Για πρώτη φορά

παρουσιάζεται, πέραν της οργάνωσης της δομής, λειτουργική συσχέτιση για τις K8/K18 και τις ιδιότητες της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς επίσης και των οξειδοαναγωγικών χαρακτηριστικών των μιτοχονδρίων. Επιπλέον του μηχανισμού δράσης του δικτύου K8/K18, παρουσιάστηκε η προστατευτική δράση του δικτύου της δεσμίνης στα παραπάνω λειτουργικά χαρακτηριστικά των καρδιακών μιτοχονδρίων, μέσω της μελέτης του μοντέλου *Des^{-/-}*, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (βλέπε κεφάλαιο «Εισαγωγή»).

13 Οι κερατίνες K8 και K18 εκφράζονται στο ανθρώπινο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια - Κλινική σημασία.

Μέσω μελετών σε πειραματικά *in vivo* μοντέλα, προτείνουμε έναν νέο μηχανισμό καρδιοπροστασίας μέσω του παράγοντα TNF- α στην καρδιακή ανεπάρκεια, που στηρίζεται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού ενδιάμεσων ινιδίων. Ο επανασυσχετισμός του ρόλου του TNF- α και των βασικών βιολογικών του δράσεων σε συνάρτηση με τον κυτταροσκελετό ενδιάμεσων ινιδίων, είναι αναγκαίος για την κατανόηση του ρόλου του στην καρδιακή παθοφυσιολογία του ανθρώπου. Αυτό θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει στη διαλεύκανση των αιτιών για την αποτυχία των κλινικών μελετών με χρήση αντι-κυτταροκινών στην παθολογία του μυοκαρδίου (Feldman, Kadokami et al. 2003).

Κεντρικό εύρημα της παρούσας διατριβής αποτελεί η ανακάλυψη της δυνατότητας του ανθρώπινου μυοκαρδίου να εκφράζει τις κερατίνες K8 και K18 σε παθολογικές καταστάσεις και μάλιστα στα μυοκαρδιοκύτταρα. Είναι η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία όπου προτείνεται η έκφραση και ο σχηματισμός δικτύου K8/K18 στην παθοφυσιολογία του ενήλικου μυοκαρδίου του ανθρώπου.

Οι κερατίνες δεν είχαν βρεθεί να εκφράζονται στο ισχαιμικό μυοκάρδιο ή στο μυοκάρδιο ασθενών με υπερτροφική καρδιομυοπάθεια (D'Amati, Kahn et al. 1992). Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στο συγκεκριμένο πλαίσιο καρδιακής παθολογίας, ή σε τεχνικούς περιορισμούς (π.χ. ελλιπής ειδικότητα των αντισωμάτων) που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη. Ωστόσο, κομμένη K18 έχει προταθεί να συνεντοπίζεται με συσσωματώματα λιποφουσκίνης στα μυοκαρδιοκύτταρα σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία νόσο. Στη συγκεκριμένη αναφορά προτείνεται πως η κομμένη K18 δεν προέρχεται από τα μυοκαρδιοκύτταρα,

καθώς χρώση για την K18 στα μυοκαρδιοκύτταρα ασθενών ήταν αρνητική (Soleiman, Lukschal et al. 2008). Το σύστημα αυτό μελέτης είναι επικίνδυνο για ψευδώς θετικά αποτελέσματα στα πειράματα εντόπισης της κομμένης κερατίνης 18, λόγω της ιδιαίτερα έντονης ικανότητας αυτοφθορισμού των συσσωματωμάτων λιποφουσκίνης, έναν τεχνικό περιορισμό ο οποίος έχει συζητηθεί στη βιβλιογραφία (Kuruc and Franke 1988).

Από τις *in vivo* μελέτες μας στα ποντίκια με καρδιο-ειδική υπερέκφραση του παράγοντα TNF- α , μπορούμε να υποθέσουμε πως η έκφραση των κερατινών K8 και K18 στο ανθρώπινο παθολογικό μυοκάρδιο οφείλεται στην επαγωγή του TNF- α , η οποία είναι επίσης βιβλιογραφικά γνωστό πως συμβαίνει στην καρδιά ασθενών με διαφόρων τύπων καρδιακή παθολογία (Levine, Kalman et al. 1990; Mann 2003). Παρότι τα επίπεδα έκφρασης των K8 και K18 φαίνονται μικρότερα στο ανθρώπινο παθολογικό μυοκάρδιο, σε σύγκριση με τα ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης στο μυοκάρδιο υπερέκφρασης TNF- α ποντικών (MHCsTNF α μοντέλο), είναι σημαντικά, εάν υπολογίσουμε το μεγαλύτερο μέγεθος των ανθρώπινων μυοκαρδιοκυττάρων και ιδιαίτερα το εξειδικευμένο πρότυπο εντόπισης των πρωτεϊνών αυτών στους εμβόλιμους δίσκους των μυοκαρδιοκυττάρων (Εικόνες 64 και 65).

Οι πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων K8 και K18 είναι ευρέως γνωστές βιβλιογραφικά για την κλινική σημαντικότητά τους. Η αυστηρή ιστοειδικότητά τους για τα απλά επιθήλια και το σχετικά σταθερό πρότυπο έκφρασής τους κατά το νεοπλασματικό μετασχηματισμό, τις καθιστούν πολύτιμους διαγνωστικούς δείκτες. Είναι επίσης χρήσιμες στην πρόγνωση όγκων, καθώς προκύπτει ότι τα επίπεδα έκφρασης σχετίζονται με μικρότερο βαθμό επιθετικότητας (Omary, Ku et al. 2009). Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία του ήπατος (Strnad, Paschke et al. 2012), καθώς μεταλλάξεις στα γονίδια των K8 και K18 στον άνθρωπο έχουν βρεθεί να προκαλούν ασθένειες του ήπατος (Omary and Ku 1997; Toivola, Boor et al. 2015).

Πρόσφατα στοιχεία ενισχύουν περαιτέρω την κλινική αξία της ανακάλυψης των καρδιακών κερατινών K8 και K18. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως συστημακά διαλυτά μόρια κομμένης από κασπάσες κερατίνης K8 (caspase cleaved keratin 18, ccCK-18), τα οποία ανιχνεύονται από ένα ειδικό αντίσωμα για έναν νέο επίτοπο που εμφανίζεται έπειτα από την πρωτεόλυση από τις κασπάσες, είναι αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, ιδιαίτερα οξέος μυοκαρδιακού εμφράγματος (Adlbrecht, Hoetzenecker et al. 2007; Herzer, Kneiseler et al. 2011). Επιπρόσθετα, αυτο-αντισώματα για την κερατίνη 18 έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και ισχαιμική καρδιομυοπάθεια (Mattey, Dawes et al. 2004). Οι τελευταίες παρατηρήσεις, μαζί με το γεγονός ότι κομμάτια κερατινών

απλών επιθηλίων στον ορό έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες για όγκους, με σκοπό την παρακολούθηση της πορείας της ασθένειας σε διάφορους τύπους καρκίνου (Linder 2007), προτείνουν την ενδεχόμενη αξία εκμετάλλευσης των K8 και K18 ως βιοδείκτες για τις ασθένειες του μυοκαρδίου. Επιπλέον, οι μελέτες μας στα *in vivo* διαγονιδιακά μοντέλα ποντικού δηλώνουν μία πιθανή συσχέτιση του διαφορικού προτύπου έκφρασης των K8/K18 και των σταδίων ανάπτυξης της καρδιακής ανεπάρκειας, σε συνδυασμό και με το βαθμό διατάραξης του δικτύου της δεσμίνης (για διαταραχές της δεσμίνης βλέπε επόμενη παράγραφο).

Παρόλο που τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα έντονο ενδιαφέρον για την πιθανή χρήση της K18 ως βιοδείκτη για τις καρδιαγγειακές ασθένειες, οι μελέτες αυτές προτείνουν πως η K18 προκύπτει από βλάβες στα ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία μπορεί να εκφράζεται, όπως κάποια ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων της καρδιάς και στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (Borg, Dawes et al. 1993), αποκλείοντας την έκφραση της K18 από τα μυοκαρδιοκύτταρα (Soleiman, Lukschal et al. 2008). Πιο πρόσφατα, προτάθηκε πως η κομμένη κερατίνη 18 μπορεί να προέρχεται από τα ηπατοκύτταρα, σε απόκριση σε βλάβες στο ήπαρ που μπορεί να προκαλούνται από τις καρδιακές ασθένειες (Herzer, Kneiseler et al. 2011). Επιπλέον, σε αντίθεση με τις μελέτες της παρούσας διατριβής, οι μελέτες αυτές αναφέροντα σε οξεία στεφανιαία σύνδρομο και ισχαιμικές ασθένειες, ενώ μόνο οι Herzer et al. μελέτησαν επίσης δείγματα από ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια.

Επιπροσθέτως, όπως έχει αναφερθεί ήδη, τα δείγματα υγιούς ανθρώπου χωρίς περιγραφόμενη παθολογία στο μυοκάρδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας στις μελέτες μας, ήταν αρνητικά για έκφραση κερατινών 8, 18 και 19 σε όλες τις πειραματικές προσεγγίσεις που πραγματοποιήθηκαν (Εικόνα 65, αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται για την K19), σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Gown and Vogel 1984; Kuruc and Franke 1988; Jerse and Zidar 2011).

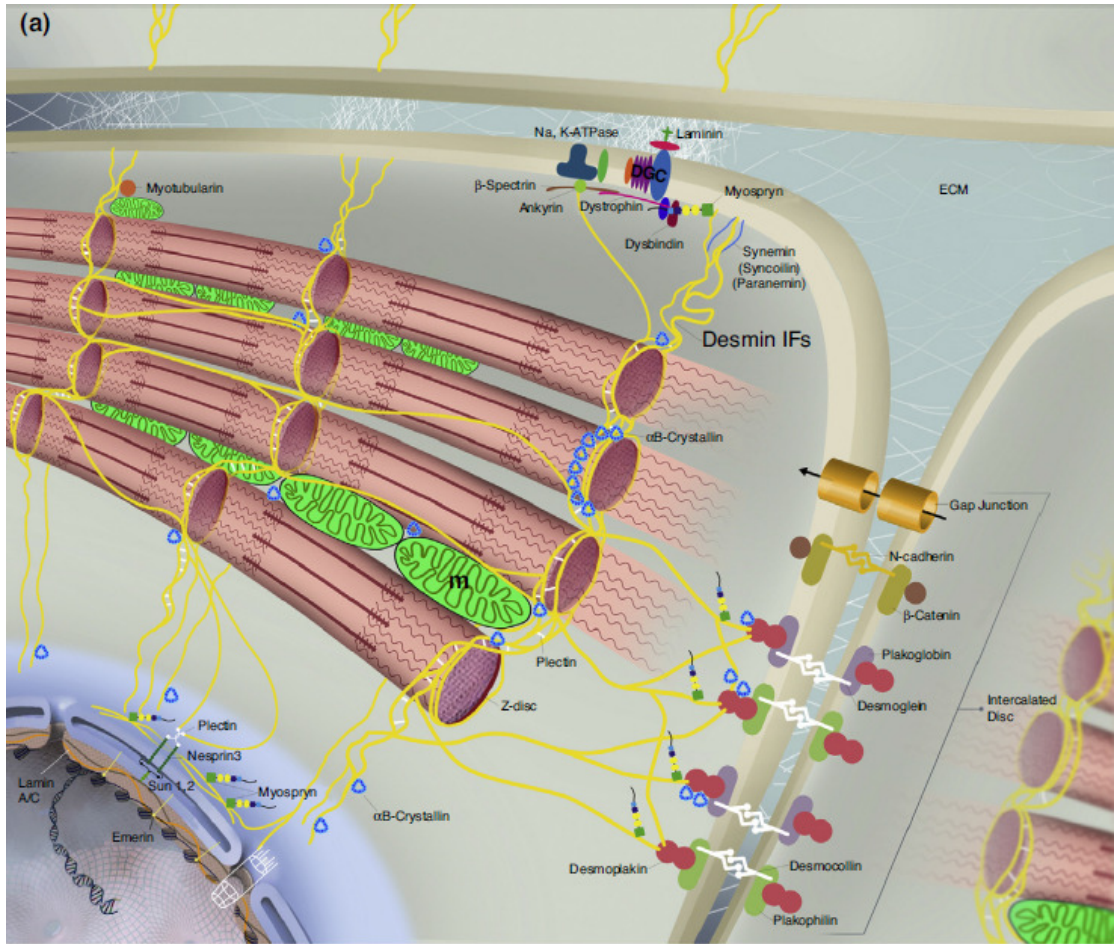
14 Το δίκτυο της δεσμίνης είναι διαταραγμένο στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια.

