

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ – ΙΡΙΣ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΒΙΟΦΥΣΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ**  
**ΤΗΣ ΚΑΛΜΟΔΟΥΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ**  
**ΤΗΣ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ Ca<sup>2+</sup> -**  
**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2023**

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση  
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



*«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202) ».*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια έρευνες έχουν συσχετίσει πληθώρα μεταλλάξεων και στα τρία γονίδια (CALM1,CALM2,CALM3) που κωδικοποιούν την καλμοδουλίνη (CaM) με παθολογικούς φαινότυπους θνησιγενών κολπικών αρρυθμιών, κυρίως CPVT και LQTS. Η CaM είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη δέσμησης  $Ca^{2+}$  που μεταξύ άλλων αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή των υποδοχέων ρυανοδίνης 2 (RyR2) και κατέχει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του  $Ca^{2+}$ , κατά το μηχανισμό διέγερσης-συστολής των καρδιομυοκυττάρων (ECC). Ο ακριβής μηχανισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ CaM και RyR2 δεν είναι πλήρως γνωστός, γεγονός που προκαλεί δυσκολία στη μελέτη και τον προσδιορισμό του μηχανισμού που μπορεί να οδηγεί σε καλμοδουλινοπάθειες. Η παρούσα διατριβή συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ CaM-RyR2, μέσω της μελέτης της επίδρασης CaM-μεταλλάξεων, που έχουν συσχετισθεί με θνησιγενή αρρυθμιογενή καρδιακά σύνδρομα, τόσο στο ίδιο το μόριο της CaM όσο και στην αλληλεπίδραση με τον RyR2.

Αρχικά, ερευνάται η επίδραση που επιφέρουν ορισμένες CaM μεταλλάξεις στο μόριο της CaM αγρίου τύπου (CaMwt) απο πλευράς δομής, θερμικής σταθερότητας και ικανότητας δέσμησης  $Ca^{2+}$  με τις τεχνικές της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού (CD) και της φασματοσκοπίας φθορισμού. Στη συνέχεια, μελετάται η αλληλεπίδραση της CaMwt και ορισμένων εκ των CaM μεταλλαγμένων μορφών με συνθετικά πεπτίδια που αφορούν στην κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2 (πεπτίδιο B) και σε μία δεύτερη περιοχή του RyR2, που πιθανώς αποτελεί και αυτή περιοχή πρόσδεσης της CaM (πεπτίδιο F). Η θερμοδυναμική μελέτη της εν λόγω αλληλεπίδρασης πραγματοποιείται με χρήση της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδοτησης (ITC). Όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία διατηρούν την τριτοταγή τους διαμόρφωση, τόσο παρουσία όσο και απουσία  $Ca^{2+}$ . Κατά πλειονότητα οι μεταλλάξεις προκαλούν σε διαφορετικό βαθμό απώλεια στη θερμοσταθερότητα του μορίου της CaM, που σχετίζεται με τη δέσμηση  $Ca^{2+}$  και προκαλούν μείωση στη συγγένεια σύνδεσης του  $Ca^{2+}$  στο C-λοβό. Οι δύο αλληλουχίες του ανθρώπινου RyR2 (πεπτίδια B και F) βρέθηκε να αλληλεπιδρούν με υψηλή συγγένεια με την CaMwt, τόσο παρουσία όσο και απουσία  $Ca^{2+}$ , γεγονός που υποδεικνύει πως το πεπτίδιο F αποτελεί πιθανή περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2. Τα αποτελέσματα

της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμένων CaM με τα πεπτίδια B και F, έδωσαν σε ένα γενικό πλαίσιο μικρές μεταβολές στη συγγένεια σύνδεσης σε σχέση με την CaMwt που δεν επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης της CaM στον υποδοχέα, παρουσία  $Ca^{2+}$ . Η απουσία  $Ca^{2+}$  αποκλείει την πρόσδεση των μεταλλαγμένων μορφών της CaM και στα δύο πεπτίδια.

Η εργασία αυτή χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος αναλύεται διεξοδικά το θεωρητικό υπόβαθρο στο οποίο βασίζεται η εν λόγω εργασία, ενώ στο δεύτερο μέρος παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι πειραματικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, τα πειραματικά αποτελέσματα και τέλος τα συμπεράσματα που προκύπτουν.

# **BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL STUDY OF THE ROLE OF CALMODULIN AND ITS MUTANTS IN CALCIUM SIGNALING PATHWAYS- MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENESIS**

## **ABSTRACT**

Many studies the last years have associated numerous mutations in all three genes (CALM1, CALM2, CALM3) that encode human calmodulin (CaM) with pathological phenotypes of fatal arrhythmogenic syndromes, mainly CPVT and LQTS. CaM is a multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$  - binding protein that, among other things, is an important regulator of the ryanodine receptor 2 (RyR2) and plays an important role in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling during the excitation contraction coupling (ECC) mechanism in cardiomyocytes. The exact mechanism of the interaction between CaM and RyR2 is still not fully understood, which makes it difficult to determine the mechanism that may lead in the development of calmodulinopathies. The present study contributes in better understanding of the underlying mechanism of the interaction between CaM and RyR2, through the study of the effect of CaM-mutations, which have been associated with fatal arrhythmogenic heart syndromes, both on the CaM molecule itself and also on the interaction with RyR2.

In the present thesis, is being studied the effect of certain CaM mutations on the wild type CaM molecule (CaMwt) in terms of structure, thermal stability and  $\text{Ca}^{2+}$  - binding affinity using the techniques of circular dichroism spectroscopy (CD) and fluorescence spectroscopy, respectively. Furthermore, isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were performed to investigate and compare the interactions of the wild type and mutant CaM proteins with various synthetic peptides located in the well-established RyR2 CaM- binding region (peptide B), as well other potential CaM-binding region of human RyR2. No gross changes observed in tertiary structure of the mutant CaM proteins, either in absence or presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Decrease in thermal stability compared to CaMwt, is a feature of most of the studied CaM mutations, with. Also, none of the CaM mutations, affected  $\text{Ca}^{2+}$  - binding to the N-lobe of CaM but nearly all of them, with exception of one, resulted in decrease  $\text{Ca}^{2+}$  - binding in the C-lobe to varying degrees. The two sequences of human RyR2 (peptides B and F) interact with significant affinity with CaMwt, in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , indicating that peptide F is a potential CaM-binding region

of RyR2. The results of the interaction of mutant CaMs with peptides B and F gave a general framework for small changes in binding affinity relative to CaMwt that do not affect the ability of CaM to bind to the receptor in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The absence of  $\text{Ca}^{2+}$  precludes the binding of the mutant forms of CaM to both peptides.

The present study is divided into two parts. In the first part, the theoretical background on which this work is based is thoroughly analyzed, while in the second part, all the experimental methods used in this study, the experimental results and finally the conclusions are presented in detail.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A.Θεωρητικό Μέρος .....	1
Κεφάλαιο 1. Η βιολογική σημασία των σημάτων ασβεστίου.....	1
1.1.Γενικά στοιχεία.....	1
1.2.Τα $Ca^{2+}$ ως δεύτεροι αγγελιοφόροι.....	2
1.3.Πρωτεΐνες δέσμησης $Ca^{2+}$ .....	4
1.4. Σηματοδότηση $Ca^{2+}$ .....	6
1.5.Μηχανισμός σύζευξης διέγερσης-συστολής του καρδιακού μυοκυττάρου.....	10
Κεφάλαιο 2. Υποδοχείς ρυανοδίνης.....	13
2.1.Γενικά στοιχεία.....	13
2.2.Ισομορφές των RyRs.....	13
2.3.Δομικά χαρακτηριστικά των RyRs.....	15
2.3.1. Κρυσταλλογραφική μελέτη.....	15
2.3.2.Μελέτη κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM).....	18
2.3.3. Δομικές μεταβολές στους RyR κατά τη μετάβαση από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση.....	23
2.4.Ρυθμιστές των RyRs.....	30
Κεφάλαιο 3. Καλμοδουλίνη (CaM).....	34
3.1. Γενικά στοιχεία.....	34
3.2. Δομή και λειτουργία της CaM.....	34
3.3.Η CaM ως ρυθμιστής των RyRs.....	38
3.3.1.Γενικά στοιχεία.....	38
3.3.2.Η CaM ως ρυθμιστής του RyR2.....	39
3.3.3.Θεωρητικό μοντέλο μοριακού μηχανισμού ρύθμισης RyR2.....	40
3.4.Περιοχές πρόσδεσης της CaM στους RyR1-2.....	42
3.4.1.Η περιοχή CaMBD2 ως η κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR1 (αα 3614-3643) και στον RyR2 ( αα 3583-3603).....	46
3.4.2.Οι αλληλουχίες που πιθανώς λειτουργούν ως επιπλέον περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR2.....	55
Κεφάλαιο 4. Καρδιακές παθολογίες που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία του RyR2 και της CaM.....	59
4.1.Γενικά στοιχεία.....	59

4.2.Δυσλειτουργία στον RyR2-Ακανόνιστη διαστολική έκλυση Ca <sup>2+</sup> .....	60
4.3 Η δυσλειτουργία του RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια .....	62
4.4 Μεταλλάξεις στον RyR2 και αρρυθμογένεση .....	66
4.5. Μεταλλάξεις στην CaM που σχετίζονται με καρδιακές παθολογίες των ιοντικών καναλιών.....	68
Σκοπός διατριβής .....	75
<b>B. Πειραματικό Μέρος.....</b>	<b>77</b>
<b>Κεφάλαιο 5. Παραγωγή ανασυνδυασμένων CaM και σύνθεση πεπτιδίων hRyR2.....</b>	<b>77</b>
5.1 Κλωνοποίηση και έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακό σύστημα.....	77
5.1.1 Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων .....	78
5.1.2.Πρωτεϊνική έκφραση, καθαρισμός και αποκοπή της ιντεΐνης της 6xHis-SUMO2- intein-CaM.....	81
5.2.Σύνθεση hRyR2 πεπτιδίων .....	83
5.2.1 Πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης (Solid-phase peptide synthesis,SPPS) .....	83
<b>Κεφάλαιο 6.Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχροϊσμού (Circular Dichroism-CD) .....</b>	<b>89</b>
6.1.Γενικά στοιχεία.....	89
6.2.Φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού και πρωτεΐνες .....	93
6.3.Δευτεροταγής δομή και θερμική σταθερότητα των ανασυνδυασμένων CaM .....	96
<b>Κεφάλαιο 7. Φασματοσκοπία φθορισμού.....</b>	<b>98</b>
7.1.Γενικά στοιχεία.....	98
7.2.Φθορισμός πρωτεϊνών .....	100
7.3.Μελέτη της δέσμευσης του ασβεστίου στην CaMwt και τα μεταλλάγματά της με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού σταθερής κατάστασης (Steady-state fluorescence spectroscopy) .....	103
<b>Κεφάλαιο 8. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης.....</b>	<b>108</b>
<b>(Isothermal Titration Calorimetry-ITC).....</b>	<b>108</b>
8.1.Γενικά στοιχεία.....	108
8.2.Βασική αρχή της τεχνικής ITC-οργανολογία.....	109
8.3.Μοντελοποίηση απλής αλληλεπίδρασης δύο μορίων.....	111
8.4.Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων CaM με τα συνθετικά πεπτίδια hRyR2.....	114
<b>Γ. Αποτελέσματα .....</b>	<b>116</b>
9.Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένης CaM WT και μεταλλαγμάτων της.....	116
10.Συνθετικά πεπτίδια ανθρώπινου (human) RyR2.....	119



11.Επιβεβαίωση δευτεροταγούς δομής των μεταλλαγμένων μορφών CaM με χρήση φασματοπολωσιμετρίας CD.....	121
12.Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων μορφών της CaM με χρήση φασματοπολωσιμετρίας CD.....	126
13.Μελέτη της δέσμευσης του Ca <sup>2+</sup> στην CaMwt και τις μεταλλαγμένες μορφές της με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού σταθερής καταστασης.....	130
14.Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων hRyR2 με την CaMwt με χρήση θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC).....	136
15.Μελέτη της αλληλεπίδρασης της CaMwt και μεταλλάξεων της με τα συνθετικά πεπτίδια B και F του υποδοχέα hRyR2 με θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC) .....	146
Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	155
Συμπεράσματα .....	167
Βιβλιογραφία .....	176

# Α.Θεωρητικό Μέρος

## Κεφάλαιο 1. Η βιολογική σημασία των σημάτων ασβεστίου

### 1.1.Γενικά στοιχεία

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των κυττάρων, είναι η ικανότητα τους να ρυθμίζουν κρίσιμες βιολογικές λειτουργίες ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο άμεσο περιβάλλον τους.

Η εξελικτική μετάβαση από τους μονοκύτταρους στους πολυκύτταρους οργανισμούς δημιούργησε την απαίτηση για εξειδίκευση των επιμέρους κυτταρικών λειτουργιών καθώς και την ανάγκη για ‘επικοινωνία’ μεταξύ των διακριτών αυτών βιολογικών μονάδων (Fedrizzi, Lim and Carafoli, 2008). Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα ανέπτυξαν μια σειρά από ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς μεταφοράς μηνυμάτων, που με τη βοήθεια εξειδικευμένων μορίων, μπορούν και ελέγχουν με δυναμικό τρόπο αναρίθμητες βιολογικές δράσεις.

Η κυτταρική σηματοδότηση είναι η διαδικασία εκείνη, κατά την οποία εξωκυττάρια σήματα ‘μεταφράζονται’ στο εσωτερικό του κυττάρου σε συγκεκριμένες αποκρίσεις/εντολές με τη βοήθεια μιας μικρότερης ομάδας αγγελιοφόρων μορίων. Τα εξωκυττάρια σήματα, γνωστά και ως πρώτοι αγγελιοφόροι, μπορεί να είναι νευροδιαβιβαστές, ορμόνες, η εμφάνιση διαφοράς δυναμικού σε κάποια περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης, ιόντα, πρωτεΐνες, μεταβολίτες κ.α. Τα αγγελιοφόρα μόρια, γνωστά και ως δεύτεροι αγγελιοφόροι, μεταβιβάζουν το σήμα ενδοκυτταρικά και χωρίζονται σε υδρόφιλα μόρια (π.χ. inositol triphosphate (InsP<sub>3</sub>), cyclic ADP Ribose (cADPR), ιόντα ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>)), υδρόφοβα μόρια (π.χ. diacylglycerol) και αέρια (π.χ. NO, CO, H<sub>2</sub>S) (Fedrizzi, Lim and Carafoli, 2008).

Το ασβέστιο, είναι το τρίτο σε αφθονία μέταλλο στη φύση αλλά και το μέταλλο που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, τα ιόντα ασβεστίου (στο εξής Ca<sup>2+</sup>) επιλέχθηκαν κατά τα πρώτα εξελικτικά στάδια για το ρόλο του δευτέρου αγγελιοφόρου, έχοντας κομβική θέση στη ρύθμιση πολλών σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, από την αρχή της ζωής με την εκκίνηση της γονιμοποίησης, μέχρι και το τέλος της και την έναρξη της κυτταρικής απόπτωσης. Μεταξύ άλλων, τα Ca<sup>2+</sup>

ελέγχουν την έκκριση νευροδιαβιβαστών, τη γονιδιακή έκφραση, την κυτταρική διαίρεση/πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό αλλά και τη μυϊκή συστολή και διαστολή και εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η μάθηση και η μνήμη (Bootman *et al.*, 2012). Σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό ελέγχου των βιολογικών αυτών δράσεων αποτελούν οι πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου (calcium-binding proteins), ένα πολυάριθμο και ετερογενές σύνολο πρωτεϊνών που έχουν ως κοινό σημείο την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν επιλεκτικά και αντιστρεπτά με τα  $Ca^{2+}$  μέσα από εξειδικευμένα δομικά μοτίβα. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν κεντρικό ρόλο στην ομοίωση του ασβεστίου τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό των κυττάρων και μπορούν να αποκωδικοποιούν την όποια μεταβολή συγκέντρωσης των  $Ca^{2+}$  εμφανίζεται (σήματα  $Ca^{2+}$ ) με την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των κατάλληλων κάθε φορά βιοχημικών μονοπατιών.

Η σημασία των  $Ca^{2+}$  στις βιολογικές δράσεις παρουσιάζεται αναλυτικότερα στις επόμενες ενότητες της εργασίας αυτής, εξηγώντας παράλληλα πώς αυτό το φαινομενικά απλό ιόν, συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών και συχνά αντίρροπων κυτταρικών λειτουργιών.

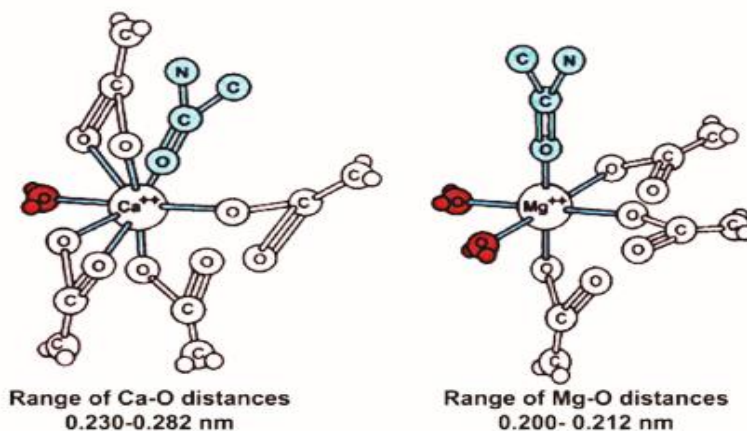
## 1.2. Τα $Ca^{2+}$ ως δεύτεροι αγγελιοφόροι

Οι παράγοντες που συνήθως είναι υπεύθυνοι για τη μεταβίβαση των μηνυμάτων σε ενδοκυτταρικούς στόχους, πρέπει να μπορούν να διατηρηθούν σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης, ώστε να αποφεύγεται η επιπλέον δαπάνη ενέργειας από το κύτταρο για τη ρύθμισή τους. Όταν πρόκειται για πολύπλοκα μόρια σηματοδότησης, τότε η συγκέντρωσή τους ελέγχεται μέσω της βιοσύνθεσης και της αποικοδόμησης. Όσον αφορά τα  $Ca^{2+}$ , ο έλεγχος γίνεται μέσω της αντιστρεπτής τους σύνδεσης σε εξειδικευμένα πρωτεϊνικά μόρια ( $Ca^{2+}$ -binding proteins).

Το κύτταρο επενδύει σημαντική ενέργεια για τον αυστηρό έλεγχο της συγκέντρωσης των  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]$ ). Αυτό είναι εμφανές και από το γεγονός πως η  $[Ca^{2+}]$  κυμαίνεται/ρυθμίζεται με ταχύτητα και αποτελεσματικότητα σε ένα εύρος μεταξύ 100 nM (ενδοκυτταρικά σε φάση χαλάρωσης) και 1-2 mM (εξωκυττάρια) (Clapham, 2007). Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό γίνεται εφικτό βασίζεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των  $Ca^{2+}$  ως μόρια πρόσδεσης. Το φορτίο και το μέγεθος των  $Ca^{2+}$  (διάμετρος 2.28 Å) επιτρέπει τη σύνδεσή τους σε πολύπλοκες γεωμετρίες σαν αυτές που απαντώνται συχνά σε σύνθετα

βιολογικά μόρια (πρωτεΐνες). Η ευελιξία συναρμογής των  $\text{Ca}^{2+}$  με το οξυγόνο (συνήθως 6-8 άτομα οξυγόνου μπορούν να οργανωθούν γύρω του, με μέγιστη χωρητικότητα τα 12 άτομα), δίνει τη δυνατότητα ισχυρής σύνδεσης στα πρωτεϊνικά μόρια. Στα περισσότερα σύμπλοκα αυτής της μορφής, 6 ή 7 άτομα οξυγόνου συναρμόζονται γύρω από ένα ιόν  $\text{Ca}^{2+}$  περίπου στα 2.5 Å, σε μια διαμόρφωση που ονομάζεται πεντάγωνη διπυραμιδική. Συνήθως η σύνδεση γίνεται με τα οξυγόνα που προσφέρονται από τα πρωτεϊνικά καρβοξύλια ή/και μόρια νερού (Clapham, 2007). Το μεταβλητό μήκος και η γωνία δεσμού  $\text{Ca}^{2+} - \text{O}$ , εμφανίζει διάφορες διακυμάνσεις σε σχέση με αυτές του μαγνησίου το οποίο λόγω του μικρού του μεγέθους και της χαμηλότερης πολωσιμότητας απαιτεί ακριβή οκτάεδρη γεωμετρία συναρμογής με τους προσδέτες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μαγνήσιο να δημιουργεί πιο συμπαγείς και άκαμπτες διαμορφώσεις που βρίσκονται σπανιότερα σε πρωτεϊνικά μόρια. Το γεγονός αυτό είναι και ένας από τους λόγους που το ασβέστιο υπερίσχυσε ως αγγελιοφόρο μόριο έναντι του μαγνησίου, το οποίο θα μπορούσε εν δυνάμει να έχει το ρόλο αυτό, όντας πιο διαδεδομένο στο νερό της θάλασσας κατά τα πρώτα βήματα της εξελικτικής διαδικασίας (Carafoli and Krebs, 2016). Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των δύο ιόντων (Fedrizzi, Lim and Carafoli, 2008).

Properties of un-hydrated and hydrated $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Mg}^{2+}$ :				
	Ionic radius	Polarizability	Hydration energy	Hydrated ions
	Å	$\alpha_0 \times 10^{24} \text{ cm}^2$	kcal/g ion	Å
$\text{Ca}^{2+}$	0.99	0.531	410	4.5
$\text{Mg}^{2+}$	0.65	0.012	495	5.9



**Εικόνα 1:** (Επάνω) Χημικές ιδιότητες των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ . (Κάτω) Συναρμογή των ιόντων στις θέσεις δέσμευσης των πρωτεϊνικών μορίων (υποθετική σύγκριση).

Η διατήρηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου σε χαμηλά επίπεδα (σε κλίμακα nM ενδοκυτταρικά), αποτελεί μια βιολογική αναγκαιότητα που προέκυψε εξελικτικά από την επιλογή των φωσφορικών ομάδων ως το ενεργειακό ‘νόμισμα’ του κυττάρου. Τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου, σε αντίθεση με αυτά του μαγνησίου, έχουν χαμηλή διαλυτότητα και είναι τοξικά για το κύτταρο, με αποτέλεσμα οι υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου (στο εύρος των mM) να δρούν παρεμποδιστικά στη παραγωγή ενέργειας από την υδρόλυση των φωσφορικών ομάδων. (Carafoli and Krebs, 2016).

### 1.3. Πρωτεΐνες δέσμευσης $\text{Ca}^{2+}$

Τα  $\text{Ca}^{2+}$  εντός των κυττάρων μπορεί να υπάρχουν είτε ως ελεύθερα ιόντα, είτε συμπλοκοποιημένα με ανόργανα στοιχεία και μικρού μοριακού βάρους οργανικά μόρια. Τα τελευταία, δεσμεύουν συνήθως τα  $\text{Ca}^{2+}$  με χαμηλή συγγένεια σύνδεσης και δεν είναι ικανά να διατηρήσουν την ελεύθερη  $[\text{Ca}^{2+}]$  στην κλίμακα των nM. Για να μπορέσει να γίνει αυτό εφικτό, απαιτείται η δέσμευση των  $\text{Ca}^{2+}$  από πρωτεΐνες που διαθέτουν εξειδικευμένες θέσεις δέσμευσης για τα  $\text{Ca}^{2+}$ .

Γενικά, υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες τέτοιων πρωτεϊνικών μορίων: στην πρώτη κατηγορία, ανήκουν οι πρωτεΐνες που είναι διαλυτές στο κυτταρόπλασμα, οι απομονωμένες μέσα στα κυτταρικά οργανίδια πρωτεΐνες ή αυτές που είναι οργανωμένες σε αδιάλυτες μη μεμβρανικές δομές. Οι πρωτεΐνες αυτές (ρυθμιστικές-buffers), έχουν την ικανότητα ρύθμισης των επιπέδων της  $[Ca^{2+}]$  χωρίς να μεταβάλλεται το ολικό περιεχόμενο του κυττάρου σε ασβέστιο (δυναμική ρύθμιση). Παράλληλα, κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν ως επιπρόσθετο ρόλο την αποκωδικοποίηση της πληροφορίας που ‘μεταφέρουν’ τα  $Ca^{2+}$ . Το ασβέστιο μπορεί να μεταφέρει την πληροφορία στους πρωτεϊνικούς στόχους άμεσα, όταν αυτοί διαθέτουν ειδικές θέσεις δέσμευσης  $Ca^{2+}$ . Ανάλογα λοιπόν με την ύπαρξη αυτών των θέσεων, κατά τη δέσμευση των  $Ca^{2+}$  οι πρωτεΐνες αυτές αυξάνουν ή μειώνουν την ενεργότητά τους. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες των περιπτώσεων, τα  $Ca^{2+}$  δεν μεταδίδουν άμεσα το σήμα στους εκάστοτε πρωτεϊνικούς στόχους. Πριν από αυτό, το σήμα αποκωδικοποιείται από πρωτεϊνικά μόρια (αισθητήρες - sensors) που δεσμεύουν τα  $Ca^{2+}$  και μεταφέρουν την πληροφορία μέσω της αλλαγής στη στερεοδιάταξή τους (ενδιάμεσο στάδιο). Στην πορεία, μέσω αυτής της στερεοχημικής αλλαγής και της μετέπειτα σύνδεσης των πρωτεϊνών αισθητήρων σε συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς στόχους, μεταδίδεται η εκάστοτε πληροφορία (Carafoli and Krebs, 2016).

Η δεύτερη κατηγορία πρωτεϊνών που ελέγχουν τα επίπεδα των  $Ca^{2+}$  στο κύτταρο, αφορά αυτές που βρίσκονται στο εσωτερικό των μεμβρανών και μεταφέρουν τα  $Ca^{2+}$  μέσα και έξω από το κύτταρο ή μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του ενδοπλασματικού/σαρκοπλασματικού (endoplasmic/sarcoplasmic reticulum, ER/SR) δικτύου των οργανιδίων του κυτταροπλάσματος. Όταν η μεταφορά  $Ca^{2+}$  πραγματοποιείται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, προφανώς και μεταβάλλεται η ολική συγκεντρωση των  $Ca^{2+}$  στο κύτταρο (Carafoli and Krebs, 2016).

Όλες οι πρωτεΐνες δέσμευσης  $Ca^{2+}$ , είτε πρόκειται για ρυθμιστικές είτε για αισθητήριες, διαθέτουν ειδικές θέσεις δέσμευσης  $Ca^{2+}$ , που ονομάζονται EF-hand δομικά μοτίβα, τα οποία και θα αναλυθούν εκτενέστερα στο κεφάλαιο 3.

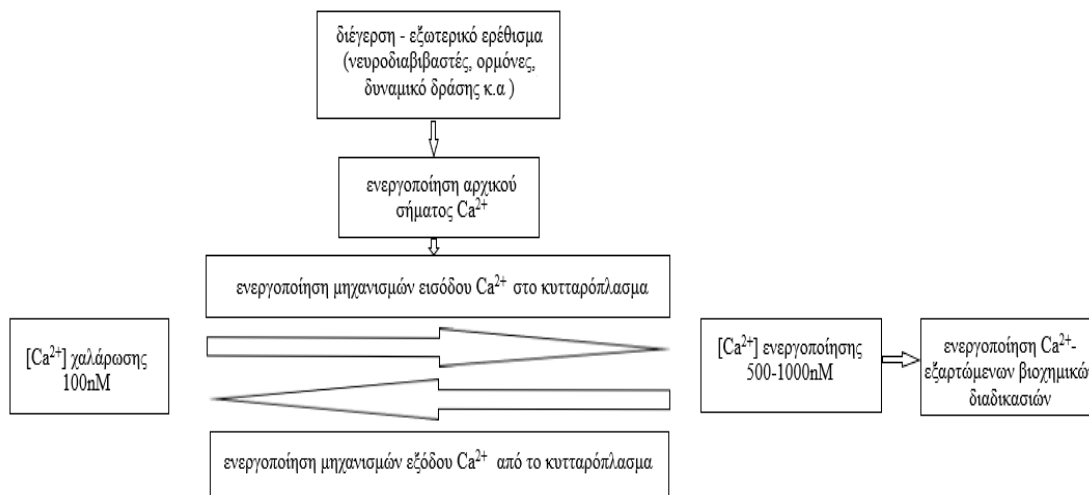
#### 1.4. Σηματοδότηση $\text{Ca}^{2+}$

Κάθε κύτταρο, ανάλογα με τη βιολογική λειτουργία που απαιτείται να εκτελεστεί, ενεργοποιεί κάθε φορά τους επιθυμητούς μηχανισμούς σηματοδότησης. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της ρύθμισης της συγκέντρωσης των  $\text{Ca}^{2+}$  τόσο χρονικά όσο και χωρικά. Παράλληλα, όλα τα συστήματα σηματοδότησης ασβεστίου έχουν ένα κοινό – λειτουργούν δημιουργώντας σύντομες αυξομειώσεις στα επίπεδα  $\text{Ca}^{2+}$ . Αυτά τα παροδικά κύματα  $\text{Ca}^{2+}$  προκύπτουν από τις μεταβολές της συγκέντρωσης κατά την είσοδο ή έξοδο των ιόντων στο κύτταρο και από εισροές/εκροές των ενδοκυτταρικών ‘αποθηκών’ ασβεστίου του κυττάρου (ER/SR). Όλα εξαρτώνται λοιπόν από μία δυναμική ισορροπία μεταξύ των αντιδράσεων που επιτρέπουν την είσοδο των  $\text{Ca}^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα και των αντιδράσεων που τα αποβάλλουν από αυτό (Berridge, Bootman and Roderick, 2003).

Η διαδικασία της σηματοδότησης  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά μέσα από τέσσερα διακριτά στάδια (Berridge, Lipp and Bootman, 2000) :

1. Η σηματοδότηση ξεκινά όταν ένα εξωτερικό ερέθισμα (π.χ ηλεκτρικό, ορμονικό σήμα κ.α.) ενεργοποιεί το εναρκτήριο σήμα  $\text{Ca}^{2+}$
2. Το αρχικό σήμα  $\text{Ca}^{2+}$ , ενεργοποιεί με τη σειρά του τους μηχανισμούς που τροφοδοτούν τα  $\text{Ca}^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα
3. Η αύξηση της  $[\text{Ca}^{2+}]$  στο εσωτερικό του κυττάρου, οδηγεί στη δέσμευση των ιόντων στις  $\text{Ca}^{2+}$ -εξαρτώμενες πρωτεΐνες, επάγοντας αλλαγές στη στερεοχημική τους διάταξη και επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο και την μετέπειτα αλληλεπίδραση τους με άλλα πρωτεϊνικά μόρια-στόχους, μεταδίδοντας την επιθυμητή πληροφορία
4. Τελικά, μετά το πέρας της επίδρασης της αρχικής διέγερσης και εφόσον ολοκληρωθεί η κατάλληλη βιοχημική δράση, τα  $\text{Ca}^{2+}$  αποδεσμεύονται από τις εκάστοτε πρωτεΐνες και μέσω των μηχανισμών που αποβάλλουν την περίσσεια  $\text{Ca}^{2+}$ , το κύτταρο επέρχεται ξανά σε φάση χαλάρωσης

Στο σχήμα 1 παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία (Berridge, Lipp and Bootman, 2000):



**Σχήμα 1:** Στάδια σηματοδότησης  $Ca^{2+}$  (Berridge, Lipp and Bootman, 2000).

Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της σηματοδότησης λοιπόν κατέχουν τα πρωτεϊνικά μόρια-διάλυτοι που μεταφέρουν τα  $Ca^{2+}$  εντός και εκτός του κυτταροπλάσματος, ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο τη  $[Ca^{2+}]$  στην κλίμακα των nM. Τα κανάλια  $Ca^{2+}$ , βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και στις μεμβρανικές περιοχές των ER/SR και των μιτοχονδρίων.

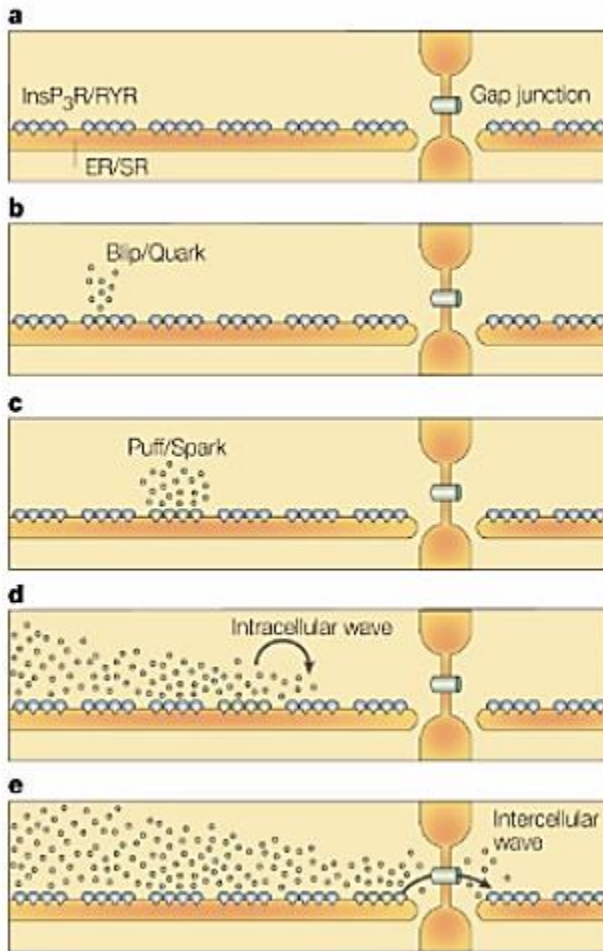
Τα κανάλια  $Ca^{2+}$  που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη ρυθμίζονται από διάφορους μηχανισμούς : 1) την αλληλεπίδραση με υποκαταστάτες (Receptor-Operated Channels, ROCs), 2) την εκκένωση των ενδοκυτταρικών αποθηκών  $Ca^{2+}$  (Store-Operated Channels, SOCs), 3) τις αλλαγές στο ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης, (Voltage-Operated Calcium Channels, VOCCs) και 4) την αλληλεπίδραση με περιβαλλοντικά σήματα (π.χ θερμοκρασία, pH), (Transient Receptor Protein ion-channel family, TRP). Τα παραπάνω κανάλια, κατανέμονται επιλεκτικά στους ιστούς με βάση τις ιδιότητές τους στην ανοικτή/κλειστή διαμόρφωση και τη δυνατότητα απόκρισης σε συγκεκριμένα ερεθίσματα ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Η είσοδος των  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα γίνεται μέσω αυτών των καναλιών ανάλογα το εξωτερικό ερέθισμα που



διεγείρει την πλασματική μεμβράνη και την ενεργοποίηση των καναλιών (Carafoli and Krebs, 2016).

Στις μεμβράνες του ER/SR βρίσκονται δυο από τα πιο σημαντικά ενδοκυτταρικά κανάλια  $Ca^{2+}$ . Πρόκειται για τους υποδοχείς 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>Rs) και τους υποδοχείς ρυανοδίνης (RyRs). Και τα δύο αυτά κανάλια είναι ευαίσθητα στις εναλλαγές της ενδοκυτταρικής  $[Ca^{2+}]$  και είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της απελευθέρωσης των  $Ca^{2+}$  από τα ER/SR. Η ενεργοποίηση ή αναστολή των υποδοχέων εξαρτάται απόλυτα από τα επίπεδα της  $[Ca^{2+}]$  στο κυτταρόπλασμα. Και οι δύο υποδοχείς διαθέτουν θέσεις δέσμησης  $Ca^{2+}$  (λειτουργώντας ως αισθητήρες  $Ca^{2+}$ , αναγνωρίζοντας τις εναλλαγές στην  $[Ca^{2+}]$ ) αλλά ταυτόχρονα ρυθμίζονται και έμμεσα από πληθώρα  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενων πρωτεϊνών. Με τη διέγερση της πλασματικής μεμβράνης, η μικρή τοπική αύξηση της  $[Ca^{2+}]$  μέσα στο κυτταρόπλασμα προκαλεί την σχεδόν ταυτόχρονη έκλυση  $Ca^{2+}$ , με τη μορφή σπινθήρων  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  sparks), από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες (ER/SR), μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται  $Ca^{2+}$ -επαγόμενη απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release, CICR) (Berridge, Bootman and Roderick, 2003). Αυτοί οι σπινθήρες  $Ca^{2+}$  έχουν συγκεκριμένη χωρική-τοπική οργάνωση καθώς ξεκινούν τοπικά από την περιοχή απελευθέρωσης κοντά στον πιο ευαίσθητο υποδοχέα και έπειτα, ενεργοποιώντας διπλανούς υποδοχείς, διαδίδονται ως ταλαντώσεις-κύματα  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  oscillations -  $Ca^{2+}$  waves) σε όλο το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 2) (Berridge, Lipp and Bootman, 2000). Η διαδικασία CICR είναι η αναγεννητική διαδικασία που τροφοδοτεί την αρχική έκλυση  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  spark) και καταλήγει στη διάδοση κυμάτων  $Ca^{2+}$ . Ο κατάλληλος μηχανισμός δράσης εξαρτάται από τη χωροχρονική ρύθμιση των σημάτων  $Ca^{2+}$ . Ο χωρικός έλεγχος, αφορά στους υποδοχείς ή τις ομάδες των υποδοχέων που συγχρονίζονται μέσω της διαδικασίας CICR για την διάδοση των κυμάτων  $Ca^{2+}$  στο κατάλληλο ενδοκυτταρικό σημείο και στην αναγκαία  $[Ca^{2+}]$  ώστε να ενεργοποιηθούν οι κατάλληλες  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενες πρωτεΐνες. Ο χρονικός έλεγχος αφορά στις εναλλαγές της συχνότητας των κυμάτων  $Ca^{2+}$ , οι οποίες καθορίζονται από το περιοδικό άνοιγμα/κλείσιμο των καναλιών  $Ca^{2+}$  και των υποδοχέων του ER/SR, ανάλογα πάλι την επιθυμητή δράση που απαιτείται να εκτελεστεί. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν πρωτεΐνες που μπορούν να αποκωδικοποιούν τις εναλλαγές αυτές στη συχνότητα των ταλαντώσεων  $Ca^{2+}$  (CaMKII, protein kinase C) (Berridge, Lipp and Bootman, 2000).

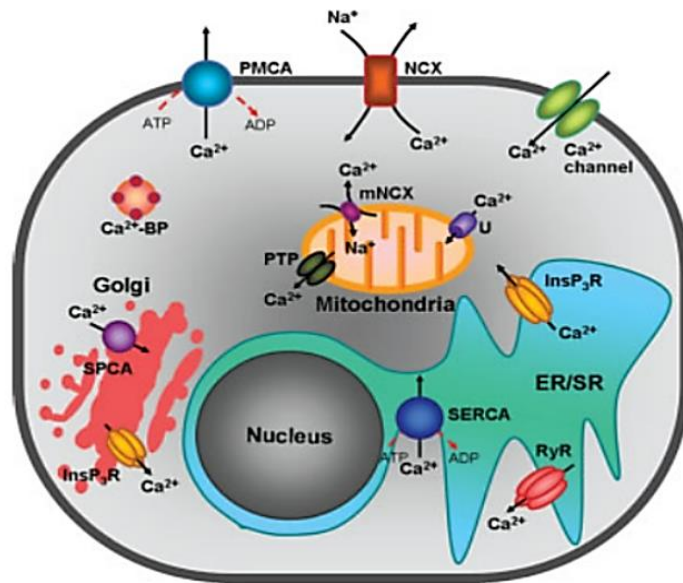
Η περίσσεια των  $\text{Ca}^{2+}$  αποβάλλεται από το κυτταρόπλασμα, προς διατήρηση της ομοιόστασης  $\text{Ca}^{2+}$  (100 nM σε φάση χαλάρωσης), τόσο στον εξωκυττάριο χώρο όσο και πίσω στις ενδοκυτταρικές αποθήκες με τη βοήθεια ειδικών αντλιών και ιονανταλλακτών. Οι ΑΤΡασες  $\text{Ca}^{2+}$  (αντλίες  $\text{Ca}^{2+}$ ) βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη (PMCA αντλία), στις μεμβράνες του ER/SR (sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase (SERCA) αντλία) και στο ενδοπλασματικό σύστημα Golgi (secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SPCA) αντλία). Η αντλία SERCA είναι ο πιο γρήγορος μηχανισμός μείωσης του διαθέσιμου  $\text{Ca}^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Δεύτερο σύστημα εξόδου  $\text{Ca}^{2+}$  είναι οι ιονανταλλάκτες  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (NCX). Βρίσκονται ιδιαίτερα ενεργοί στα διεγερμένα κύτταρα



**Εικόνα 2:** a)  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  και  $\text{RyRs}$  στην επιφάνεια του ER/SR. b) Ως αντίδραση σε μικρή διέγερση, οι υποδοχείς ανοίγουν απελευθερώνοντας ελάχιστη ποσότητα  $\text{Ca}^{2+}$ . c) Σε υψηλότερο βαθμό διέγερσης, ομάδες των υποδοχέων ανοίγουν ταυτόχρονα παράγοντας σπινθήρες ( $\text{Ca}^{2+}$  sparks). d) Όταν τα κύτταρα είναι σε πλήρη διέγερση, μέσω της CICR διαδικασία ενεργοποιούνται γειτονικές συστάδες των υποδοχέων, απελευθερώνοντας  $\text{Ca}^{2+}$ , δημιουργώντας ενδοκυττάρια κύματα  $\text{Ca}^{2+}$ . e) μέσω των ενδιάμεσων συνδέσεων των κυττάρων (gap junctions) το κύμα  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί να μεταδοθεί στα διπλανά κύτταρα δίνοντας ένα διακυτταρικό κύμα  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge, Lipp and Bootman, 2000).

και συμπληρώνουν τη δράση της ΑΤΡασης καθώς διαθέτουν μεγάλη μεταφορική ικανότητα αλλά χαμηλή συγγένεια για τα  $\text{Ca}^{2+}$ . Οι NCX ανταλλάσσουν 3 ιόντα  $\text{Na}^+$  για ένα  $\text{Ca}^{2+}$  και έτσι ελέγχουν το διαμεμβρανικό δυναμικό και τις συγκεντρώσεις των ιόντων αυτών. Η περίσσεια  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί επίσης να απορροφηθεί από τα μιτοχόνδρια μέσω του

μιτοχονδριακού μονομεταφορέα ασβεστίου (MCU). Τα  $\text{Ca}^{2+}$  μπορούν να επιστρέψουν ξανά στο κυτταρόπλασμα μέσω της λειτουργίας του μιτοχονδριακού NCX (mNCX), ο οποίος μπορεί να ρυθμίσει τη ροή ιόντων και προς τις δύο κατευθύνσεις (Carafoli and Krebs, 2016). Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται οι διάλυι μεταφοράς  $\text{Ca}^{2+}$  σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο (Fedrizzi, Lim and Carafoli, 2008) :



Εικόνα 3: Διάλυι μεταφοράς  $\text{Ca}^{2+}$  στο ευκαρυωτικό κύτταρο (Fedrizzi, Lim and Carafoli, 2008).

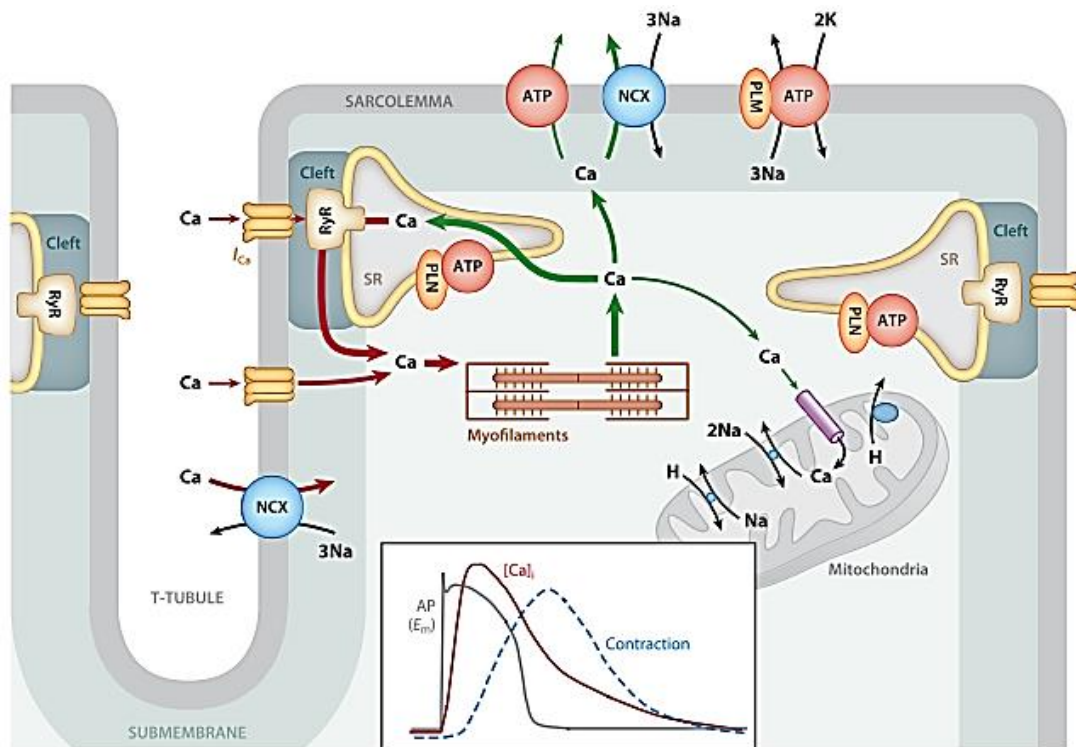
Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς σηματοδότησης  $\text{Ca}^{2+}$  είναι ο μηχανισμός σύζευξης διέγερσης - συστολής του καρδιακού μυοκυττάρου, ο οποίος περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω.

### 1.5. Μηχανισμός σύζευξης διέγερσης-συστολής του καρδιακού μυοκυττάρου

Ο μηχανισμός της σύζευξης διέγερσης-συστολής (Excitation Contraction Coupling, ECC) περιλαμβάνει μια σειρά από αυστηρά καθορισμένες αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν από την ηλεκτρική διέγερση του μυοκυττάρου στη συστολή του καρδιακού μύος. Τα  $\text{Ca}^{2+}$  παίζουν καθοριστικό ρόλο στη σωστή ρύθμιση του καρδιακού ρυθμού, καθώς είναι τα ιόντα που συνδέονται άμεσα με την τροπονίνη C των μυοϊνιδίων και προκαλούν τη συστολή της καρδιάς (Bers, 2002). Η συστολή των μυοκυττάρων εξαρτάται από τις εναλλαγές στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση του  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Η αδυναμία ρύθμισης

της  $[Ca^{2+}]_i$  οδηγεί σε διαταραχή του καρδιακού ρυθμού καταλήγοντας σε παθολογικές καταστάσεις (Eisner *et al.*, 2017). Η σύζευξη διέγερσης – συστολής του μυοκυττάρου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία σε μοριακό επίπεδο, στην οποία συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες, μικρά μόρια και ιόντα.

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται απλουστευμένα η δομή ενός καρδιακού μυοκυττάρου και τα επιμέρους μόρια και ιόντα που λαμβάνουν μέρος στο μηχανισμό ECC.



**Σχήμα 2:** Απεικόνιση της μεταφοράς των  $Ca^{2+}$  κατά τη σύζευξη διέγερσης - συστολής σε ένα καρδιακό μυοκύτταρο (Bers, 2014).

Κατά το δυναμικό δράσης της καρδιάς, πραγματοποιείται εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης του σαρκειλήματος του μυοκυττάρου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται τα τάσεοελεγχόμενα κανάλια  $Ca^{2+}$  τύπου L- (LTCCs ή υποδοχείς διυδροπυριδίνης, DHPRs) απ' όπου και εισέρχεται μικρή ποσότητα  $Ca^{2+}$ . Η μικρή αυτή τοπική αύξηση στη  $[Ca^{2+}]_i$  επάγει την περαιτέρω απελευθέρωση σημαντικής ποσότητας  $Ca^{2+}$  υπό την μορφή «σπινθήρων  $Ca^{2+}$ » ( $Ca^{2+}$ - sparks) από το SR μέσω των υποδοχέων ρυανοδίνης τύπου 2

(RyR2), μέσω της διαδικασίας CICR (Cannell, Cheng and Lederer, 1995). Η τοπική αύξηση της  $[Ca^{2+}]_i$  κατά την είσοδο του  $Ca^{2+}$  μπορεί να ενεργοποιήσει τη διαδικασία CICR καθώς τα LTCCs βρίσκονται στους εγκάρσιους t-σωληνίσκους, σε σχετικά κοντινή απόσταση από τους RyR2 (junctional dyadic cleft area) (Cheng *et al.*, 1996). Όταν πραγματοποιηθούν σύγχρονα πολλά  $Ca^{2+}$  sparks (με την ενεργοποίηση περισσότερων RyR2) και η ελεύθερη συγκέντρωση των  $Ca^{2+}$  αυξηθεί στο επιθυμητό επίπεδο για το κύτταρο, τα  $Ca^{2+}$  συνδέονται σε καθορισμένες θέσεις σύνδεσης στην τροπονίνη C των μυοϊνιδίων. Με τον τρόπο αυτό, η τροπονίνη C επιτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης των μυοϊνιδίων και το κύτταρο υφίσταται μυϊκή συστολή (Woodcock and Matkovich, 2005). Για να επέλθει χαλάρωση του μυός, απαιτείται μείωση της  $[Ca^{2+}]_i$  και το  $Ca^{2+}$  αποδεσμεύεται από την τροπονίνη C. Αυτό περιλαμβάνει την απομάκρυνση του  $Ca^{2+}$  από το κυτταρόπλασμα μέσω τεσσάρων κύριων οδών: ένα μέρος των  $Ca^{2+}$  μεταφέρεται πίσω στο SR μέσω της ATPάσης  $Ca^{2+}$  του SR ( Sarcoplasmic Reticulum Calcium transport ATPase, SERCA), το μεγαλύτερο μέρος των  $Ca^{2+}$  απομακρύνονται από το κύτταρο μέσω των ιονανταλλακτών  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) και της ATPάσης  $Ca^{2+}$  του σαρκειλήματος και τέλος ορισμένη ποσότητα  $Ca^{2+}$  μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια μέσω του μηχανισμού μιτοχονδριακής μονο-μεταφοράς  $Ca^{2+}$  (Bers, 2002).

## Κεφάλαιο 2. Υποδοχείς ρυανοδίνης

### 2.1.Γενικά στοιχεία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν δύο είδη ενδοκυτταρικών ιοντικών καναλιών απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  από τα ER/SR, οι υποδοχείς ρυανοδίνης (Ryanodine Receptors, RyRs) και οι υποδοχείς της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης ( $IP_3Rs$ ). Και τα δύο είδη έχουν παρόμοιο ρόλο αλλά διαφέρουν κατά πολύ σε μέγεθος και στην ταχύτητα απελευθέρωσης των  $Ca^{2+}$ , καθώς οι RyRs εξελίχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε η απελευθέρωση των  $Ca^{2+}$  να είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη λειτουργία των ιοντικών καναλιών  $Ca^{2+}$  της πλασματικής μεμβράνης (LTCCs), σε αντίθεση με τους  $IP_3Rs$  που κυρίως η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από την απόκριση του δεύτερου αγγελιοφόρου  $IP_3$  (Wehrens and Marks, 2005). Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι RyRs είναι διαπερατοί μόνο από μικρά οργανικά και ανόργανα κατιόντα και όχι από ανιόντα (Lau, 2014).

Οι RyRs οφείλουν την ονομασία τους στο αλκαλοειδές ρυανοδίνη, ένα μικρό μόριο που απαντάται στο φυτό *Ryania speciosa*, το οποίο παρουσιάζει παρασιτοκτόνο δράση και εντοπίζεται κυρίως στην νότια Αμερική (Van Petegem, 2015). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξεως των nM), η ρυανοδίνη συνδέεται με τον υποδοχέα και διατηρεί το κανάλι στην ανοιχτή του διαμόρφωση, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις (>100μM) παρεμποδίζει το κανάλι (Meissner, 2017). Οι RyRs βρίσκονται σε μια ευρεία ποικιλία κυττάρων όπως τα νευρωνικά, τα επιθηλιακά, τα λεμφοκύτταρα και τα εξωκρινή κύτταρα αλλά κυρίως κατέχουν εξέχον ρόλο στο μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής (ECC) των σκελετικών και καρδιακών μυοκυττάρων, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω. Σε συνδυασμό με τα LTCCs, μετατρέπουν το ηλεκτρικό σήμα (εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης) σε χημικό, απελευθερώνοντας  $Ca^{2+}$  από τα ER/SR (Van Petegem, 2015). Οι υποδοχείς αυτοί ελέγχονται από μια πληθώρα ρυθμιστικών μορίων και ιόντων, τα οποία θα αναφερθούν διεξοδικά στη συνέχεια.

### 2.2.Ισομορφές των RyRs

Οι RyRs στα θηλαστικά απαντώνται σε τρεις ισομορφές (RyR1-3). Η ισομορφή τύπου 1 (RyR1) εντοπίζεται κυρίως στο σκελετικό μυ (Takeshima *et al.*, 1989), η ισομορφή τύπου 2 (RyR2) επικρατεί στον καρδιακό μυ (Nakai *et al.*, 1990) και η ισομορφή

τύπου 3 (RyR3) βρέθηκε αρχικά στα νευρωνικά κύτταρα του εγκεφάλου (Hakamata *et al.*, 1992), αλλά και οι τρεις ισομορφές έχουν βρεθεί σε πολλούς και διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Lanner *et al.*, 2010).

Ο τύπος RyR1 είναι η πιο μελετημένη ισομορφή του υποδοχέα λόγω της υψηλής έκφρασής της και της ευκολίας απομόνωσης από το σκελετικό μυ. Οι τρεις ισομορφές κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Στον άνθρωπο, το γονίδιο που κωδικοποιεί την ισομορφή RyR1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19q13.2 και αποτελείται από 104 εξόνια. Το γονίδιο που αφορά στην RyR2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q43 (102 εξόνια), ενώ αυτό της ισομορφής RyR3 στο χρωμόσωμα 15q13.3-14 (103 εξόνια) (Lanner *et al.*, 2010). Σημαντικό είναι πως παρόλο που τα RyR γονίδια στο ποντίκι βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (7A3, 13A2 και 2E4 για τους RyR1, RyR2 και RyR3 αντίστοιχα), τα γειτονικά γονίδια σε αυτά τα χρωμοσώματα είναι όμοια με αυτά που αντιστοιχούν στα ανθρώπινα (Wehrens and Marks, 2005). Και οι τρεις ισομορφές RyR εμφανίζουν 65% ομολογία στην αμινοξική τους ακολουθία (Hakamata *et al.*, 1992) με την ύπαρξη τριών περιοχών διαφοροποίησης για τις ισομορφές RyR1 και RyR2 (Πίνακας 1) (Lanner *et al.*, 2010).

Στα μη θηλαστικά σπονδυλωτά, οι υποδοχείς εκφράζονται σε δύο ισομορφές, την RyR $\alpha$  και RyR $\beta$  (O'Brien, Meissner and Block, 1993). Η ισομορφή RyR $\alpha$  εκφράζεται κυρίως στο σκελετικό μυ, ενώ η RyR $\beta$  στο σκελετικό και καρδιακό μυ, στον εγκέφαλο, τους πνεύμονες και το στομάχι (Oyamada *et al.*, 1994).

**Πίνακας 1:** Περιοχές διαφοροποίησης στην πρωτοταγή δομή των ισομορφών RyR1 και RyR2

Περιοχή διαφοροποίησης	Αμινοξική αλληλουχία	Αμινοξική αλληλουχία
	RyR1	RyR2
<b>D1</b>	4254-4631	4210-4562
<b>D2</b>	1342-1403	1353-1397
<b>D3</b>	1872-1923	1852-1890

### 2.3. Δομικά χαρακτηριστικά των RyRs

Το εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος των RyRs αλλά και η πληθώρα των ρυθμιστών που αλληλεπιδρούν με αυτούς καθιστούν τη δομική τους μελέτη ιδιαίτερα δύσκολη. Μέχρι στιγμής η δομή των υποδοχέων ή τμημάτων τους έχει μελετηθεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (X-ray crystallography) και κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM) σε χαμηλή ανάλυση.

#### 2.3.1. Κρυσταλλογραφική μελέτη

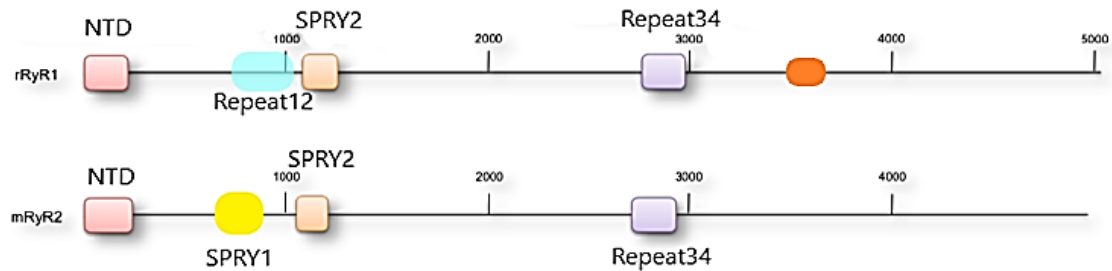
Η κρυσταλλογραφική μελέτη των RyRs έχει εξαιρετικά αργή εξέλιξη, καθώς υπάρχει δυσκολία στην απομόνωση των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης που απαιτεί η μέθοδος. Μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστη η κρυσταλλική δομή ολόκληρου του μορίου, γεγονός το οποίο δυσχεραίνει την περεταίρω μελέτη τους. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μελέτες που έχουν αποδώσει κρυσταλλογραφικές δομές συγκεκριμένων περιοχών των RyRs (Εικόνα 4) οι οποίες αποτελούν περίπου το 23% της συνολικής αλληλουχίας των RyR (Yuchi and Van Petegem, 2016). Πιο συγκεκριμένα, είναι διαθέσιμες είναι οι κρυσταλλικές δομές :

- 1) Τριών τμημάτων (A,B και C) του N-τελικού άκρου του RyR1 του κουνελιού που αντιστοιχούν στα πρώτα 559 αμινοξέα της ακολουθίας του υποδοχέα σε υψηλή διακριτική ικανότητα 2.5Å. Η δομική περιοχή A (αα 1-205) αποτελείται από επαναλαμβανόμενες β-πτυχωτές επιφάνειες, οι οποίες επιστοιβάζονται μέσω ισχυρών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (β-trefoil δομή) καθώς και από μία α-έλικα, που επικαλύπτει πλευρικά τον υδρόφοβο πυρήνα. Η περιοχή B (αα 206-394) αποτελεί επίσης μία β-trefoil δομή και η C (αα 395-532) απαρτίζεται από μια δέσμη πέντε α-ελίκων. Τα τελευταία 27 αμινοξέα της περιοχής δεν είναι ορατά σε αυτή την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Και οι τρεις αυτές δομικές περιοχές αλληλεπιδρούν εκτενώς μεταξύ τους μέσω μιας διεπιφάνειας 1687Å<sup>2</sup>, εκ των οποίων τα 517 Å<sup>2</sup> είναι υδρόφοβης φύσεως (Εικόνα 4) (Tung *et al.*, 2010; Amador *et al.*, 2009).
- 2) Του τμήματος που αφορά στα πρώτα 217 αμινοξέα του N-τελικού άκρου της αλληλουχίας του RyR2 του ποντικού σε διακριτική ικανότητα 2.55Å. Η δομή του τμήματος αυτού περιλαμβάνει μία β-trefoil δομή που αποτελείται από 12 β-πτυχωτές επιφάνειες η οποία πλαισιώνεται από μία α-έλικα 10 αμινοξικών

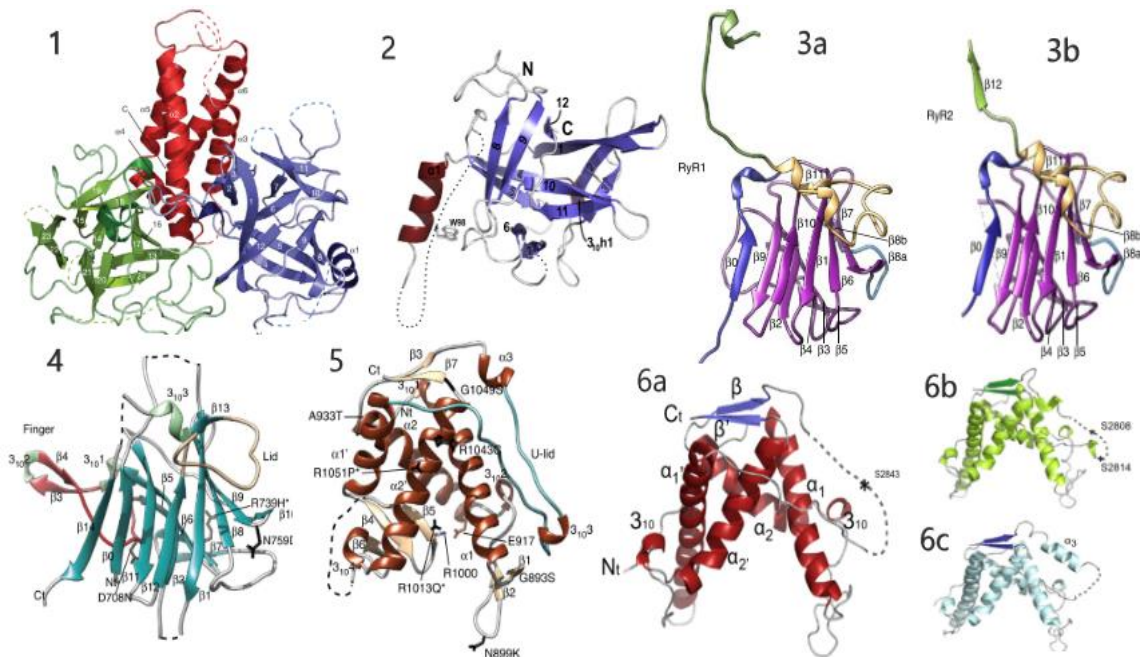


- καταλοίπων και μία μικρότερη έλικα τριών αμινοξέων (Εικόνα 4) (Lobo and Van Petegem, 2009). Ολόκληρη η κρυσταλλική δομή του N-τελικού άκρου (αα 1-606) προσδιορίστηκε από τους (Borko *et al.*, 2014) (PDB 4JKQ).
- 3) Των περιοχών SPRY2 (αα 1070-1246) του RyR1 του κουνελιού και SPRY2 (αα 1080-1253) του RyR2 του ποντικού σε διακριτική ικανότητα 1.84Å και 1.34Å αντίστοιχα. Ο πυρήνας της δομικής αυτής περιοχής αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα. Το N-τελικό άκρο της περιοχής έχει μία επέκταση μίας β-πτυχωτής επιφάνειας και μία έλικα τριών αμινοξικών καταλοίπων. Το C-τελικό άκρο διαθέτει δύο α-έλικες και μία β-πτυχωτή επιφάνεια και σχηματίζουν β-φύλλα με την αντίστοιχη β-πτυχωτή επιφάνεια του πυρήνα (περιοχή lid) (Εικόνα 4) (Lau and Van Petegem, 2014).
  - 4) Της περιοχής SPRY1 (αα 650-844) του RyR2 του ποντικού σε διακριτική ικανότητα 1.2Å. Ο πυρήνας της δομικής αυτής περιοχής αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα όπως και της περιοχής SPRY2. Η περιοχή lid σε αυτή τη δομή δημιουργεί ένα ‘καπάκι’ πάνω απ’ την πυρήνα. Η δομική αυτή περιοχή διαθέτει επίσης μία δομή β-hairpin που ξεχωρίζει απ’ τον πυρήνα (Εικόνα 4) (Yuchi *et al.*, 2015).
  - 5) Της περιοχής Repeat12 (αα 862-1054) που διαχωρίζει τις SPRY1-2 του RyR1 του κουνελιού σε διακριτική ικανότητα 1.5Å. Πρόκειται για ένα τμήμα που απαρτίζεται από δύο επαναλήψεις (Repeat1 και 2), κάθε μία από τις οποίες διαθέτει δύο α-έλικες και μια μικρή β-πτυχωτή επιφάνεια σε κάθε C-τελικό άκρο, οι οποίες διευθετούνται έτσι ώστε να δημιουργείται ένα ‘δίκλωνο’ β-φύλλο (Εικόνα 4) (Yuchi *et al.*, 2015).
  - 6) Των περιοχών της κεντρικής περιοχής των RyRs και συγκεκριμένα των αα 2734-2940 του RyR1 του κουνελιού, της αα 2699-2904 του RyR2 του ποντικού και της αα 2597-2800 του RyR3 του ανθρώπου, οι οποίες περιλαμβάνουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης των υποδοχέων, σε διακριτική ικανότητα από 1.65-1.95Å. Οι περιοχές αυτές είναι γνωστές και ως Repeat34 και παρουσιάζουν παρόμοια δομή με την Repeat12 που προαναφέρθηκε με ουσιαστική διαφορά εδώ τη δομή διπλής συμμετρίας (Εικόνα 4) (Yuchi, Lau and Van Petegem, 2012).

7) Του τμήματος aa 3614-3643 της κεντρικής περιοχής του RyR1 του κουνελιού (PDB 2BCX) (Maximciuc *et al.*, 2006)



**Εικόνα 4 :** Σχηματική απεικόνιση σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής των δομικών περιοχών του RyR1 του κουνελιού (rRyR1) και του RyR2 του ποντικού (mRyR2) των οποίων υπάρχει διαθέσιμη η κρυσταλλογραφική δομή.



**Εικόνα 5:** Κρυσταλλικές δομές 1) των 1-559 αα του RyR1 (rabbit), 2) των 1-217αα του RyR2 (mouse), 3) των περιοχών SPRY2 a) των 1070-1246αα του RyR1 (rabbit) και b) των 1080-1253αα του RyR2 (mouse), 4) της περιοχής SPRY1 (650-844αα) του RyR2 (mouse), 5) της περιοχής Repeat12 (862-1054αα) του RyR1 (rabbit) και 6) των περιοχών Repeat34 των a) του RyR1 (rabbit) b) του RyR2 (mouse) και c) RyR3 (human) (δομές από PDB).