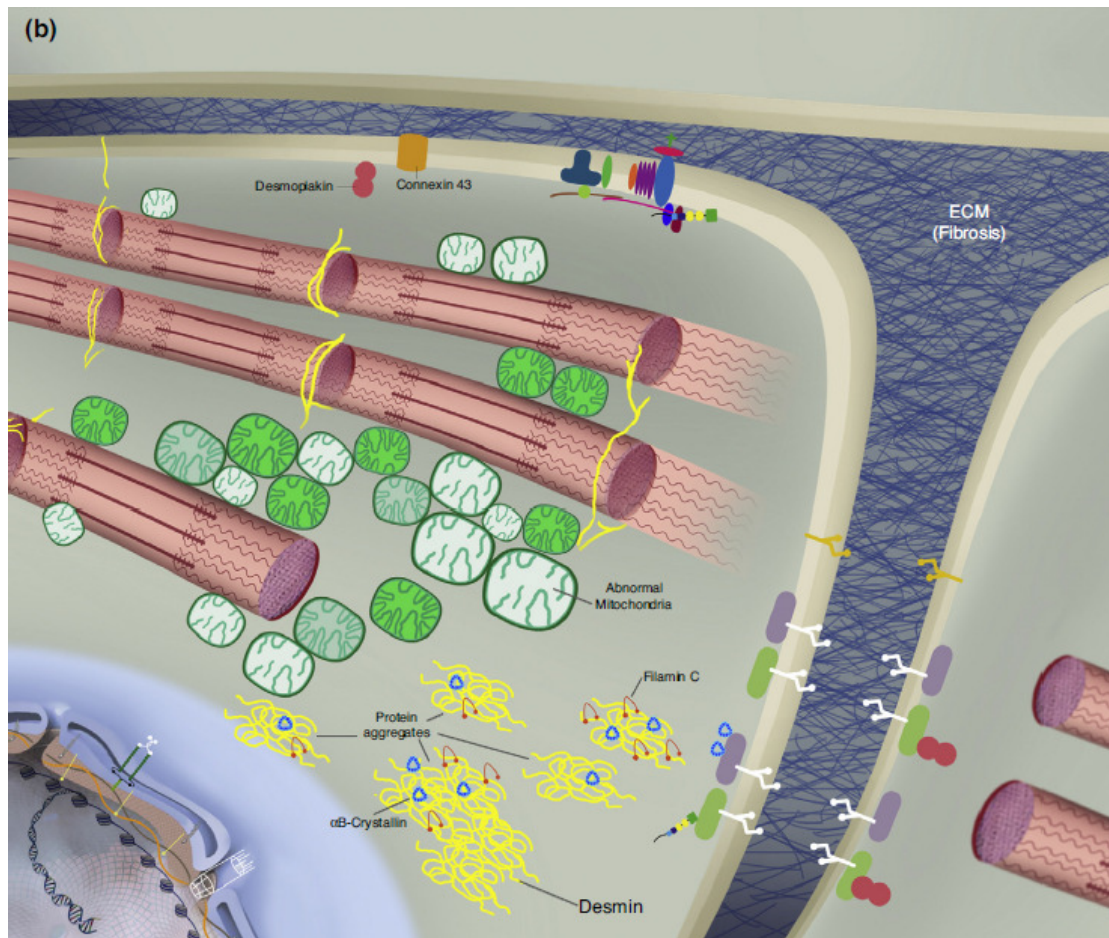
Ακόμα ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα της συγκεκριμένης διατριβής, είναι πως το δίκτυο της δεσμίνης είναι διαταραγμένο στα μυοκαρδιοκύτταρα του ανθρώπινου παθολογικού μυοκαρδίου, καθώς έχει απολέσει το ειδικό για τους εμβόλιμους δίσκους πρότυπο εντόπισής του (Εικόνες 65 και 66), σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας σε γενετικό μοντέλο καρδιομυοπάθειας (MHCsTNFα μοντέλο ποντικού) (Panagoroulou, Davos et al. 2008). Παρόμοια

στοιχεία για τη δεσμίνη στην καρδιομυοπάθεια ανθρώπου έχουν προκύψει από την περίπτωση του συνδρόμου Carvajal, όπου η δεσμίνη χάνεται από τους εμβόλιμους δίσκους, ενώ ωστόσο διατηρείται η δεσμοκολλίνη (Kaplan, Gard et al. 2004).

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που προτείνει τη διατάραξη του δικτύου της δεσμίνης και την απουσία της από τους εμβόλιμους δίσκους –πιθανόν λόγω της πρωτεόλυσης της από την κασπάση 6, όπως συμβαίνει στα MHCsTNFα ποντίκια– γενικά στην καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Επιπρόσθετα, υποθέτουμε πως η διατάραξη αυτή του δικτύου της δεσμίνης οφείλεται στη δράση του TNF-α, βάση και των μελετών μας στο μοντέλο ποντικίου MHCsTNFα. Η ανακάλυψη του εναλλακτικού δικτύου K8/K18 στο διαταραγμένο μυοκάρδιο και οι προτεινόμενοι μηχανισμοί του, δηλώνουν τον κεντρικό ρόλο του κυτταροσκελετού δεσμίνης, του φυσιολογικού καρδιακού δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων, στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδίου και θα μπορούσε να βοηθήσει στην περαιτέρω κατανόηση του ρόλου της και των άγνωστων έως τώρα μηχανισμών καρδιοπροστασίας.

Ο ρόλος της δεσμίνης στην παθοφυσιολογία του μυός είναι ιδιαίτερα σημαντικός, με μία πληθώρα μεταλλάξεων να σχετίζονται με τις αποκαλούμενες «ασθένειες που σχετίζονται με τη δεσμίνη», ή «δεσμινοπάθειες» (Capetanaki Y, Parathanasiou S et al. 2015) (βλέπε κεφάλαιο «Εισαγωγή»). Ωστόσο η παρούσα μελέτη προτείνει έναν κεντρικό μηχανιστικό ρόλο για το δίκτυο της δεσμίνης στην καρδιακή ανεπάρκεια γενικά. Καθώς το δίκτυο δεσμίνης εμφανίζεται διαταραγμένο στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, θα μπορούσαμε να προτείνουμε πως η καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου αποτελεί ίσως την πιο συχνή μορφή δεσμινοπάθειας (Εικόνα 68).





Εικόνα 68. Το δίκτυο της δεσμίνης στο φυσιολογικό και παθολογικό μυοκάρδιο. Η δεσμίνη (κίτρινο) στο φυσιολογικό μυοκάρδιο (α) διασυνδέει τη συσταλτή συσκευή με τις δομές των εμβόλιμων δίσκων (Intercalated Disc), τα μεμβρανικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια (πράσινο) και τη σακροπλασματική μεμβράνη. Στο παθολογικό μυοκάρδιο (β) το δίκτυο της δεσμίνης είναι διαταραγμένο, με έντονη την παρουσία συσσωματωμάτων. Η στόχευση της δεσμίνης στους εμβόλιμους δίσκους χάνεται και οι δομές αυτές εμφανίζονται διαταραγμένες. Επιπλέον τα μυοϊνίδια παρουσιάζουν ανωμαλίες όπως και τα μιτοχόνδρια που εμφανίζουν έντονες διαταραχές στη μορφολογία και οργάνωσή τους. Από ανασκόπηση (Carpetanaki Y, Papathanasiou S et al. 2015).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΕΣ

Τα αποτελέσματα της έρευνας στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής οδήγησαν σε ιδιαίτερα σημαντικές ανακαλύψεις για τις βασικές ιδιότητες των μυοκαρδιοκυττάρων στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδίου. Αντλήθηκαν κρίσιμα συμπεράσματα για τη δράση του παράγοντα TNF-α στην καρδιά και χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά καινοτόμοι μηχανισμοί απόκρισης του μυοκαρδίου σε παθολογικές καταστάσεις, με καρδιοπροστατευτική δράση.

Συγκεκριμένα, οι καινοτόμες ανακαλύψεις της μελέτης μας συνοψίζονται επιγραμματικά στα εξής:

- Προτείνουμε για πρώτη φορά πως η υπερέκφραση του παράγοντα TNF-α σε μεγάλη κλίμακα στο μυοκάρδιο προσδίδει καρδιοπροστασία στο μοντέλο έλλειψης του γονιδίου της δεσμίνης.
- Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία παρουσιάζει τη δυνατότητα του ενήλικου μυοκαρδιοκυττάρου να εκφράζει τις επιθηλιακές πρωτεΐνες κερατίνη 8 και κερατίνη 18, σε ανεξάρτητα *in vivo* μοντέλα. Δείξαμε πως το φαινόμενο αυτό είναι κοινό χαρακτηριστικό απόκρισης σε διαφορετικές καταστάσεις παθολογίας του μυοκαρδίου.
- Δείξαμε πως οι εκτοπικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες K8 και K18 σχηματίζουν δίκτυο κυτταροσκελετού ενδιάμεσων ινιδίων με ειδικά χαρακτηριστικά προτύπου εντόπισης σε σημαντικές δομές του μυοκαρδιοκυττάρου, όπως οι εμβόλιμοι δίσκοι και τα κοσταμερή.
- Προτείνουμε για πρώτη φορά έναν μηχανιστικό ρόλο για τον παράγοντα TNF-α στην εκτοπική έκφραση των πρωτεϊνών K8/K18 στο μυοκάρδιο, μέσω της γονιδιακής ρύθμισής τους από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB.
- Ανακαλύψαμε έναν καινοτόμο μηχανισμό καρδιοπροστασίας *in vivo*, μέσω εκτοπικής έκφρασης και σχηματισμού του εναλλακτικού δικτύου κυτταροσκελετού K8/K18 στο παθολογικό μυοκάρδιο έλλειψης της δεσμίνης,

αλλά και στο μοντέλο πειραματικά προκαλούμενης καρδιακής ανεπάρκειας μέσω περισφίξης της αορτής.

- Παρουσιάζουμε πως το φαινόμενο της εκτοπικής έκφρασης των επιθηλιακών πρωτεϊνών K8/K18 συμβαίνει και στο ανθρώπινο παθολογικό μυοκάρδιο, σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Οι K8/K18 σχηματίζουν δίκτυο στα μυοκαρδιοκύτταρα με παρόμοια χαρακτηριστικά εντόπισης όπως βρέθηκε στα *in vivo* μοντέλα.
- Τέλος δείχνουμε πως ο φυσιολογικός κυτταροσκελετός της δεσμίνης είναι διαταραγμένος στο ανθρώπινο παθολογικό μυοκάρδιο και απουσιάζει από τους εμβόλιμους δίσκους των μυοκαρδιοκυττάρων, όπου εντοπίζεται ο εναλλακτικός κυτταροσκελετός των K8/K18 με μεγαλύτερη πιστότητα.

Οι ανακαλύψεις αυτές προτείνουν την επαναξιολόγηση της παρούσας γνώσης για τη βιολογία του μυοκαρδιοκυττάρου, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στις ασθένειες του μυοκαρδίου του ανθρώπου. Επιπλέον, η ενδεχόμενη διαγνωστική ή ακόμα και προγνωστική αξία για διαφορετικούς τύπους και στάδια καρδιακών παθολογιών είναι σημαντική και χρήζει σε βάθος μελέτης και κλινικής αξιολόγησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, M. and R. G. Oshima (1990). "A single human keratin 18 gene is expressed in diverse epithelial cells of transgenic mice." J Cell Biol **111**(3): 1197-1206.
- Abu-Amer, Y., F. P. Ross, et al. (1998). "Tumor necrosis factor-alpha activation of nuclear transcription factor-kappaB in marrow macrophages is mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of Ikappa Balpha." J Biol Chem **273**(45): 29417-29423.
- Adlbrecht, C., K. Hoetzenecker, et al. (2007). "Elevated levels of interleukin-1beta-converting enzyme and caspase-cleaved cytokeratin-18 in acute myocardial infarction." Eur J Clin Invest **37**(5): 372-380.
- Agnetti, G., V. L. Halperin, et al. (2014). "Desmin modifications associate with amyloid-like oligomers deposition in heart failure." Cardiovasc Res **102**(1): 24-34.
- Alam, H., P. Gangadaran, et al. (2011). "Loss of keratin 8 phosphorylation leads to increased tumor progression and correlates with clinico-pathological parameters of OSCC patients." PLoS One **6**(11): e27767.
- Allen, R. E., L. L. Rankin, et al. (1991). "Desmin is present in proliferating rat muscle satellite cells but not in bovine muscle satellite cells." J Cell Physiol **149**(3): 525-535.
- Anderson, J., Z. Li, et al. (2002). "Models of skeletal muscle to explain the increase in passive stiffness in desmin knockout muscle." J Biomech **35**(10): 1315-1324.
- Anker, S. D. and A. J. Coats (2002). "How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH." Int J Cardiol **86**(2-3): 123-130.
- Arber, S., J. J. Hunter, et al. (1997). "MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure." Cell **88**(3): 393-403.
- Arin, M. J., M. A. Longley, et al. (2001). "Focal activation of a mutant allele defines the role of stem cells in mosaic skin disorders." J Cell Biol **152**(3): 645-649.
- Arras, M., A. Hoche, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha in macrophages of heart, liver, kidney, and in the pituitary gland." Cell Tissue Res **285**(1): 39-49.
- Bader, B. L., L. Jahn, et al. (1988). "Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene." Eur J Cell Biol **47**(2): 300-319.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-683.
- Bang, M. L., C. Gregorio, et al. (2002). "Molecular dissection of the interaction of desmin with the C-terminal region of nebulin." J Struct Biol **137**(1-2): 119-127.