### 2.3.2. Μελέτη κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM)

Παρά την έλλειψη εκτεταμένης πληροφορίας γύρω από την κρυσταλλογραφική δομή των RyRs, έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές μελέτες με τη χρήση της κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-electron microscopy, cryo-EM). Από τα τέλη του 1980 υπάρχει δομική πληροφορία σε χαμηλή ανάλυση και έπειτα από το 2012 έως και σήμερα οι μελέτες έχουν αποδώσει υψηλής ανάλυσης δομές σε συνδυασμό με τεχνικές τρισδιάστατης αναπαράστασης (3D reconstruction).

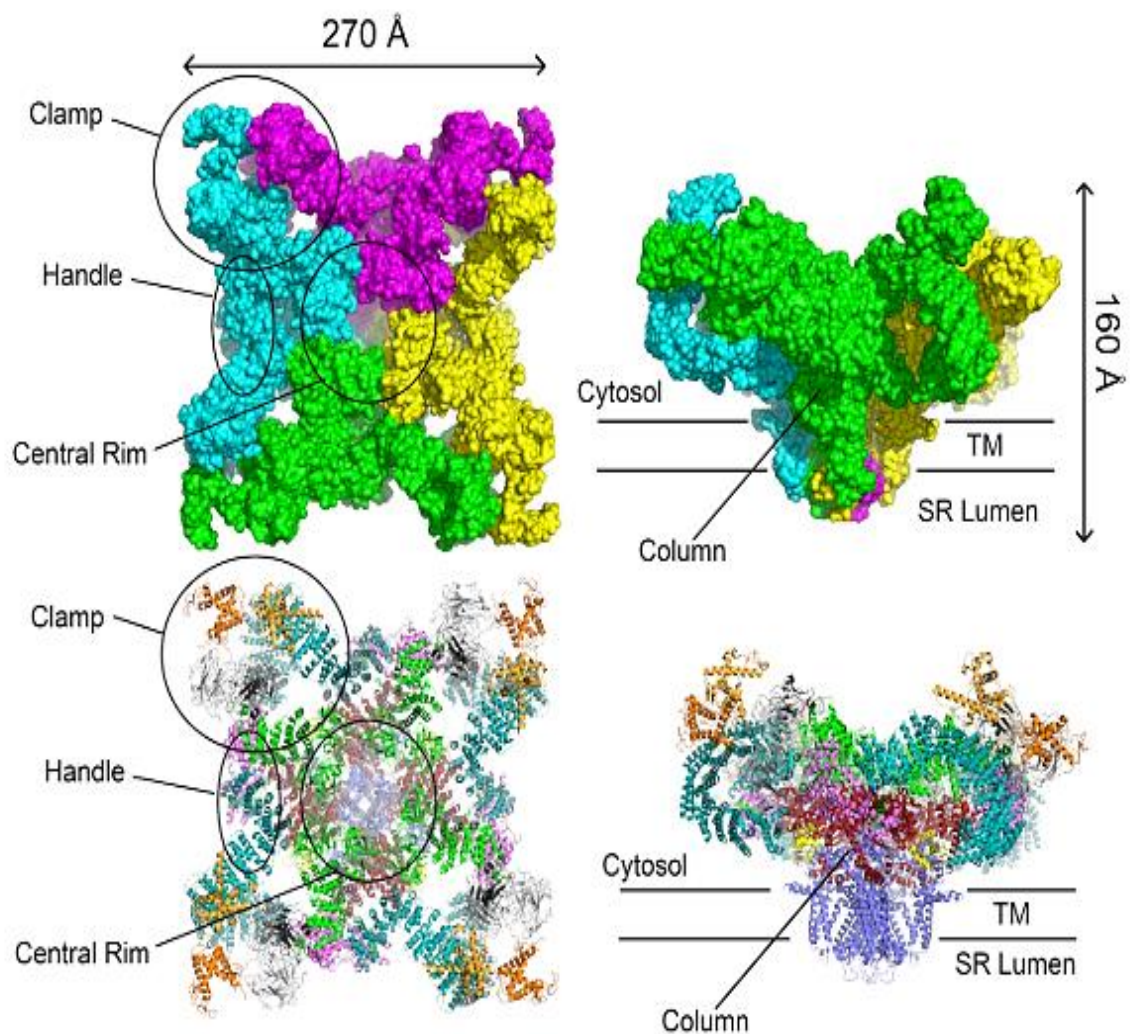
Οι πολύ χαμηλής ανάλυσης ( $\sim 10\text{\AA}$ ) αρχικές μελέτες (Saito *et al.*, 1988; Wagenknecht *et al.*, 1989; Radermacher *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1998) κατέδειξαν μια συνολική τετραπλή συμμετρική (C4) αρχιτεκτονική των RyRs σε σχήμα ‘μανιταριού’, με το μεγαλύτερο τμήμα του υποδοχέα να ανήκει στη κυτταροπλασματική περιοχή (80%,  $275 \times 275 \times 100\text{\AA}$ ) και το υπόλοιπο να αποτελεί τη διαμεμβρανική περιοχή του πόρου ( $120 \times 120 \times 60\text{\AA}$ ). Οι δύο αυτές περιοχές συνδέονταν μέσω μίας «στήλης» (α-έλικα, column). Σε αυτή την ανάλυση φάνηκαν κάποιες διακριτές περιοχές : η περιοχή «σφιγκτήρα» (clamp), «λαβής» (handle) και η κεντρική (central rim) (Εικόνα 6).

Το 2015, τρεις μελέτες (Efremov *et al.*, 2015; Zalk *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015) έδωσαν την πρώτη ατομική δομή του RyR1 του κουνελιού σε κλειστή διαμόρφωση (Εικόνα 6) σε αναλύσεις μεταξύ 3.8 έως 6.1 $\text{\AA}$ . Ακολούθησαν μελέτες σε διάφορες διαμορφώσεις για τον RyR1 (des George *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2016) και για τον RyR2 (Peng *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2019b). Όλες αυτές οι νεότερες μελέτες έδωσαν τη δυνατότητα της καλύτερης κατανόησης της αρχιτεκτονικής των RyRs. Η πιο λεπτομερής απεικόνιση αποκάλυψε πως οι RyRs αποτελούν όντως ομοτετραμερή πρωτεϊνικά συμπλέγματα μοριακής μάζας περίπου 2.2 MDa, με κάθε ένα από τα μονομερή να αποτελείται από περίπου 5037 αμινοξικά κατάλοιπα. Το κυτταροπλασματικό τμήμα αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του υποδοχέα, με την περιοχή του πόρου να καταλαμβάνει μόλις το 1/5 του καναλιού.

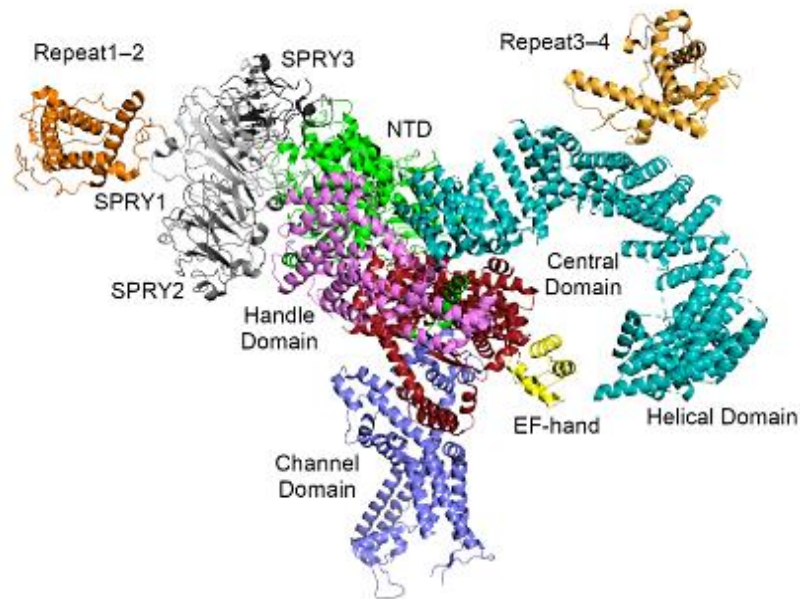
Στις δομές με την υψηλότερη ανάλυση (έως 3.8 $\text{\AA}$ ) μπορεί να φανεί ξεκάθαρα ότι ο RyR1 είναι ένα ομοτετραμερές κανάλι με κάθε μονομερές να απαρτίζεται από τα εξής επιμέρους τμήματα : το N-τελικό (N-Terminal Domain, NTD, αα 1-627) (Amador *et al.*, 2009), τρία SPRY τμήματα (SPRY1-3, αα 628-1656) (Lau and Van Petegem, 2014), που διακόπτονται από ένα τμήμα επανάληψης RyR (Repeat 1-2, αα 850-1054), ένα τμήμα

«λαβής» (Handle domain, αα 2145–3613), ένα εκτεταμένο τμήμα α-ελίκων (helical domain,) που διακόπτεται από ένα δεύτερο τμήμα επανάληψης RyR (Repeat3-4, αα 2735-2938), το κεντρικό τμήμα (central domain, αα 3667-4174), το διαμεμβρανικό πόρο (αα 4820-4956) και το C-τελικό τμήμα (C-Terminal Domain, CTD, αα 4957-5037) (Εικόνα 7). Το τμήμα NTD διαχωρίζεται επίσης στα υπο-τμήματα A, B και C. Με εξαίρεση τα NTD και τα SPRY τμήματα, η το μεγαλύτερο μέρος της δομής απαρτίζεται από α-έλικες. Πιο συγκεκριμένα, οι προηγούμενες πιο ασαφείς περιοχές όπως η κεντρική, η περιοχή «handle» και τα ελικοειδή τμήματα έχουν επαναλαμβανόμενες αναδιπλώσεις «armadillo» και μαζί με την N-τελική περιοχή παρέχουν ένα δίκτυο υπερ-ελίκων, για τη πρόσδεση των πολλαπλών ρυθμιστών του καναλιού αλλά και για την διάδοση των διαμορφωτικών αλλαγών (Yan *et al.*, 2015).

Ο υποδοχέας μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο εκτεταμένα α-πηνία (α-solenoids) σε περίπου ορθή γωνία μεταξύ τους. Το πρώτο α-πηνίο δημιουργείται από το υποτμήμα C (NTD-C, αα 393-627) μαζί με το κεντρικό τμήμα και κομμάτι του «handle» τμήματος. Αποτελείται από περίπου 30 α-έλικες οργανωμένες σε δύο παράλληλες στρώσεις. Αυτή η περιοχή χρησιμεύει στο να υποστηρίζει την RyR κυτταροπλασματική περιοχή και επεκτείνεται ως την επιφάνεια της «handle» περιοχής του υποδοχέα, όπου αναδιπλώνεται κάτω από τα υπο-τμήματα A και B του NTD (Efremov *et al.*, 2015). Το δεύτερο α-πηνίο αποτελεί τμήμα του «handle» μαζί με το μεγάλο και κοίλο ελικοειδές τμήμα (Εικόνα 7). Τοποθετείται περίπου κάθετα στο πρώτο α-πηνίο και αποτελεί το μεγαλύτερο κομμάτι του ‘σφιγκτήρα’ (clamp) και των άκρων της κυτταροπλασματικής κεφαλής του υποδοχέα (Εικόνα 6). Όλα τα επιμέρους τμήματα που απαρτίζουν τα δύο α-πηνία δημιουργούν μεταξύ τους διεπιφάνειες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του RyR, συνδέοντας με δυναμικό τρόπο την κυτταροπλασματική περιοχή με το άνοιγμα-κλείσιμο του πόρου (Tung *et al.*, 2010). Τα α-πηνία είναι γνωστό πως εξυπηρετούν στη δέσμευση άλλων πρωτεϊνικών μορίων και εφόσον εδώ παρατηρείται πως αυτή η περιοχή αποτελεί εξαιρετικά μεγάλο κομμάτι του υποδοχέα, πιθανώς αυτή είναι και η περιοχή όπου συνδέονται οι περισσότεροι ρυθμιστές του καναλιού, που καθορίζουν τη λειτουργία του (Lanner *et al.*, 2010; Van Petegem, 2015). Στις διεπιφάνειες των τμημάτων του κεντρικού τμήματος, έχουν προσδιοριστεί οι θέσεις δέσμευσης των  $Ca^{2+}$ , ATP και καφεΐνης (Wei *et al.*, 2016; des George *et al.*, 2016).



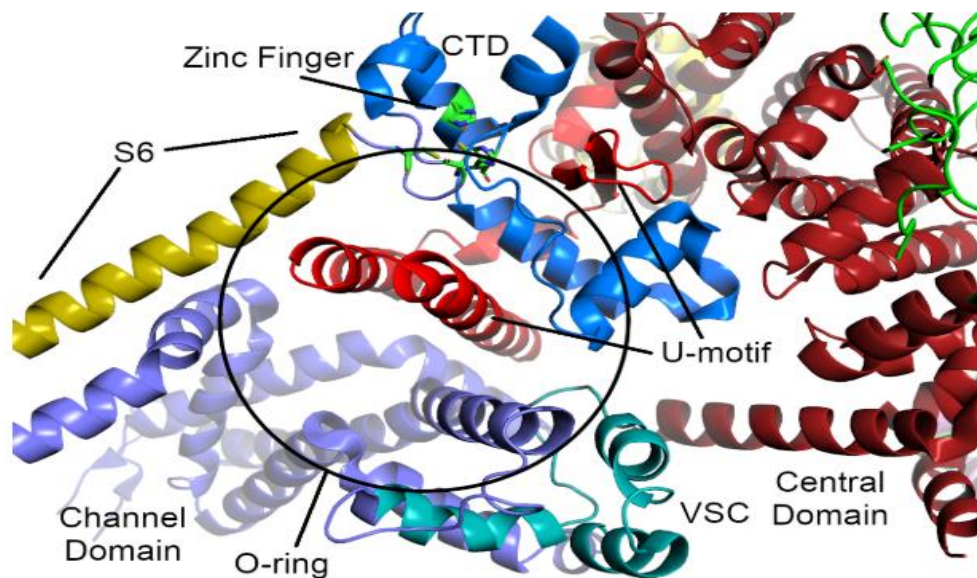
**Εικόνα 6.** Αναπαράσταση του υποδοχέα RyR1 (κυτταροπλασματική και διαμεμβρανική όψη). (Επάνω) Χάρτης πυκνότητας με cryo-EM μέθοδο σε διακριτική ικανότητα 6Å με χρωματισμένο ξεχωριστά το κάθε μονομερές. (Κάτω) Μοριακό μοντέλο στα 3.8 Å με cryo – EM (PDB ID 3J8H) (Yan et al., 2015) (η δομή αυτή επιλέχθηκε καθώς αποτελεί την πιο λεπτομερή απεικόνιση στην υψηλότερη ανάλυση που έχει επιτευχθεί, καθώς στον υποδοχέα RyR2 λείπει μεγάλο κομμάτι του ελικοειδούς τμήματος)



**Εικόνα 7.** Το μονομερές του RyR1 όπου διαφαίνονται με λεπτομέρεια τα επιμέρους τμήματα που το απαρτίζουν.

Η περιοχή του διαμεμβρανικού πόρου ομοιάζει κατά έναν τρόπο με μία μίξη των ιοντικών καναλιών νατρίου και των ιοντικών καναλιών που ενεργοποιούνται με το pH. Η περιοχή του πόρου ανήκει στην υπο-οικογένεια 6TM των ιοντικών διαύλων, με έξι διαμεμβρανικές έλικες (S1-S6) ανά μονομερές να οργανώνονται σε ένα ιοντικό κανάλι, με την S6 έλικα να διαμορφώνει το ιοντικό μονοπάτι. Ο ιοντικός πόρος των RyRs ξεχωρίζει των υπολοίπων 6TM σε τρία βασικά σημεία. Αρχικά, η S6 έλικα είναι ασυνήθιστα μακριά, με το μισό μήκος να είναι διαμεμβρανικό και το υπόλοιπο κυτταροπλασματικό. Στη συνέχεια της (προς την κυτταροπλασματική πλευρά), υπάρχει μία μικρή  $\alpha$ -έλικα του CTD, η οποία διαθέτει μία θέση δέσμευσης C2H2 για Zn (zinc finger). Δεύτερον, τα κατάλοιπα μεταξύ των S2-S3 ελίκων δημιουργούν μια δομή αισθητήρα τάσεως (voltage-sensor like domain, VSC, aa 4541-4819), η οποία συνδέει την CTD περιοχή με τμήμα των S1-S4. Τέλος, τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα μεταξύ της S5 και της έλικας του πόρου δημιουργούν ένα βρόγχο (hairpin loop) ο οποίος προεξέχει εντός του SR (διεισδύει περίπου στο 1/3 της μεμβρανικής περιοχής (Zalk *et al.*, 2015). Το πέρασμα του πόρου που

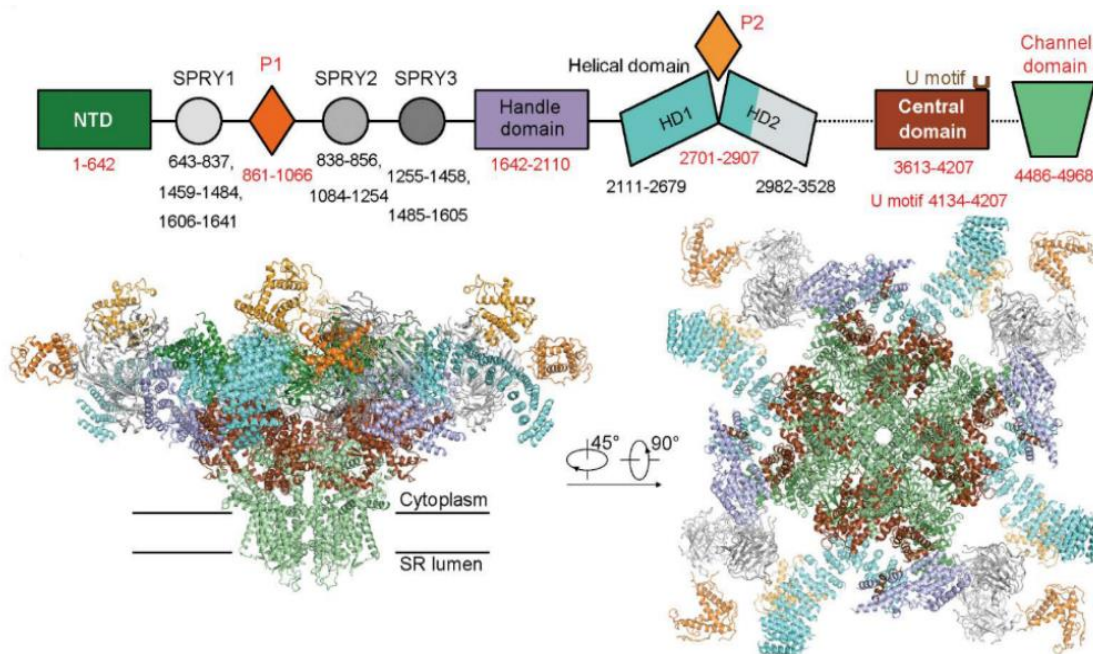
περιβάλλεται από τις S4-S5 αμφιπαθητικές έλικες σχηματίζει το άνοιγμα του πόρου με μονή πύλη στο Ile4937 για τον RyR1 και στο Ile4868 για τον RyR2 και αποτελεί το πιο στενό τμήμα του πόρου. Τα επιμήκη τμήματα των S6, η CTD και η VSC μαζί δημιουργούν τον σχηματισμό O-δακτυλίου (O-ring) σε κάθε μονομερές. Τα κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής του κεντρικού τμήματος (αα 4170-4250 στον RyR1, αα 4134-4207 στον RyR2), δημιουργούν ένα U-μοτίβο, που διεισδύει στο O-ring (Εικόνα 8). Η κοίλη επιφάνεια των α-πηνίων, που απλώνεται πάνω από το U-μοτίβο, περιβάλλει το O-ring. Τα VSC,CTD και το κεντρικό τμήμα μαζί αποτελούν την ‘στήλη’ που φαίνεται στην Εικόνα 6 (Van Petegem, 2012).



**Εικόνα 8:** Περιοχή του RyR1 όπου φαίνεται το U-motif (έντονο κόκκινο), η περιοχή O-ring (κύκλος), η VSC (κυανό), η έλικα S6 (κίτρινο), το zinc finger της CTD περιοχής(μπλε) και τμήματα της κεντρικής περιοχής ενεργοποίησης (κόκκινο σκούρο) και της περιοχής του καναλιού (μωβ) (Yan et al., 2015)

Παρόλο που οι RyR1 και RyR2 διαθέτουν παρόμοια τεταρτοταγή δομή (πράγμα αναμενόμενο εφόσον παρουσιάζουν αμινοξική ομολογία 70%), η σύγκριση των δομών του καλύτερα μελετημένου RyR1 με τις μέχρι τώρα διαθέσιμες cryo-EM δομές του RyR2 (Peng *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2019a; Gong *et al.*, 2019) δείχνει σημαντικές δομικές

διαφορές. Αυτό είναι περισσότερο αντιληπτό στο δεύτερο μισό του ελικοειδούς τμήματος (HD2), το οποίο συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τα LTCCs και τους γειτονικούς υποδοχείς για τον RyR1 αλλά όχι για τον RyR2. Αξίζει να σημειωθεί πως όλες οι δομές του RyR2 έδειξαν πολύ πιο εύκαμπτα τα περιφερειακά τμήματά του (SPRY1-3, P1, P2, NTD-A, NTD-B) (Εικόνα 9) αλλά η διακριτική ικανότητα των δομών είναι αρκετά χαμηλή για την λεπτομερή ανάλυση των εν λόγω τμημάτων αυτής της ισομορφής (Yan *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2019). Για το λόγο αυτό, η περιγραφή των cryo-EM μελετών έγινε με βάση τον RyR1, ενώ στην Εικόνα 9 που ακολουθεί παρατίθεται και η δομή του RyR2.



**Εικόνα 9 :** (επάνω) Αμινοξική αλληλουχία που αντιστοιχεί σε κάθε τμήμα-περιοχή του RyR2, (κάτω) Cryo – EM δομή του RyR2 του χοίρου στην κλειστή διαμόρφωση σε διακριτική ικανότητα 4.2Å (PDB 5GOA) (Peng *et al.*, 2016).

### 2.3.3. Δομικές μεταβολές στους RyR κατά τη μετάβαση από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση.

#### 2.3.3.1. Γενικά στοιχεία

Αρχικά, είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως η ρύθμιση των RyR ελέγχεται από ένα σημαντικό αριθμό πρωτεϊνών, μικρών μορίων και ιόντων, τα οποία αλληλεπιδρούν με το τετραμερές σε συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης σε απόσταση από την περιοχή του διαμεμβρανικού πόρου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές υποδεικνύουν την ύπαρξη



αλλοστερικών θέσεων σύνδεσης στην κυτταροπλασματική περιοχή, που οδηγούν σε αλλαγές διαμόρφωσης και στη περιοχή του πόρου. Σε αυτήν την ενότητα, για την καλύτερη περιγραφή και κατανόηση του περίπλοκου μηχανισμού των RyR1 και RyR2, γίνεται αναφορά σε cryo-EM μελέτες των τελευταίων ετών, που έχουν επιτύχει αναπαραστάσεις των υποδοχέων τόσο σε κλειστή όσο και σε ανοικτή διαμόρφωση με τη βοήθεια των κατάλληλων ρυθμιστών.

Για την μελέτη του μηχανισμού της ενεργοποίησης των RyR ήταν κομβική η απόκτηση δομών υψηλής ανάλυσης στην ανοικτή διαμόρφωση. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι πιο πρόσφατες μελέτες που έχουν επιτύχει σε υψηλή διακριτική ικανότητα να αναπαραστήσουν την ανοικτή διαμόρφωση των RyR1 και RyR2.

**Πίνακας 2:** Μελέτες που έχουν επιτύχει υψηλής διακριτικότητας δομές για την ανοικτή διαμόρφωση των RyR1 και RyR2 με τη βοήθεια ρυθμιστών.

Ισομορφή	Ρυθμιστές σταθεροποίησης στην ανοικτή διαμόρφωση	Διακριτική ικανότητα (Å)	Μελέτη
<b>rRyR1</b>	Ca <sup>2+</sup> /ATP/Caffeine Ca <sup>2+</sup> /ryanodine	3.8	(des George <i>et al.</i> , 2016)
<b>rRyR1</b>	Ca <sup>2+</sup> /PCB95	5.7	(Bai <i>et al.</i> , 2016)
<b>rRyR1</b>	Ca <sup>2+</sup> /Ruthenium Red	4.9	(Wei <i>et al.</i> , 2016)
<b>pRyR2</b>	Ca <sup>2+</sup> /PCB95	4.2	(Peng <i>et al.</i> , 2016)
<b>pRyR2</b>	Ca <sup>2+</sup> /ATP/Caffeine/FKBP12.6 Ca <sup>2+</sup> /PCB95	4.6	(Chi <i>et al.</i> , 2019a)
<b>pRyR2</b>	Ca <sup>2+</sup> /ATP/Caffeine/FKBP12.6 Ca <sup>2+</sup> /PCB95	4.2 4.4	(Gong <i>et al.</i> , 2019)

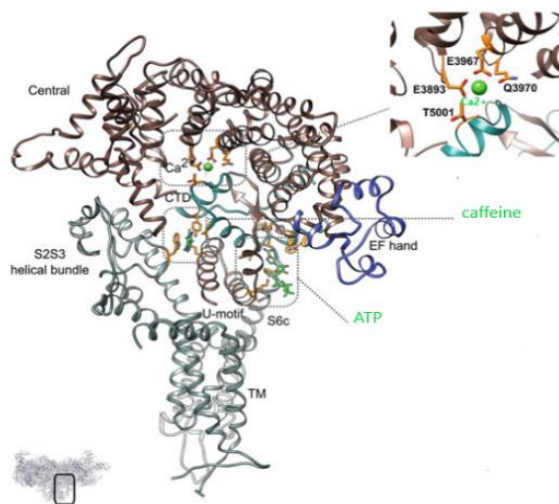
Απουσία των ενεργοποιητών, οι όποιες αλλαγές στη διαμόρφωση, λόγω της ευκαμψίας του RyR, δεν εμπίπτουν στο μηχανισμό της ενεργοποίησης. Οι αλλαγές περιορίζονται στα άκρα του κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα και εμφανίζονται σαν μία ευρύτερη περιστροφή όλων των τμημάτων γύρω από τον άξονα συμμετρίας του τετραμερούς, εκτός του κεντρικού τμήματος, της περιοχής του διαμεμβρανικού πόρου και της C-τελικής περιοχής (Bai *et al.*, 2016;des George *et al.*,

2016). Παρουσία των  $\text{Ca}^{2+}$  και των ενεργοποιητών, λαμβάνουν χώρα συγκεκριμένες δομικές αλλαγές στην κεντρική περιοχή και στο C-τελικό άκρο, οδηγώντας στο άνοιγμα του πόρου. Οι δομικές αλλαγές που παρατηρούνται στο N-τελικό τμήμα, στην περιοχή των λαβών (handles) και στα ελικοειδή τμήματα (helical domains, HD), οφείλονται κατά κύριο λόγο στην ευκαμψία του υποδοχέα και δεν σχετίζονται με το μηχανισμό ενεργοποίησης· εντοπίζονται προς την διαμεμβρανική περιοχή και διαδίδονται αριστερόστροφα κατά τον άξονα συμμετρίας.

### **2.3.3.2. Δομικές μεταβολές στον RyR1**

Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της μετάβασης από την ανοικτή στην κλειστή διαμόρφωση βασική προϋπόθεση ήταν να αποσαφηνιστεί πρωτίστως ο ρόλος του EF-hand δομικού μοτίβου στην ενεργοποίηση του υποδοχέα από το κυτταροπλασματικό  $\text{Ca}^{2+}$ . Υψηλής ανάλυσης RyR1 δομές έδειξαν πως τα EF-hand δομικά μοτίβα του υποδοχέα βρίσκονται δίπλα στο συντηρημένο πυρήνα της πρωτεΐνης, κοντά στην S6 έλικα του πόρου. Αρχικώς, είχε προταθεί πως αυτό το μοτίβο δέσμευσης του  $\text{Ca}^{2+}$  θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στην άσβεστο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του RyR1, αλλά επερχόμενες μελέτες κατέδειξαν πως η εξ' ολοκλήρου διαγραφή αυτού του τμήματος δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση του (Guo *et al.*, 2016).

Η θέση δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$  στον RyR1 προσδιορίστηκε μεταξύ του κεντρικού και του C-τελικού τμήματος και συντονίζεται από τις καρβοξυλικές πλευρικές αλυσίδες των E3967 και E3893 του  $\alpha$ -πηνίου του πυρήνα του κεντρικού τμήματος και τον καρβονυλικό σκελετό του T5001 της C-τελικής περιοχής (des George *et al.*, 2016) (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Μονομερές του RyR1 όπου φαίνεται η θέση δέσμευσης του  $\text{Ca}^{2+}$  (Willegems and Efremov, 2017)

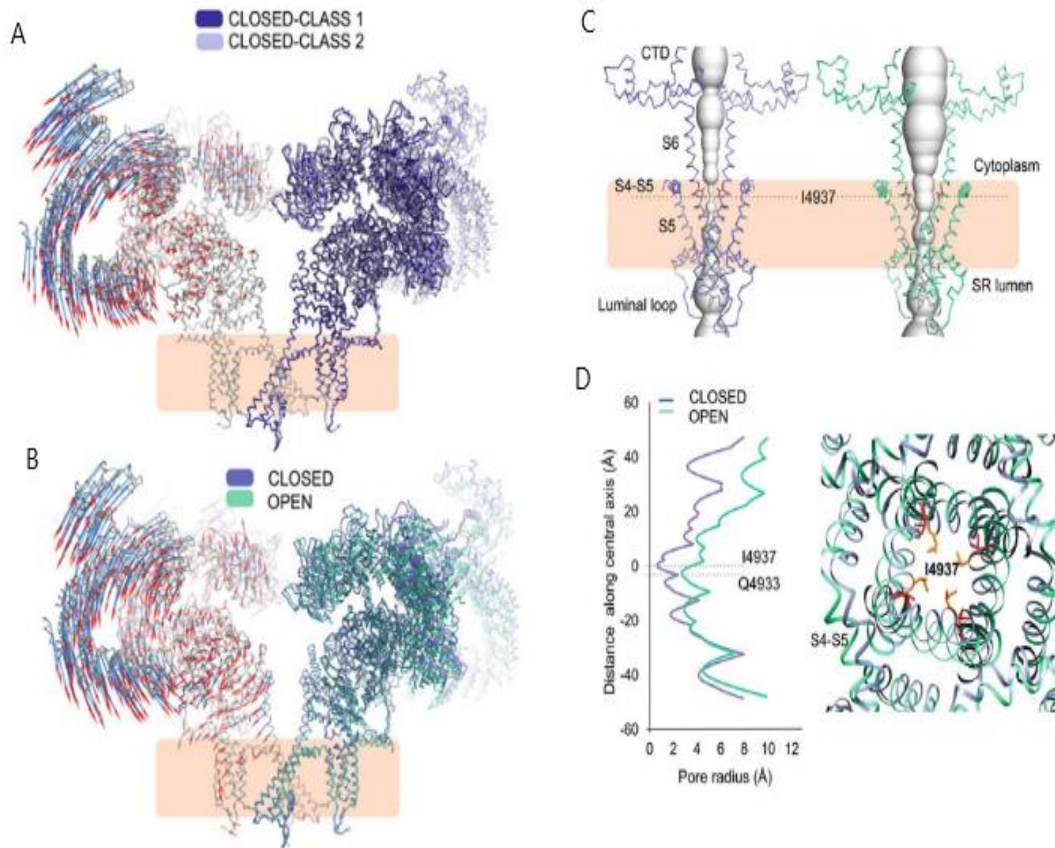
Οι δομικές αλλαγές λοιπόν, περιλαμβάνουν περιστροφή της κεντρικής περιοχής σε σχέση με την S6 έλικα γύρω από τον άξονα συμμετρίας του υποδοχέα. Στην περιοχή του διαμεμβρανικού πόρου, οι S6 έλικες κινούνται ακτινικά προς τα έξω σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας και αυτό φαίνεται ως μια ‘κάμψη’ της έλικας γύρω από το σημείο που βρίσκεται το G4934 (RyR1) (G4864 RyR2), τρία αμινοξικά κατάλοιπα κάτω από αυτά της περιοχής του ανοίγματος του πόρου (I4937, RyR1)(I4867, RyR2) (des George *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2016). Η περιοχή γλυκίνης (glycine) είναι σημαντική στο μηχανισμό της μετάβασης από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση, τόσο για τον RyR1 όσο και για τον RyR2. Στην ανοικτή διαμόρφωση η προς τα έξω κίνηση της S6 οδηγεί στη διαστολή του πόρου. Η απόσταση των  $\alpha$  ανθράκων (Ca-Ca) μεταξύ των I4937 αυξάνει κατά  $6\text{\AA}$  και η απόσταση μεταξύ των πιο κοντινών ατόμων των πλευρικών αλυσίδων αυξάνει από τα 5 στα  $12\text{\AA}$ . Η διάμετρος του πόρου αυξάνει από περίπου  $1.2\text{\AA}$  στα  $7\text{\AA}$  και σε αυτό το στάδιο αυτή η διαστολή πραγματοποιείται στα πολικά κατάλοιπα Gln4933 που βρίσκονται μια ελικοειδή στροφή κάτω του I4937. Τα εναπομείναντα τμήματα του ιοντικού πόρου, που περιλαμβάνουν το ιοντικό φίλτρο επιλογής και τους βρόγχους προς το εσωτερικό του SR, παραμένουν ουσιαστικά αμετάβλητα κατά το άνοιγμα του πόρου.

Το άνοιγμα του κυτταροπλασματικού τμήματος της S6 είναι συνακόλουθο της προς τα έξω μεταβολής του ελικοειδούς του U μοτίβου κατά  $3\text{\AA}$  και οι έλικες S4S5 που

δημιουργούν ένα δακτύλιο γύρω από την S6 επίσης κινούνται κατά 3Å. Το τμήμα VSD οριακά περιστρέφεται προς τα έξω σαν ένα άκαμπτο σώμα μακριά από τον άξονα συμμετρίας καθώς ανοίγει ο πόρος. Το άνοιγμα πιθανώς συνδέεται με την εναλλαγή ενός μοτίβου γεφυρών άλατος μεταξύ των S6 ελίκων και γύρω από τις οριζόντιες S4S5 έλικες (des George *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2016). Αυτά τα δίκτυα γεφυρών άλατος πιθανώς σταθεροποιούν την ανοικτή και την κλειστή διαμόρφωση του καναλιού ελαχιστοποιώντας την ύπαρξη ενδιάμεσων σταδίων.

Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού μέσω το οποίου η δέσμευση του  $Ca^{2+}$  οδηγεί στο άνοιγμα του RyR1, είναι σημαντικό να τονισθεί πως η παραπάνω περιγραφή αφορά σε διαμορφώσεις του υποδοχέα που έχουν σταθεροποιηθεί με τη βοήθεια ενεργοποιητών. Αρχικά, πραγματοποιείται η δέσμευση του  $Ca^{2+}$  και στη συνέχεια σταθεροποιείται ο υποδοχέας (π.χ. με τη χρήση ATP και καφεΐνης) στην ανοικτή διαμόρφωση. Η δέσμευση των  $Ca^{2+}$  οδηγεί στο να πλησιάσουν τα κατάλοιπα του α-πηνίου (E3867, E3893) που συντονίζουν το ιόν με το T5001 του C-τελικού άκρου. Οι αποστάσεις των α ανθράκων μειώνονται σε 1.5 - 2 Å. Ως αποτέλεσμα αυτού, το α-πηνίου της κεντρικής περιοχής κινείται κατά έξι βαθμούς γύρω από τη β-hairpin του U-μοτίβου, μετατοπίζοντας το N-τελικό άκρο από την κεντρική περιοχή και κατ' επέκταση το κυτταροπλασματικό τμήμα προς την μεμβρανική επιφάνεια, οδηγώντας σε μια γενικευμένη δομική αλλαγή. Το κεντρικό τμήμα περιστρέφεται στο μεμβρανικό επίπεδο και η διαμεμβρανική και κεντρική περιοχή υφίστανται μικρές μετατοπίσεις. Οι μεγαλύτερες δομικές αλλαγές συμβαίνουν τοπικά στην S6 έλικα (4936-4956) και τη γειτονική περιοχή στο C-τελικό τμήμα (4957-4985), που συνοδεύεται με μια μετατόπιση της ελικοειδούς hairpin του U-μοτίβου παράλληλα στη μεμβράνη. Επομένως, φαίνεται πως παρουσία  $Ca^{2+}$  η μετάβαση από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση σχετίζεται με την 'κάμψη' της S6 έλικας και μέρους του γειτονικού τμήματος του C-τελικού άκρου. Αυτός ο μηχανισμός εξηγεί γιατί η σύνδεση μεταξύ της S6 και του C-τελικού τμήματος, που δίνεται μέσω της θέσης δέσμευσης του Zn, είναι ύψιστης σημασίας για την ενεργοποίηση του καναλιού. Για το άνοιγμα του πόρου, οι δομικές αλλαγές πρέπει να γίνονται στο πλαίσιο του συντονισμού ολόκληρου του τετραμερούς και αυτό εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των μονομερών. Εάν η αλληλεπίδραση μεταξύ των κεντρικών περιοχών και των C-τελικών

τμημάτων των μονομερών είναι ασθενείς, η λειτουργία αυτή αντικαθίσταται από τα NTD-AB, καθιστώντας τα σημαντικά για τη λειτουργία του μηχανισμού.



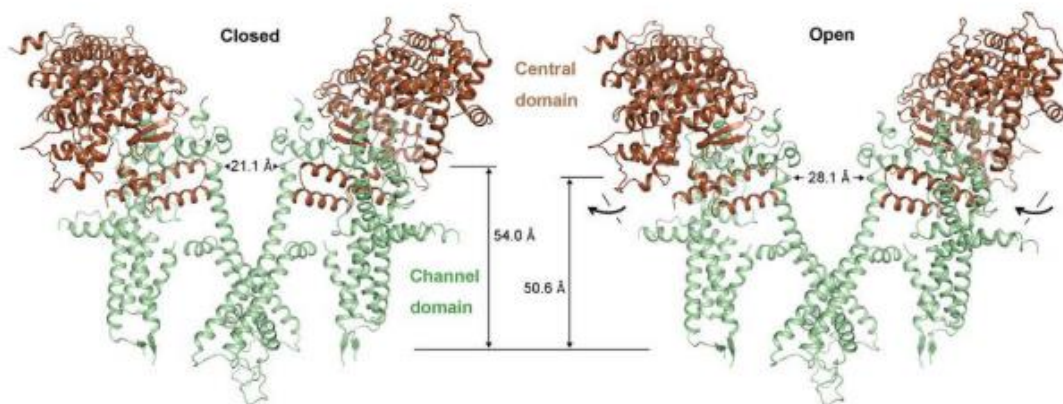
**Εικόνα 11** : Μηχανισμός RyR1. Α) Πλευρική απεικόνιση του RyR1 όπου φαίνεται η κίνηση της κυτταροπλασματικής κεφαλής στην κλειστή διαμόρφωση. Τα βέλη στο αριστερό μονομερές παρουσιάζουν την δομικές αλλαγές σε δύο διαφορετικές φάσης της κλειστής διαμόρφωσης. Β) Δομικές αλλαγές κατά τη μετάβαση από την κλειστή (μπλε) στην ανοικτή διαμόρφωση (κυανό). Τα βέλη σε αυτή τη φάση δείχνουν επιπρόσθετη μετακίνηση στην κεντρική περιοχή και την περιοχή του διαμεμβρανικού πόρου. C) Απεικόνιση του πόρου στην κλειστή (αριστερά) και στην ανοικτή (δεξιά) διαμόρφωση. Η επιφάνεια του διαύλου φαίνεται με γκρι χρώμα και υπολογίστηκε μέσω HOLE. D) Διαγραμματική απεικόνιση της διαμέτρου του πόρου σε συνάρτηση της απόστασης κατά τον άξονα συμμετρίας στην κλειστή και ανοικτή διαμόρφωση (αριστερά) και απεικόνιση της περιοχής του πόρου κατά της μετακίνηση του I4937 καταλοίπου από την κλειστή (πορτοκαλί) (PDB:5TB0, 4.4Å) στην ανοικτή (κόκκινο) (PDB 5TAL,4.2Å) διαμόρφωση (Willegems and Efremov, 2017).

### 2.3.3.3. Δομικές μεταβολές στον RyR2

Η δομική μελέτη γύρω από τον μηχανισμό ενεργοποίησης του RyR2 είναι λιγότερο εκτενής σε σχέση με τον RyR1 υποδοχέα, οπότε αναφέρονται εν συντομία ορισμένα συμπεράσματα που έχουν προκύψει από τις μελέτες των τελευταίων ετών (Peng *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2019a; Gong *et al.*, 2019).

Συγκρίνοντας την ανοικτή με την κλειστή διαμόρφωση του RyR2, παρατηρείται πως δεν υπάρχουν τεράστιες δομικές αλλαγές μεταξύ των κυτταροπλασματικών περιοχών, αλλά η ολική κίνηση της κυτταροπλασματικής κεφαλής προκύπτει από τη σχετική μετατόπιση μεταξύ των διαφόρων περιοχών της και της εναλλαγής των θέσεων τους. Η κεντρική περιοχή (central domain) βρέθηκε να είναι η βασική περιοχή που μεταδίδει τις διαμορφωτικές αλλαγές, ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο το άνοιγμα και το κλείσιμο του καναλιού. Αυτή η περιοχή υφίσταται τόσο συστολή στο εσωτερικό της, όσο και περιστροφή, η οποία οδηγεί στην τελική εξωτερική κλίση των S6 ελίκων του διαμεμβρανικού πόρου.

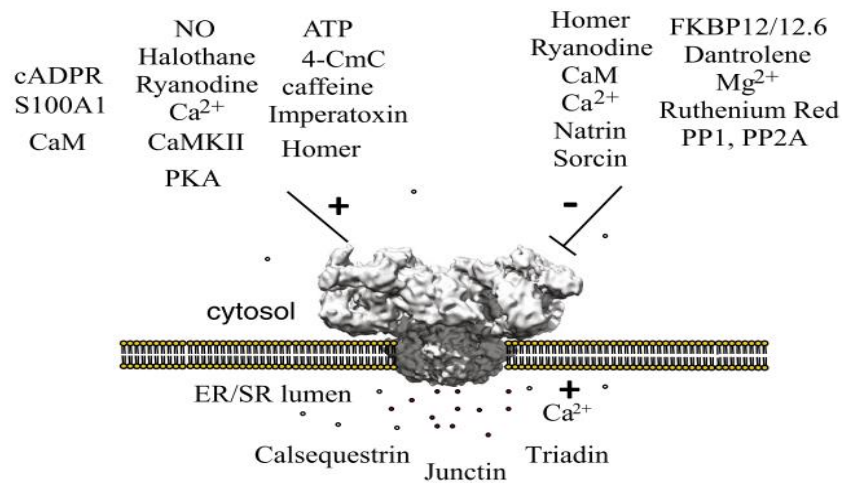
Όλες οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι οι θέσεις πρόσδεσης των  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP και καφεΐνης βρίσκονται στις διεπιφάνειες μεταξύ της κεντρικής περιοχής και της περιοχής του πόρου (Gong *et al.*, 2019), οι οποίες ταυτίζονται με αυτές στη δομή του RyR1 (des George *et al.*, 2016). Αυτό, έρχεται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις ότι η συστολική κίνηση και η χαλάρωση της κεντρικής περιοχής είναι εξαιρετικής σημασίας για την διάνοϊξη του RyR καναλιού (Zalk *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2015). Σε συνθήκες απουσίας  $\text{Ca}^{2+}$ , ο υποδοχέας RyR2 παραμένει κλειστός ενώ η αύξηση της  $[\text{Ca}^{2+}]$  γύρω στα 20  $\mu\text{M}$  οδηγεί στη συστολή του κεντρικού τμήματος, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στη διαστολή της περιοχής του πόρου (S6 έλικες). Ο ακριβής προσδιορισμός της θέσης δέσμευσης του  $\text{Ca}^{2+}$  απαιτεί δομές υψηλότερης διακριτικής ικανότητας για το συγκεκριμένο υποδοχέα. Σύγκριση των δομών στην ανοικτή και κλειστή διαμόρφωση δείχνει πως το κατάλοιπο R4874 μετακινείται μακριά από το E4872, ενώ το E4878 πιθανώς πλησιάζει κοντά στο E4872 στην ανοικτή διαμόρφωση. Αυτό υποδηλώνει ότι τα κατάλοιπα E4872 και E4878 πιθανώς παίζουν και αυτά σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του RyR2 από το  $\text{Ca}^{2+}$  (Peng *et al.*, 2016).



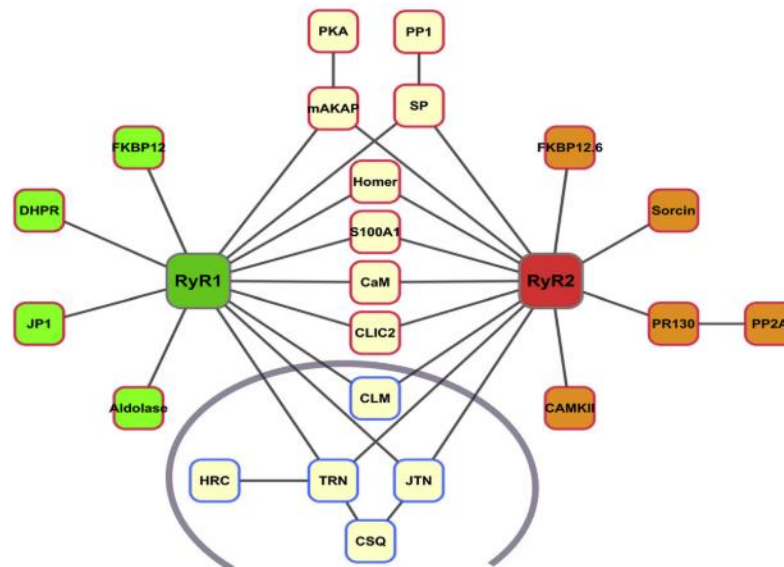
**Εικόνα 12:** Οι επιμέρους μετατόπισης των τμημάτων της κεντρικής περιοχής του RyR2, οδηγούν στη διεύρυνση του κυτταροπλασματικού τμήματος των S6 ελίκων, μέσω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του U-μοτίβου και του CTD.

## 2.4.Ρυθμιστές των RyRs

Έχει ήδη περιγράψει πως επιτυγχάνεται η ρύθμιση των υποδοχέων μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, μικρά μόρια και ιόντα. Οι ρυθμιστικοί αυτοί παράγοντες προσδένονται άμεσα στον υποδοχέα τόσο στην περιοχή της κυτταροπλασματικής κεφαλής όσο και από την πλευρά του SR και είτε ενεργοποιούν, είτε αναστέλλουν τη λειτουργία του καναλιού. Σε κάποιες περιπτώσεις, ορισμένα μόρια εμφανίζουν και τις δύο ιδιότητες, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στη περιοχή του υποδοχέα (Εικόνα 13). Σημαντικό είναι να τονιστεί το γεγονός ότι παρόλο που οι υποδοχείς εμφανίζουν 65% αμινοξική ομολογία, η επίδραση των ρυθμιστών μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ισομορφών RyR (Εικόνα 14).



**Εικόνα 13:** Ρυθμιστές RyR. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι φυσικοί και μη ρυθμιστές των υποδοχέων που ενεργοποιούν (+) το κανάλι ή το απενεργοποιούν (-). Ορισμένοι από αυτούς ( πχ.  $Ca^{2+}$ , CaM) εμπίπτουν και στις δύο κατηγορίες ρυθμιστών καθώς η δράση τους εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους (Van Petegem, 2015).



**Εικόνα 14:** Ρυθμιστικές πρωτεΐνες των RyR1 και RyR2 βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ( κόκκινο πλαίσιο) ή στο SR (κυανό πλαίσιο εντός γκρι κύκλου). Οι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν και τους δύο υποδοχείς εμφανίζονται με κίτρινο (κεντρικά) ενώ με πράσινο αυτές που ρυθμίζουν αποκλειστικά τον RyR1 και με πορτοκαλί τον RyR2 (Song *et al.*, 2011).



Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται ορισμένες βασικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τους RyRs και η αντίστοιχη λειτουργία τους.

**Πίνακας 3.** Λειτουργία ρυθμιστικών πρωτεϊνών των RyRs (Bers, 2004).

<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Λειτουργία</b>
<b>FKBP12</b>	Ευνοεί το συντονισμένο άνοιγμα του RyR1
<b>FKBP12.6</b>	Ευνοεί το συντονισμένο άνοιγμα του RyR2
<b>Calmodulin</b>	Αναστέλει τον RyR2 ( $\pm$ RyR1)
<b>CaMKII</b>	Φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον RyR2
<b>PKA</b>	Φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον RyR2
<b>-mAKAP</b>	- Πρόσδενει PKA
<b>PPI</b>	Αποφωσφορυλίωση του RyR
<b>-Spinophilin</b>	-Προσδένει PPI
<b>PP2A</b>	Αποφωσφορυλίωση του RyR
<b>-PR130</b>	-Προσδένει PP2A
<b>Sorcin</b>	Αναστέλει το κλείσιμο του RyR
<b>DHPR</b>	Συντονισμός του DHPR στον RyR
<b>Homer</b>	Ενεργοποιεί τον RyR1, αναστέλει τον RyR2
<b>Junctin</b>	Δεσμέυει την καλσεκουεστρίνη στον RyR
<b>Triadin</b>	Δεσμέυει την καλσεκουεστρίνη στον RyR
<b>Calcequestrin</b>	Ρυθμίζει την $[Ca^{2+}]_{SR}$ , επιδρά στη διαμόρφωση του RyR
<b>HRC</b>	Ρυθμίζει την $[Ca]_{SR}$ , επιδρά στη διαμόρφωση του RyR

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των RyRs διαδραματίζουν τα  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Τα  $Mg^{2+}$  και η ATP ρυθμίζουν τους υποδοχείς από την κυτταροπλασματική πλευρά ενώ τα  $Ca^{2+}$  και από την πλευρά του SR. Οι διαφορές που εμφανίζουν στη ρύθμισή τους οι RyR1 και RyR2 από τους εν λόγω παράγοντες, πιθανόν να συνδέεται με τα διαφορετικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι δύο ισομορφές κατά το μηχανισμό της σύζευξης διέγερσης-συστολής. Τα  $Ca^{2+}$  ρυθμίζουν τους RyR είτε μέσω

άμεσης σύνδεσης είτε έμμεσα μέσω της CaM και CaMKII. Συγκεκριμένα, ο RyR1 ενεργοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  (~ 1μM) και αναστέλλεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (~ 1mM) (Meissner, 1994; Meissner *et al.*, 1997). Τα  $Ca^{2+}$  από το SR επίσης φαίνεται να διεγείρουν την έκλυση  $Ca^{2+}$  στο σκελετικό και τον καρδιακό μυ.

Τα  $Mg^{2+}$  φαίνεται να αναστέλλουν τους RyRs με δύο μηχανισμούς. Είτε μειώνοντας την ανοικτή πιθανότητα των RyR συναγωνιζόμενα με τις υψηλής συγγένειας θέσεις σύνδεσης των  $Ca^{2+}$ , είτε με το να συνδέονται σε χαμηλότερης συγγένειας θέσεις σύνδεσης  $Ca^{2+}$  που με τη σειρά τους περιορίζουν την αναστολή των RyR από τα  $Ca^{2+}$  (Laver, Baynes and Dulhunty, 1997). Αξίζει να σημειωθεί η διαφορά στο βαθμό αναστολής του  $Mg^{2+}$  μεταξύ των διαφόρων ισομορφών RyR. Οι RyR2 και RyR3 ενεργοποιούνται από τα  $Ca^{2+}$  σε μεγαλύτερο βαθμό από τον RyR1 και απαιτούν υψηλότερες συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  για αναστολή. Με το τρόπο αυτό, σε αυξημένες κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$ , τα  $Mg^{2+}$  παρεμποδίζουν τον RyR1 και σε λιγότερο βαθμό τους RyR2 και RyR3 (Lamb, 2000).

Η ATP ενεργοποιεί όλους τους υποδοχείς. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι ο RyR1 μπορεί να ενεργοποιηθεί από την ATP απουσία  $Ca^{2+}$ , αλλά για την μέγιστη ενεργοποίηση θα πρέπει να υπάρχει  $Ca^{2+}$ , ενώ ο RyR2 απαιτεί την παρουσία  $Ca^{2+}$  για να ενεργοποιηθεί από την ATP. Στα περισσότερα κύτταρα η ATP βρίσκεται συνδεδεμένη με τα  $Mg^{2+}$ . Οπότε είναι πιθανό κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το σύμπλεγμα Mg-ATP και όχι η ελεύθερη ATP να ρυθμίζει την έκλυση  $Ca^{2+}$ .

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί θα αναλυθεί εκτενέστερα το πρωτεϊνικό μόριο της καλμοδουλίνης (CaM), που είναι και το κύριο αντικείμενο μελέτης σε αυτή την διατριβή.

## Κεφάλαιο 3. Καλμοδουλίνη (CaM)

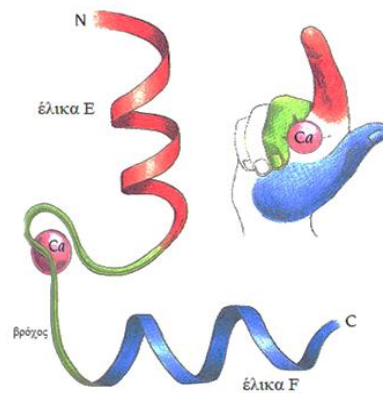
### 3.1. Γενικά στοιχεία

Η CaM είναι μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες-αισθητήρες του ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium sensing protein), που απαντάται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα των ανώτερων οργανισμών και διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση βασικών βιολογικών λειτουργιών όπως η γονιμοποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μυϊκή σύσπαση, η κυτταρική απόπτωση κ.α. (Hoeflich and Ikura, 2002). Πρόκειται για μία υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη, καθώς η αμινοξική της αλληλουχία δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά στη πορεία της εξέλιξης. Παρά το μικρό μοριακό της μέγεθος (~17 kDa), η καλμοδουλίνη παίζει κομβικό ρόλο σε πάρα πολλά βιοχημικά μονοπάτια και η σπουδαιότητά της υπογραμμίζεται από το γεγονός πως κωδικοποιείται από τρία διαφορετικά, μη αλληλόμορφα γονίδια (*CALM1*, *CALM2*, *CALM3*), που βρίσκονται σε τρία διαφορετικά χρωμοσώματα (14q24-q31, 2p21.1-p21.3, 19q13.2-q13.3) (Berchtold *et al.*, 1993). Και τα τρία αυτά γονίδια δίνουν την ίδια πανομοιότυπη πρωτεΐνη, με σειρά επιπέδου έκφρασης *CALM3* > *CALM2* > *CALM1* (Crotti *et al.*, 2013).

### 3.2. Δομή και λειτουργία της CaM

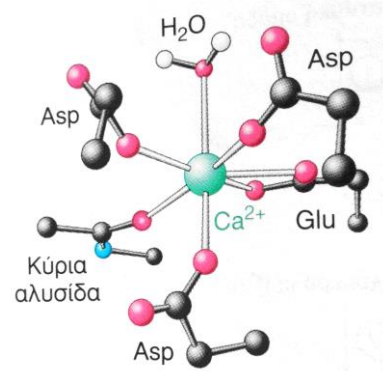
Η CaM αποτελείται από 148 αμινοξικά κατάλοιπα και ανήκει στην οικογένεια των EF-hand πρωτεϊνών καθώς διαθέτει τέσσερα δομικά μοτίβα EF-hand.

Το δομικό αυτό μοτίβο, αποτελεί μοτίβο δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$  και πρώτη φορά περιγράφηκε από τον Robert Kretsinger το 1973, με τον προσδιορισμό της δομής της παρβαλβουμίνης. Η ονομασία των ελίκων E και F έχει προκύψει από την αρίθμηση που δόθηκε στην πέμπτη και έκτη έλικα του N-τελικού άκρου της παρβαλβουμίνης όπου και εντοπίζεται το συγκεκριμένο μοτίβο, και έκτοτε έχει καθιερωθεί στην βιβλιογραφία με αυτή την ονομασία (Branden and Tooze, 1999). Κάθε EF-hand μοτίβο απαρτίζεται από μία N-τελική  $\alpha$ -έλικα, έναν εύκαμπτο βρόγχο σύνδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$



**Εικόνα 15:** EF-hand δομικό μοτίβο σε τρισδιάστατη αναπαράσταση

και μία C-τελική  $\alpha$ -έλικα (Εικόνα 15) (Chin and Means, 2000). Ο βρόγχος αποτελείται από 12 αμινοξικά κατάλοιπα, εκ των οποίων τα πέντε είναι κατάλοιπα πρόσδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$ . Οι πλευρικές αλυσίδες αυτών των καταλοίπων θα πρέπει να περιέχουν ένα τουλάχιστον άτομο οξυγόνου (συνήθως καρβοξυλικές ομάδες), με το ασπαρτικό οξύ (Asp) και το γλουταμικό οξύ (Glu) να εμφανίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα. Το αμέσως επόμενο κατάλοιπο (έκτο) θα πρέπει να είναι η γλυκίνη (Gly), διότι η πλευρική αλυσίδα οποιουδήποτε άλλου καταλοίπου θα παρεμπόδιζε τη δομή του μοτίβου (μικρό μέγεθος, ικανότητα σχηματισμού απότομων στροφών στη πρωτεϊνική αλυσίδα). Παράλληλα, ένας αριθμός πλευρικών ομάδων δημιουργούν έναν υδρόφοβο πυρήνα μεταξύ των δύο  $\alpha$ -ελίκων του μοτίβου, οπότε και αυτές θα πρέπει να εμφανίζουν υδρόφοβο χαρακτήρα. Με το τρόπο αυτό, το  $\text{Ca}^{2+}$  συναρμόζεται συνήθως με επτά άτομα οξυγόνου - έξι άτομα στο δομικό μοτίβο EF-hand από τις πλευρικές και την κύρια αλυσίδα της πρωτεΐνης και ένα άτομο από ένα δεσμευμένο μόριο ύδατος (Εικόνα 16) (Branden and Tooze, 1999).



**Εικόνα 16:** Συναρμογή του  $\text{Ca}^{2+}$  στο βρόγχο του δομικού μοτίβου EF-hand.

Οι πρωτεΐνες-αισθητήρες, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 1, πρέπει να είναι ικανές να ανιχνεύουν αλλαγές και να ανταποκρίνονται σε ένα αυστηρά συγκεκριμένο εύρος συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Η CaM ικανοποιεί τα κριτήρια αυτά, καθώς το εύρος συγγένειάς της για το  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 5 \times 10^{-7} \text{ M}$  έως  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) εμπίπτει στο σύνηθες εύρος της  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $10^{-7} \text{ M}$  έως  $10^{-6} \text{ M}$ ) στο κύτταρο. Επιπρόσθετα, η CaM διαθέτει αυξημένη ευαισθησία στην ανίχνευση των διακυμάνσεων της  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  καθώς τα EF3&4 του C-τελικού λοβού έχουν τρεις με πέντε φορές υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης ( $K_d \sim 1 \mu\text{M}$ ) για το  $\text{Ca}^{2+}$  απ' ό,τι τα EF1&2 του N-τελικού λοβού ( $K_d \sim 10 \mu\text{M}$ ) (Chin and Means, 2000). Το γεγονός ότι οι δύο λοβοί της CaM εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια για το  $\text{Ca}^{2+}$ , επιτρέπει στη CaM να υιοθετήσει ένα μεγάλο εύρος δομικών διαμορφώσεων ανάλογα με το βαθμό πλήρωσης σε  $\text{Ca}^{2+}$ . Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της ικανότητας της, είναι η ρύθμιση των τασιελεγχόμενων καναλιών  $\text{Ca}^{2+}$  τύπου L (LTCCs). Η CaM προσδένεται στο κανάλι και με ταχύτατο ρυθμό εντοπίζει σημαντικές

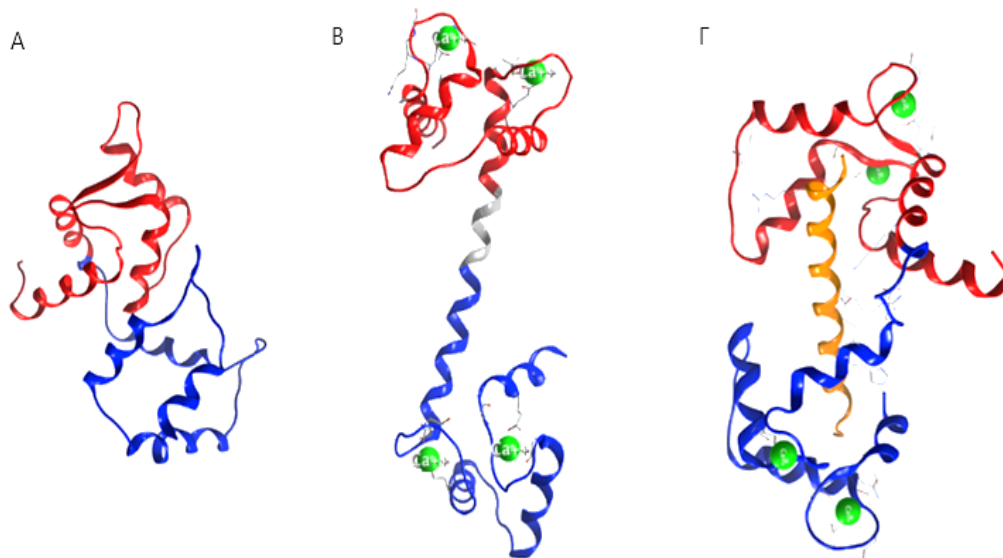
μεταβολές στην συγκέντρωση του  $\text{Ca}^{2+}$  στο μικροπεριβάλλον του C-λοβού, ενώ παράλληλα μπορεί να διακρίνει μεταβολές μικρότερης έντασης ή και μεγαλύτερης διάρκειας στα επίπεδα  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  μέσω του N-λοβού (Sorensen, Søndergaard and Overgaard, 2013).

Η CaM αποκτά δύο διαμορφώσεις ανάλογα με το εάν είναι συνδεδεμένη (**CaCaM**) ή όχι (**apo-CaM**) με το  $\text{Ca}^{2+}$  (Εικόνα 17). Παρουσία περίσσειας ασβεστίου, η κρυσταλλική δομή της CaM αποκαλύπτει μία διαμόρφωση τύπου αλτήρα (dumbbell-like conformation), η οποία απαρτίζεται από δύο σφαιρικούς λοβούς, τον αμινο-τελικό (N-terminal) και τον καρβοξυ-τελικό (C-terminal), οι οποίοι συνδέονται μέσω μίας εύκαμπτης  $\alpha$ -έλικας. Ο N-λοβός διαθέτει τα 1 και 2 EF-hand δομικά μοτίβα (EF1&2) και ο C-λοβός τα 3 και 4 (EF3&4) (Sorensen, Søndergaard and Overgaard, 2013). Απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , ο N-τελικός λοβός της CaM υιοθετεί μία πιο ‘κλειστή’ διαμόρφωση, στην οποία οι έλικες και των δύο EF-hand επιστοιβάζονται μαζί. Αντίθετα, ο C-λοβός της apo-CaM βρίσκεται σε μια ‘ημι-ανοικτή’ διευθέτηση, όπου ένα υδρόφοβο τμήμα του είναι μερικώς εκτεθειμένο στο διαλύτη. Αυτό, ενδεχομένως να επιτρέπει στην CaM να αλληλοεπιδρά με ορισμένες πρωτεΐνες-στόχους στα επίπεδα χαλάρωσης του ελεύθερου ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$  (Swindells and Ikura, 1996).

Όταν, το  $\text{Ca}^{2+}$  δεσμευτεί στην CaM, συναρμόζεται στον εύκαμπτο βρόγχο του κάθε EF-hand δομικού μοτίβου μέσω των επτά οξυγόνων των κυρίως αμινοξικών καρβοξυλίων. Η δέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$  οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη διευθέτηση των ελίκων των EF-hands, και των δύο λοβών, οπότε το μόριο της CaM αποκτά μια πιο ανοικτή διαμόρφωση. Αυτές οι αναπροσαρμογές στη δομή της CaM, έχουν ως αποτέλεσμα τη συντονισμένη έκθεση των υδρόφοβων τμημάτων των λοβών, διευκολύνοντας έτσι τη σύνδεση της CaCaM στις κατάλληλες υδροφοβικές αλληλουχίες που υπάρχουν στις πρωτεΐνες-στόχους. Τα υδρόφοβα αυτά τμήματα, περιέχουν σε ένα μεγάλο ποσοστό εύκαμπτα κατάλοιπα πλούσια σε μεθιονίνη, που σε συνδυασμό με την εύκαμπτη και υψηλά δυναμική φύση της  $\alpha$ -έλικας που συνδέει τους δύο λοβούς της CaM, επιτρέπει την αλληλεπίδραση με πολλαπλές και διαφορετικής φύσης πρωτεΐνες και αλληλουχίες. Τα κλασσικά μοτίβα στα οποία συνδέεται η CaCaM έχουν μήκος περίπου 20 αμινοξικών καταλοίπων με υψηλή πυκνότητα θετικά φορτισμένων αμινοξέων και παράλληλα

περιλαμβάνουν μεγάλα υδρόφοβα κατάλοιπα τοποθετημένα σε μεταβλητές αποστάσεις. Η CaM συνήθως τυλίγεται γύρω από αυτό το ελικοειδές μοτίβο με τους δύο λοβούς να προσδένονται στα υδρόφοβα αυτά κατάλοιπα. Η πρόσδεση μπορεί να γίνει τόσο με παράλληλη (N-λοβός της CaCaM με N-τελικό άκρο του μοτίβου-πεπτιδίου) όσο και με αντιπαράλληλη διευθέτηση. Η τελική διευθέτηση εξαρτάται πιθανώς από την πυκνότητα θετικού φορτίου του κάθε μοτίβου σύνδεσης, με τον C-λοβό της CaCaM να εμφανίζει υψηλότερη συχνότητα σύνδεσης με το πιο θετικά φορτισμένο άκρο. Άλλο ένα μοτίβο πρόσδεσης της CaM είναι το IQ (IQXXXRGXXXR), το οποίο αρχικώς θεωρήθηκε ότι αποτελεί το κύριο μοτίβο πρόσδεσης για την apo-CaM. Τα μοτίβα αυτά είναι εξαιρετικά υδρόφοβα και έχουν βασικό χαρακτήρα. Ωστόσο, είναι πλέον γνωστό ότι η CaM αλληλοεπιδρά με πολλαπλούς στόχους που διαθέτουν ακολουθίες με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και που πολλές φορές δεν μπορούν να οργανωθούν σε συγκεκριμένα μοτίβα πρόσδεσης (Sorensen, Søndergaard and Overgaard, 2013). Το μεγάλο αυτό εύρος των διαμορφώσεων που μπορεί να αποκτήσει η CaM ανάλογα με το βαθμό πλήρωσής της με  $Ca^{2+}$ , της επιτρέπει να αλληλοεπιδρά επιλεκτικά με πάνω από 300 πρωτεϊνικούς στόχους. Από την ολική ενδοκυτταρική συγκέντρωση της CaM (~6  $\mu M$ ), το 99% είναι συνδεδεμένο σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και έτσι η συγκέντρωση της ελεύθερης CaM στο κύτταρο κυμαίνεται στα επίπεδα των 50-100 nM (Guo *et al.*, 2011).