- Bantel, H., A. Luger, et al. (2004). "Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury." Hepatology **40**(5): 1078-1087.
- Banyer, J. L., N. H. Hamilton, et al. (2000). "Cytokines in innate and adaptive immunity." Rev Immunogenet **2**(3): 359-373.
- Bar, H., F. Bea, et al. (2001). "Phosphorylation of cytokeratin 8 and 18 in human vascular smooth muscle cells of atherosclerotic lesions and umbilical cord vessels." Basic Res Cardiol **96**(1): 50-58.
- Bar, H., N. Mucke, et al. (2007). "Assembly defects of desmin disease mutants carrying deletions in the alpha-helical rod domain are rescued by wild type protein." J Struct Biol **158**(1): 107-115.
- Bar, H., N. Mucke, et al. (2005). "Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with in vitro filament assembly at distinct stages." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15099-15104.
- Bar, H., S. Sharma, et al. (2009). "Interference of amino-terminal desmin fragments with desmin filament formation." Cell Motil Cytoskeleton **66**(11): 986-999.
- Barak, V., H. Goike, et al. (2004). "Clinical utility of cytokeratins as tumor markers." Clin Biochem **37**(7): 529-540.
- Baribault, H., J. Penner, et al. (1994). "Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice." Genes Dev **8**(24): 2964-2973.
- Baribault, H., J. Price, et al. (1993). "Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8." Genes Dev **7**(7A): 1191-1202.
- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol **11**(9): 372-377.
- Beil, M., A. Micoulet, et al. (2003). "Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells." Nat Cell Biol **5**(9): 803-811.
- Bellin, R. M., T. W. Huiatt, et al. (2001). "Synemin may function to directly link muscle cell intermediate filaments to both myofibrillar Z-lines and costameres." J Biol Chem **276**(34): 32330-32337.
- Bellin, R. M., S. W. Sernett, et al. (1999). "Molecular characteristics and interactions of the intermediate filament protein synemin. Interactions with alpha-actinin may anchor synemin-containing heterofilaments." J Biol Chem **274**(41): 29493-29499.
- Bennardini, F., A. Wrzosek, et al. (1992). "Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments." Circ Res **71**(2): 288-294.
- Beutler, B., J. Mahoney, et al. (1985). "Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells." J Exp Med **161**(5): 984-995.
- Bolli, R., Z. A. Bhatti, et al. (1997). "Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide." Circ Res **81**(1): 42-52.

- Borg, A. A., P. T. Dawes, et al. (1993). "Increased levels of IgA antibodies to cytokeratin-18 and epidermal keratin in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **36**(2): 229-233.
- Bozkurt, B., S. B. Kribbs, et al. (1998). "Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats." Circulation **97**(14): 1382-1391.
- Bozkurt, B., G. Torre-Amione, et al. (2001). "Results of targeted anti-tumor necrosis factor therapy with etanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure." Circulation **103**(8): 1044-1047.
- Brasier, A. R., D. Ron, et al. (1990). "A family of constitutive C/EBP-like DNA binding proteins attenuate the IL-1 alpha induced, NF kappa B mediated trans-activation of the angiotensinogen gene acute-phase response element." EMBO J **9**(12): 3933-3944.
- Breckler, J. and E. Lazarides (1982). "Isolation of a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments from avian embryonic skeletal muscle." J Cell Biol **92**(3): 795-806.
- Brown, M., M. McGuinness, et al. (2005). "Cardiac-specific blockade of NF-kappaB in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(1): H466-476.
- Bryant, D., L. Becker, et al. (1998). "Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha." Circulation **97**(14): 1375-1381.
- Bui, N. T., A. Livolsi, et al. (2001). "Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha." J Cell Biol **152**(4): 753-764.
- Burchfield, J. S., J. W. Dong, et al. (2010). "The cytoprotective effects of tumor necrosis factor are conveyed through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in the heart." Circ Heart Fail **3**(1): 157-164.
- Burke, B. and C. L. Stewart (2002). "Life at the edge: the nuclear envelope and human disease." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(8): 575-585.
- Burstein, B., E. Libby, et al. (2008). "Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences." Circulation **117**(13): 1630-1641.
- Butin-Israeli, V., S. A. Adam, et al. (2012). "Nuclear lamin functions and disease." Trends Genet **28**(9): 464-471.
- Cadrin, M., H. Hovington, et al. (2000). "Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver." J Hepatol **33**(2): 199-207.
- Canty, T. G., Jr., E. M. Boyle, Jr., et al. (1999). "Oxidative stress induces NF-kappaB nuclear translocation without degradation of IkappaBalpha." Circulation **100**(19 Suppl): II361-364.
- Capetanaki, Y. (2000). "Desmin cytoskeleton in healthy and failing heart." Heart Fail Rev **5**(3): 203-220.

- Capetanaki, Y. (2002). "Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function." Trends Cardiovasc Med **12**(8): 339-348.
- Capetanaki Y, Papathanasiou S, et al. (2015). "Desmin related disease: a matter of cell survival failure." Curr Opin Cell Biol **32**: 113-120.
- Capetanaki, Y., R. J. Bloch, et al. (2007). "Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles." Exp Cell Res **313**(10): 2063-2076.
- Capetanaki, Y., D. J. Milner, et al. (1997). "Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences." Cell Struct Funct **22**(1): 103-116.
- Capetanaki, Y. G., J. Ngai, et al. (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**(22): 6909-6913.
- Carlsson, L., Z. Li, et al. (1999). "Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice." Exp Cell Res **251**(1): 213-223.
- Caron, A. and F. Chapon (1999). "Desmin phosphorylation abnormalities in cytoplasmic body and desmin-related myopathies." Muscle Nerve **22**(8): 1122-1125.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Casscells, W., E. Speir, et al. (1990). "Isolation, characterization, and localization of heparin-binding growth factors in the heart." J Clin Invest **85**(2): 433-441.
- Caulin, C., C. F. Ware, et al. (2000). "Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis." J Cell Biol **149**(1): 17-22.
- Chan, R., B. F. Edwards, et al. (1988). "Characterization of two monoclonal antibodies in an immunohistochemical study of keratin 8 and 18 expression." Am J Clin Pathol **89**(4): 472-480.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.
- Chen, F., R. Chang, et al. (2003). "Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis." J Biol Chem **278**(9): 6848-6853.
- Chou, C. F., A. J. Smith, et al. (1992). "Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18." J Biol Chem **267**(6): 3901-3906.
- Chung, B. M., A. Arutyunov, et al. (2015). "Regulation of C-X-C chemokine gene expression by keratin 17 and hnRNP K in skin tumor keratinocytes." J Cell Biol **208**(5): 613-627.
- Chung, E. S., M. Packer, et al. (2003). "Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results

- of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial." Circulation **107**(25): 3133-3140.
- Clemen, C. S., H. Herrmann, et al. (2013). "Desminopathies: pathology and mechanisms." Acta Neuropathol **125**(1): 47-75.
- Cockerham, G. C., N. V. Laver, et al. (2002). "An immunohistochemical analysis and comparison of posterior polymorphous dystrophy with congenital hereditary endothelial dystrophy." Cornea **21**(8): 787-791.
- Cohen, S., B. Zhai, et al. (2012). "Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy." J Cell Biol **198**(4): 575-589.
- Cohn, J. N. (1995). "Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition." Circulation **91**(10): 2504-2507.
- Costa, M. L., R. Escaleira, et al. (2004). "Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein." Braz J Med Biol Res **37**(12): 1819-1830.
- Coulombe, P. A., M. E. Hutton, et al. (1991). "Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses." Cell **66**(6): 1301-1311.
- Coulombe, P. A., M. L. Kerns, et al. (2009). "Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility." J Clin Invest **119**(7): 1784-1793.
- Coulombe, P. A. and C. H. Lee (2012). "Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath." J Invest Dermatol **132**(3 Pt 2): 763-775.
- Coulombe, P. A. and M. B. Omary (2002). "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 110-122.
- Craig, R., A. Larkin, et al. (2000). "p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system." J Biol Chem **275**(31): 23814-23824.
- D'Amati, G., H. J. Kahn, et al. (1992). "Altered distribution of desmin filaments in hypertrophic cardiomyopathy: an immunohistochemical study." Mod Pathol **5**(2): 165-168.
- Delon, I. and N. H. Brown (2007). "Integrins and the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **19**(1): 43-50.
- Depianto, D., M. L. Kerns, et al. (2010). "Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin." Nat Genet **42**(10): 910-914.
- Deswal, A., B. Bozkurt, et al. (1999). "Safety and efficacy of a soluble P75 tumor necrosis factor receptor (Enbrel, etanercept) in patients with advanced heart failure." Circulation **99**(25): 3224-3226.

- Dettbarn, C. A., R. Betto, et al. (1994). "Modulation of cardiac sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor by sphingosine." J Mol Cell Cardiol **26**(2): 229-242.
- Deuchar, G. A., L. H. Opie, et al. (2007). "TNF α is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning." Life Sci **80**(18): 1686-1691.
- Devin, A., A. Cook, et al. (2000). "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." Immunity **12**(4): 419-429.
- Diguet, N., Y. Mallat, et al. (2011). "Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy." J Biol Chem **286**(40): 35007-35019.
- Dinareello, C. A., J. G. Cannon, et al. (1986). "Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1." J Exp Med **163**(6): 1433-1450.
- Dinsdale, D., J. C. Lee, et al. (2004). "Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis." Am J Pathol **164**(2): 395-407.
- Duan, S., Z. Yao, et al. (2009). "The Pirh2-keratin 8/18 interaction modulates the cellular distribution of mitochondria and UV-induced apoptosis." Cell Death Differ **16**(6): 826-837.
- Duffy, M. J. (2006). "Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value?" Clin Chem **52**(3): 345-351.
- Dupin, I., Y. Sakamoto, et al. (2011). "Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus." J Cell Sci **124**(Pt 6): 865-872.
- Duprey, P. and D. Paulin (1995). "What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo." Int J Dev Biol **39**(3): 443-457.
- Eddy, L. J., D. V. Goeddel, et al. (1992). "Tumor necrosis factor- α pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury." Biochem Biophys Res Commun **184**(2): 1056-1059.
- Elamrani, N., J. J. Brustis, et al. (1995). "Desmin degradation and Ca²⁺-dependent proteolysis during myoblast fusion." Biol Cell **85**(2-3): 177-183.
- Engel, D., R. Peshock, et al. (2004). "Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(3): H1303-1311.
- Erber, A., D. Riemer, et al. (1999). "Characterization of the Hydra lamin and its gene: A molecular phylogeny of metazoan lamins." J Mol Evol **49**(2): 260-271.
- Eriksson, J. E., D. L. Brautigan, et al. (1992). "Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 11093-11097.
- Erl, W., G. K. Hansson, et al. (1999). "Nuclear factor- κ B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells." Circ Res **84**(6): 668-677.

- Factor, S. M. and T. F. Robinson (1988). "Comparative connective tissue structure-function relationships in biologic pumps." Lab Invest **58**(2): 150-156.
- Favre, B., Y. Schneider, et al. (2011). "Plectin interacts with the rod domain of type III intermediate filament proteins desmin and vimentin." Eur J Cell Biol **90**(5): 390-400.
- Feldman, A. M., A. Combes, et al. (2000). "The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure." J Am Coll Cardiol **35**(3): 537-544.
- Feldman, A. M., T. Kadokami, et al. (2003). "The role of anticytokine therapy in heart failure: recent lessons from preclinical and clinical trials?" Med Clin North Am **87**(2): 419-440.
- Fickert, P., M. Trauner, et al. (2003). "Mallory body formation in primary biliary cirrhosis is associated with increased amounts and abnormal phosphorylation and ubiquitination of cytokeratins." J Hepatol **38**(4): 387-394.
- Finkel, M. S., C. V. Oddis, et al. (1992). "Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide." Science **257**(5068): 387-389.
- Foley-Comer, A. J., S. E. Herrick, et al. (2002). "Evidence for incorporation of free-floating mesothelial cells as a mechanism of serosal healing." J Cell Sci **115**(Pt 7): 1383-1389.
- Fountoulakis, M., E. Soumaka, et al. (2005). "Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model." J Mol Cell Cardiol **38**(3): 461-474.
- Fradette, J., L. Germain, et al. (1998). "The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent assembly properties." J Biol Chem **273**(52): 35176-35184.
- Franke, W. W., C. M. Borrmann, et al. (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." Eur J Cell Biol **85**(2): 69-82.
- Fuchs, E. (1995). "Keratins and the skin." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 123-153.
- Fuchs, E. and D. W. Cleveland (1998). "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease." Science **279**(5350): 514-519.
- Fuchs, E. and K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem **63**: 345-382.
- Fujii, T., H. Takagi, et al. (2000). "Bundle formation of smooth muscle desmin intermediate filaments by calponin and its binding site on the desmin molecule." J Biochem **127**(3): 457-465.
- Fujio, Y., K. Kunisada, et al. (1997). "Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes." J Clin Invest **99**(12): 2898-2905.
- Garcia-Verdugo, I., M. Synguelakis, et al. (2008). "Interaction of surfactant protein A with the intermediate filaments desmin and vimentin." Biochemistry **47**(18): 5127-5138.