Αξίζει να σημειωθεί πως η έκθεση των υδρόφοβων τμημάτων της CaM στο διαλύτη είναι αποτέλεσμα των αλλοστερικών τροποποιήσεων που συνοδεύουν τη σύνδεση  $Ca^{2+}$ , μια μετάβαση κατά την οποία εμφανίζεται σημαντική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs της πρωτεΐνης. Η ικανότητα της μετατροπής της δέσμευσης  $Ca^{2+}$  σε βιοχημική ενέργεια είναι και το χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αισθητήρων  $Ca^{2+}$ , όπως η CaM, και αποτελεί την ενεργειακή βάση στην ικανότητα τους να μετάγουν τα σήματα  $Ca^{2+}$  στο εσωτερικό του κυττάρου (Chin and Means, 2000).



**Εικόνα 17:** Στερεοδιατάξεις της CaM. A) apo-CaM (PDB: 1QX5) B) CaCaM (PDB: 1CLL) Γ) Συμπλοκοποιημένη CaM με πεπτίδιο (πορτοκαλί) (PDB: 2BCX). Ο N-λοβός της CaM είναι με κόκκινο χρώμα, ο C-λοβός με μπλε και το δεσμευμένο  $Ca^{2+}$  με πράσινο.

### 3.3.Η CaM ως ρυθμιστής των RyRs.

#### 3.3.1.Γενικά στοιχεία

Η CaM είναι βασικός ρυθμιστής των RyRs, έχοντας καθοριστικό ρόλο στην απελευθέρωση των  $Ca^{2+}$  από το SR/ER κατά το μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής. Η ρύθμιση από την CaM μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με άμεση αλληλεπίδραση με τους RyRs, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας την CaMKII (CaM-dependent kinase II) που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τους υποδοχείς. Η CaM αλληλοεπιδρά άμεσα με τους RyRs με στοιχειομετρία 4:1 (4 μόρια CaM / 1 τετραμερές RyR) (Huang *et al.*, 2013) και μπορεί να συνδεθεί με υψηλή συγγένεια ( $K_d$  στην κλίμακα των nM) και στις τρεις ισομορφές RyRs τόσο στην apo-CaM όσο και στην CaCaM διαμόρφωση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  (~100 nM, συνθήκες ενδοκυτταρικής χαλάρωσης), η CaM κυρίως υπάρχει στην apo-CaM διαμόρφωση και ενεργοποιεί τους RyR1 και RyR3, ενώ στον RyR2 συνήθως έχει είτε μικρή ανασταλτική δράση είτε δεν επιφέρει κάποια αλλαγή (Fruen *et al.*, 2000). Σε υψηλές συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  (~1  $\mu$ M), η CaM υιοθετεί την CaCaM διαμόρφωση και αναστέλλει και τις τρεις ισομορφές των RyRs (Balshaw *et al.*, 2001).

Η διαφορετική επίδραση της CaM στη ρύθμιση των RyR1 και RyR2 πιθανώς να σχετίζεται με τις διαφορές που εμφανίζουν οι δύο ισομορφές στο μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής. Βασική διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε αυτό το μηχανισμό είναι η απελευθέρωση των  $Ca^{2+}$  από το SR, μέσω της ενεργοποίησης των RyRs. Όπως έχει αναφερθεί και στο κεφάλαιο 1, η απελευθέρωση των  $Ca^{2+}$  από το SR, συμβαίνει ως αποτέλεσμα της αύξησης της τοπικής  $[Ca^{2+}]_i$  όταν υπάρξει εισροή  $Ca^{2+}$  στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω των διαύλων ασβεστίου (LTCCs ή DHPR) στη μεμβράνη των t-σωληνίσκων, κατά την εκπόλωση του σαρκειλήματος. Όσο η  $[Ca^{2+}]_i$  αυξάνει, ακολουθεί περαιτέρω έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR (διαδικασία CICR). Στο σκελετικό μυ, η ενεργοποίηση του RyR1 πραγματοποιείται κυρίως μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής του με τους διαύλους ασβεστίου με σχετικά γρήγορη απόκριση (2 ms) (Protasi, 2002). Αντιθέτως, η ενεργοποίηση του RyR2 στον καρδιακό μυ γίνεται με σχετικά πιο αργό ρυθμό, καθώς οφείλεται στα  $Ca^{2+}$  που εισέρχονται από το εξωτερικό των κυττάρων (μέσω των διαύλων) και όχι στην αλληλεπίδραση RyR2 - LTCCs/DHPR (Sham, Cleemann and Morad, 1995).

### 3.3.2. Η CaM ως ρυθμιστής του RyR2

Ο μοριακός μηχανισμός της αλληλεπίδρασης CaM-RyR2 δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός, ωστόσο πληθώρα μελετών έχουν παρουσιάσει πως η πλήρης ανασταλτική δράση της CaM απαιτεί τον κορεσμό σε  $Ca^{2+}$  και των δύο λοβών της πρωτεΐνης (Yamaguchi *et al.*, 2003; Xu and Meissner., 2004; Søndergaard *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014).

Λόγω της  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενης δράσης της CaM στη ρύθμιση του RyR2, μελέτες έχουν συσχετίσει τη λειτουργία της με το μηχανισμό τερματισμού της απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  από το SR. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει πως η μείωση του  $Ca^{2+}$  στο εσωτερικό του SR, ως αποτέλεσμα της απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$ , ελέγχει τον τερματισμό της CICR διαδικασίας και κατέχει σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση του RyR2 και τελικά οδηγεί στον τερματισμό της απελευθέρωσης (Lukyanenko, Wiesner and Györke, 1998; Zima *et al.*, 2008; Niggli, 2009). Έχει μάλιστα προσδιοριστεί πως όταν η συγκέντρωση των  $Ca^{2+}$  στο εσωτερικό του SR μειωθεί μέχρις ενός συγκεκριμένου κατωτάτου ορίου (όριο τερματισμού), τότε η έκλυση των  $Ca^{2+}$  από το SR σταματά. Αυτή



η κατώτατη συγκέντρωση διαπιστώθηκε πως είναι ανεξάρτητη της αρχικής συγκέντρωσης του περιεχομένου  $Ca^{2+}$  του SR και ανεξάρτητη του μεγέθους της εκροής των  $Ca^{2+}$  από το SR (Zima *et al.*, 2008).

Μελέτη του 2013 (Tian *et al.*, 2013) έχει παρουσιάσει πως η CaM αγρίου τύπου αυξάνει το όριο τερματισμού (διευκολύνοντας – επιταχύνοντας τον τερματισμό). Αντίθετα, μεταλλάξεις στο μόριο της CaM, που σχετίζονται με μειωμένη δέσμευση των  $Ca^{2+}$  και στους δύο λοβούς μαζί ή μόνο στον C-λοβό, μειώνουν το όριο τερματισμού, οδηγώντας σε καθυστερημένο τερματισμό της έκλυσης  $Ca^{2+}$ . Παράλληλα, η εξάλειψη της κύριας περιοχής πρόσδεσης της CaM στον RyR2 (αα 3583-3603) ή σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή που αποτρέπουν την πρόσδεση της CaM, φαίνεται να μειώνουν το όριο τερματισμού χωρίς να έχουν όμως κάποιο αντίκτυπο στο όριο ενεργοποίησης. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις στον υποδοχέα που επηρεάζουν την ανασταλτική δράση της CaM αλλά όχι την πρόσδεσή της σε αυτόν, επίσης μειώνουν το όριο τερματισμού και προσδιορίζουν έτσι έναν πιθανό ρόλο της περιοχής πρόσδεσης στον τερματισμό της απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  (Tian *et al.*, 2013). Συμπερασματικά, η CaM διευκολύνει τον τερματισμό της έκλυσης  $Ca^{2+}$  από το SR, αυξάνοντας το όριο τερματισμού και η δράση της αυτή εξαρτάται κυρίως από τη δέσμευση του  $Ca^{2+}$  στο C-λοβό.

Επομένως, τα δύο βασικά σημεία γύρω από τα οποία εστιάζουν οι μελέτες για τον προσδιορισμό του λεπτομερούς μηχανισμού ρύθμισης του RyR2 από την CaM, είναι η δέσμευση των  $Ca^{2+}$  στην CaM και οι θέσεις πρόσδεσης της CaM (CaMBDs, Calmodulin Binding Domains) στον RyR2.

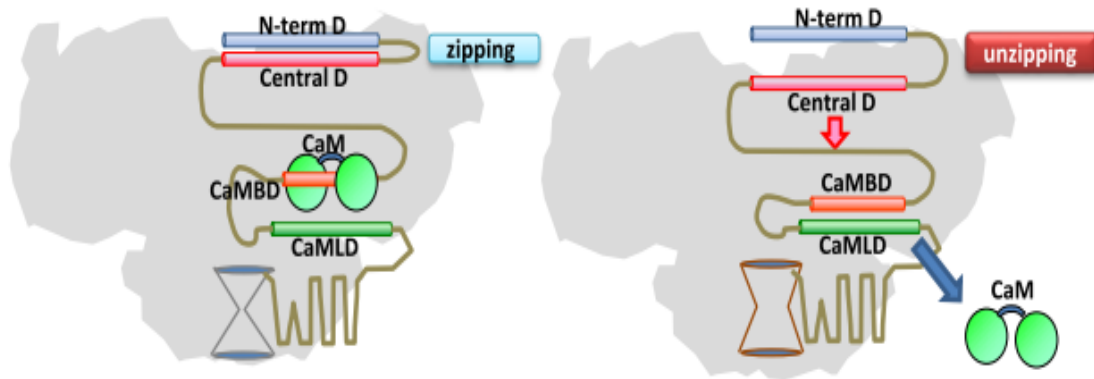
### **3.3.3.Θεωρητικό μοντέλο μοριακού μηχανισμού ρύθμισης RyR2.**

Στο δεύτερο κεφάλαιο, έγινε αναφορά στις δομικές μεταβολές που υφίσταται το κανάλι RyR κατά τη μετάβασή του από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση. Σε αυτή την υποενότητα γίνεται αναφορά στο επικρατέστερο θεωρητικό μοντέλο που συνδέει τις αλλοστερικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη λειτουργία του RyR2 με το ρόλο που πιθανώς διαδραματίζουν οι CaMBDs και η ίδια η CaM σε αυτό. Το θεωρητικό αυτό μοντέλο για τον RyR2 προέκυψε με βάση τα πειραματικά δεδομένα που έχουν συγκεντρωθεί για τον RyR1 και τη σημαντική τους ομοιότητα.

Μία μελέτη στον υποδοχέα RyR1 το 2002, υπέδειξε πως η ισχυρή αλληλεπίδραση του N- τελικού τμήματος με το κεντρικό τμήμα του υποδοχέα (zipping) σταθεροποιεί το κανάλι στην κλειστή του διαμόρφωση, ενώ η απομάκρυνση των εν λόγω τμημάτων (unzipping) οδηγεί στο άνοιγμα του καναλιού (domain switch hypothesis) (Ikemoto & Yamamoto, 2002). Στην πορεία, διαμορφώθηκε μια θεωρητική πρόβλεψη για τον RyR1 που υποστηρίζει πως απουσία της CaM λαμβάνει χώρα μια  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη ενδομοριακή αλληλεπίδραση του ζεύγους των περιοχών CaMBD (αα 3614-3643) και CaMLD (CaMLD, Calmodulin Like Domain) (αα 4064-4210). Η αλληλεπίδραση αυτή, σε συνδυασμό με την αλλοστερική μεταβολή που υφίσταται το ζεύγος του N-τελικού τμήματος με το κεντρικό τμήμα του RyR1, οδηγεί στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η παρουσία της CaM εμποδίζει την αλληλεπίδραση CaMBD-CaMLD και ανταγωνίζεται την CaMLD στην πρόσδεση στην CaMBD, αναστέλλοντας τη λειτουργία του καναλιού (Gangopadhyay and Ikemoto, 2008). Η περιοχή CaMLD, έχει αποδειχθεί πως διαθέτει δύο δομικά μοτίβα EF hand και το CD φάσμα της αλληλουχίας αυτής έχει βρεθεί πως ομοιάζει με αυτό της CaM. Ωστόσο, κατά τη δέσμευση των  $Ca^{2+}$ , η α-έλικα της CaMLD εμφανίζει λιγότερο σημαντικές τροποποιήσεις σε σχέση με αυτές που υφίσταται η CaM, γεγονός που υποδεικνύει πως οι δομικές αλλαγές της CaMLD είναι μικρότερης έκτασης. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι στον RyR1, η CaMLD προσδένεται στους διαύλους ασβεστίου τύπου L και σε πεπτιδικές αλληλουχίες που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για την CaM (Xiong *et al.*, 2006).

Κατ' αναλογία με το καθιερωμένο μοντέλο ρύθμισης/λειτουργίας του υποδοχέα RYR1, το 2018 προτάθηκε ένα αντίστοιχο μοντέλο για τον υποδοχέα RyR2. Σύμφωνα με αυτό, οι συντονισμένες αλληλεπιδράσεις της απομάκρυνσης (unzipping) του ζεύγους N-τελικού άκρου-κεντρικού τμήματος με την προσέγγιση (zipping) του ζεύγους CaMLD (αα 4026-4172) - CaMBD (αα 3553-3603) στον RyR2 φαίνεται να ενεργοποιούν τον υποδοχέα. Στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε ότι μια μετάλλαξη στην περιοχή CaMLD του RyR2 που σχετίζεται με το σύνδρομο CPVT, συνοδεύεται από ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ CaMLD και CaMBD και παρεμπόδιση της πρόσδεσης της CaM στην CaMBD. Με το τρόπο αυτό, προκαλείται ακανόνιστη έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR του καρδιομυοκυττάρου, φαινόμενο το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε θνησιγενή αρρυθμία. Οι διαπιστώσεις αυτές ενισχύουν την άποψη ότι η σωστή πρόσδεση της CaM στον RyR2 είναι υψίστης σημασίας

και πιθανώς λειτουργεί ως ένας φυσικός μοριακός σταθεροποιητής του υποδοχέα. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται συνοπτικά το παραπάνω θεωρητικό μοντέλο (Nishimura *et al.*, 2018).



**Εικόνα 18 :** Θεωρητικό μοντέλο ρύθμισης RyR2. Αριστερά παρουσιάζεται πως η ισχυρή αλληλεπίδραση του ζεύγους N-τελικού τμήματος – κεντρικού τμήματος προκαλεί αλλοστερική απομάκρυνση στο ζεύγος CaMLD - CaMBD, επιτρέποντας στην CaM να προσδεθεί όπως προβλέπεται στην CaMBD με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο υποδοχέας. Δεξιά, παρουσιάζεται η αντίστροφη διαδικασία που οδηγεί στην παρεμπόδιση του καναλιού λόγω της μη σωστής πρόσδεσης της CaM στον υποδοχέα (Nishimura *et al.*, 2018).

Η καλύτερη κατανόηση του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης του RyR2 απαιτεί τη διεξοδική μελέτη όλων των επιμέρους σταδίων της διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένου της δέσμευσης του  $Ca^{2+}$  στην CaM, των δομικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα κατά την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του RyR2 και το ρόλο που διαδραματίζει η CaM σε αυτές.

### 3.4.Περιοχές πρόσδεσης της CaM στους RyR1-2

Εκτεταμένη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί γύρω από τις πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM (CaMBDs) στους RyRs. Οι πρώτες μελέτες ήρθαν με τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής των RyRs, μέσω της κλωνοποίησης του cDNA που κωδικοποιεί τον RyR1 (Takeshima *et al.*, 1989) και τον RyR2 (Otsu *et al.*, 1990). Το γεγονός πως οι περιοχές πρόσδεσης της CaM στις διάφορες πρωτεΐνες φέρουν (συνήθως) το μοτίβο αμφιπαθούς α-έλικας με δύο θετικά φορτισμένες δέσμες που τις διαχωρίζει μια υδρόφοβη περιοχή (Harris, Croall and Morrow, 1988) σε συνδυασμό με τις παραπάνω μελέτες, κατέληξε στον προσδιορισμό διαφόρων πιθανών CaMBDs στην αμινοξική

ακολουθία των RyRs. Οι πιθανές CaMBDs που προέκυψαν, σε αυτό το στάδιο, για τους RyR1 και RyR2 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 4:** Πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR1 και RyR2 βάσει της ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής

RyR1	3614-3637	(Takeshima et al. 1989)
	4295-4325	
	2807-2840	(Zorzato et al., 1990)
	2909-2930	
	3031-3049	
	2641-2657	(A. R. Marks, Fleischer, & Tempst., 1990)
	3362-3374	
	3947-3965	
	4309-4322	
	1383-1400	(Brandt et al., 1992)
1974-1996		
3358-3374		
RyR2	3581-3604	(Nakai et al., 1990)
	4257-4285	
	2775-2807	(Otsu et al., 1990)
	2877-2898	
	2998-3016	

Με βάση τα δεδομένα των παραπάνω πρωταρχικών μελετών, ακολούθησαν βιοχημικές/βιοφυσικές μελέτες, στις οποίες μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της CaM με συντετηγμένες πρωτεΐνες ή συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούσαν σε πιθανές CaMBDs στους RyR1 και RyR2, ώστε να γίνει ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης (Lau, Chan and Van Petegem, 2014). Σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της CaM στις CaMBDs είχε η παρουσία των  $Ca^{2+}$ , παρόλο που ορισμένες περιοχές αλληλοεπιδρούσαν τόσο παρουσία, όσο και απουσία  $Ca^{2+}$ . Οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα πεπτίδια των RyR1 και RyR2 (CaMBDs) που εμφάνισαν, είτε ισχυρή είτε ασθενή, συγγένεια σύνδεσης με την CaM παρουσιάζονται παρακάτω (πίνακας 5) (Huang *et al.*, 2013).

**Πίνακας 5:** Πιθανές περιοχές πρόσδεσης (CaMBDs) στους RyR1 και RyR2 που προέκυψαν από τις μελέτες αλληλεπίδρασης συνθετικών πεπτιδίων των RyR1 και RyR2 με την CaM. Με μωβ χρώμα φαίνονται οι περιοχές που αντιστοιχούν στα πεπτίδια ή τις συντετηγμένες πρωτεΐνες των RyRs που εμφάνισαν ισχυρή συγγένεια σύνδεσης με την CaM, ενώ με μαύρο χρώμα αυτές που εμφάνισαν ασθενή σύνδεση.

<b>Πιθανές CaMBDs</b>			
<b>RyR1</b>		<b>RyR2</b>	
<b>921–1173</b> <b>2063–2091</b> <b>2804–2930</b> <b>2961–3084</b> <b>3611–3642</b> <b>4303–4328</b>	Chen and MacLennan, 1994	<b>263–614</b> <b>2724–3016</b> <b>3298–3961</b> <b>4548–4748</b>	Balshaw et al., 2001
<b>1975–1999</b>	Zhang et al., 2003	<b>3583–3603</b>	Yamaguchi et al., 2003
<b>2937–3225</b> <b>3546–3655</b> <b>4425–4621</b>	Menegazzi et al., 1994	<b>3007–3023</b> <b>3583–3603</b> <b>4480–4497</b>	Guerrini et al., 1995
<b>3042– 3057</b> <b>3617–3634</b> <b>4540–4557</b>	Guerrini et al., 1995		
<b>3225–3662</b> <b>4302– 4430</b>	Balshaw et al., 2001		
<b>3614–3643</b>	Rodney et al., 2001; Xiong et al., 2002; Zhu et al., 2004		

Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός πως οι παραπάνω αλληλουχίες αφορούν τμήματα του υποδοχέα και προφανώς όχι την ακέραια δομή του τετραμερούς. Αυτό συνεπάγεται ότι οι *in vitro* μελέτες των αλληλεπιδράσεων των πιθανών CaMBDs με την CaM, ίσως να μην είναι αντιπροσωπευτικές των πραγματικών συνθηκών κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνται οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις. Στην τεταρτοταγή δομή του υποδοχέα, κάποιες από τις αλληλουχίες αυτές είναι πιθανό να βρίσκονται “θαμμένες” στο εσωτερικό του και συνεπώς μη προσβάσιμες στην CaM, η οποία συνδέεται στην επιφάνεια του RyR. Με βάση τη διαπίστωση αυτή, δε συνεπάγεται απαραίτητα ότι τα παραπάνω δεδομένα των θετικών αλληλεπιδράσεων ανταποκρίνονται με ακρίβεια στο τι πραγματικά συμβαίνει ενδοκυτταρικά με τα βιομόρια στις λειτουργικές τους διαμορφώσεις. Ήδη, διάφορες Cryo-EM μελέτες των τελευταίων ετών έχουν τελικά αποκλείσει ορισμένες από

τις παραπάνω αλληλουχίες ως μη συμβατές με τις νεότερες δομικές αναλύσεις. Συνεπώς, έως και σήμερα, τέσσερις αλληλουχίες έχουν επικρατήσει ως πιθανές CaMBDs και αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 6 (Lau, Chan and Van Petegem, 2014;Brohus *et al.*, 2019;Søndergaard *et al.*, 2019)

**Πίνακας 6:** Επικρατέστερες CaMBDs των RyR1 και RyR2

	<b>RyR1</b>	<b>RyR2</b>
<b>CaMBD1a</b>	1976–1998	1940-1966
<b>CaMBD1b</b>	2055-2088	2022-2052
<b>CaMBD2</b>	<b>3614-3643</b>	<b>3583-3603</b>
<b>CaMBD3</b>	4295-4325	4246-4276

Από τις παραπάνω επικρατέστερες CaMBDs μόνο η περιοχή CaMBD2 έχει χαρακτηριστεί ως κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM , τόσο στον RyR1 όσο και στον RyR2, και έχει αποδειχθεί ο λειτουργικός της ρόλος στην αλληλεπίδραση RyR-CaM (Fruen *et al.*, 2003;Yamaguchi *et al.*, 2003;Tian *et al.*, 2013;Yang *et al.*, 2014;Søndergaard *et al.*, 2015;Gong *et al.*, 2019). Αυτό φυσικά δεν αποκλείει την πιθανότητα και οι υπόλοιπες να έχουν σημαντικό ρόλο στην εν λόγω αλληλεπίδραση, όπως θα αναφερθεί στην πορεία, καθώς επίσης υπάρχει πιθανότητα να υπάρχουν και άλλες περιοχές που ακόμη δεν έχουν προσδιοριστεί. Η περιοχή CaMBD2, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19, είναι υψηλά συντηρημένη και στις τρεις ισομορφές του RyR και στην επόμενη υποενότητα θα αναφερθούν περισσότερες λεπτομέρειες για το ρόλο της στην αλληλεπίδραση της CaM με τον RyR2.

CaMBD1a

```

RyR1  RSRYGLLIKAFSMTAAETARRTREF 1998
RyR2  RFRYNEVMQALNMSAALTARKTKEF 1965
RyR3  KFRYNELMQALNMSAALTARKTKEF 1866

```

CaMBD1b

```

RyR1  ETTLGSRLMSLLEKVRLLVKKKKEEKPEEEERSAEE 2088
RyR2  DLTIRGRLLSLVEKVTYLKKKQAEKPVES--SDS 2052
RyR3  DTSWTGKLCALVYKIKGPPKPEKEQPTES--EEE 1950

```

CaMBD2

```

RyR1  KSKKAVVHKLLSKQRRRAVVACFRMTPLYNL 3644
RyR2  RSKKAVVHKLLSKQRRRAVVACFRMAPLYNL 3611
RyR3  RSKKAVVHKLLSKQRRRAVVACFRMAPLYNL 3499

```

CaMBD3

```

RyR1  ARVVAAAGRALRGLSYRSLRRRVRRRLRRLTA 4325
RyR2  FALRYNILTLMRMLSLKSLKKQMKKVKKMTV 4276
RyR3  ASVKRNVDFLKRATLKNLRKQYRNVKKMTA 4177

```

**Εικόνα 19:** Αμινοξική ακολουθία των τεσσάρων πιθανών CaMBDs των RyR1-3 του ανθρώπου. Με γκρι σκιαγράφηση φαίνονται τα συντηρημένα τμήματα των αλληλουχιών των RyRs (Brohus *et al.*, 2019a).

### 3.4.1.Η περιοχή CaMBD2 ως η κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR1 (αα 3614-3643) και στον RyR2 ( αα 3583-3603).

Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 19, η αλληλουχίες CaMBD2 που αντιστοιχούν στους RyR1 και RyR2, εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλή αμινοξική ομολογία με τις μόνες διαφορές να εντοπίζονται σε τρία αμινοξικά κατάλοιπα (K3614/R3581, R3629/K3596, T3639/A3606). Το γεγονός αυτό, ενισχύει την πιθανότητα αυτές οι αλληλουχίες να αποτελούν τη βασική CaMBD στους δύο υποδοχείς και παράλληλα δίνεται κατ' αυτόν τον τρόπο και η δυνατότητα συσχέτισης των συμπερασμάτων που προκύπτουν από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της CaM με τον RyR1, με αυτά της αλληλεπίδρασης της CaM με τον RyR2, με σκοπό την καλύτερη δυνατή προσέγγιση του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης RyR-CaM.

Πειράματα έδειξαν πως οι θέσεις πρόσδεσης των apo-CaM και CaCaM στον RyR1 καταστρέφονται μετά από την ήπια πέψη με θρυψίνη μεμβρανών του SR, αλλά η CaM (και στις δύο της διαμορφώσεις), όταν προσδεθεί στον υποδοχέα πριν την πέψη της θρυψίνης, προστατεύει τις θέσεις πρόσδεσης από την πέψη στις θέσεις Arg3630 και Arg3637 του RyR1. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως τόσο η apo-CaM όσο και η CaCaM προσδέονται στον RyR1 στην ίδια ή σε επικαλυπτόμενες περιοχές και μπλοκάρουν την

πρόσδεση της θρυψίνης στις θέσεις 3630 και 3637. Οι δύο αυτές θέσεις βρίσκονται εντός της περιοχής aa 3614-3642, η οποία είχε προηγουμένως προταθεί από διάφορες μελέτες ως πιθανή CaMBD στον RyR1 (Moore *et al.*, 1999). Επιπρόσθετα, μελέτη με χρήση σημειακών μεταλλάξεων (W3620A,L3624D) του RyR1 (πλήρες μόριο) και επισημασμένης CaM ( $[^{35}\text{S}]\text{apo-CaM}/[^{35}\text{S}]\text{CaCaM}$ ) σε κύτταρα, επιβεβαίωσε πως οι δύο ισομορφές προσδένονται σε περιοχές επικαλυπτόμενες στην περιοχή 3614-3643 του RyR1 (Yamaguchi, Xin and Meissner, 2001). Στη συνέχεια, πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από την πρόσδεση της  $[^{35}\text{S}]\text{CaM}$  στο συνθετικό πεπτιδίο aa 3614-3643 του RyR1, τόσο παρουσία και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , έδειξαν πως η CaM προσδένεται σε αυτό και στις δύο διαμορφώσεις της. Επίσης, η ίδια μελέτη προσδιόρισε πως με τη διαγραφή των τελευταίων 9 αμινοξέων του συνθετικού πεπτιδίου (aa 3614-3634), η apo-CaM χάνει την ικανότητα πρόσδεσης σε αυτό, πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει και για την CaCaM. Αυτό το ευρημα οδήγησε στο να προταθεί ένα μοντέλο στο οποίο οι θέσεις πρόσδεσης των apo-CaM/CaCaM είναι επικαλυπτόμενες και ανήκουν στην περιοχή aa 3614-3643, όπου κατά τη δέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$  στην CaM λαμβάνει χώρα μία μετατοπιση προς το N-τελικό άκρο της περιοχής πρόσδεσης και ίσως αυτή η μετατόπιση να συνδέεται με τη διαφορά στη ρύθμιση του υποδοχέα από την CaM (Rodney *et al.*, 2001).

Ταυτόχρονα, πρωταρχικές μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM) και τρισδιάστατες αναπαραστάσεις του RyR1 με τις apo-CaM (Wagenknecht *et al.*, 1997) και CaCaM (Samsó and Wagenknecht, 2002) επιβεβαιώνουν πως οι θέσεις πρόσδεσης των δύο ισομορφών είναι επικαλυπτόμενες και μάλιστα πως τα γεωμετρικά του κέντρα απέχουν  $33\pm 4$  Å. Μεταγενέστερες μελέτες cryo-EM του RyR1 με μεταλλαγμένη μορφή της CaM (CaM<sub>1234</sub>), στην οποία και οι τέσσερις θέσεις δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$  ήταν μη λειτουργικές, έδειξαν πως η μεταλλαγμένη μορφή συνδέεται στην ίδια θέση που προσδένεται η apo-CaM στον RyR1 ανεξάρτητα της  $[\text{Ca}^{2+}]$ , καθώς επίσης και πως η πρόσδεση του  $\text{Ca}^{2+}$  στην CaM είναι αυτή που επιφέρει τις διαμορφωτικές αλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης στον RyR1 και όχι η πρόσδεση του  $\text{Ca}^{2+}$  στον ίδιο τον υποδοχέα (Huang *et al.*, 2012). Πειραματικά αποτελέσματα FRET φθορισμού (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer) προσδιόρισαν μικρότερες αλλαγές σε σχέση με τις διαμορφωτικές αλλαγές (κλίμακας nM) των cryo-EM μελετών κατά την μετάβαση της apo-CaM-RyR1 στην CaCaM-RyR1 μορφή, το οποίο δε σημαίνει πως οι διαμορφωτικές



αλλαγές δεν υπάρχουν αλλά πως ο μηχανισμός της CaM-RyR1 αλληλεπίδρασης είναι αρκετά πολύπλοκος (Cornea *et al.*, 2009).

Μια σειρά από μελέτες πραγματοποιήθηκαν πάνω στην πρόσδεση τόσο ολόκληρου του μορίου της CaM, όσο και του κάθε λοβού της ξεχωριστά, είτε σε ολόκληρο τον RyR1, είτε στο συνθετικό πεπτίδιο aa 3614-3643. Για το πλήρες μόριο του RyR1 βρέθηκε πως ο C-τελικός λοβός μπορεί να συνδεθεί με πολύ μειωμένη συγγένεια αλλά ο N-λοβός με πολύ μικρότερη ή και μηδενική δέσμευση. Ο C-τελικός λοβός της CaM προσδένεται στο πεπτίδιο με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι ολόκληρο το μόριο της CaM τόσο σε nM όσο και σε μM συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$ . Ο N-λοβός φαίνεται να μην προσδένεται στην περιοχή aa 3614-3643 σε nM [ $Ca^{2+}$ ] ενώ προσδένεται με χαμηλή συγγένεια σε υψηλή [ $Ca^{2+}$ ]. Αυτό δείχνει πως και οι δύο λοβοί της CaM είναι απαραίτητοι για υψηλής συγγένειας σύνδεση στον RyR1. Τα δεδομένα αυτά, υποστηρίζουν πως η θέση πρόσδεσης της CaM είναι ασυνεχής στον RyR1 με το C-λοβό να προσδένεται στην περιοχή aa 3614-3643 τόσο παρουσία όσο και απουσία  $Ca^{2+}$  και το N-λοβό πιθανώς σε κάποια άλλη κοντινή περιοχή. Και οι δύο λοβοί απαιτούνται για την μέγιστη λειτουργική ρύθμιση του υποδοχέα, τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ο C-λοβός πιθανώς λειτουργεί ως διακόπτης που εξαρτάται από την δέσμευση  $Ca^{2+}$  σε αυτόν, επιφέρει αλλαγές στη διαμόρφωση τόσο της CaM όσο και της κύριας CaMBD περιοχής του RyR1 και επηρεάζει την αλληλεπίδραση του N-λοβού με μία άλλη θέση πρόσδεσης (Xiong *et al.*, 2002).

Η κρυσταλλική δομή της CaCaM με το συνθετικό πεπτίδιο aa 3614-3643, έδειξε πως η CaCaM προσδένεται αντιπαράλληλα στο πεπτίδιο ( π.χ. N-τελικό άκρο του πεπτιδίου με C-λοβό), με του δύο λοβούς να μην αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται στην κρυσταλλική δομή μεταξύ του N-λοβού της CaCaM και του καταλοίπου Phe3636 δε φαίνεται να είναι σημαντικές για την αναστολή του καναλιού από την CaCaM. Προτείνεται από τη μελέτη (Maximciuc *et al.*, 2006), πως όταν και τα δύο άκρα είναι διαθέσιμα, η CaCaM προσδένεται στην περιοχή aa 3614-3643 του RyR1 με τον ένα λοβό να βρίσκεται 17 κατάλοιπα μακριά από τον άλλο, ενώ όταν το Phe3636 δεν είναι προσβάσιμο, τότε η CaCaM προσδένεται στο Trp3620 μόνο μέσω του C-λοβού της. Ο N-λοβός μπορεί πιθανώς να τοποθετείται αλλού από κάποια άλλη περιοχή –ανταγωνιστή όπως η 4064-4210 του RyR1 που έχει βρεθεί πως προσδένεται στο πεπτίδιο

3614-3643 (Xiong *et al.*, 2006). Αυτό πιθανώς να επιτρέπει στο N-λοβό να προσδεθεί σε μια άλλη μη συνεχή θέση στο κανάλι (Xiong *et al.*, 2002). Προτείνεται ακόμη πως η πρόσδεση των λοβών της CaM σε ασυνεχείς περιοχές του RyR1 συναγωνίζεται την πρόσδεση στο aa 3614-3634 στο Trp3620 και Phe3636 και πως η διαθεσιμότητα αυτών των καταλοίπων λόγω των διαμορφωτικών αλλαγών ή της πρόσδεσης άλλων προσδετών ελέγχει την αναστολή του καναλιού σε υψηλές  $[Ca^{2+}]$  (Maximciuc *et al.*, 2006).

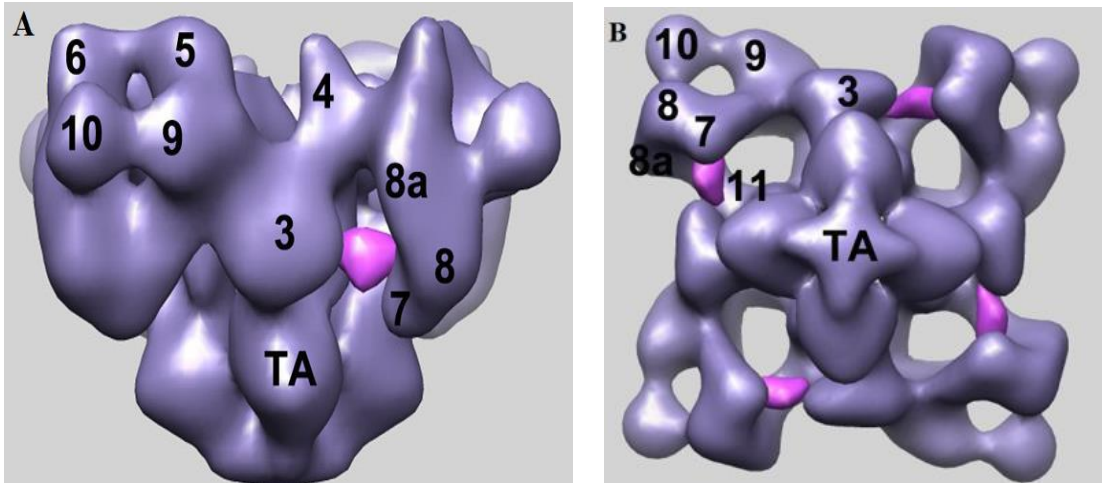
Με αφορμή τη διαφορετική ρύθμιση που εμφανίζει η CaM στους RyR1 και RyR2 αλλά και με βάση την υψηλή αμινοξική ομολογία που εμφανίζει η περιοχή aa 3583-3603 του RyR2 με την κύρια CaMBD (aa 3614-3643) του RyR1, μελετήθηκε για πρώτη φορά το 2003 κατά πόσο αυτή η αλληλουχία αποτελεί την αντίστοιχη κύρια CaMBD στον RyR2.

Πράγματι, πειραματικά δεδομένα πρόσδεσης της  $[^{35}S]CaM$  στον RyR2 αλλά και αποτελέσματα καταγραφής σήματος μονού καναλιού RyR2, επιβεβαίωσαν πως η διαγραφή της aa 3583-3603 οδηγεί τόσο στον αποκλεισμό της πρόσδεσης της CaM στον υποδοχέα, όσο και στην παρεμπόδιση της αναστολής του υποδοχέα από την CaM σε  $[Ca^{2+}]_i$  τόσο κάτω όσο και άνω του 1  $\mu M$ . Επιπρόσθετα, στην ίδια μελέτη η δημιουργία πέντε μονών και διπλών σημειακών μεταλλάξεων στον RyR2 (W3587A,L3591D,F3603A,W3587A/L3591D,L3591D/F3603A) οδήγησε σε αποκλεισμό ή μειωμένη πρόσδεση της  $[^{35}S]CaM$  και αναστολή των λειτουργιών του μονού καναλιού RyR2 ανάλογα με τα επίπεδα  $[Ca^{2+}]_i$ . Κυρίως οι μονές μεταλλάξεις οδήγησαν σε απώλεια ή μειωμένη πρόσδεση της apo-CaM και όχι της CaCaM. Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πειράματα για τον RyR1, φαίνεται πως οι δύο ισομορφές παρουσιάζουν ίδια επιρροή στην πρόσδεση της apo-CaM αλλά διαφορετική στην CaCaM. Οι δύο διπλές μεταλλάξεις εμφανίζουν μειωμένη πρόσδεση τόσο της apo-CaM όσο και της CaCaM. Και οι δύο ισομορφές της CaM αποτυγχάνουν να αναστείλουν τη λειτουργία του RyR2-L3591D/F3603A και RyR2-W3587A/L3591D στα 0.4 $\mu M$ , ενώ στα 2 $\mu M$  η CaM αναστέλλει τον RyR2-W3587A/L3591D αλλά όχι τον RyR2-L3591D/F3603A. Για να προσδιοριστεί σε τι βαθμό επηρεάζουν οι πολύ μικρές αναντιστοιχίες στην αμινοξική ακολουθία των CaMBDs των RyR1-2, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις υποκταστάσεις αμινοξέων (ενός εντός της CaMBD2 και τριών πλευρικών της περιοχής) στον RyR2 με τα αντίστοιχα του RyR1. Τα αποτελέσματα της πρόσδεσης της  $[^{35}S]CaM$  στην μεταλλαγμένη

μορφή RyR2 ήταν όμοια με της αγρίου τύπου μορφής RyR2, καθώς και η αναστολή της ρύθμισης του υποδοχέα παρέμεινε ίδια. Αυτό υποδεικνύει πως οι μικρές διαφορές στην αμινοξική ακολουθία στις κύριες CaMBDs των RyR1-2 δεν είναι υπεύθυνες για τη διαφορετική ρύθμιση των δύο ισομορφών από την CaM και πως πιθανώς η διαφορά να οφείλεται σε παρακείμενες περιοχές που μπορεί να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση CaM-RyR όπου εμφανίζουν διαφορά οι RyR1 και RyR2 (Yamaguchi *et al.*, 2003).

Τουλάχιστον τρεις διαφορετικές *in vivo* μελέτες έχουν προσδιορίσει πως η τριπλή μετάλλαξη W3587A/L3591D/F3603A στην περιοχή aa 3583-3603 του RyR2 οδηγεί στον αποκλεισμό της αναστολής του RyR2 από την CaM τόσο σε συνθήκες διαστολικής (nM) όσο και σε συστολικής (μM)  $[Ca^{2+}]_i$  (Yamaguchi *et al.*, 2013; Arnáiz-Cot *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2013). Ακόμη, η τριπλή αυτή μετάλλαξη, βρέθηκε πως μειώνει το όριο τερματισμού της απελευθέρωσης των  $Ca^{2+}$  από το SR, οδηγώντας σε αύξηση της έκλυσης των  $Ca^{2+}$ . Όμοιο αποτέλεσμα προκύπτει και με τη διαγραφή της περιοχής aa 3583-3603. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι μονές μεταλλάξεις W3587A και L3591D μειώνουν επίσης το όριο τερματισμού όπως και η τριπλή μετάλλαξη αλλά καμία τους δεν επηρεάζει το όριο ενεργοποίησης. Έτσι όλες αυτές οι μεταλλάξεις μειώνουν το όριο τερματισμού ανεξάρτητα από το εάν επηρεάζουν την πρόσδεση της CaM στον RyR2 και αυτό υποδεικνύει πως η περιοχή aa 3583-3603 (CaMBD2) δεν έχει μόνο το ρόλο της περιοχής πρόσδεσης της CaM αλλά επίσης μπορεί και από μόνη της να μεσολαβεί στη δράση της CaM στον τερματισμό της απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  (Tian *et al.*, 2013). Πρόσφατη μελέτη προσδιόρισε επίσης πως η διαγραφή της CaMBD2 του RyR2 σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με χρήση HEK293 κυττάρων, οδήγησε στην πλήρη αναστολή της επίδρασης της CaM στον RyR2 (Søndergaard *et al.*, 2020).

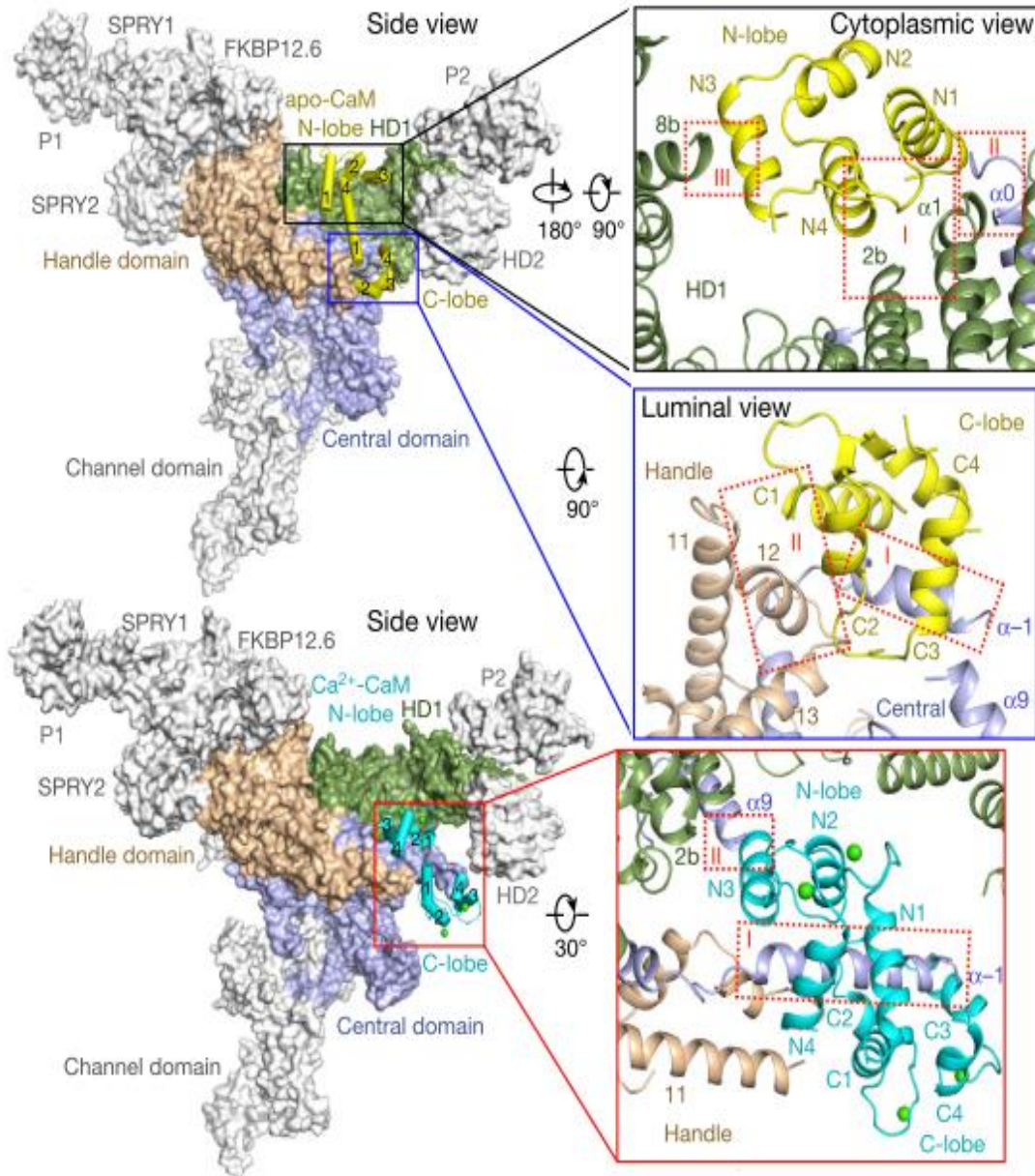
Πρωταρχικές δομικές μελέτες cryo-EM σε συνδυασμό με τεχνικές τρισδιάστατης αναπαράστασης, βασισμένες σε πειράματα προσδιορισμού της θέσης πρόσδεσης της CaM στον RyR2 μέσω της μεθόδου FRET (Guo *et al.*, 2011), εντόπισαν πως η θέση πρόσδεσης της apo-CaM στον υποδοχέα RyR2 εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των τμημάτων 3 και 7 όπως φαίνεται στην Εικόνα 20 (Huang *et al.*, 2012). Αυτή η θέση συμπίπτει με την θέση της CaCaM στον RyR1 και πιθανώς αυτό να σχετίζεται με τη διαφορετική δράση των apo- και CaCaM στους RyR1 και RyR2.



**Εικόνα 20:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της δέσμευσης της apo-CaM στον RyR2. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται η δέσμευση της apo-CaM στον RyR2, μεταξύ των περιοχών 3 και 7 σε κάθε μονομερές του υποδοχέα. (Α) απεικόνιση με πλάγια όψη και (Β) κάτοψη (Huang et al., 2012).

Πρόσφατες cryo-EM μελέτες υψηλότερης διακριτικής ικανότητας, έδωσαν για πρώτη φορά δομές των apo- και CaCaM με τον υποδοχέα RyR2. Η apo-CaM φαίνεται να προσδένεται σε μία επιμήκη σχισμή που διαμορφώνεται μεταξύ των περιοχών ‘λαβής’, του ελικοειδούς τμήματος και της κεντρικής περιοχής. Μάλιστα ο N-λοβός της CaM προσδένεται στο επάνω μέρος της, στο ελικοειδές τμήμα 1 (HD1) και αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα μέσω τριών διεπιφανειών, ενώ ο C-λοβός τοποθετείται στο κάτω μέρος που περιβάλλεται από το ελικοειδές και το κεντρικό τμήμα στο μονομερές του RyR2. Ο C-λοβός σε αυτή τη διαμόρφωση αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα μέσω δύο διεπιφανειών. Η κύρια αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα με την α-έλικα που διαμορφώνουν τα αμινοξικά κατάλοιπα aa 3593-3607 του κεντρικού τμήματος. Η υδρόφοβη κοιλότητα που σχηματίζει ο C-λοβός της apo-CaM περιβάλλει την α-έλικα (aa 3593-3607) του RyR2 (Gong *et al.*, 2019). Αυτή η περιοχή αποτελεί τμήμα της κύριας CaMBD2 και αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες των (Moore *et al.*, 1999) και (Yamaguchi, Xin and Meissner, 2001). Στην ίδια δομική μελέτη, όταν η CaM δεσμεύσει  $Ca^{2+}$ , ο N-λοβός της CaCaM προσδένεται στο κεντρικό τμήμα του RyR2, ενώ ο C-λοβός μετακινείται προς τα κάτω, σχεδόν εκτός της σχισμής και συντονίζεται μόνο από την α έλικα (aa 3583-3607). Αυτή η περιορισμένη επαφή του C-λοβού της CaCaM με τον υποδοχέα πιθανώς να εξηγεί την ελαστικότητά του. Πιο συγκεκριμένα, ο N- και C-λοβός της CaCaM αλληλοεπιδρούν με το C- και N- τελικό άκρο της έλικας aa 3583-3607 αντίστοιχα. Τα Phe 3604 και Trp

3588 συγκρατούν τις υδροφοβικές κοιλότητες που σχηματίζουν ο N- και C- λοβός αντίστοιχα (Εικόνα 21) (Gong *et al.*, 2019). Αξίζει να σημειωθεί πως η δομή της apo CaM με τον υποδοχέα RyR2 ( PDB 6JI8) στα 3.6Å αποτελεί την δομή στην υψηλότερη διακριτική ικανότητα που έχει επιτευχθεί για τον εν λόγω υποδοχέα.



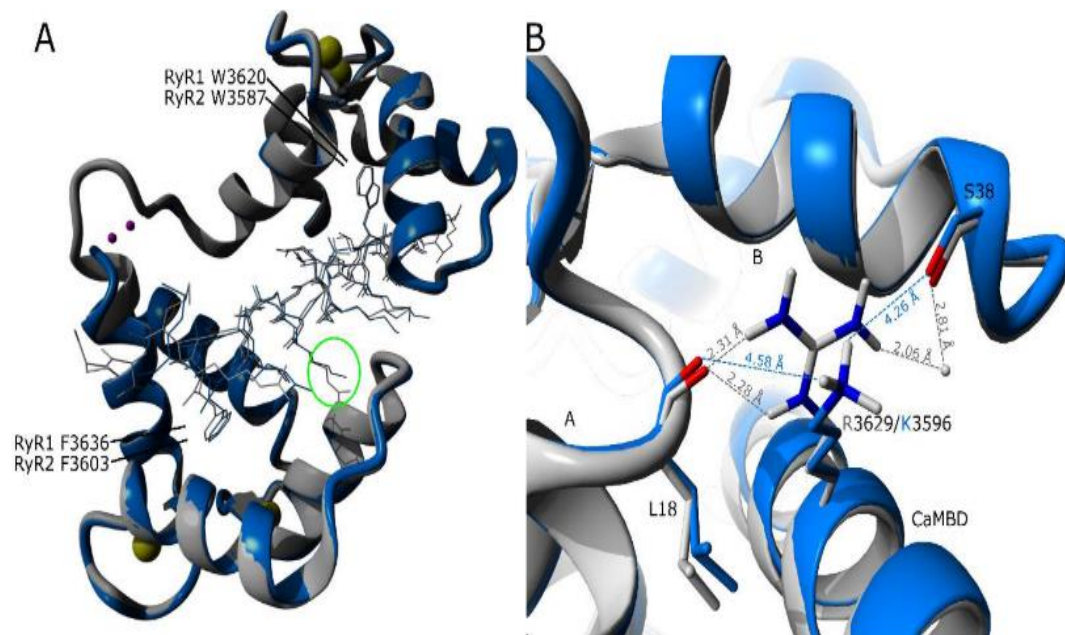
**Εικόνα 21:** Cryo-EM δομές της apo-CaM (επάνω) και CaCaM (κάτω) σε σύμπλεξη με το μονομερές του RyR2. Στα μεγεθυμένα κουτάκια παρουσιάζονται με λεπτομέρεια οι διεπιφάνειες αλληλεπίδρασης (κόκκινα διακεκομμένα κουτάκια) (Gong *et al.*, 2019)

Οι παραπάνω δομικές παρατηρήσεις για τις θέσεις πρόσδεσης της αρο-CaM και CaCaM στον RyR2, συμφωνούν με προγενέστερες μελέτες που υποδείκνυαν πως οι θέσεις πρόσδεσης των αρο- και CaCaM είναι επικαλυπτόμενες. Είναι αξιοσημείωτο ότι στη μετάβαση από την αρο- στην CaCaM διαμόρφωση κατά τη δέσμευση των  $Ca^{2+}$ , παρατηρείται πως πραγματοποιείται μία μετατόπιση προς το N-τελικό άκρο της κύριας θέσης πρόσδεσης της CaM στον RyR2 (aa 3583-3607), όπως είχε προβλέψει το 2001 η ερευνητική ομάδα των (Rodney *et al.*, 2001). Πιο συγκεκριμένα, στην αρο- διαμόρφωση το αμινοξικό κατάλοιπο του RyR2- F3604 αλληλοεπιδρά με τα F90 και F142 της CaM, ενώ στην CaCaM διαμόρφωση τόσο το F3604 όσο και το V3600 συμμετέχουν στην πρόσδεση στα F20 και F69 της CaM (Ogawa *et al.*, 2020). Επίσης, παρατηρείται πως κατά τη δέσμευση του  $Ca^{2+}$ , ο N-λοβός της CaM μετακινείται σε αντίθεση με το C-λοβό που φαίνεται να παραμένει προσδεσμένος στην CaMBD, αφήνοντας ανοικτό το ενδεχόμενο ανάλογα με τη  $[Ca^{2+}]_i$  να αλληλοεπιδρά και με άλλες πιθανές CaMBDs.

Η αντιπαράλληλη πρόσδεση της CaCaM στην περιοχή aa 3583-3607 που παρουσιάζεται στην παραπάνω cryo-EM δομή, επιβεβαιώθηκε και από την επίλυση της κρυσταλλικής δομής της CaCaM-WT με το πεπτίδιο που αφορά στην κύρια θέση πρόσδεσης CaMBD2 στη διακριτική ικανότητα των 1.8 Å (Holt *et al.*, 2020). Η κρυσταλλική αυτή δομή ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό με την αντίστοιχη κρυσταλλική δομή του πεπτιδίου που αφορά στην κύρια θέση πρόσδεσης στον RyR1 (aa 3614-3603) με την CaCaM (Maximciuc *et al.*, 2006).

Από τη σύγκριση των κρυσταλλικών δομών της CaCaM-WT σε πρόσδεση με τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στις κύριες θέσεις πρόσδεσης στον RyR1 και RyR2, προκύπτει ότι η CaM προσδέεται με όμοιο τρόπο και στις δύο περιοχές των RyR, παρουσιάζοντας το χαρακτηριστικό διάστημα των 17 αμινοξικών καταλοίπων (RMSD 0.259Å) μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων Trp και Phe της κυρίως αλληλεπίδρασης των δύο λοβών. Μεταξύ των τριών αμινοξικών καταλοίπων στα οποία εμφανίζουν διαφορά οι κύριες CaMBD2s των RyR1-2 (K3614/R3581, R3629/K3596, T3639/A3606) μόνο το K3596 είναι εμφανές στην απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της CaM-CaMBD2 του RyR2 και οι διαφορές που παρατηρούνται στις αποστάσεις φαίνονται στην Εικόνα 22. Τα R3581 και A3606 που δεν έχουν επιλυθεί δομικά στην κρυσταλλική δομή CaM/CaMBD-RyR2 αντιστοιχούν στα

K3614 και T3639 της κρυσταλλικής δομής CaM/CaMBD2-RyR1. Στον RyR1 το K3614 δε φαίνεται να αλληλοεπιδρά με την CaM αλλά το T3639 δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου μέσω των πλευρικών του αλυσίδων με τις καρβονυλικές ομάδες του C3635 και F3636. Αυτή η αλληλεπίδραση δεν προβλέπεται για την πλευρική αλυσίδα του A3606 στον RyR2 και μπορεί να οδηγεί σε αστάθεια και αλλοιωμένη δομή. Παρόλα αυτά, και οι δύο κρυσταλλικές δομές ομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό στο C-τελικό τμήμα των CaMBD2 (Holt *et al.*, 2020).



**Εικόνα 22:** Υπέρθηση των κρυσταλλικών δομών των CaCaM-WT: RyR1-CaMBD2 (PDB 2BCX) (γκρι) και CaCaM-WT: RyR2-CaMBD2 (PDB 6Y4O) (μπλε). Α) Η CaCaM απεικονίζεται σε μορφή cartoon, οι CaMBD2s των RyR1-2 με μορφή sticks και τα Ca<sup>2+</sup> με κίτρινες σφαίρες. Στον πράσινο κύκλο φαίνεται το ένα εκ των τριών αμινοξέων που διαφέρουν μεταξύ των CaMBD2s των RyR1-2 (R3629/K3596). Β) Λεπτομερής απεικόνιση της περιοχής των R3629/K3596 (Holt *et al.*, 2020).

Οι παραπάνω δομικές μελέτες απέδειξαν πως η CaMBD2 είναι όντως η θέση στον RyR2 όπου προσδένεται τόσο η apo-CaM, κυρίως μέσω του C-λοβού, όσο και η CaCaM, η οποία φαίνεται να αλληλοεπιδρά σχεδόν εξολοκλήρου με την αλληλουχία αυτή. Βέβαια, όπως έχει αναφερθεί η ύπαρξη της κύριας θέσης πρόσδεσης της CaM δεν αποκλείει την ύπαρξη και δευτερευόντων αλληλουχιών που συμμετέχουν στην πρόσδεση. Έχουν αναφερθεί ήδη οι επικρατέστερες αλληλουχίες στην προηγούμενη υποενότητα που πιθανώς να αλληλοεπιδρούν με τον N-λοβό της CaCaM, όπως φαίνεται και από τις διεπιφάνειες αλληλεπίδρασης των συγκεκριμένων δομών.

### 3.4.2. Οι αλληλουχίες που πιθανώς λειτουργούν ως επιπλέον περιοχές πρόσδεσης της CaM στον RyR2.

Σε αυτή την υποενότητα γίνεται αναφορά σε ορισμένες πρόσφατες, κυρίως βιοφυσικές, μελέτες που έχουν υποδείξει την πιθανότητα ύπαρξης επιπλέον CaMBDs εκτός της κύριας CaMBD2 που εκτενώς προαναφέρθηκε.

Μελέτη του 2013 χαρτογράφησε τις περιοχές aa 3581-3612 και aa 4261-4288 στην τρισδιάστατη απεικόνιση του RyR2. Μέσω της εισαγωγής της πρωτεΐνης GFP (πράσινη φθορίζουσα) σε συγκεκριμένες θέσεις στο cDNA του RyR2 και απεικόνιση του επισημασμένου RyR2 μέσω cryo-EM, αυτές οι δύο αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις προαναφερθείσες CaMBD2 και CaMBD3, απεικονίστηκαν αρχικά στη 3D δομή του RyR2 και έπειτα με χρήση της μεθόδου FRET μελετήθηκε η μεταξύ τους πιθανή αλληλεπίδραση. Η GFP εισάχθηκε μετά το κατάλοιπο Arg3595, για τη χαρτογράφηση της aa 3581-3612 (RyR2<sub>R3595</sub>-GFP) και μετά το Lys4269 για τη χαρτογράφηση της aa 4261-4286 (RyR2<sub>K4269</sub>-GFP). Η 3D απεικόνιση των RyR2<sub>R3595</sub>-GFP και RyR2<sub>K4269</sub>-GFP έδειξε πως οι αλληλουχίες aa 3581-3612 και 4261-4286 βρίσκονται πολύ κοντά η μία στην άλλη (~40Å), επιτρέποντας την ανίχνευση μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET) για το χαρακτηρισμό των διαμορφωτικών αλλαγών γύρω από τις CaMBDs, όταν ο RyR μεταβαίνει από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση. Για την καταγραφή των δυναμικών διαμορφωτικών αλλαγών γύρω από τις δύο περιοχές πρόσδεσης CaM που μελετήθηκαν, αναπτύχθηκε ένα ζεύγος FRET και συγκεκριμένα ένα διπλά επισημασμένο μόριο RyR2 με τις φθορίζουσες CFP (cyan fluorescent protein) και YFP (yellow fluorescent protein), να τοποθετούνται μετά το Arg3595 και το Lys4269 αντίστοιχα. Στην πορεία, ακολούθησε ανάλυση FRET των κυττάρων HEK293 τα οποία είχαν μετασχηματιστεί προηγουμένως με το διπλά επισημασμένο μόριο του RyR2 (RyR2<sub>R3595</sub>-CFP/K4269-YFP), για τον έλεγχο των πιθανών δομικών αλλαγών γύρω από τις δύο πιθανές CaMBDs. Το αποτέλεσμα ήταν να παρατηρηθεί υψηλό σήμα FRET, γεγονός που υποδηλώνει ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των aa 3581-3612 και 4261-4286 και μάλιστα όταν οι θέσεις αυτές βρίσκονται στο ίδιο μονομερές του RyR2. Αυτό, πιθανώς να δηλώνει πως οι εν λόγω αλληλουχίες να δημιουργούν θέση στο κάθε μονομερές για την CaM (intra-subunit binding pocket for CaM). Επίσης, προσδιορίστηκε πως ο RyR2<sub>R3595</sub>-CFP/K4269-YFP παρουσία καφεΐνης (δράση ενεργοποιητή στον RyR2), εκπέμπει χαμηλής



έντασης σήμα FRET, γεγονός που δείχνει πως οι παραπάνω δύο αλληλουχίες απομακρύνονται η μία από την άλλη όταν το κανάλι μεταβαίνει από την κλειστή στην ανοικτή διαμόρφωση (Huang *et al.*, 2013). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν πως είναι πιθανή η ύπαρξη επιπλέον αλληλουχιών της κύριας CaMBD που μπορεί να συνεισφέρουν στην πρόσδεση της CaM μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, καθώς και η ίδια η CaMBD είναι πιθανό να υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη ρύθμιση της λειτουργίας του RyR2.

Σε μία άλλη σημαντική μελέτη το 2014 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) για τη μελέτη των θέσεων πρόσδεσης CaMBD1 (αα 1941-1965), CaMBD2 (αα 3580-3606) και CaMBD3 (αα 4246-4276). Η μέθοδος ITC, είναι μία ποσοτική τεχνική κατά την οποία καταγράφονται οι θερμοδυναμικές παράμετροι (μεταβολή ενθαλπίας ( $\Delta H$ ), μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G$ ), κ.α.) της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικρών μορίων (όπως πεπτίδια) και μεγαλύτερων μακρομορίων (όπως πρωτεΐνες) σε διάλυμα. Η μέθοδος θα αναλυθεί εκτενέστερα στο πειραματικό μέρος. Στην εν λόγω μελέτη, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση τόσο ολόκληρου του μορίου της CaM, όσο και του κάθε λοβού της χωριστά, παρουσία και απουσία  $Ca^{2+}$ , με τις τρεις πιθανές CaMBDs. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν πως η CaCaM προσδέεται ισχυρά στην CaMBD2 κυρίως μέσω του C-λοβού της, ενώ ο N-λοβός προσδέεται ασθενέστερα και με τρόπο που υποδεικνύει πιθανή πρόσδεση και σε κάποια άλλη CaMBD. Η apo-CaM προσδέεται επίσης στην CaMBD2 αλλά πολύ ασθενέστερα απ' ότι η CaCaM, με τους δύο λοβούς να συνεισφέρουν στην αλληλεπίδραση. Όσον αφορά την πρόσδεση της CaCaM στην CaMBD1, παρατηρήθηκε πως υπάρχει ασθενέστερη πρόσδεση σε σχέση με την CaMBD2 κυρίως μέσω του N-λοβού. Ο N-λοβός (όταν ο C-λοβός είναι ήδη προ-προσδεμένος) φαίνεται να προσδέεται ισχυρότερα στην CaMBD1 από ότι στην CaMBD2, γεγονός που υποδεικνύει πως η CaCaM πιθανώς να γεφυρώνει αυτές τις δύο περιοχές. Η apo-CaM δεν φάνηκε να αλληλεπιδρά με την CaMBD1, με τη χρήση της μεθόδου αυτής στην εν λόγω μελέτη. Τέλος, η CaCaM δείχνει να προσδέεται στην CaMBD3 με έναν αρκετά ιδιαίτερο τρόπο, με το C-λοβό να παρουσιάζει μια ασθενέστερη πρόσδεση από ότι στην CaMBD2 και το N-λοβό να ακολουθεί μια πρόσδεση σε δύο μεταβάσεις. Η apo-CaM από την άλλη φαίνεται να παρουσιάζει την υψηλότερη πρόσδεση στην CaMBD3 σε σχέση με τις

υπόλοιπες CaMBDs, γεγονός που δείχνει πως η CaMBD3 πιθανώς να είναι η πρωταρχική CaMBD της apo-CaM στον RyR2 (γεγονός που δεν επαληθεύεται από τις νεότερες cryo-EM δομές της apo-CaM με τον RyR2 στις μελέτες από την ερευνητική ομάδα του Gong το 2019) (Lau, Chan and Van Petegem, 2014).

Μια ακόμη μελέτη το 2019 ασχολήθηκε με την αλληλεπίδραση της CaMWT με τις CaMBD1-3 με χρήση τιτλοδότησης με βάση την ανισοτροπία φθορισμού (fluorescence anisotropy based titration), η οποία δίνει τη δυνατότητα της διερεύνησης της αλληλεπίδρασης CaM-CaMBD σε ένα σχετικά διευρυμένο εύρος ελεύθερης συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$ . Η μελέτη καταλήγει πως και οι τρεις CaMBDs αλληλοεπιδρούν με την CaM και η συγγένεια σύνδεσης αυξάνει με την αύξηση της  $[Ca^{2+}]$ . Ωστόσο, μόνο η CaMBD2 και CaMBD3 προσδένουν την CaM με υψηλή συγγένεια σε όλες τις  $[Ca^{2+}]$  που δοκιμάστηκαν, ενώ η CaMBD1 προσδένει στην CaM μόνο σε υψηλές  $[Ca^{2+}]$  (0.2μM). Η μελέτη πρόσδεσης για τον κάθε λοβό ξεχωριστά έδειξε πως ο C-λοβός προσδένεται κατά προτίμηση στην CaMBD2, ενώ ο N-λοβός στην CaMBD3. Στις αλληλεπιδράσεις του C-λοβού με τις CaMBD2-3, η συγγένεια σύνδεσης ήταν τόσο υψηλή που υποδεικνύει πως οι θέσεις δέσμευσης  $Ca^{2+}$  ήταν κορεσμένες. Ενώ αντίθετα ο N-λοβός φάνηκε να εντοπίζει-δεσμεύει το  $Ca^{2+}$  ακριβώς κατά τη μετάβαση από τη  $[Ca^{2+}]$  χαλάρωσης στην  $[Ca^{2+}]$  ενεργοποίησης, κατά την αλληλεπίδραση με τις CaMBD2-3. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή προτείνει ένα μοντέλο αλληλεπίδρασης όπου ο C-λοβός της CaM αγκυροβολείται στην CaMBD2 και μάλιστα σε συνθήκες κορεσμού  $Ca^{2+}$  κατά τη διάρκεια των ταλαντώσεων- $Ca^{2+}$ , ενώ ο N-λοβός λειτουργεί ως ένα δυναμικός αισθητήρας  $Ca^{2+}$  που πιθανώς προσδένεται και σε επιπλέον CaMBDs του RyR2 ή να προσδένει και αυτός στην CaMBD2 (Brohus *et al.*, 2019b).