- Gard, J. J., K. Yamada, et al. (2005). "Remodeling of gap junctions and slow conduction in a mouse model of desmin-related cardiomyopathy." Cardiovasc Res **67**(3): 539-547.
- Georgatos, S. D., K. Weber, et al. (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**(19): 6780-6784.
- Gilbert, S., A. Loranger, et al. (2001). "Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation." J Cell Biol **154**(4): 763-773.
- Gilbert, S., A. Loranger, et al. (2004). "Keratins modulate c-Flip/extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 antiapoptotic signaling in simple epithelial cells." Mol Cell Biol **24**(16): 7072-7081.
- Godsel, L. M., S. N. Hsieh, et al. (2005). "Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin." J Cell Biol **171**(6): 1045-1059.
- Goldfarb, L. G. and M. C. Dalakas (2009). "Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease." J Clin Invest **119**(7): 1806-1813.
- Goll, D. E., V. F. Thompson, et al. (2003). "The calpain system." Physiol Rev **83**(3): 731-801.
- Gonzalez-Quintela, A., J. Garcia, et al. (2006). "Serum cytokeratins in alcoholic liver disease: contrasting levels of cytokeratin-18 and cytokeratin-19." Alcohol **38**(1): 45-49.
- Goto, M., Y. Liu, et al. (1995). "Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts." Circ Res **77**(3): 611-621.
- Gown, A. M. and A. M. Vogel (1984). "Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues." Am J Pathol **114**(2): 309-321.
- Grachtchouk, M., R. Mo, et al. (2000). "Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin." Nat Genet **24**(3): 216-217.
- Granger, B. L. and E. Lazarides (1980). "Synemin: a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle." Cell **22**(3): 727-738.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2005). "Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?" J Clin Invest **115**(10): 2610-2617.
- Green, K. J. and C. A. Gaudry (2000). "Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?" Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 208-216.
- Grethe, S., M. P. Ares, et al. (2004). "p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L)." Exp Cell Res **298**(2): 632-642.

- Guelen, L., L. Pagie, et al. (2008). "Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions." Nature **453**(7197): 948-951.
- Guma, F. C. R., T. G. Mello, et al. (2001). "Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype." Biochem Cell Biol **79**(4): 409-417.
- Gupta, S., N. H. Purcell, et al. (2002). "Activation of nuclear factor-kappaB is necessary for myotrophin-induced cardiac hypertrophy." J Cell Biol **159**(6): 1019-1028.
- Gurevitch, J., I. Frolkis, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion." J Am Coll Cardiol **28**(1): 247-252.
- Ham, J., C. Babij, et al. (1995). "A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death." Neuron **14**(5): 927-939.
- Hammond, G. L., Y. K. Lai, et al. (1982). "The molecules that initiate cardiac hypertrophy are not species-specific." Science **216**(4545): 529-531.
- Hammond, G. L., Y. K. Lai, et al. (1984). "Preliminary characterization of molecules that increase cell free translational activity of cardiac cytoplasmic RNA." Eur Heart J **5 Suppl F**: 225-229.
- Harel, Y., M. Silva, et al. (1993). "A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. Possible involvement of TNF in hemolytic uremic syndrome." J Clin Invest **92**(5): 2110-2116.
- Haudek, S. B., E. Spencer, et al. (2001). "Overexpression of cardiac I-kappaBalpha prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H962-968.
- Haudek, S. B., G. E. Taffet, et al. (2007). "TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways." J Clin Invest **117**(9): 2692-2701.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.
- Heald, R. and F. McKeon (1990). "Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis." Cell **61**(4): 579-589.
- Heins, S. and U. Aebi (1994). "Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks." Curr Opin Cell Biol **6**(1): 25-33.
- Heitlinger, E., M. Peter, et al. (1991). "Expression of chicken lamin B2 in Escherichia coli: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions." J Cell Biol **113**(3): 485-495.
- Herrmann, H., H. Bar, et al. (2007). "Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 562-573.
- Herrmann, H., B. Fouquet, et al. (1989). "Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. II. Identification and molecular characterization of desmin." Development **105**(2): 299-307.

- Herrmann, H., S. V. Strelkov, et al. (2009). "Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity." J Clin Invest **119**(7): 1772-1783.
- Herzer, K., G. Kneiseler, et al. (2011). "Onset of heart failure determines the hepatic cell death pattern." Ann Hepatol **10**(2): 174-179.
- Hesse, M., T. M. Magin, et al. (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." J Cell Sci **114**(Pt 14): 2569-2575.
- Higuchi, Y., K. Otsu, et al. (2002). "Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **34**(2): 233-240.
- Hirotsu, S., K. Otsu, et al. (2002). "Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy." Circulation **105**(4): 509-515.
- Hnia, K., H. Tronchere, et al. (2011). "Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle." J Clin Invest **121**(1): 70-85.
- Hoffmann, A., A. Levchenko, et al. (2002). "The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation." Science **298**(5596): 1241-1245.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-1318.
- Hol, E. M., R. F. Roelofs, et al. (2003). "Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms." Mol Psychiatry **8**(9): 786-796.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Inada, H., I. Izawa, et al. (2001). "Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD." J Cell Biol **155**(3): 415-426.
- Inada, H., H. Togashi, et al. (1999). "Balance between activities of Rho kinase and type 1 protein phosphatase modulates turnover of phosphorylation and dynamics of desmin/vimentin filaments." J Biol Chem **274**(49): 34932-34939.
- Izawa, I. and M. Inagaki (2006). "Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies." Cancer Sci **97**(3): 167-174.
- Jahn, L., B. Fouquet, et al. (1987). "Cytokeratins in certain endothelial and smooth muscle cells of two taxonomically distant vertebrate species, *Xenopus laevis* and man." Differentiation **36**(3): 234-254.
- Jahn, L., J. Kreuzer, et al. (1993). "Cytokeratins 8 and 18 in smooth muscle cells. Detection in human coronary artery, peripheral vascular, and vein graft disease and in transplantation-associated arteriosclerosis." Arterioscler Thromb **13**(11): 1631-1639.

- Jaitovich, A., S. Mehta, et al. (2008). "Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of keratin intermediate filaments in mechanically stimulated A549 cells." J Biol Chem **283**(37): 25348-25355.
- Jamora, C. and E. Fuchs (2002). "Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton." Nat Cell Biol **4**(4): E101-108.
- Janue, A., M. A. Odena, et al. (2007). "Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathies." J Neuropathol Exp Neurol **66**(8): 711-723.
- Jaquemar, D., S. Kupriyanov, et al. (2003). "Keratin 8 protection of placental barrier function." J Cell Biol **161**(4): 749-756.
- Javed, Q. and I. Murtaza (2013). "Therapeutic potential of tumour necrosis factor-alpha antagonists in patients with chronic heart failure." Heart Lung Circ **22**(5): 323-327.
- Jerse, M. and N. Zidar (2011). "Apoptosis in the developing human heart resembles apoptosis in epithelial tissues." Cell Tissue Res **343**(3): 537-543.
- Jirsova, K., S. Merjava, et al. (2007). "Immunohistochemical characterization of cytokeratins in the abnormal corneal endothelium of posterior polymorphous corneal dystrophy patients." Exp Eye Res **84**(4): 680-686.
- Jonkman, M. F., A. M. Pasmooij, et al. (2005). "Loss of desmoplakin tail causes lethal acantholytic epidermolysis bullosa." Am J Hum Genet **77**(4): 653-660.
- Kachinsky, A. M., J. A. Dominov, et al. (1994). "Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin." Dev Biol **165**(1): 216-228.
- Kaltezioti, V., G. Kouroupi, et al. (2010). "Prox1 regulates the notch1-mediated inhibition of neurogenesis." PLoS Biol **8**(12): e1000565.
- Kaminska, A., S. V. Strelkov, et al. (2004). "Small deletions disturb desmin architecture leading to breakdown of muscle cells and development of skeletal or cardioskeletal myopathy." Hum Genet **114**(3): 306-313.
- Kapadia, S., J. Lee, et al. (1995). "Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration." J Clin Invest **96**(2): 1042-1052.
- Kapadia, S. R., H. Oral, et al. (1997). "Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium." Circ Res **81**(2): 187-195.
- Kaplan, S. R., J. J. Gard, et al. (2004). "Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome." Cardiovasc Pathol **13**(1): 26-32.
- Karabinos, A., H. Schmidt, et al. (2001). "Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in Caenorhabditis elegans development." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7863-7868.
- Karantza, V. (2011). "Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers." Oncogene **30**(2): 127-138.
- Kartenbeck, J., W. W. Franke, et al. (1983). "Specific attachment of desmin filaments to desmosomal plaques in cardiac myocytes." EMBO J **2**(5): 735-742.

- Kaufman, S. J. and R. F. Foster (1988). "Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9606-9610.
- Kawajiri, A., Y. Yasui, et al. (2003). "Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase." Mol Biol Cell **14**(4): 1489-1500.
- Kawano, F., R. Fujita, et al. (2012). "HSP25 can modulate myofibrillar desmin cytoskeleton following the phosphorylation at Ser15 in rat soleus muscle." J Appl Physiol (1985) **112**(1): 176-186.
- Keaney, J. F., Jr., J. M. Hare, et al. (1996). "Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation." Am J Physiol **271**(6 Pt 2): H2646-2652.
- Ketema, M., K. Wilhelmsen, et al. (2007). "Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin." J Cell Sci **120**(Pt 19): 3384-3394.
- Khanna, D., M. McMahon, et al. (2004). "Anti-tumor necrosis factor alpha therapy and heart failure: what have we learned and where do we go from here?" Arthritis Rheum **50**(4): 1040-1050.
- Kim, J. S., C. H. Lee, et al. (2010). "Modeling the self-organization property of keratin intermediate filaments." Biophys J **99**(9): 2748-2756.
- Kim, S. and P. A. Coulombe (2007). "Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm." Genes Dev **21**(13): 1581-1597.
- Konieczny, P., P. Fuchs, et al. (2008). "Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms." J Cell Biol **181**(4): 667-681.
- Kontoyiannis, D., M. Pasparakis, et al. (1999). "Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies." Immunity **10**(3): 387-398.
- Kouloumenta, A., M. Mavroidis, et al. (2007). "Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin." J Biol Chem **282**(48): 35211-35221.
- Kramer, G., H. Erdal, et al. (2004). "Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18." Cancer Res **64**(5): 1751-1756.
- Kriegler, M., C. Perez, et al. (1988). "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF." Cell **53**(1): 45-53.
- Kroger, C., F. Loschke, et al. (2013). "Keratins control intercellular adhesion involving PKC-alpha-mediated desmoplakin phosphorylation." J Cell Biol **201**(5): 681-692.
- Kroger, C., P. Vijayaraj, et al. (2011). "Placental vasculogenesis is regulated by keratin-mediated hyperoxia in murine decidual tissues." Am J Pathol **178**(4): 1578-1590.

- Krown, K. A., K. Yasui, et al. (1995). "TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca²⁺ current and Ca²⁺ transients." FEBS Lett **376**(1-2): 24-30.
- Ku, N. O., R. Gish, et al. (2001). "Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease." N Engl J Med **344**(21): 1580-1587.
- Ku, N. O., J. K. Lim, et al. (2005). "Keratins as susceptibility genes for end-stage liver disease." Gastroenterology **129**(3): 885-893.
- Ku, N. O., S. Michie, et al. (1995). "Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant." J Cell Biol **131**(5): 1303-1314.
- Ku, N. O., S. Michie, et al. (2002). "Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4373-4378.
- Ku, N. O., S. A. Michie, et al. (1998). "Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice." J Cell Biol **143**(7): 2023-2032.
- Ku, N. O. and M. B. Omary (1994). "Identification of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 18: potential kinases and a role in filament reorganization." J Cell Biol **127**(1): 161-171.
- Ku, N. O. and M. B. Omary (2006). "A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8." J Cell Biol **174**(1): 115-125.
- Ku, N. O., P. Strnad, et al. (2007). "Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies." Hepatology **46**(5): 1639-1649.
- Ku, N. O., D. M. Toivola, et al. (2010). "Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury." Nat Cell Biol **12**(9): 876-885.
- Ku, N. O., D. M. Toivola, et al. (2004). "Studying simple epithelial keratins in cells and tissues." Methods Cell Biol **78**: 489-517.
- Ku, N. O., X. Zhou, et al. (1999). "The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): G1108-1137.
- Kubota, T., G. S. Bounoutas, et al. (2000). "Soluble tumor necrosis factor receptor abrogates myocardial inflammation but not hypertrophy in cytokine-induced cardiomyopathy." Circulation **101**(21): 2518-2525.
- Kubota, T., C. F. McTiernan, et al. (1997). "Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha." Circ Res **81**(4): 627-635.
- Kubota, T., M. Miyagishima, et al. (2001). "Overexpression of tumor necrosis factor-alpha activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium." J Mol Cell Cardiol **33**(7): 1331-1344.
- Kudryashova, E., J. Wu, et al. (2009). "Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM32 in mice leads to a myopathy with a neurogenic component." Hum Mol Genet **18**(7): 1353-1367.