Οι παραπάνω μελέτες αφορούν σε συνθετικά πεπτίδια και όχι σε ολόκληρο το μόριο του RyR2. Αυτό σημαίνει πως στην τριτοταγή διαμόρφωση οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω μελετών μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Οι πρόσφατες cryo-EM δομές των apo- και CaCaM με τον RyR2 για παράδειγμα, δεν έχουν δώσει προφανείς αλληλεπιδράσεις με τις CaMBD1 και 3 (Gong *et al.*, 2019). Αυτό όμως δεν σημαίνει πως αντικατοπτρίζει την πραγματικότητα καθώς υπάρχουν τμήματα του υποδοχέα, όπως η περιοχή της CaMBD3, που δεν είναι ορατή σε αυτές τις αναλύσεις και επίσης η πληθώρα

των ρυθμιστών και ενεργοποιητών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη λήψη των μέχρι τώρα δομών του RyR2, πιθανώς να επηρεάζουν την πραγματική τριτοταγή διαμόρφωση του μορίου.

Αυτό που μπορεί να ειπωθεί με τα ως τώρα δεδομένα είναι πως ο C- λοβός της CaM σε συνθήκες ενδοκυτταρικής χαλάρωσης (100 nM) είναι σχεδόν κορεσμένος σε  $\text{Ca}^{2+}$  και προσδεδεμένος κυρίως στην CaMBD2 κοντά στο Trp3587, ενώ ο N-λοβός δεν έχει δεσμεύσει ασβέστιο, ούτε είναι προσδεδεμένος στην CaMBD2 και πιθανώς να αλληλοεπιδρά σε κάποια άλλη CaMBD του RyR2. Κατά την διέγερση του μυοκυττάρου, ο N-λοβός δεσμεύει  $\text{Ca}^{2+}$  καθώς η  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  αυξάνει και αυτό αλλάζει την αλληλεπίδρασή του με τις CaMBDs, με μία πιθανότητα να προσδέεται σε συνθήκες κορεσμού στην περιοχή CaMBD2 κοντά στο Phe3603, όπως υποδεικνύουν οι cryo-EM δομές. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει διαθέσιμη δομή του RyR2 σε συνθήκες φυσιολογικής χαλάρωσης του μυοκυττάρου (κλειστή διαμόρφωση του RyR2 και μόνο ο C-λοβός της CaM να έχει δεσμεύσει  $\text{Ca}^{2+}$ ), ώστε να μπορεί να επιβεβαιωθεί η μετακίνηση του κορεσμένου σε  $\text{Ca}^{2+}$  C-λοβού από το Phe3607 στο Trp3587, όταν ο N-λοβός δεν έχει συνδεδεμένα  $\text{Ca}^{2+}$  (όπως φαίνεται να υποδεικνύει και η κρυσταλλική δομή του πεπτιδίου της CaMBD2 με την CaCaM) (Søndergaard *et al.*, 2020).

Σύμφωνα λοιπόν με τις παραπάνω βιοφυσικές μελέτες, παραμένει ανοικτό το ενδεχόμενο της ύπαρξης επιπλέον CaMBDs, η αναζήτηση των οποίων πιθανώς να εμπλουτίσουν τις μέχρι τώρα πληροφορίες που έχουμε για το μηχανισμό της ρύθμισης του RyR2 από την CaM.

## **Κεφάλαιο 4. Καρδιακές παθολογίες που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία του RyR2 και της CaM.**

### **4.1.Γενικά στοιχεία**

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στο κεφάλαιο 1, καθοριστικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του καρδιακού ρυθμού διαδραματίζει η χωροχρονική ρύθμιση της  $[Ca^{2+}]_i$  κατά το μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής του καρδιομυοκυττάρου. Η συντονισμένη έκλυση των  $Ca^{2+}$  από το SR, κυρίως μέσω του RyR2, είναι εξαιρετικής σημασίας για τη σωστή καρδιακή λειτουργία. Ακανόνιστη έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR κατά τη διαστολή μπορεί να οδηγήσει σε (α) μείωση του περιεχομένου  $Ca^{2+}$  στο SR, οδηγώντας σε συστολική δυσλειτουργία; (β) αυξημένη διαστολική  $[Ca^{2+}]_i$ , συμβάλλοντας σε καταστάσεις διαστολικής δυσλειτουργίας; (γ) αρρυθμογένεση; (δ) κυτταρικό ενεργειακό κόστος εξαιτίας της υπερχρήσης της ATP (Bers, 2014). Αυτές οι δυσλειτουργίες έχουν συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιακή ανεπάρκεια (HF, Heart Failure) και σύνδρομο κολπικών αρρυθμιών που συνδέονται με αιφνίδιο καρδιακό θάνατο (SCD, Sudden Cardiac Death). Η καρδιακή ανεπάρκεια επηρεάζει περίπου 26 εκατομμύρια ανθρώπους και είναι η αιτία νοσηλείας για περισσότερο από 1 εκατομμύριο ανθρώπους ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα (Dridi *et al.*, 2020). Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος σε ποσοστό 85% συνδέεται με καρδιακής προέλευσης παθολογίες και αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στο δυτικό κόσμο. Τα τελευταία 10 περίπου χρόνια επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως οι 100 στους 100.000 θανάτους σχετίζονται με SCD (Fernández-Falgueras *et al.*, 2017). Στη διατριβή αυτή γίνεται αναφορά στη σύνδεση της δυσλειτουργίας του RyR2 με την ακανόνιστη έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR, καθώς επίσης και στο πώς γενετικές μεταλλάξεις στο μόριο της CaM, που μέχρι πολύ πρόσφατα ήταν άγνωστες, επηρεάζουν τη λειτουργία της και την αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα RyR2, οδηγώντας σε καρδιακές παθολογίες που σχετίζονται με θνησιγενή σύνδρομα αρρυθμιών όπως η Κατεχολαμινεργική Πολυμορφική Κοιλιακή Ταχυκαρδία (στο εξής CPVT, Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia) και το σύνδρομο μακρού διαστήματος (στο εξής LQTS, Long QT-Syndrome).

## 4.2. Δυσλειτουργία στον RyR2-Ακανόνιστη διαστολική έκλυση Ca<sup>2+</sup>

Οποιαδήποτε διαταραχή στην κυκλική διαδικασία του μηχανισμού σύζευξης διέγερσης-συστολής του καρδιομυοκυττάρου, οδηγεί σε καταστάσεις διαταραγμένης συστολικής ή/και διαστολικής δράσης, με αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθογενειών.

Η συγχρονισμένη συστολή του καρδιακού μυ σε τακτά χρονικά διαστήματα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της σωστής καρδιακής λειτουργίας. Η συγχρονισμένη συστολή λαμβάνει χώρα ως αποτέλεσμα της σωστής διάδοσης ενός εξωκυττάρου ηλεκτρικού σήματος και της μετάφρασης αυτού του σήματος σε μηχανική δύναμη. Στο μηχανισμό σύζευξης διέγερσης-συστολής (ECC) ενός φυσιολογικού καρδιομυοκυττάρου, όπως έχει ήδη παρουσιαστεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, τα Ca<sup>2+</sup> είναι αυτά που έχουν κεντρικό ρόλο σε αυτή τη μετάφραση του δυναμικού δράσης (ηλεκτρικό σήμα) στη συστολή των μυοϊνιδίων ακτίνης-μυοσίνης (μηχανική δύναμη). Το δυναμικό δράσης, παράγει μια μικρή εισροή Na<sup>+</sup> στο κύτταρο και αυτό διεγείρει την είσοδο Ca<sup>2+</sup> από τον εξωκυττάρου χώρο μέσω των LTCCs. Αυτό με τη σειρά του διεγείρει την έκλυση μεγαλύτερης ποσότητας Ca<sup>2+</sup> από το SR μέσω της ενεργοποίησης των RyR2. Τα Ca<sup>2+</sup> σε αυτή τη φάση ενεργοποιούν τα μυοϊνίδια ακτίνης, τα οποία συστέλλουν τα ινίδια της μυοσίνης με αποτέλεσμα τη παραγωγή συστολικής δύναμης στο κύτταρο. Η χαλάρωση επέρχεται με την απομάκρυνση των Ca<sup>2+</sup> πίσω στο SR μέσω της SERCA2a ή στον εξωκυττάρου χώρο μέσω του ιονανταλλάκτη NCX.

Σε αυτόν τον τόσο σημαντικό μηχανισμό, ο υποδοχέας RyR2 έχει κομβική θέση και για αυτό το λόγο η δυσλειτουργία του συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιακή ανεπάρκεια και διάφορες μορφές αρρυθμίας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πιθανότητα του RyR2 να βρίσκεται σε ανοιχτή διαμόρφωση, αυξάνεται με την εισροή των Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα. Όταν η τοπική συγκέντρωση είναι στα επιθυμητά επίπεδα, τότε μόνο ο RyR2 ανοίγει, απελευθερώνει Ca<sup>2+</sup> και διεγείρεται η συστολική δράση. Ωστόσο, διάφορες μελέτες έχουν υποδείξει πως ο RyR2 σε παθολογικές καταστάσεις εμφανίζει ακανόνιστη διαστολική έκλυση Ca<sup>2+</sup> (Fischer, Maier and Sossalla, 2013; Belevych *et al.*, 2013).

Η ευαισθησία του υποδοχέα στην  $[Ca^{2+}]_i$  ρυθμίζεται από πληθώρα πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και η FKBP12.6, η CaM και η CASQ2, οι οποίες προκαλούν δομικές αλλαγές στα διάφορα τμήματα του RyR2 που επηρεάζουν την ανοικτή και κλειστή πιθανότητα του καναλιού. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στον υποδοχέα, ρυθμίζεται με την αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των μονομερών του RyR2, διαδικασία που ελέγχεται από κινάσες όπως η PKA (Protein Kinase A) και η CaMKII (Calmodulin Kinase II) και από φωσφατάσες όπως η PP1 και PP2a (Protein Phosphatase 1 and 2a)(Heijman *et al.*, 2014;Heijmana *et al.*, 2017).

Πιο συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της σερίνης (Ser) στις θέσεις 2808 (S2808), 2814 (S2014) και 2030 (S2030) του RyR2, φαίνεται να έχει επίδραση στην έκλυση  $Ca^{2+}$  από τον υποδοχέα και να αλλάζει τη λειτουργικότητά του σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (Marx *et al.*, 2000;Wehrens *et al.*, 2004;Xiao *et al.*, 2006). Για παράδειγμα η FKBP12.6, όντας συνδεδεμένη στον RyR2, σταθεροποιεί το τετραμερές, βοηθώντας έτσι το κανάλι να παραμένει κλειστό κατά τη φάση χαλάρωσης του καρδιομυοκυττάρου (Marx *et al.*, 2000;Wehrens *et al.*, 2003;Wehrens and Marks, 2003). Ωστόσο, όταν η PKA φωσφορυλιώνει τον RyR2, διακόπτει την πρόσδεση της FKBP12.6, οδηγώντας με το τρόπο αυτό σε αύξηση της πιθανότητας της ανοικτής διαμόρφωσης του υποδοχέα (Marx *et al.*, 2000). Όταν μάλιστα αυτό συμβαίνει κατ' εξακολούθηση, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη εκροή των  $Ca^{2+}$  από το SR (SR  $Ca^{2+}$  leak), προκαλώντας πρόωρη συστολική δράση και αρρυθμίες ή μείωση της συγκέντρωσης των  $Ca^{2+}$  στο SR, το οποίο αποτελεί έναν από τους πιθανότερους μηχανισμούς εκδήλωσης καρδιακής ανεπάρκειας (Wehrens *et al.*, 2003). Επιπρόσθετα, η CaMKII φωσφορυλιώνει τον RyR2 (S2814) σε συνθήκες διέγερσης του καρδιαγγειακού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, όταν η CaMKII ενεργοποιείται από την β- αδρενεργική διέγερση όπως σε κατάσταση άσκησης ή υπό φυσιολογικό στρες, φωσφορυλιώνει τον RyR2, προκαλώντας πιο συχνή και πιο έντονη συστολική δράση (Wehrens *et al.*, 2004;Shan *et al.*, 2010). Όπως φαίνεται λοιπόν, το επίπεδο της φωσφορυλίωσης του RyR2 παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του υποδοχέα.

Επιπρόσθετα, η πρόσδεση των διαφόρων ρυθμιστικών πρωτεϊνών επηρεάζει τη λειτουργία του RyR2 και μεταλλάξεις είτε στον ίδιο τον υποδοχέα είτε στις ρυθμιστικές

πρωτεΐνες μπορούν να οδηγήσουν σε μη φυσιολογική έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR και καρδιακές παθολογίες.

Παράλληλα, σημαντική επίδραση στη λειτουργία του RyR2 σε καταστάσεις παθολογείας έχουν και διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η οξειδωτική και η S-νιτροζυλίωση. Ο ρόλος της οξειδωτικής μάλιστα, αποτελεί τομέα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η καρδιακή παθολογία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικής και ο RyR2 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες (Zima and Blatter, 2006; Zima and Mazurek, 2016). Αυτή του η ευαισθησία, οφείλεται στην παρουσία πολλών κυστεϊνών στο μόριο του υποδοχέα. Όταν ο RyR2 οξειδωθεί, αυξάνεται η διαρροή  $Ca^{2+}$ , διαδικασία η οποία μπορεί να αντιστραφεί με την μείωση της οξειδωτικής (Zima and Blatter, 2006; Terentyev *et al.*, 2008). Από την άλλη, η S-νιτροζυλίωση μειώνει την ενεργότητα του RyR2, βοηθώντας τη διατήρηση του περιεχομένου  $Ca^{2+}$  στο SR στα φυσιολογικά όρια (Gonzalez *et al.*, 2010).

#### **4.3 Η δυσλειτουργία του RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια**

Η καρδιακή ανεπάρκεια προκύπτει όταν το μυοκάρδιο δεν είναι πλέον ικανό να προωθήσει ικανή ποσότητα αίματος στο σώμα ώστε να μπορούν να οξυγονωθούν επαρκώς οι ιστοί των οργάνων. Πρόκειται για μια προοδευτική πάθηση, η οποία περιλαμβάνει αναδιαμόρφωση ολόκληρου του μυοκαρδίου (González *et al.*, 2018).

Στην καρδιακή ανεπάρκεια, η δυσλειτουργία στη ρύθμιση του  $Ca^{2+}$  οδηγεί σε μείωση του περιεχομένου  $Ca^{2+}$  στο SR, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί μείωση του πλάτους και αύξηση της διάρκειας των σημάτων  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$  waves) κατά τη συστολή. Αυτή η μεταβολή οδηγεί σε μειωμένη συσταλτική ικανότητα και μειωμένη καρδιακή απόδοση (Marks, 2013). Το γεγονός της μείωσης της  $[Ca^{2+}]$  στο εσωτερικό του SR, προκύπτει από το συνδυασμό της μειωμένης απόδοσης της SERCA2a, την αυξημένη δράση του NCX και τη διαστολική διαρροή του RyR2. Ο ρόλος της διαστολικής διαρροής  $Ca^{2+}$  από τον RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι αρκετά καλά εδραιωμένος. Αρχικά, συμβάλλει στην μείωση της  $[Ca^{2+}]$  στο SR, προκαλώντας σήματα  $Ca^{2+}$  μειωμένης έντασης και μεγαλύτερης διάρκειας. Επίσης, η διαστολική έκλυση  $Ca^{2+}$  σε συνδυασμό με την υπερενεργητικότητα του NCX, οδηγεί σε καθυστερημένες μετα-εκπολώσεις DADs (DADs, Delayed After Depolarizations) και αρρυθμογένεση στο μυοκάρδιο, που προοδευτικά καταρρέει

(Wehrens *et al.*, 2003). Η ακανόνιστη έκλυση  $Ca^{2+}$  από τον RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να προκληθεί από ενισχυμένη φωσφορυλίωση του υποδοχέα από τις PKA και CaMKII. Έχει προσδιοριστεί πως η υπερφωσφορυλίωση του RyR2 στη θέση S2814 από την CaMKII μπορεί να οδηγήσει σε διαρροή  $Ca^{2+}$  από τον RyR2 και κατ' επέκταση την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας (Luo and Anderson, 2013), ενώ η παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης στη θέση αυτή έχει βρεθεί πως προστατεύει από την ανάπτυξη της νόσου σε ζωικά μοντέλα ποντικού (Respress *et al.*, 2012).

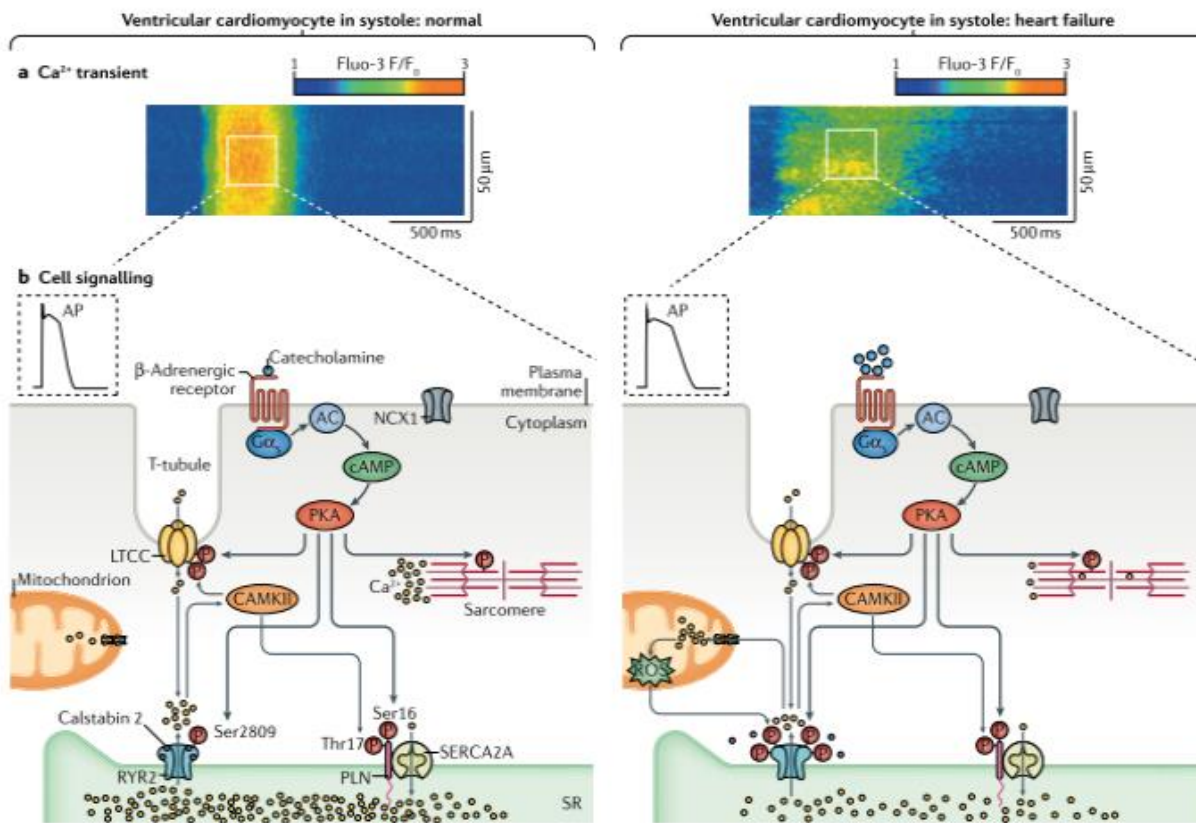
Ωστόσο, οι μελέτες γύρω από τις θέσεις φωσφορυλίωσης στον RyR2 αλλά και για το ποια κινάση (PKA ή CaMKII) κατέχει κύριο ρόλο στο μηχανισμό της καρδιακής ανεπάρκειας παραμένουν αντιφατικές. Για παράδειγμα, η υπερφωσφορυλίωση του RyR2 στη θέση S2808 από την PKA σε ανθρώπινα και ζωικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας, έχει συσχετισθεί με την διάσταση της FKBP12.6 από τον RyR2, προκαλώντας αποσταθεροποίηση του καναλιού με αποτέλεσμα την διαρροή  $Ca^{2+}$  από το SR, στο πλαίσιο της  $\beta$ -αδρενεργικής διέγερσης (Shan, Betzenhauser, *et al.*, 2010). Παράλληλα, άλλες μελέτες έχουν δείξει πως η αντικατάσταση της σερίνης στη θέση 2808 με αλανίνη, που προστατεύει από την φωσφορυλίωση, δεν απέτρεψε την εκδήλωση της νόσου, ούτε την  $\beta$ -αδρενεργική απόκριση σε ζωικό μοντέλο ποντικού. Άλλες μελέτες έχουν τονίσει τη σημασία της φωσφορυλίωσης στη θέση S2030, σε αντίθεση με τη S2808, από την PKA στην εκδήλωση της νόσου (Xiao *et al.*, 2005).

Παράλληλα με την φωσφορυλίωση του RyR2, υπάρχουν και άλλοι πιθανοί μηχανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργίες στον υποδοχέα και να συμβάλλουν στην αυξημένη διαρροή  $Ca^{2+}$  και στην εκδήλωση καρδιακής ανεπάρκειας. (α) Η οξείδωση (από ROS (Reactive Oxygen Species)) μπορεί να ενεργοποιήσει απευθείας τον RyR2 αλλά και την CaMKII, δημιουργώντας μία πιθανή συνέργεια με την φωσφορυλίωση από την CaMKII. (β) Η μειωμένη πρόσδεση της CaM στον RyR2 που έχει παρατηρηθεί στην καρδιακή ανεπάρκεια, μπορεί να προκαλέσει αυξημένους 'σπινθήρες  $Ca^{2+}$ ' ( $Ca^{2+}$  sparks) και διαρροή από το SR. (γ) Οι πρωτεΐνες S100A1 και Σορσίνη (Sorcin) μπορούν επίσης να έχουν όμοια δράση με την CaM σταθεροποιώντας τον RyR2. Η μειωμένη έκφρασή τους ή η δυσλειτουργία τους μπορεί να επηρεάσει τη διαρροή  $Ca^{2+}$  και να οδηγήσει στην καρδιακή ανεπάρκεια. (δ) Η δομική απομάκρυνση (unzipping) του N-



τελικού τμήματος και του κεντρικού τμήματος του RyR2 (περιοχή όπου έχουν εντοπιστεί και CPVT μεταλλάξεις), έχει επίσης συσχετισθεί με αυξημένη έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR σε περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας. Η επανασύνδεση (re-zipping) των δύο αυτών περιοχών του RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια και στην CPVT πιθανώς να περιορίζει την διαρροή  $Ca^{2+}$  (Bers, 2014).

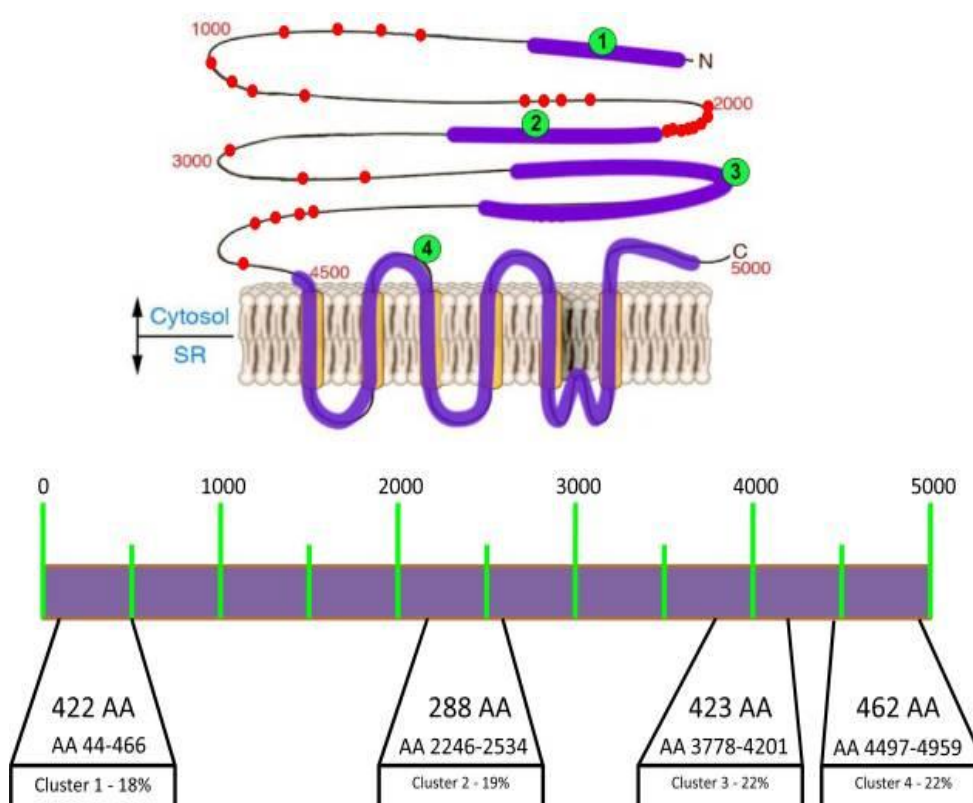
Όλα τα παραπάνω σενάρια είναι πιθανό να συμβάλλουν στην εμφάνιση διαρροής  $Ca^{2+}$  από τον RyR2 στην καρδιακή ανεπάρκεια και μάλιστα χωρίς να αποκλείει το ένα το άλλο. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η δυσλειτουργία του υποδοχέα συνδέεται με την εκδήλωση της νόσου είναι ακόμη υπό διερεύνηση.



**Εικόνα 23:** α) Αναπαράσταση γραμμικής σάρωσης όπου παρουσιάζονται τα κύματα Ca<sup>2+</sup> όπως καταγράφονται σε υγιή και ασθενή μυοκαρδιοκύτταρα. Το πλάτος των κυμάτων Ca<sup>2+</sup> στα ασθενή κύτταρα φαίνεται χαμηλότερο από τα υγιή. β) Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης Ca<sup>2+</sup> κατά τη συστολή σε υγιές και ασθενές κοιλιακό μυοκύτταρο. Στο ασθενές μυοκύτταρο (δεξιά) υπάρχει διαστολική διαρροή Ca<sup>2+</sup> μέσω του RyR2 και μείωση της δράσης της SERCA2a, που μαζί οδηγούν στη μείωση του περιεχομένου Ca<sup>2+</sup> στο SR. Στην καρδιακή ανεπάρκεια, τα επίπεδα των κατεχολαμινών αυξάνονται, το οποίο διεγείρει την δραστηριότητα του β-αδρενεργικού υποδοχέα και αυξάνει την παραγωγή της cAMP και ως εκ τούτου αυξάνει την φωσφορυλίωση τόσο του RyR2 από την PKA στη θέση Ser2809 αλλά και των LTCCs, PLN (phospholamban) στη θέση Ser16 και πρωτεϊνών του σαρκομερούς. Η παθολογική διαρροή Ca<sup>2+</sup> από το SR προκύπτει από την αναδιαμόρφωση του RyR2 ως αποτέλεσμα υπερφωσφορυλίωσης, οξειδωτικής, S-νιτροζυλίωσης και διάστασης της FKBP12.6 από το σύμπλεγμα του RyR2, οδηγώντας σε κανάλια που δεν κλείνουν ως αναμένεται κατά τη διαστολή. Η αυξημένη [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> διεγείρει την CaMKII, η οποία φωσφορυλιώνει τα LTCCs και PLN στη θέση Thr17. Η [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, σε κάποιο βαθμό, ρυθμίζεται από τα μιτοχόνδρια που παράγουν ROS (reactive oxygen species), τα οποία μοτεούν να συμβάλλουν στην περεαίρω οξειδωτική του RyR2. Στην καρδιακή ανεπάρκεια, η διάρκεια των κυμάτων Ca<sup>2+</sup> είναι μεγαλύτερη, κυρίως εξαιτίας της πιο αργής κινητικής στην επαναπροώθηση του Ca<sup>2+</sup> στο SR, από αυτή σε ένα υγιές κοιλιακό καδιομυοκύτταρο με αποτέλεσμα να υπάρχει μειωμένη συσταλτικότητα (Dridi et al., 2020).

#### 4.4 Μεταλλάξεις στον RyR2 και αρρυθμογένεση

Παθολογικές σημειακές μεταλλάξεις στο μόριο του RyR2 έχουν προσδιοριστεί σε ασθενής με CPVT. Πρόκειται για μία κληρονομική αρρυθμογόνο διαταραχή που προκαλείται μετά από άσκηση ή στρες και εμφανίζει υψηλό ρίσκο αιφνίδιου καρδιακού θανάτου. Στο 60% των περιπτώσεων η CPVT προκαλείται από μεταλλάξεις στον RyR2. Οι μεταλλάξεις αυτές συγκεντρώνονται κυρίως σε τέσσερις περιοχές της αλληλουχίας του RyR2. Οι περιοχές αυτές είναι : I) αα 77-466, II) αα 2246-2534, III) αα 3778-4201 και IV) αα 4497-4959 (Εικόνα 24). Ένα ποσοστό της τάξης του 46% των μεταλλάξεων εντοπίζεται στις περιοχές III και IV, ενώ μόλις ένα 10% των μεταλλάξεων έχει προσδιοριστεί εκτός των τεσσάρων περιοχών (Priori and Chen, 2011).

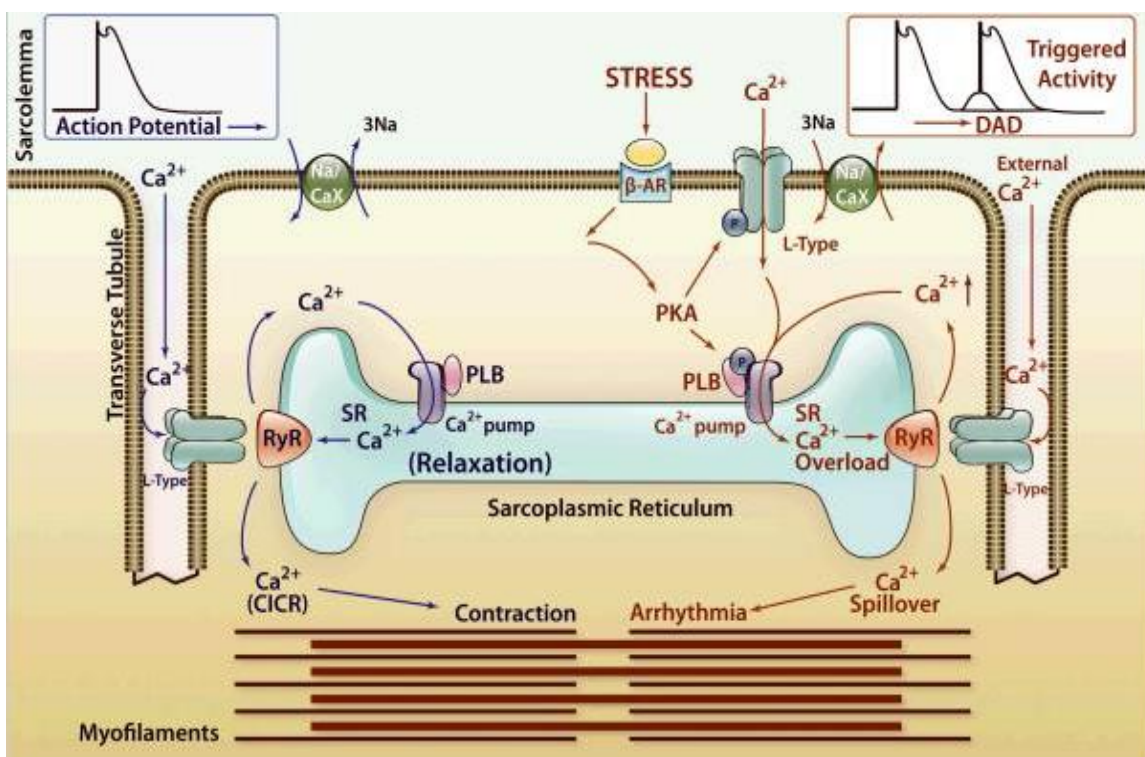


**Εικόνα 24:** (πάνω) Σχηματική αναπαράσταση του πρωτεϊνικού μορίου του RyR2 όπου φαίνονται οι περιοχές που εντοπίζονται κυρίως οι CPVT μεταλλάξεις. (κάτω) Ποσοστά εμφάνισης των μεταλλάξεων ανά περιοχή στην αμινοξική ακολουθία του RyR2. Με κόκκινο παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί εκτός των τεσσάρων κύριων περιοχών (Priori and Chen, 2011).