- Kuisk, I. R., H. Li, et al. (1996). "A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis." Dev Biol **174**(1): 1-13.
- Kumar, A., B. Paladugu, et al. (2007). "Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms are involved in TNF-alpha -induced depression of cardiac myocyte contractility." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(5): R1900-1906.
- Kumemura, H., M. Harada, et al. (2008). "Mutation in keratin 18 induces mitochondrial fragmentation in liver-derived epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **367**(1): 33-40.
- Kupferminc, M. J., A. M. Peaceman, et al. (1999). "Tumor necrosis factor-alpha is decreased in the umbilical cord plasma of patients with severe preeclampsia." Am J Perinatol **16**(5): 203-208.
- Kurrelmeyer, K. M., L. H. Michael, et al. (2000). "Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5456-5461.
- Kuruc, N. and W. W. Franke (1988). "Transient coexpression of desmin and cytokeratins 8 and 18 in developing myocardial cells of some vertebrate species." Differentiation **38**(3): 177-193.
- Kwak, E. L., D. A. Larochelle, et al. (1995). "Role for NF-kappa B in the regulation of ferritin H by tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **270**(25): 15285-15293.
- Laflamme, M. A. and C. E. Murry (2011). "Heart regeneration." Nature **473**(7347): 326-335.
- Langley, R. C., Jr. and C. M. Cohen (1986). "Association of spectrin with desmin intermediate filaments." J Cell Biochem **30**(2): 101-109.
- Lapouge, K., L. Fontao, et al. (2006). "New insights into the molecular basis of desmoplakin- and desmin-related cardiomyopathies." J Cell Sci **119**(Pt 23): 4974-4985.
- Larsen, T. H., H. Dalen, et al. (1999). "Membrane skeleton in cultured chick cardiac myocytes revealed by high resolution immunocytochemistry." Histochem Cell Biol **112**(4): 307-316.
- Latini, R., M. Bianchi, et al. (1994). "Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin-1 receptor antagonist." J Cardiovasc Pharmacol **23**(1): 1-6.
- Lazarides, E. (1980). "Desmin and intermediate filaments in muscle cells." Results Probl Cell Differ **11**: 124-131.
- Lazarides, E. (1980). "Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space." Nature **283**(5744): 249-256.
- Lazarides, E. (1982). "Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins." Annu Rev Biochem **51**: 219-250.

- Lazarides, E. and B. D. Hubbard (1976). "Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(12): 4344-4348.
- Lecour, S., L. Rochette, et al. (2005). "Free radicals trigger TNF alpha-induced cardioprotection." Cardiovasc Res **65**(1): 239-243.
- Lee, C. H. and P. A. Coulombe (2009). "Self-organization of keratin intermediate filaments into cross-linked networks." J Cell Biol **186**(3): 409-421.
- Lee, C. H., M. S. Kim, et al. (2012). "Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments." Nat Struct Mol Biol **19**(7): 707-715.
- Lee, J. C., O. Schickling, et al. (2002). "DEDD regulates degradation of intermediate filaments during apoptosis." J Cell Biol **158**(6): 1051-1066.
- Lee, J. P., H. C. Palfrey, et al. (1999). "The role of immunophilins in mutant superoxide dismutase-1linked familial amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3251-3256.
- Leers, M. P., W. Kolgen, et al. (1999). "Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis." J Pathol **187**(5): 567-572.
- Lepilina, A., A. N. Coon, et al. (2006). "A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration." Cell **127**(3): 607-619.
- Levine, B., J. Kalman, et al. (1990). "Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure." N Engl J Med **323**(4): 236-241.
- Li, C., R. L. Kao, et al. (2001). "Early activation of IKKbeta during in vivo myocardial ischemia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H1264-1271.
- Li, H. and Y. Capetanaki (1993). "Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5." Nucleic Acids Res **21**(2): 335-343.
- Li, H. and Y. Capetanaki (1994). "An E box in the desmin promoter cooperates with the E box and MEF-2 sites of a distal enhancer to direct muscle-specific transcription." EMBO J **13**(15): 3580-3589.
- Li, H., S. K. Choudhary, et al. (1994). "Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin." J Cell Biol **124**(5): 827-841.
- Li, J., T. Hampton, et al. (1997). "Stretch-induced VEGF expression in the heart." J Clin Invest **100**(1): 18-24.
- Li, W., Q. Zhang, et al. (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**(1): 84-89.
- Li, X., M. R. Moody, et al. (2000). "Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm." Circulation **102**(14): 1690-1696.

- Li, Z., E. Colucci-Guyon, et al. (1996). "Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin." Dev Biol **175**(2): 362-366.
- Li, Z. L., A. Lillienbaum, et al. (1989). "Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development." Gene **78**(2): 243-254.
- Lin, Y. M., Y. R. Chen, et al. (2008). "eIF3k regulates apoptosis in epithelial cells by releasing caspase 3 from keratin-containing inclusions." J Cell Sci **121**(Pt 14): 2382-2393.
- Linder, S. (2007). "Cytokeratin markers come of age." Tumour Biol **28**(4): 189-195.
- Lindner, V., S. Edah-Tally, et al. (1999). "Cardiac myxoma with glandular component: case report and review of the literature." Pathol Res Pract **195**(4): 267-272.
- Liu, J., Q. Chen, et al. (2006). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts." FASEB J **20**(2): 362-364.
- Lloyd, C., Q. C. Yu, et al. (1995). "The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14." J Cell Biol **129**(5): 1329-1344.
- Lo, B. K., M. Yu, et al. (2010). "CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas." Am J Pathol **176**(5): 2435-2446.
- Lockard, V. G. and S. Bloom (1993). "Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **25**(3): 303-309.
- Loranger, A., S. Duclos, et al. (1997). "Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity." Am J Pathol **151**(6): 1673-1683.
- Loranger, A., S. Gilbert, et al. (2006). "Keratin 8 modulation of desmoplakin deposition at desmosomes in hepatocytes." Exp Cell Res **312**(20): 4108-4119.
- Low-Friedrich, I., D. Weisensee, et al. (1992). "Cytokines induce stress protein formation in cultured cardiac myocytes." Basic Res Cardiol **87**(1): 12-18.
- Lu, H., M. Hesse, et al. (2005). "Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development." Eur J Cell Biol **84**(8): 709-718.
- Magin, T. M., R. Schroder, et al. (1998). "Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates." J Cell Biol **140**(6): 1441-1451.
- Maier, H. J., T. G. Schips, et al. (2012). "Cardiomyocyte-specific IkappaB kinase (IKK)/NF-kappaB activation induces reversible inflammatory cardiomyopathy and heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): 11794-11799.
- Malik, S. T., M. S. Naylor, et al. (1990). "Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice." Eur J Cancer **26**(10): 1031-1034.
- Manicourt, D. H., R. Triki, et al. (1993). "Levels of circulating tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of hyaluronan and antigenic keratan sulfate." Arthritis Rheum **36**(4): 490-499.

- Mann, D. L. (2002). "Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future." Circ Res **91**(11): 988-998.
- Mann, D. L. (2003). "Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation." Annu Rev Physiol **65**: 81-101.
- Marber, M. S., R. Mestral, et al. (1995). "Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury." J Clin Invest **95**(4): 1446-1456.
- Matsusaka, H., M. Ikeuchi, et al. (2005). "Selective disruption of MMP-2 gene exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in mice with cytokine-induced cardiomyopathy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(5): H1858-1864.
- Mattey, D. L., P. T. Dawes, et al. (2004). "Increased levels of antibodies to cytokeratin 18 in patients with rheumatoid arthritis and ischaemic heart disease." Ann Rheum Dis **63**(4): 420-425.
- Maulik, N., R. M. Engelman, et al. (1993). "Interleukin-1 alpha preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury." Circulation **88**(5 Pt 2): II387-394.
- Maulik, N., H. Sasaki, et al. (2000). "Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors." FEBS Lett **485**(1): 7-12.
- Maulik, N., M. Sato, et al. (1998). "An essential role of NFkappaB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia." FEBS Lett **429**(3): 365-369.
- Maurer, J., B. Nelson, et al. (2008). "Contrasting expression of keratins in mouse and human embryonic stem cells." PLoS One **3**(10): e3451.
- Mavroidis, M., P. Panagopoulou, et al. (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**(9): 3318-3327.
- McLean, W. H. and C. B. Moore (2011). "Keratin disorders: from gene to therapy." Hum Mol Genet **20**(R2): R189-197.
- Meng, J. J., E. A. Bornslaeger, et al. (1997). "Two-hybrid analysis reveals fundamental differences in direct interactions between desmoplakin and cell type-specific intermediate filaments." J Biol Chem **272**(34): 21495-21503.
- Mercurio, F., H. Zhu, et al. (1997). "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation." Science **278**(5339): 860-866.
- Mermelstein, C. S., L. R. Andrade, et al. (2006). "Desmin filaments are stably associated with the outer nuclear surface in chick myoblasts." Cell Tissue Res **323**(2): 351-357.
- Milner, D. J., M. Mavroidis, et al. (2000). "Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function." J Cell Biol **150**(6): 1283-1298.

- Milner, D. J., G. E. Taffet, et al. (1999). "The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function." J Mol Cell Cardiol **31**(11): 2063-2076.
- Milner, D. J., G. Weitzer, et al. (1996). "Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin." J Cell Biol **134**(5): 1255-1270.
- Mitsui, T., M. Kawajiri, et al. (2000). "Functional association between nicotinic acetylcholine receptor and sarcomeric proteins via actin and desmin filaments." J Cell Biochem **77**(4): 584-595.
- Mizuno, Y., T. G. Thompson, et al. (2001). "Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6156-6161.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, et al. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell **93**(2): 215-228.
- Moll, R., M. Divo, et al. (2008). "The human keratins: biology and pathology." Histochem Cell Biol **129**(6): 705-733.
- Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell **31**(1): 11-24.
- Moll, R., C. Hage, et al. (1991). "Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue." Lab Invest **65**(1): 74-86.
- Moon, M. C., L. Yau, et al. (2008). "Injury-induced expression of cytokeratins 8 and 18 by vascular smooth muscle cells requires concurrent activation of cytoskeletal and growth factor receptors." Can J Physiol Pharmacol **86**(5): 223-231.
- Morishita, R., T. Sugimoto, et al. (1997). "In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction." Nat Med **3**(8): 894-899.
- Mugnier, B., N. Balandraud, et al. (2003). "Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(7): 1849-1852.
- Myers RM, S. J., Snyder M, Dunham I, Hardison RC, Bernstein BE, Gingeras TR, Kent WJ, Birney E et al. (2011). "A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE)." PLoS Biol **9**(4): e1001046.
- Nakano, M., A. A. Knowlton, et al. (1998). "Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte." Circulation **97**(14): 1392-1400.
- Nakano, M., A. A. Knowlton, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha-induced expression of heat shock protein 72 in adult feline cardiac myocytes." Am J Physiol **270**(4 Pt 2): H1231-1239.
- Nakayama, M., H. Satoh, et al. (2003). "Cytokeratin 19 fragment in patients with nonmalignant respiratory diseases." Chest **123**(6): 2001-2006.

- Narula, J., P. Pandey, et al. (1999). "Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8144-8149.
- Naylor, M. S., G. W. Stamp, et al. (1993). "Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression." J Clin Invest **91**(5): 2194-2206.
- Nelson, S. K., G. H. Wong, et al. (1995). "Leukemia inhibitory factor and tumor necrosis factor induce manganese superoxide dismutase and protect rabbit hearts from reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol **27**(1): 223-229.
- Nisman, B., J. Lafair, et al. (1998). "Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, CYFRA 21-1, and carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung carcinoma: does the combined use of cytokeratin markers give any additional information?" Cancer **82**(10): 1850-1859.
- O'Connor, C. M., D. J. Asai, et al. (1981). "In vitro translation of the intermediate filament proteins desmin and vimentin." Mol Cell Biol **1**(4): 303-309.
- Oeckinghaus, A., M. S. Hayden, et al. (2011). "Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways." Nat Immunol **12**(8): 695-708.
- Ohtakara, K., H. Inada, et al. (2000). "p21-activated kinase PAK phosphorylates desmin at sites different from those for Rho-associated kinase." Biochem Biophys Res Commun **272**(3): 712-716.
- Omary, M. B. and N. O. Ku (1997). "Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions." Hepatology **25**(5): 1043-1048.
- Omary, M. B., N. O. Ku, et al. (1998). "Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro." Subcell Biochem **31**: 105-140.
- Omary, M. B., N. O. Ku, et al. (2009). "Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease." J Clin Invest **119**(7): 1794-1805.
- Omary, M. B., N. O. Ku, et al. (2006). ""Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights." Trends Biochem Sci **31**(7): 383-394.
- Omary, M. B., N. O. Ku, et al. (2002). "Keratins: guardians of the liver." Hepatology **35**(2): 251-257.
- Onai, Y., J. Suzuki, et al. (2004). "Inhibition of IkappaB phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury." Cardiovasc Res **63**(1): 51-59.
- Oral, H., G. W. Dorn, 2nd, et al. (1997). "Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte." J Biol Chem **272**(8): 4836-4842.
- Osborn, M. and H. H. Goebel (1983). "The cytoplasmic bodies in a congenital myopathy can be stained with antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein." Acta Neuropathol **62**(1-2): 149-152.
- Oshima, R. G. (2002). "Apoptosis and keratin intermediate filaments." Cell Death Differ **9**(5): 486-492.

- Oshima, R. G., W. E. Howe, et al. (1983). "Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos." Dev Biol **99**(2): 447-455.
- Pal, R. and A. Khanna (2005). "Role of hepatocyte-like cells in the differentiation of cardiomyocytes from mouse embryonic stem cells." Stem Cells Dev **14**(2): 153-161.
- Pan, X., R. P. Hobbs, et al. (2013). "The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia." Curr Opin Cell Biol **25**(1): 47-56.
- Panagopoulou, P., C. H. Davos, et al. (2008). "Desmin mediates TNF-alpha-induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure." J Cell Biol **181**(5): 761-775.
- Papatheodoridis, G. V., E. Hadziyannis, et al. (2008). "Serum apoptotic caspase activity as a marker of severity in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection." Gut **57**(4): 500-506.
- Pardo, J. V., J. D. Siliciano, et al. (1983). "A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(4): 1008-1012.
- Park, J. H., C. Lee, et al. (2012). "Clear cell papillary renal cell carcinoma: a report of 15 cases including three cases of concurrent other-type renal cell carcinomas." Korean J Pathol **46**(6): 541-547.
- Parker, T. G., S. E. Packer, et al. (1990). "Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes." J Clin Invest **85**(2): 507-514.
- Parry, D. A. and P. M. Steinert (1999). "Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism." Q Rev Biophys **32**(2): 99-187.
- Pennica, D., J. S. Hayflick, et al. (1985). "Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(18): 6060-6064.
- Perez-Pomares, J. M., D. Macias, et al. (1998). "Immunolocalization of the vascular endothelial growth factor receptor-2 in the subepicardial mesenchyme of hamster embryos: identification of the coronary vessel precursors." Histochem J **30**(9): 627-634.
- Perkins, N. D. (2000). "The Rel/NF-kappa B family: friend and foe." Trends Biochem Sci **25**(9): 434-440.
- Peters, B., J. Kirfel, et al. (2001). "Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveal its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex." Mol Biol Cell **12**(6): 1775-1789.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pinz, I., S. D. Wax, et al. (2008). "Low over-expression of TNFalpha in the mouse heart increases contractile performance via TNFR1." J Cell Biochem **105**(1): 99-107.

- Plumier, J. C., B. M. Ross, et al. (1995). "Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery." J Clin Invest **95**(4): 1854-1860.
- Pogliano, J. (2008). "The bacterial cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **20**(1): 19-27.
- Poon, E., E. V. Howman, et al. (2002). "Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex." J Biol Chem **277**(5): 3433-3439.
- Porter, R. M., S. Leitgeb, et al. (1996). "Gene targeting at the mouse cytokeratin 10 locus: severe skin fragility and changes of cytokeratin expression in the epidermis." J Cell Biol **132**(5): 925-936.
- Postel, R., M. Ketema, et al. (2011). "Nesprin-3 augments peripheral nuclear localization of intermediate filaments in zebrafish." J Cell Sci **124**(Pt 5): 755-764.
- Price, M. G. (1987). "Skelemins: cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle." J Cell Biol **104**(5): 1325-1336.
- Psarras, S., M. Mavroidis, et al. (2010). "Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model." Eur Heart J **33**(15): 1954-1963.
- Purcell, N. H., G. Tang, et al. (2001). "Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6668-6673.
- Quinlan, R. A., J. A. Cohlberg, et al. (1984). "Heterotypic tetramer (A2D2) complexes of non-epidermal keratins isolated from cytoskeletons of rat hepatocytes and hepatoma cells." J Mol Biol **178**(2): 365-388.
- Raftos, D. A., E. L. Cooper, et al. (1991). "Invertebrate cytokines: tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin 1-like molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9518-9522.
- Rajabi, M., C. Kassiotis, et al. (2007). "Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis." Heart Fail Rev **12**(3-4): 331-343.
- Ralston, E., Z. Lu, et al. (2006). "Blood vessels and desmin control the positioning of nuclei in skeletal muscle fibers." J Cell Physiol **209**(3): 874-882.
- Rappaport, L., P. Oliviero, et al. (1998). "Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function." Mol Cell Biochem **184**(1-2): 101-105.
- Rauchhaus, M., V. Koloczek, et al. (2000). "Inflammatory cytokines and the possible immunological role for lipoproteins in chronic heart failure." Int J Cardiol **76**(2-3): 125-133.
- Reichelt, J., H. Bussow, et al. (2001). "Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice." Mol Biol Cell **12**(6): 1557-1568.
- Reimold, A. M. (2002). "TNFalpha as therapeutic target: new drugs, more applications." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **1**(4): 377-392.
- Reinhard, C., B. Shamon, et al. (1997). "Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2." EMBO J **16**(5): 1080-1092.

- Reipert, S., F. Steinbock, et al. (1999). "Association of mitochondria with plectin and desmin intermediate filaments in striated muscle." Exp Cell Res **252**(2): 479-491.
- Rickelt, S., I. Moll, et al. (2011). "Intercellular adhering junctions with an asymmetric molecular composition: desmosomes connecting Merkel cells and keratinocytes." Cell Tissue Res **346**(1): 65-77.
- Ritchie, M. E. (1998). "Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris." Circulation **98**(17): 1707-1713.
- Robson, R. M., T. W. Huiatt, et al. (2004). "Muscle intermediate filament proteins." Methods Cell Biol **78**: 519-553.
- Rosenbloom, K. R., C. A. Sloan, et al. (2013). "ENCODE data in the UCSC Genome Browser: year 5 update." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D56-63.
- Rossol, M., U. Meusch, et al. (2007). "Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells." J Immunol **179**(6): 4239-4248.
- Rothe, M., V. Sarma, et al. (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." Science **269**(5229): 1424-1427.
- Ruddle, N. H. and B. H. Waksman (1967). "Cytotoxic effect of lymphocyte-antigen interaction in delayed hypersensitivity." Science **157**(3792): 1060-1062.
- Saba, S., A. M. Janczewski, et al. (2005). "Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α ." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(4): H1456-1467.
- Sadoshima, J., Y. Xu, et al. (1993). "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." Cell **75**(5): 977-984.
- Sakata, Y., A. L. Chancey, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta receptor antagonism attenuates myocardial fibrosis in mice with cardiac-restricted overexpression of tumor necrosis factor." Basic Res Cardiol **103**(1): 60-68.
- Samarel, A. M. (2005). "Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(6): H2291-2301.
- Sandborn, W. J., R. McLeod, et al. (1999). "Medical therapy for induction and maintenance of remission in pouchitis: a systematic review." Inflamm Bowel Dis **5**(1): 33-39.
- Sasaki, H., N. Galang, et al. (1999). "Redox regulation of NF-kappaB and AP-1 in ischemic reperfused heart." Antioxid Redox Signal **1**(3): 317-324.
- Satoh, M., G. Tamura, et al. (1996). "Expression of cytokine genes and presence of enteroviral genomic RNA in endomyocardial biopsy tissues of myocarditis and dilated cardiomyopathy." Virchows Arch **427**(5): 503-509.
- Schaart, G., C. Viebahn, et al. (1989). "Desmin and titin expression in early postimplantation mouse embryos." Development **107**(3): 585-596.

- Schluter, K. D., M. Weber, et al. (1994). "NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action." Am J Physiol **267**(4 Pt 2): H1461-1466.
- Schneider, A., J. Lamb, et al. (2006). "Keratin 8 mutations are not associated with familial, sporadic and alcoholic pancreatitis in a population from the United States." Pancreatology **6**(1-2): 103-108.
- Schroder, R., I. Warlo, et al. (1999). "Immunogold EM reveals a close association of plectin and the desmin cytoskeleton in human skeletal muscle." Eur J Cell Biol **78**(4): 288-295.
- Schutte, B., M. Henfling, et al. (2006). "DEDD association with cytokeratin filaments correlates with sensitivity to apoptosis." Apoptosis **11**(9): 1561-1572.
- Schweitzer, S. C., M. W. Klymkowsky, et al. (2001). "Paranemin and the organization of desmin filament networks." J Cell Sci **114**(Pt 6): 1079-1089.
- Schweizer, J., P. E. Bowden, et al. (2006). "New consensus nomenclature for mammalian keratins." J Cell Biol **174**(2): 169-174.
- Scorrano, L., M. Ashiya, et al. (2002). "A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis." Dev Cell **2**(1): 55-67.
- Selcen, D. (2011). "Myofibrillar myopathies." Neuromuscul Disord **21**(3): 161-171.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences." Cell **46**(5): 705-716.
- Shah, S. B., J. Davis, et al. (2004). "Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation." Biophys J **86**(5): 2993-3008.
- Sharma, S., N. Mucke, et al. (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**(12): 1207-1219.
- Sihag, R. K., M. Inagaki, et al. (2007). "Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments." Exp Cell Res **313**(10): 2098-2109.
- Simpson, C. L., D. M. Patel, et al. (2011). "Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(9): 565-580.
- Sivasubramanian, N., M. L. Coker, et al. (2001). "Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor." Circulation **104**(7): 826-831.
- Soleiman, A., A. Lukschal, et al. (2008). "Myocardial lipofuscin-laden lysosomes contain the apoptosis marker caspase-cleaved cytokeratin-18." Eur J Clin Invest **38**(10): 708-712.
- Steinert, P. M. and D. A. Parry (1985). "Intermediate filaments: conformity and diversity of expression and structure." Annu Rev Cell Biol **1**: 41-65.
- Stone, M. R., A. O'Neill, et al. (2007). "Absence of keratin 19 in mice causes skeletal myopathy with mitochondrial and sarcolemmal reorganization." J Cell Sci **120**(Pt 22): 3999-4008.

- Strnad, P., T. C. Lienau, et al. (2006). "Keratin variants associate with progression of fibrosis during chronic hepatitis C infection." Hepatology **43**(6): 1354-1363.
- Strnad, P., S. Paschke, et al. (2012). "Keratins: markers and modulators of liver disease." Curr Opin Gastroenterol **28**(3): 209-216.
- Strnad, P., G. Z. Tao, et al. (2008). "Keratin mutation predisposes to mouse liver fibrosis and unmasks differential effects of the carbon tetrachloride and thioacetamide models." Gastroenterology **134**(4): 1169-1179.
- Stuurman, N., S. Heins, et al. (1998). "Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions." J Struct Biol **122**(1-2): 42-66.
- Suffredini, A. F., R. E. Fromm, et al. (1989). "The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin." N Engl J Med **321**(5): 280-287.
- Suffredini, A. F., D. Reda, et al. (1995). "Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration." J Immunol **155**(10): 5038-5045.
- Sun, M., M. Chen, et al. (2007). "Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state." Circulation **115**(11): 1398-1407.
- Suoizzi, K. C., X. Wu, et al. (2012). "Spectraplakins: master orchestrators of cytoskeletal dynamics." J Cell Biol **197**(4): 465-475.
- Szabadkai, G., K. Bianchi, et al. (2006). "Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels." J Cell Biol **175**(6): 901-911.
- Szeverenyi, I., A. J. Cassidy, et al. (2008). "The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases." Hum Mutat **29**(3): 351-360.
- Tang, H. L., H. L. Lung, et al. (2008). "Vimentin supports mitochondrial morphology and organization." Biochem J **410**(1): 141-146.
- Tao, G. Z., D. H. Li, et al. (2008). "Monitoring of epithelial cell caspase activation via detection of durable keratin fragment formation." J Pathol **215**(2): 164-174.
- Tao, G. Z., K. S. Looi, et al. (2009). "Keratins modulate the shape and function of hepatocyte mitochondria: a mechanism for protection from apoptosis." J Cell Sci **122**(Pt 21): 3851-3855.
- Tao, G. Z., P. Strnad, et al. (2007). "Analysis of keratin polypeptides 8 and 19 variants in inflammatory bowel disease." Clin Gastroenterol Hepatol **5**(7): 857-864.
- Tao, G. Z., D. M. Toivola, et al. (2003). "Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury." J Cell Sci **116**(Pt 22): 4629-4638.
- Terracio, L., B. Miller, et al. (1988). "Effects of cyclic mechanical stimulation of the cellular components of the heart: in vitro." In Vitro Cell Dev Biol **24**(1): 53-58.

- Thorey, I. S., J. J. Meneses, et al. (1993). "Embryonic expression of human keratin 18 and K18-beta-galactosidase fusion genes in transgenic mice." Dev Biol **160**(2): 519-534.
- Tidball, J. G. (1992). "Desmin at myotendinous junctions." Exp Cell Res **199**(2): 206-212.
- Toivola, D. M., H. Baribault, et al. (2000). "Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(6): G1343-1354.
- Toivola, D. M., P. Boor, et al. (2015). "Keratins in health and disease." Curr Opin Cell Biol **32**: 73-81.
- Toivola, D. M., P. Strnad, et al. (2010). "Intermediate filaments take the heat as stress proteins." Trends Cell Biol **20**(2): 79-91.
- Toivola, D. M., G. Z. Tao, et al. (2005). "Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments." Trends Cell Biol **15**(11): 608-617.
- Tokuyasu, K. T., A. H. Dutton, et al. (1983). "Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle." J Cell Biol **96**(6): 1736-1742.
- Tolstonog, G. V., M. Sabasch, et al. (2002). "Cytoplasmic intermediate filaments are stably associated with nuclear matrices and potentially modulate their DNA-binding function." DNA Cell Biol **21**(3): 213-239.
- Tolstonog, G. V., X. Wang, et al. (2000). "Intermediate filaments reconstituted from vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein selectively bind repetitive and mobile DNA sequences from a mixture of mouse genomic DNA fragments." DNA Cell Biol **19**(11): 647-677.
- Tong, X. and P. A. Coulombe (2006). "Keratin 17 modulates hair follicle cycling in a TNFalpha-dependent fashion." Genes Dev **20**(10): 1353-1364.
- Torre-Amione, G., S. Kapadia, et al. (1996). "Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)." J Am Coll Cardiol **27**(5): 1201-1206.
- Tracey, K. J. and A. Cerami (1989). "Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease." Curr Opin Immunol **1**(3): 454-461.
- Tracey, K. J., Y. Fong, et al. (1987). "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia." Nature **330**(6149): 662-664.
- Tracey, K. J., S. F. Lowry, et al. (1986). "Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes of skeletal muscle plasma membrane potential." J Exp Med **164**(4): 1368-1373.
- Traub, P. (1995). "Intermediate filaments and gene regulation." Physiol Chem Phys Med NMR **27**(4): 377-400.
- Tsai, M. Y., S. Wang, et al. (2006). "A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly." Science **311**(5769): 1887-1893.

- Tzeng, H. P., S. Evans, et al. (2014). "Dysferlin mediates the cytoprotective effects of TRAF2 following myocardial ischemia reperfusion injury." J Am Heart Assoc **3**(1): e000662.
- Ursitti, J. A., P. C. Lee, et al. (2004). "Cloning and characterization of cytokeratins 8 and 19 in adult rat striated muscle. Interaction with the dystrophin glycoprotein complex." J Biol Chem **279**(40): 41830-41838.
- Valen, G., G. K. Hansson, et al. (2000). "Unstable angina activates myocardial heat shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factors NFkappaB and AP-1." Cardiovasc Res **47**(1): 49-56.
- van der Loop, F. T., G. Schaart, et al. (1992). "Expression and organization of muscle specific proteins during the early developmental stages of the rabbit heart." Anat Embryol (Berl) **185**(5): 439-450.
- Vijayaraj, P., C. Kroger, et al. (2009). "Keratins regulate protein biosynthesis through localization of GLUT1 and -3 upstream of AMP kinase and Raptor." J Cell Biol **187**(2): 175-184.
- Volkman, X., M. Cornberg, et al. (2006). "Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection." Hepatology **43**(6): 1311-1316.
- Vorgias, C. E. and P. Traub (1986). "Nucleic acid-binding activities of the intermediate filament subunit proteins desmin and glial fibrillary acidic protein." Z Naturforsch C **41**(9-10): 897-909.
- Wagner, O. I., J. Lifshitz, et al. (2003). "Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions." J Neurosci **23**(27): 9046-9058.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Wallace, L., L. Roberts-Thompson, et al. (2012). "Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity." J Cell Sci **125**(Pt 7): 1750-1758.
- Wan, S., J. M. DeSmet, et al. (1996). "Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass." J Thorac Cardiovasc Surg **112**(3): 806-811.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." Science **281**(5383): 1680-1683.
- Wang, L., S. Srinivasan, et al. (2007). "Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations." J Biol Chem **282**(11): 8219-8227.
- Weber, G. F., M. A. Bjerke, et al. (2012). "A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration." Dev Cell **22**(1): 104-115.
- Weber, K. T., J. E. Jalil, et al. (1989). "Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease." Am J Hypertens **2**(12 Pt 1): 931-940.

- Weber, K. T., R. Pick, et al. (1988). "Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy." Am Heart J **116**(6 Pt 1): 1641-1646.
- Wede, O. K., M. Lofgren, et al. (2002). "Mechanical function of intermediate filaments in arteries of different size examined using desmin deficient mice." J Physiol **540**(Pt 3): 941-949.
- Weiner, H. L. and J. L. Swain (1989). "Acidic fibroblast growth factor mRNA is expressed by cardiac myocytes in culture and the protein is localized to the extracellular matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2683-2687.
- Weisleder, N., E. Soumaka, et al. (2004). "Cardiomyocyte-specific desmin rescue of desmin null cardiomyopathy excludes vascular involvement." J Mol Cell Cardiol **36**(1): 121-128.
- Weisleder, N., G. E. Taffet, et al. (2004). "Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 769-774.
- Weitzer, G., D. J. Milner, et al. (1995). "Cytoskeletal control of myogenesis: a desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation." Dev Biol **172**(2): 422-439.
- Wiche, G. (1998). "Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics." J Cell Sci **111** (Pt 17): 2477-2486.
- Wieckowska, A., N. N. Zein, et al. (2006). "In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **44**(1): 27-33.
- Wilhelmsen, K., S. H. Litjens, et al. (2005). "Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin." J Cell Biol **171**(5): 799-810.
- Winter, D. L., D. Paulin, et al. (2014). "Posttranslational modifications of desmin and their implication in biological processes and pathologies." Histochem Cell Biol **141**(1): 1-16.
- Wittmann, T. and A. Desai (2005). "Microtubule cytoskeleton: a new twist at the end." Curr Biol **15**(4): R126-129.
- Wong, G. H. and D. V. Goeddel (1988). "Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism." Science **242**(4880): 941-944.
- Wu, C. J., M. Lovett, et al. (1992). "Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts." Transplantation **54**(2): 326-332.
- Wu, R. L., T. T. Chen, et al. (1994). "Functional importance of an Sp1- and an NFkB-related nuclear protein in a keratinocyte-specific promoter of rabbit K3 keratin gene." J Biol Chem **269**(45): 28450-28459.
- Yamaoka, K., T. Otsuka, et al. (1998). "Activation of STAT5 by lipopolysaccharide through granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in human monocytes." J Immunol **160**(2): 838-845.

- Ye, X., H. M. Zhang, et al. (2014). "Coxsackievirus-induced miR-21 disrupts cardiomyocyte interactions via the downregulation of intercalated disk components." PLoS Pathog **10**(4): e1004070.
- Yokoyama, T., L. Vaca, et al. (1993). "Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart." J Clin Invest **92**(5): 2303-2312.
- Yoshida, K., T. Taga, et al. (1996). "Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 407-411.
- Yuan, J., T. W. Huiatt, et al. (1999). "The effects of mono-ADP-ribosylation on desmin assembly-disassembly." Arch Biochem Biophys **363**(2): 314-322.
- Zandi, E., D. M. Rothwarf, et al. (1997). "The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation." Cell **91**(2): 243-252.
- Zhong, B. and M. B. Omary (2004). "Actin overexpression parallels severity of pancreatic injury." Exp Cell Res **299**(2): 404-414.
- Zhong, B., P. Strnad, et al. (2009). "Keratin variants are overrepresented in primary biliary cirrhosis and associate with disease severity." Hepatology **50**(2): 546-554.
- Zhong, B., Q. Zhou, et al. (2004). "Organ-specific stress induces mouse pancreatic keratin overexpression in association with NF-kappaB activation." J Cell Sci **117**(Pt 9): 1709-1719.
- Zhou, H., T. W. Huiatt, et al. (1996). "Characterization of ADP-ribosylation sites on desmin and restoration of desmin intermediate filament assembly by de-ADP-ribosylation." Arch Biochem Biophys **334**(2): 214-222.
- Zhou, Q., M. Cadrin, et al. (2006). "Keratin 20 serine 13 phosphorylation is a stress and intestinal goblet cell marker." J Biol Chem **281**(24): 16453-16461.
- Zhou, Q., D. M. Toivola, et al. (2003). "Keratin 20 helps maintain intermediate filament organization in intestinal epithelia." Mol Biol Cell **14**(7): 2959-2971.

Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου μέσω και στατιστική ανάλυση όλων των γενοτύπων σε ποντίκια ηλικίας 3ών και 6 μηνών.

Ανάλυση - 3 μήνες

Suppl Table 1 3 μήνες	WT n=17	<i>Krt18</i> ^{-/-} n=12	<i>Des</i> ^{-/-} n=15	<i>Tnf</i> ^{Myh6} n=10	<i>Tnf</i> ^{Myh6} <i>Des</i> ^{-/-} n=16	<i>Tnf</i> ^{Myh6} <i>Krt18</i> ^{-/-} n=11	<i>Tnf</i> ^{Myh6} <i>Des</i> ^{-/-} <i>Krt18</i> ^{-/-} n=12
LVESD(mm)	1.74±0.03	1.82±0.06	2.42±0.04 ^{††††,¥¥¥¥}	2.19±0.11 ^{*,††,##,¥¥¥¥}	2.19±0.05 ^{*,†††,##,¥¥¥¥}	2.91±0.11 ^{****,††††,0000,††,¥¥¥¥}	2.80±0.11 ^{****,††††,¥¥¥¥}
LVEDD(mm)	3.19±0.05	3.33±0.06	3.70±0.06 ^{††,¥¥¥¥}	3.24±0.15 ^{**,†,##}	3.53±0.09 ^{##,¥¥}	4.33±0.15 ^{****,††††,0000,††,¥¥¥¥}	4.08±0.12 ^{**,††††,¥¥¥¥}
PWTs(mm)	1.21±0.01	1.24±0.03	1.13±0.02 ^{††††,¥¥¥}	1.16±0.01 ^{††,¥}	1.15±0.02 ^{††††,¥}	1.13±0.02 ^{††††,¥}	1.10±0.02 ^{††††,¥¥¥¥}
PWTd (mm)	0.74±0.03	0.73±0.02	0.71±0.01	0.69±0.01 [¥]	0.68±0.01 ^{†,¥¥}	0.69±0.01 [¥]	0.66±0.01 ^{††,¥¥}
FS%	45.29±0.63	45.43±1.07	34.63±0.42 ^{††††,¥¥¥¥}	32.62±0.43 ^{*,††††,††,¥¥¥¥}	37.69±0.58 ^{***,††††,##,¥¥¥¥}	32.75±0.64 ^{††††,††,¥¥¥¥}	31.64±0.85 ^{**,††††,¥¥¥¥}
EF	83.52±0.58	83.54±0.98	72.11±1.22 ^{††††,††,¥¥¥¥}	69.37±0.59 ^{*,††††,††,¥¥¥¥}	75.72±0.68 ^{††††,##,¥¥¥¥}	69.51±0.87 ^{*,††††,††,¥¥¥¥}	67.89±1.22 ^{††††,¥¥¥¥}
r/h	2.19±0.07	2.30±0.09	2.62±0.07 ^{†,¥¥¥}	2.37±0.11 ^{##}	2.63±0.10 ^{†,##,¥¥¥}	3.17±0.13 ^{***,††††,0000,††,¥¥¥¥}	3.12±0.12 ^{***,††††,¥¥¥¥}

Μέσος όρος±SE; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs *Des*^{-/-}; †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001, ††††p<0.0001 vs *Krt18*^{-/-}; ∆p<0.05, ∆∆p<0.01, ∆∆∆p<0.001, ∆∆∆∆p<0.0001 vs *Tnf*^{Myh6}; ‡p<0.05, ‡‡ p<0.0001 vs *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-}; #p<0.001, ## p<0.0001 vs *Tnf*^{Myh6}*Des*^{-/-}*Krt18*^{-/-}; ¥p<0.05, ¥¥p<0.01, ¥¥¥p<0.001, ¥¥¥¥p<0.0001 vs WT.

Ανάλυση - 6 μήνες

Suppl Table 1 6 μήνες	WT n=20	<i>Krt18</i> ^{-/-} n=8	<i>Des</i> ^{-/-} n=15	<i>Tnf</i> ^{Myh6} n=9	<i>Tnf</i> ^{Myh6} <i>Des</i> ^{-/-} n=11	<i>Tnf</i> ^{Myh6} <i>Krt18</i> ^{-/-} n=8	<i>Tnf</i> ^{Myh6} <i>Des</i> ^{-/-} <i>Krt18</i> ^{-/-} n=8
LVESD(mm)	1.75±0.04	2.03±0.12	3.13±0.12 ^{††††,‡‡‡,¥¥¥¥}	2.94±0.13 ^{††††,‡,¥¥¥¥}	2.52±0.13 ^{†,‡,¥¥¥¥}	3.18±0.32 ^{††††,‡‡,¥¥¥¥}	3.07±0.14 ^{††††,¥¥¥¥}
LVEDD(mm)	3.24±0.07	3.56±0.13	4.27±0.10 ^{††††,‡,¥¥¥¥}	4.08±0.13 ^{†,¥¥¥¥}	3.91±0.15 ^{¥¥¥}	4.43±0.28 ^{††††,‡‡,¥¥¥¥}	4.24±0.16 ^{††,¥¥¥¥}
PWTs(mm)	1.24±0.02	1.22±0.02	1.06±0.03 ^{††††,¥¥¥¥}	1.06±0.03 ^{††††,‡‡,¥¥¥¥}	1.16±0.02 ^{**,\$}	1.10±0.03 ^{††,¥¥¥}	1.09±0.03 ^{††,¥¥¥}
PWTd (mm)	0.73±0.01	0.72±0.02	0.69±0.02 [¥]	0.64±0.02 ^{*,††,¥¥¥¥}	0.68±0.02 ^{¥¥}	0.67±0.01 ^{¥¥}	0.68±0.01 [¥]
FS%	45.80±0.70	42.97±1.85	27.03±1.34 ^{††††,¥¥¥¥}	27.92±1.84 ^{††††,‡‡‡,¥¥¥¥}	35.73±1.42 ^{***,††,‡‡‡,¥¥¥¥}	29.42±2.99 ^{††††,‡‡,¥¥¥¥}	27.68±1.16 ^{††††,¥¥¥¥}
EF	83.93±0.63	81.04±1,74	60.59±2.29 ^{††††,‡‡‡,¥¥¥¥}	62.06±3.27 ^{††††,‡,‡‡,¥¥¥¥}	73.07±1.74 ^{‡‡,¥¥¥}	62.32±5.00 ^{††††,‡‡,¥¥¥¥}	58.39±3.93 ^{††††,¥¥¥¥}
r/h	2.22±0.06	2.49±0.13	3.13±0.12 ^{††,¥¥¥¥}	3.19±0.14 ^{††,¥¥¥¥}	2.91±0.15 ^{†,¥¥¥¥}	3.32±0.27 ^{††††,¥¥¥¥}	3.12±0.16 ^{††,¥¥¥¥}

Μέσος όρος ±SE; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 vs *Des*^{-/-}; †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001, ††††p<0.0001 vs *Krt18*^{-/-}; ‡p<0.05, ‡‡p<0.01, ‡‡‡p<0.001 vs *Tnf*^{Myh6} *Des*^{-/-}; #p<0.05, #‡p<0.01, #‡‡p<0.001 vs *Tnf*^{Myh6} *Des*^{-/-} *Krt18*^{-/-}; ¥p<0.05, ¥‡p<0.01, ¥‡‡p<0.001, ¥‡‡‡p<0.0001 vs WT. One-way ANOVA με Bonferroni-Dunn post-hoc test.

Παράρτημα Συμπληρωματικού Πίνακα 1.

HR: Heart Rate - Καρδιακός ρυθμός (παλμοί ανά λεπτό)
LVESD(mm): Left Ventricular End Systolic Dimension - Τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας
LVEDD(mm): Left Ventricular End Diastolic Dimension - Τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας
PWTs(mm): Posterior Wall Thickness Systole - Πάχος οπισθίου τοιχώματος στη συστολή
PWTd (mm): Posterior Wall Thickness Diastole - Πάχος οπισθίου τοιχώματος στη διαστολή
FS%: Fractional Shortening - % Συστολική βράχυνση της εγκάρσιας διαμέτρου της αριστερής κοιλίας
EF: Ejection Fraction - Κλάσμα εξώθησης
r/h ratio: LV radius to PWT ratio - Ακτίνα της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας προς το τελοδιαστολικό πάχος του οπισθίου τοιχώματος

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. Λίστα των γονιδίων με τη μεγαλύτερη μεταβολή από τη σύγκριση μεταγραφώματος μυοκαρδίου μεταξύ $Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$ και $Des^{-/-}$ ποντικών.

Γονίδια αυξημένης έκφρασης [$Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$] vs [$Des^{-/-}$]				
FC ([$Tnf^{Myh6}Des^{-/-}$] vs [$Des^{-/-}$])	Γονίδιο	Όνομα γονιδίου	Κωδικός “Entrez Gene”	
114,98	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	14858	
61,52	Gm3776 /// Gsta1 /// Gsta2	predicted gene 3776 /// glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya) /// glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	100042295///14857///14858	
25,96	Krt18	keratin 18	16668	
23,95	Kcne1	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1	16509	
16,44	Krt8	keratin 8	16691	
12,71	Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	140781	
12,34	Krt8	keratin 8	16691	
10,61	Rpgrip1	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	77945	
10,27	Gdf15	growth differentiation factor 15	23886	
10,23	Hrasls	HRAS-like suppressor	27281	
9,25	Tnni1	troponin I, skeletal, slow 1	21952	
8,90	Krt8	keratin 8	16691	
8,54	Wif1	Wnt inhibitory factor	24117	

		1	
8,52	Maoa	monoamine oxidase A	17161
8,33	Zdhhc2	zinc finger, DHHC domain containing 2	70546
8,23	Ang	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	11727
7,58	Mlana	melan-A	77836
6,76	Snap91	synaptosomal-associated protein 91	20616
6,75	Rnf14	ring finger protein 14	56736
6,41	Txnrd1	thioredoxin reductase 1	50493

Γονίδια μειωμένης έκφρασης [*Tnf^{Myh6}Des^{-/-}*] vs [*Des^{-/-}*]

FC ([<i>Tnf^{Myh6}Des^{-/-}</i>] vs [<i>Des^{-/-}</i>])	Γονίδιο	Όνομα γονιδίου	Κωδικός "Entrez Gene"
-59,60	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	17381
-48,87	Spp1	secreted phosphoprotein 1	20750
-21,38	Myot	myotilin	58916
-15,26	Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	93695
-8,97	Rpl3l	ribosomal protein L3-like	66211
-6,84	Itgax	integrin alpha X	16411
-6,53	Myh6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha	17888
-6,12	2210407C18Rik	RIKEN cDNA 2210407C18 gene	78354
-6,11	Kcnj3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	16519

-5,50	Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	71911
-5,24	Atp6v0d2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2	242341
-5,14	Cyfp2	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	76884
-4,98	Aplnr	apelin receptor	23796
-4,86	Hamp	hepcidin antimicrobial peptide	84506
-4,57	Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1	21807
-4,50	Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	60596
-4,38	Wnk2	WNK lysine deficient protein kinase 2	75607
-4,34	Gpr22	G protein-coupled receptor 22	73010
-4,21	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	67800
-4,11	Dsp	desmoplakin	109620

Συμπληρωματικός Πίνακας 3. Πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τον πατάγοντα NF-κB, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης (Genomatix/MatInspector), οι σε περιοχές που βρέθηκαν θετικές στην ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με anti-p65 στο *Tnf^{Myh6}Des^{-/-}* μυοκάρδιο.

	Seq. name	Matrix Family	Detailed Family Information	Matrix	Detailed Matrix Information	Tissue	Opt.	Start position	End position	Anchor position	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Mat. sim. - opt.	Evidence #	Evidence	Sequence	Chromosomal position
K8-NFκBsite6	spapathanasi_5	V\$NFκB	Nuclear factor kappa B/c-rel	V\$CREL.01	c-Rel	Blood Cells, Bone Marrow Cells, Hematopoietic System, Immune System, Leukocytes, Myeloid Cells, Phagocytes	0,91	2187	2201	2194	-	1	0,923	0,013	0		aagggcccTTCCgac	chr15:101,835,137
K8-NFκBsite8	spapathanasi_5	V\$NFκB	Nuclear factor kappa B/c-rel	V\$NFκBPAB65.02	NF-kappaB (p65)	Blood Cells, Bone Marrow Cells, Hematopoietic System, Immune System, Leukocytes, Myeloid Cells, Phagocytes	0,85	2759	2773	2766	-	0,765	0,859	0,009	0		ctggggaaTTCTctc	chr15:101,835,709
K18-NFκBsite6	spapathanasi_8	V\$NFκB	Nuclear factor kappa B/c-rel	V\$CREL.01	c-Rel	Blood Cells, Bone Marrow Cells, Hematopoietic System, Immune System, Leukocytes, Myeloid Cells, Phagocytes	0,91	3352	3366	3359	-	1	0,916	0,006	1	part of model match of STAT_NFκB_05	ttcgggtccTTCCtgg	chr15:101,857,359

K18-NFkBsite8	spathanasi_8	V\$NFKB	Nuclear factor kappa B/c-rel	V\$NFKAP PAB.01	NF-kappaB	Blood Cells, Bone Marrow Cells, Hematopoietic System, Immune System, Leukocytes, Myeloid Cells, Phagocytes	0,89	4592	4606	4599	+	1	0,938	0,048	0		ggGGGAggtccctac	chr15:101,858,599
K8K18-NFkBsite1	spathanasi_3	V\$NKXH	NKX homeodomain factors	V\$NKX25.05	Homeodomain factor Nkx-2.5/Csx	Bone and Bones, Cardiovascular System, Central Nervous System, Connective Tissue, Digestive System, Embryonic Structures, Endocrine System, Heart, Islets of Langerhans, Lung, Muscles, Myocardium, Nervous System, Pancreas, Prostate, Respiratory System, Skeleton, Spinal Cord, Thyroid Gland, Urogenital System,	0,97	68	86	77	+	1	0,996	0,026	1	part of model match of NFKB_NKXH_01	ctggtTGAGtgggtccagt	chr15:101,843,812

Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Παράμετροι ηχοκαρδιογραφίας μυοκαρδίου μέσω και στατιστική ανάλυση των WT και *Krt18^{-/-}* ποντικών 2- και 4-εβδομάδες μετά από χειρουργείο περίσφυξης αορτής TAC.

	Baseline				2-εβδομάδες pTAC				4-εβδομάδες pTAC			
	WT		<i>Krt18^{-/-}</i>		WT		<i>Krt18^{-/-}</i>		WT		<i>Krt18^{-/-}</i>	
	n=7		n=8		n=4		n=6		n=4		n=6	
LVPWd	0,914	±0,02	0,840	±0,02	**1,168	±0,07	††0,94	±0,05	***1,35	±0,1	†††*0,982	±0,04
IVSd	0,944	±0,02	0,865	±0,02	*1,213	±0,04	*1,053	±0,07	**1,220	±0,05	***1,165	±0,05
LVIDd	3,296	±0,04	3,501	±0,09	3,220	±0,16	3,633	±0,26	3,615	±0,12	3,615	±0,12
LVPWs	1,524	±0,06	1,378	±0,04	†††*1,793	±0,06	1,315	±0,11	†††**1,908	±0,07	1,363	±0,04
IVSs	1,594	±0,07	1,526	±0,04	***1,888	±0,02	†1,663	±0,04	***1,950	±0,05	†††1,593	±0,03
LVIDs	1,540	±0,03	1,679	±0,08	1,558	±0,12	†*2,247	±0,27	1,523	±0,13	†2,135	±0,17
LVM	105,314	±3,26	102,638	±5,34	**148,050	±9,03	**133,8	±6,23	***164,750	±16,53	***149,75	±7,24
LVMi	3,743	±0,08	3,150	±0,13	***5,225	±0,35	†*4,033	±0,2	***5,750	±0,60	††***4,483	±0,26
RWT	0,566	±0,01	0,490	±0,01	†*0,745	±0,06	0,573	±0,07	††***0,815	±0,05	0,598	±0,04
FS	53,241	±1,12	52,214	±1,50	51,385	±3,74	†***39,085	±3,45	51,775	±4,09	†***41,383	±2,66

Μέσος όρος±SEM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs Baseline values of the same genotype; †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001, ††††p<0.0001 vs WT or *Krt18^{-/-}* in the same condition. Two way ANOVA with Bonferroni-Dunn post-hoc test.