Η ασθένεια οδηγεί σε διαστολική διαρροή  $Ca^{2+}$  μετά από β-αδρενεργική διέγερση. Αυτή η διαρροή διεγείρει την ενεργοποίηση του ιονανταλλάκτη  $Na^+/Ca^{2+}$ , οδηγώντας σε καθυστερημένες μετα-εκπολώσεις (DADs) και πιθανότατα στην ανάπτυξη θνησιγενούς κοιλιακής ταχυαρρυθμίας (Baltogiannis *et al.*, 2019). Ο μεταλλαγμένος RyR2 οδηγεί σε διαστολική έκλυση στην CPVT μόνο όταν υπάρχει β-αδρενεργική διέγερση και όχι σε φάση χαλάρωσης. Ο ακριβής μηχανισμός της επίδρασης των μεταλλάξεων στη λειτουργία του RyR2 δεν είναι πλήρως γνωστός και υπάρχουν διάφορες επιστημονικές υποθέσεις. Έχει βρεθεί ότι η β-αδρενεργική διέγερση μειώνει την συγγένεια σύνδεσης της FKBP12.6, που σταθεροποιεί τον RyR2, σε ασθενείς με CPVT (Wehrens *et al.*, 2003). Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει πως η ενεργοποίηση της CaMKII από την β-αδρενεργική διέγερση ή την άσκηση μπορεί να επιδεινώσει τη διαρροή  $Ca^{2+}$  στα κανάλια RyR2 που φέρουν CPVT-μεταλλάξεις (Bezzerrides *et al.*, 2019). Αυτός ο μηχανισμός είναι πιθανό να παίζει σημαντικό ρόλο μιας και η κοιλιακή ταχυκαρδία παρατηρείται μόνο σε υψηλούς καρδιακούς ρυθμούς σε ασθενείς με CPVT (Sumitomo *et al.*, 2003).

Ένα ακόμη πιθανό σενάριο προβλέπει πως οι μεταλλάξεις στον RyR2 εξασθενούν την αλληλεπίδραση του N-τελικού και του κεντρικού τμήματος του RyR2, οδηγώντας σε διαμορφωτικές αλλαγές, αποσταθεροποιώντας την κλειστή διαμόρφωση του καναλιού και καταλήγοντας σε διαρροή  $Ca^{2+}$ . Έχει προταθεί επίσης και ένας άλλος μηχανισμός για τους DADs και την επαγόμενη ενεργοποίηση στην CPVT, σύμφωνα με τον οποίο η συσσώρευση  $Ca^{2+}$  στο SR διεγείρει την αυθόρμητη απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  (store-overload induced- $Ca^{2+}$  release) (Εικόνα 25) (Priori and Chen, 2011). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως και η CaM παίζει σημαντικό ρόλο στη δυσλειτουργία του RyR2 στη CPVT, καθώς οι μεταλλάξεις στον RyR2 μειώνουν την πρόσδεση της CaM στον υποδοχέα, αποσταθεροποιώντας το κανάλι και προκαλώντας αυθόρμητη έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR (Xu *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2019).

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις πως μεταλλάξεις στον RyR2 συνδέονται με την εκδήλωση αρρυθμογενούς δεξιάς κοιλιακής καρδιομυοπάθειας ARVC (ARVC, Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy) είτε ως αίτιο εκδήλωσης της νόσου είτε ως παράγοντας που συμβάλλει σε αυτό (Landstrom, Dobrev and Wehrens, 2017).



**Εικόνα 25:** (αριστερά) Ca<sup>2+</sup> - επαγόμενη απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> (CICR), (δεξιά) store-overload induced-Ca<sup>2+</sup> release (SOICR) και αρρυθμογένεση. Το αριστερό τμήμα (μπλε βέλη) αναπαριστά το μηχανισμό CICR, όπου το δυναμικό δράσης, ενεργοποιεί τα LTCCs, προκαλώντας εισροή Ca<sup>2+</sup> στο κύτταρο. Η εισροή αυτή επάγει την απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το SR μέσω του RyR2 και οδηγεί στην συστολή του μυοκυττάρου. Το δεξί τμήμα (κόκκινα βέλη) αναπαριστά το μηχανισμό SOICR, όπου συμβαίνει αυθόρμητη απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το SR ως αποτέλεσμα της υπερφόρτωσης του εσωτερικού του SR σε Ca<sup>2+</sup>, που συμβαίνει μετά από β-αδρενεργική διέγερση λόγω στρες (Priori and Chen, 2011).

#### 4.5. Μεταλλάξεις στην CaM που σχετίζονται με καρδιακές παθολογίες των ιοντικών καναλιών.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τρία ανεξάρτητα γονίδια (CALM1, CALM2, CALM3) κωδικοποιούν την ίδια πανομοιότυπη CaM σε όλα τα σπονδυλωτά. Αυτό, σε συνδυασμό με τον εξαιρετικό βαθμό συντήρησης της CaM, ακόμη και στην πιο απλή μορφή ζωής κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, οδήγησε στην πεποίθηση πως η ακρίβεια στη μετάφραση της CaM είναι ζωτικής σημασίας για κάθε οργανισμό. Το 2012 (Nyegaard *et al.*, 2012), γίνεται για πρώτη φορά αναφορά σε μία κλινική περίπτωση δύο ασθενών που έπασχαν από κοιλιακή ταχυκαρδία και κατέληξαν με αιφνίδιο καρδιακό θάνατο σε πολύ νεαρή ηλικία.

Παραδόξως, ο γενετικός έλεγχος στα μέχρι τότε γνωστά γονίδια που συνδέονταν με τις δύο αυτές παθήσεις (RYS2, CASQ2, KCNJ2, KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2 και SCN5A), απέτυχε στο να εντοπίσει μεταλλάξεις που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την κλινική αυτή εικόνα. Ωστόσο, περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε μεταλλάξεις στην αμινοξική ακολουθία της CaM (Nyegaard *et al.*, 2012). Έκτοτε, άλλες 25 ερευνητικές μελέτες έχουν προσδιορίσει ή/και χαρακτηρίσει τουλάχιστον 18 διαφορετικές μεταλλάξεις και στα τρία γονίδια που κωδικοποιούν την CaM σε ασθενείς με σοβαρό καρδιακό αρρυθμογενή φαινότυπο (Πίνακας 7) (Kotta *et al.*, 2018). Αξίζει να σημειωθεί πως οι CALM μεταλλάξεις παρουσιάζουν εξαιρετική διεισδυτικότητα, καθώς αρκεί μία και μόνο μετάλλαξη σε ένα εκ των 6 αλληλόμορφων των τριών CALM γονιδίων (όπως στις ετερόζυγες μεταλλάξεις) για να προκαλέσει σημαντικές λειτουργικές διαταραχές (Badone *et al.*, 2018).

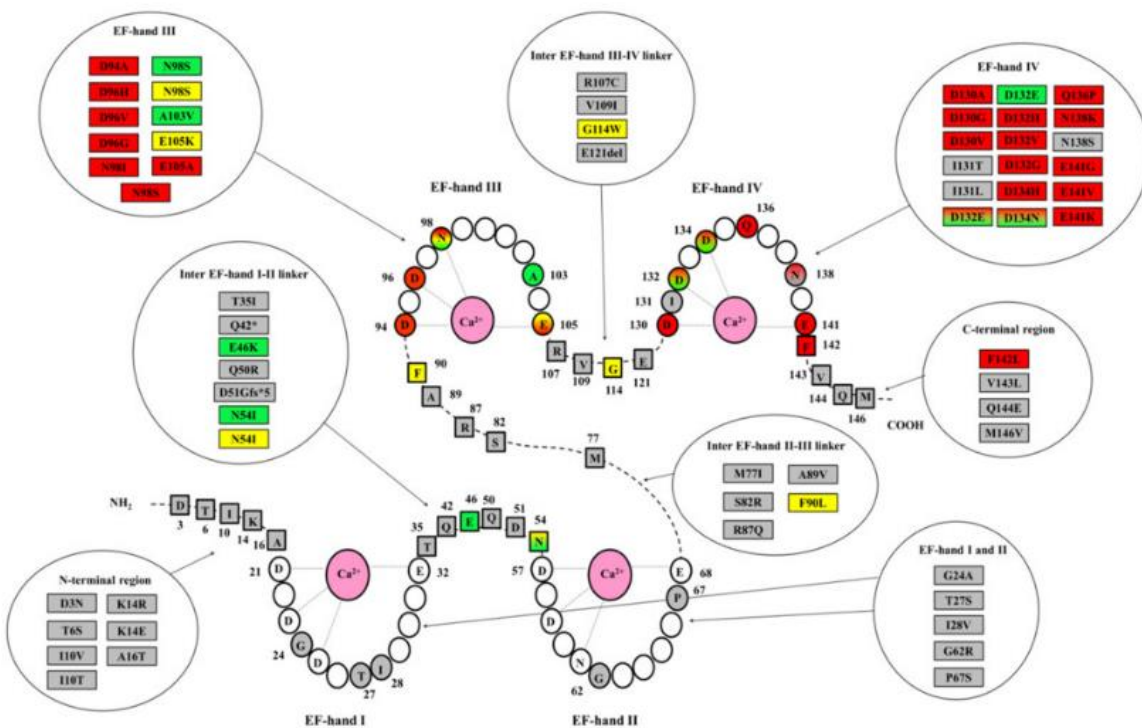
**Πίνακας 7:** Δημοσιευμένες CALM μεταλλάξεις που έχουν συσχετισθεί με αρρυθμογενή φαινότυπο

Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Protein domain	N. of probands	Associated phenotype
CALM1	c.161A>T	p.N54I	inter-EF hand I-II linker	1	CPVT
CALM1	c.268T>C	p.F90L	inter-EF hand II-III linker	1	IVF
CALM2	c.268T>C	p.F90L	inter-EF hand II-III linker	1	SUD
CALM3	c.281A>C	p.D94A	EF-hand III	1	LQTS
CALM3	c.286G>C	p.D96H	EF-hand III	1	LQTS
CALM2	c.287A>T	p.D96V	EF-hand III	1	LQTS
CALM1	c.293A>G	p.N98S	EF-hand III	2	LQTS, CPVT
CALM2	c.293A>G	p.N98S	EF-hand III	4	LQTS,CPVT,SUD
CALM2	c.293A>T	p.N98I	EF-hand III	1	LQTS
CALM3	c.308C>T	p.A103V	EF-hand III	1	CPVT
CALM1	c.314A>C	p.E105A	EF-hand III	1	LQTS
CALM1	c.389A>G	p.D130G	EF-hand IV	2	LQTS
CALM2	c.389A>G	p.D130G	EF-hand IV	1	LQTS
CALM3	c.389A>G	p.D130G	EF-hand IV	1	LQTS
CALM2	c.389A>T	p.D130V	EF-hand IV	1	LQTS
CALM2	c.394G>C	p.D132H	EF-hand IV	1	LQTS
CALM1	c.395A>T	p.D132V	EF-hand IV	1	LQTS
CALM2	c.396T>G	p.D132E	EF-hand IV	1	LQTS/CPVT Overlap
CALM2	c.400G>C	p.D134H	EF-hand IV	1	LQTS
CALM2	c.407A>C	p.Q136P	EF-hand IV	1	LQTS
CALM1	c.422A>G	p.E141G	EF-hand IV	1	LQTS
CALM1	c.426C>G	p.F142L	C-terminal region	3	LQTS
CALM3	c.426T>G	p.F142L	C-terminal region	1	LQTS

Τα τελευταία χρόνια, έχει επικρατήσει η χρήση του όρου 'Καλμοδουλινοπάθεια'(Calmodulinopathy) για να περιγράψει την εξαιρετικά σοβαρή αρρυθμογενή κατάσταση που προκύπτει αποκλειστικά και μόνο από μεταλλάξεις στα CALM γονίδια και περιλαμβάνει κυρίως φαινοτύπους όπως το σύνδρομο μακρού διαστήματος QT (LQTS), η κατεχολαμινεργική πολυμορφική ταχυκαρδία (CPVT), ενός συνδυασμού μεταξύ LQTS/CPVT φαινοτύπου, ένα μικρό ποσοστό της ιδιοπαθούς κοιλιακής μαρμαρυγής (IVF, idiopathic ventricular fibrillation) και του αιφνίδιου καρδιακού θανάτου (SUD, sudden cardiac death) σε νεαρή ηλικία (Chazin and Johnson, 2020). Σύμφωνα με το διεθνές μητρώο Καλμοδουλινοπάθειας (ICalmR, International Calmodulinopathy Registry), το οποίο δημιουργήθηκε μόλις το 2015, έχουν καταγραφεί συνολικά 74 περιστατικά ασθενών με καλμοδουλινοπάθεια, σε 51 διαφορετικές οικογένειες από όλο τον κόσμο. Στα περιστατικά αυτά έχουν εντοπιστεί συνολικά 35 μονές νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις (31% στο CALM1, 46% στο CALM2 και 23% στο CALM3), που οδηγούν σε 28 διακριτές αμινοξικές αλλαγές στην αλληλουχία της CaM (Εικόνα 26). Η πλειονότητα των μεταλλάξεων εντοπίζεται κυρίως στα αμινοξικά κατάλοιπα των EF-hand δομικών μοτίβων III και IV (80%) και οι περισσότερες από αυτές επηρεάζουν ένα εκ των τεσσάρων κυρίως αμινοξέων που συμμετέχουν στην πρόσδεση του  $Ca^{2+}$  (Asp, Asp, Asp/Asn και Glu στις θέσεις 1, 3, 5 και 12 αντίστοιχα στο βρόγχο σύνδεσης του  $Ca^{2+}$ ). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, πως παρόλο που η κάθε μετάλλαξη φαίνεται να είναι μοναδική ως προς τον τύπο και τη θέση της στο γονιδίωμα, υπάρχουν τρεις μεταλλάξεις (N98S, D130G και F142L) που εμφανίζονται σε 10, 5 και 4 οικογένειες αντίστοιχα. Επίσης, σημαντική συσχέτιση υπάρχει μεταξύ της θέσης της μετάλλαξης και του εκάστοτε φαινοτύπου. Μετάλλαξη στο EF-hand δομικό μοτίβο IV έχει βρεθεί στην πλειονότητα των CALM-LQTS περιπτώσεων (53%), αλλά μόνο σε μία εκ των εννέα CALM-CPVT (11%). Αντίθετα, μεταλλάξεις που συσχετίζονται με τον CALM-CPVT φαινότυπο προσδιορίζονται κυρίως στο δομικό μοτίβο EF-hand III (56%) ή στην περιοχή μεταξύ του EF-hand I & II (33%). Αξίζει να αναφερθεί πως στις 27 εκ των 29 περιπτώσεων με CALM-LQTS (93%) και στις 7 εκ των 9 περιπτώσεων με CALM-CPVT (78%) οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν ήταν *de novo*, ενώ μια περίπτωση CALM-LQTS και μία

περίπτωση IVF φάνηκαν να ακολουθούν φυλοσύνδετη κληρονομικότητα με τον έναν γονέα (Crotti *et al.*, 2019).

Οι κύριοι φαινότυποι που έχουν συσχετισθεί με τις CALM μεταλλάξεις είναι ο LQTS (CALM-LQTS,49%) και ο CPVT (CALM-CPVT,28%) σύμφωνα με το μητρώο ICalmR. Οι CALM-LQTS ασθενείς παρουσίασαν εξαιρετικά παρατεταμένο μέσο QTc ( $594 \pm 73$  ms) και υψηλό ποσοστό (78%) εκδήλωσης θνησιγενούς αρρυθμίας σε πολύ μικρή ηλικία. Επιπρόσθετα, ένα ποσοστό 83% των ασθενών παρουσίασε μια τυπική μορφολογία επαναπόλωσης που χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη έναρξη του κύματος T. Αυτό το μοτίβο στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (ECG) ομοιάζει με αυτό του συνδρόμου LQTS3 και του συνδρόμου Timothy. Το 58% των ασθενών εκδήλωσαν συνδυασμό συμπτωμάτων όπως η εξαιρετική παράταση QT, βραδυκαρδία, 2:1 κολποκοιλιακό φραγμό, αλλοιώσεις στο T κύμα του ECG και σοβαρά αρρυθμογενή επεισόδια κατά την



**Εικόνα 26 :** Σχηματικό μοντέλο της CaM όπου παρουσιάζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που κυρίως συμμετέχουν στην πρόσδεση των τεσσάρων Ca<sup>2+</sup>. Όλα τα χρωματισμένα αμινοξέα αφορούν τις θέσεις όπου έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις της CaM σε ασθενείς από το μητρώο ICalmR και από περιπτώσεις στο γενικό πληθυσμό (gnomAD database). Όλες οι αμινοξικές αλλαγές που έχουν μέχρι τώρα προσδιοριστεί παρουσιάζονται εντός των μεγάλων κύκλων με χρωματική κωδικοποίηση ανάλογα με το συσχετιζόμενο φαινότυπο : κόκκινο για το σύνδρομο LQTS, πράσινο για το σύνδρομο CPVT, κίτρινο για τα IVF,SUD και ατυπικό φαινότυπο και γκρι για τις περιπτώσεις που έχουν προσδιοριστεί από τη βάση δεδομένων gnomAD. Οι διπλοί χρωματισμοί αφορούν είτε σε επικάλυψη φαινοτύπου είτε σε συσχέτιση με πολλούς διαφορετικούς φαινοτύπους (Crotti *et al.*, 2019).



περιγεννητική περίοδο. Αυτή η εκδήλωση συμπτωμάτων τόσο νωρίς στο ηλικιακό φάσμα (περίπου έως τα 1.5 έτη) είναι ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτού του φαινοτύπου (91% του συνόλου όλων των περιπτώσεων καλμοδουλινοπάθειας). Μεταξύ των ασθενών, ένα ποσοστό 41% βρέθηκε να πάσχει και από δομικές καρδιακές ανωμαλίες (Crotti *et al.*, 2019).

Οι CALM-CPVT ασθενείς παρουσίασαν όλοι συμπτωματικά καρδιακά επεισόδια μετά από αδρενεργική διέγερση κατά την παιδική ηλικία, με χαρακτηριστικά CPVT που προκαλούνται μετά από στρες, όπως οι απομονωμένες πρόωρες κοιλιακές συστολές, οι μη διατηρούμενες κοιλιακές ταχυκαρδίες και μαρμαρυγές. Η εκδήλωση σοβαρών αρρυθμογενών επεισοδίων ήταν μικρότερη στη περίπτωση των CALM-LQTS ασθενών (48%), με έναρξη των συμπτωμάτων περίπου στην ηλικία των 6 ετών και με ένα ποσοστό εκδήλωσης καρδιακού θανάτου στο 14%. Τα διαθέσιμα ECGs, είτε ήταν φυσιολογικά είτε παρουσίαζαν ένα εμφανές κύμα U με ένα μοτίβο επαναπόλωσης όμοιο με αυτό που παρατηρείται στο σύνδρομο Andersen-Tawil (Crotti *et al.*, 2019).

Αξίζει να αναφερθεί πως σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών CALM-LQTS και CALM-CPVT, παρουσιάστηκαν ταυτόχρονα και ήπιες έως σοβαρές νευρολογικές βλάβες, όπως η επιληψία, η καθυστερημένη ανάπτυξη και η κινητική ή/και νοητική αναπηρία. Περίπου οι μισές εξ αυτών των περιπτώσεων ήταν αποτέλεσμα των καρδιακών ανακοπών, ενώ οι υπόλοιπες δεν σχετίστηκαν με αυτά και πιθανώς να συνδέονται αποκλειστικά με την εκδήλωση των CALM μεταλλάξεων (Crotti *et al.*, 2019).

Είναι γνωστό πως τα LQTS και CPVT σύνδρομα μπορούν να προκληθούν από δυσλειτουργία των Cav1.2 και RyR2 καναλιών (Landstrom, Dobrev and Wehrens, 2017). Πρωταρχικές μελέτες έχουν δείξει πως οι μεταλλάξεις της CaM προκαλούν διαταραγμένες αλληλεπιδράσεις και επηρεάζουν το άνοιγμα και το κλείσιμο αυτών των καναλιών. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, οι προσπάθειες διαχωρισμού και συσχέτισης του εκάστοτε φαινοτύπου με την τροποποίηση των γονιδίων ή την ταυτότητα της πρωτεϊνικής μετάλλαξης, της θέσης ή της συγγένειας σύνδεσης με το Ca<sup>2+</sup> έχουν προχωρήσει μόνο σε ένα πολύ βασικό επίπεδο (Hwang, Hyun-SeokNitu *et al.*, 2014). Αυτό όμως είναι απόλυτα λογικό δεδομένης της πολυπλοκότητας του μηχανισμού με τον οποίο η ίδια η CaMWT επιδρά στη λειτουργία των ιοντικών καναλιών.

Με βάση το λειτουργικό χαρακτηρισμό περίπου 11 CALM μεταλλάξεων (ετερόλογα συστήματα έκφρασης, κοιλιακά μυοκύτταρα θηλαστικών, καρδιομυοκύτταρα διαφοροποιημένα από ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, hiPSC-CMs), έχει προσδιοριστεί πως σε ένα γενικό πλαίσιο οι CALM-LQTS μεταλλάξεις κυρίως μειώνουν την συγγένεια σύνδεσης της CaM με το Ca<sup>2+</sup> στο C-λοβό, με επακόλουθη μείωση της Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενης απενεργοποίησης (CDI, Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation) των καναλιών Cav1.2, η οποία οδηγεί με τη σειρά της σε παρατεταμένα δυναμικά δράσης (Pirilas *et al.*, 2016). Αντιθέτως, οι CALM-CPVT μεταλλάξεις μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις αφορούν σε αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν άμεσα στην πρόσδεση του Ca<sup>2+</sup>. Οι λιγοστές λειτουργικές μελέτες έχουν υποδείξει ένα πιθανό μηχανισμό κατά τον οποίο, αυτές οι μεταλλάξεις αυξάνουν τη συγγένεια σύνδεσης της CaM με τον RyR2, αυξάνοντας την πιθανότητα το κανάλι να υιοθετήσει την ανοικτή του διαμόρφωση, οδηγώντας σε αυθόρμητη έκλυση Ca<sup>2+</sup> από το SR (Chazin and Johnson, 2020). Ωστόσο, πολύ πρόσφατη μελέτη κάνοντας χρήση ενός μοντέλου RyR2 σε HEK293 κύτταρα έδειξε πως οι μεταλλάξεις μείωσαν την CaM αναστολή της έκλυσης Ca<sup>2+</sup> μέσω του RyR2 και ταυτόχρονα αύξησαν την έκλυση Ca<sup>2+</sup> λόγω της υπερφόρτωσης Ca<sup>2+</sup> στο SR (Søndergaard, Liu, Brohus, *et al.*, 2019). Για το προσδιορισμό του μηχανισμού της λειτουργίας των CALM-CPVT μεταλλάξεων απαιτείται σίγουρα περαιτέρω λεπτομερής μελέτη, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τη δομική αλληλεπίδραση του RyR2 με την CaM όσο και το πώς ορισμένοι ρυθμιστές επιδρούν σε αυτή την αλληλεπίδραση. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως ορισμένες μεταλλάξεις της CaM μειώνουν την ενεργότητα της CaMKII, η οποία όπως έχει αναφερθεί παίζει σημαντικό ρόλο, στην αλληλεπίδραση μεταξύ CaM και RyR2 (Berchtold *et al.*, 2016).

Μέχρι σήμερα, παρόλο που η έρευνα γύρω από τις μεταλλάξεις της CaM εξελίσσεται με ταχύ ρυθμό, οι θεραπείες που έχουν εφαρμοστεί σε ασθενείς με καλμοδουλινοπάθειες θεωρούνται ανησυχητικά ανεπαρκείς (ανταρρυθμικά, β-αναστολείς, εμφυτεύματα κλπ.) (Crotti *et al.*, 2019). Για τον προσδιορισμό αποτελεσματικότερων θεραπειών απαιτείται πιο λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών που η CaM και οι μεταλλάξεις της τροποποιούν τη λειτουργία των ιοντικών καναλιών που έχουν συσχετισθεί με τον εκάστοτε φαινότυπο (LQTS, CPVT). Αυτή τη στιγμή, οι έρευνες δεν είναι σε σημείο να μπορούν να προβλέψουν τις συνέπειες μιας CaM μετάλλαξης σε

σχέση με μια συγκεκριμένη λειτουργία των ιοντικών καναλιών, πόσο μάλλον τον αντίκτυπο που μπορεί να έχει στην ευρύτερη κυτταρική λειτουργία ή τη φυσιολογία. Ωστόσο, μέσω των *in vitro* μελετών, υπάρχουν αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί προς διερεύνηση (Chazin and Johnson, 2020).

## Σκοπός διατριβής

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο να εμπλουτίσει το πεδίο έρευνας γύρω από το μηχανισμό αλληλεπίδρασης της CaM με τον RyR2 μέσω της μελέτης της επίδρασης νέων CaM-μεταλλάξεων, που έχουν συσχετισθεί με θνησιγενή αρρυθμιογενή καρδιακά σύνδρομα, τόσο στο ίδιο το μόριο της CaM όσο και στην αλληλεπίδραση με τον RyR2. Σκοπός είναι να διαπιστωθεί πώς η παρουσία των εκάστοτε μεταλλάξεων επηρεάζει τη δομή, τη θερμική σταθερότητα και την ικανότητα της CaM να δεσμεύει  $Ca^{2+}$ , καθώς και πώς αυτές οι μεταβολές επηρεάζουν τη σύνδεση της CaM σε δύο περιοχές του ανθρώπινου RyR2, την κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM (CaMBD2) και μία δεύτερη πιθανή περιοχή πρόσδεσης της CaM, που προσδιορίστηκε.

Για το σκοπό αυτό εκφράστηκαν και απομονώθηκαν σε υψηλή καθαρότητα ικανές ποσότητες ανασυνδυασμένης CaM αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών N54I, D96V, N98S, D130G, F142L, F90L, E105A, N98I, D132E, D134H και Q136P της. Ήδη σε προηγούμενα στάδια της μελέτης και σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Καρδιολογίας της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου του Cardiff, έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία πρωτόκολλα για την κλωνοποίηση και την απομόνωση τόσο για την αγρίου τύπου όσο και για μεταλλαγμένες μορφές της CaM (Nomikos *et al.*, 2014 ;Vassilakopoulou *et al.*, 2015).

Μέσω πειραμάτων κυκλικού διχροισμού (Circular Dichroism, CD) επαληθεύτηκε η σωστή αναδίπλωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που απομονώθηκαν και μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των μεταλλαγμένων μορίων τους σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη τόσο παρουσία όσο και απουσία  $Ca^{2+}$ .

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα δέσμευσης του  $Ca^{2+}$  στις μεταλλαγμένες μορφές της CaM με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού με τη χρήση καλά καθιερωμένων πρωτοκόλλων της διεθνούς βιβλιογραφίας (VanScyoc and Shea, 2001; VanScyoc *et al.*, 2002).

Για τις μεταλλάξεις N54I, D96V, N98S, D130G, F142L και F90L τα πειράματα επαναλήφθηκαν προς σύγκριση με τα νεότερα για τις N98I, D132E, D134H και Q136P.

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης τόσο της αγρίου τύπου CaM (CaMwt) και των μεταλλαγμένων μορφών N98I, D132E, D134H και Q136P με τον υποδοχέα RyR2, χρησιμοποιήθηκαν σύνθετικά πεπτίδια που αφορούν στην κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM (CaMBD2) και συνθετικά πεπτίδια που αφορούν σε πιθανές περιοχές πρόσδεσης της CaM στο καρβο-τελικό άκρο του ανθρώπινου RyR2. Από τη βιβλιογραφία, λόγω της εξαιρετικά μεγάλης δυσκολίας που παρουσιάζει η έκφραση και η απομόνωση ολόκληρου του υποδοχέα RyR2, έχει καθιερωθεί η χρήση συνθετικών πεπτιδίων για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων με τον υποδοχέα (Menegazzi *et al.*, 1994; Lau, Chan and Van Petegem, 2014). Επιπρόσθετα, έγινε χρήση τυχαία αναδιατεταγμένων συνθετικών πεπτιδίων (scrambled) που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες και η κύρια περιοχή πρόσδεσης της CaM (CaMBD2) στον RyR2, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, ώστε να επιβεβαιώσει την εγκυρότητα της αλληλεπίδρασης της CaMwt με μια άλλη πιθανή νέα περιοχή πρόσδεσης της CaM στον hRyR2. Όλες οι αλληλεπιδράσεις των συνθετικών πεπτιδίων με τους διαφόρους τύπους της CaM πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες απουσίας και παρουσίας  $Ca^{2+}$  και αποτυπώθηκαν ποσοτικά με χρήση της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τόσο της σταθεράς σύνδεσης και της στοιχειομετρίας, όσο και τη μεταβολή ενθαλπίας, εντροπίας και ελεύθερης ενέργειας Gibbs που συνοδεύουν τη σύνδεση.

Η μελέτη αυτή ενισχύει την ευρύτερη έρευνα που λαμβάνει χώρα την τελευταία δεκαετία πάνω στις μεταλλάξεις της CaM, καθώς μπορεί να επιτρέψει μια αποτελεσματικότερη συσχέτισή τους με τους εκάστοτε μηχανισμούς παθογένειας (CPVT,LQTS), δεδομένου πως οι βιοφυσικές μελέτες πραγματοποιούνται για όλες τις μεταλλάξεις στο ίδιο σύστημα. Τέλος, η μελέτη της αλληλεπίδρασης της CaMwt και των μεταλλαγμένων μορφών N98I, D132E, D134H και Q136P τόσο με την κύρια CaMBD, όσο και με άλλες πιθανές περιοχές πρόσδεσης στον RyR2, συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση του περίπλοκου μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ CaM και RyR2.

## **B. Πειραματικό Μέρος**

### **Κεφάλαιο 5. Παραγωγή ανασυνδυασμένων CaM και σύνθεση πεπτιδίων hRyR2**

#### **5.1 Κλωνοποίηση και έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακό σύστημα**

Η κλωνοποίηση (expression cloning) αποτελεί μία βασική τεχνική της Μοριακής Βιολογίας για την σύνθεση πρωτεϊνών. Στην τεχνική αυτή, αρχικά κλωνοποιείται το DNA που κωδικοποιεί την αλληλουχία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης (με τεχνικές PCR ή/και τη χρήση περιοριστικών ενζύμων) μέσα σε έναν κατάλληλο φορέα έκφρασης, που είναι συνήθως πλασμίδιο. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται στη συνέχεια σε βακτηριακά ή ευκαρυωτικά κυτταρα, με μία διαδικασία που είναι γνωστή ως μετασχηματισμός. Τα πλασμίδια αυτά είτε ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή, είτε παραμένουν ανεξάρτητα. Περίπου 1 στα 10.000 αρχικά κύτταρα θα μετασχηματιστεί επιτυχώς με το πλασμίδιο. Το πλασμίδιο περιέχει ειδικές αλληλουχίες προαγωγέων, που επάγουν την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης, καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τη προστασία των κυττάρων που θα το υποδεχτούν και τον εύκολο διαχωρισμό τους από αυτά που δεν μετασχηματίστηκαν επιτυχώς. Με το τρόπο αυτό, η επιθυμητή αλληλουχία βρίσκεται εντός του κυττάρου και μπορεί να εκφραστεί πλέον σε πρωτεΐνη με τη βοήθεια ειδικών χημικών παραγόντων (όπως IPTG, Isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside), που επιτρέπουν την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Η ποσότητα αυτή της πρωτεΐνης μπορεί στη συνέχεια να εκχυλιστεί από τα κύτταρα-ξενιστές.

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κλωνοποίησης και έκφρασης σε βακτηριακό σύστημα για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης CaM αγρίου τύπου (CaM WT) και των μεταλλαγμάτων της, με σκοπό τη μελέτη τους με φασματοσκοπία κυκλικού διχροϊσμού, φασματοσκοπία φθορισμού και θερμοδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης.

Τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω και αφορούν στην παραγωγή της CaM και των μεταλλαγμάτων της έλαβαν χώρα στο Ουαλικό Ινστιτούτο Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Cardiff.

### **5.1.1 Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων**

Η ανθρώπινη CaM (Αριθμός GenBank: AAD45181.1) ενισχύθηκε με τεχνικές PCR με τη βοήθεια ενζύμων Phusion Polymerase και κατάλληλων εκκινητών έτσι ώστε να εισαχθούν στην ακολουθία οι θέσεις αναγνώρισης 5'-KpnI και 3'-NotI και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο φορέα pHSIE. Οι εκκινητές ενίσχυσης της καλμοδουλίνης ήταν οι ακόλουθοι:

5'-GGAAGGTACCATGG CTGATCAGCTGACCGAAG-3' (forward) και 5'-GCAAGCGGCCGCTCAT TTTGCAGTCATCATCTGTAC-3' (reverse).

Για την έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της καλμοδουλίνης που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή, η CaM υποβλήθηκε σε σημειακή μεταλλαξιγένεση στο πλασμίδιο pHSIE (QuikChange II; Stratagene). Κάθε μια από τις μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με διδαιοξυνουκλεοτιδική αλληλούχιση (Applied Biosystems Big-Dye Ver 3.1 chemistry and model 3730 automated capillary DNA sequencer by DNA Sequencing & Services™).

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή της κατασκευής των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων της CaM και των μεταλλαγμάτων της.

### **Συνένωση πλασμιδίου με ένθεμα πρωτεϊνικού DNA (CaM<sub>WT</sub>)**

#### **Υλικά και Όργανα**

- ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης, pH 7,5 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1mM ATP) (NEB)
- T4 DNA λιγάση σε ρυθμιστικό διάλυμα φύλαξης (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 50% γλυκερόλη) (NEB)
- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- Θερμικός κυκλοποιητής GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer)

Η μοριακή αναλογία πλασμιδίου - ενθέματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 3:1. Το ένθεμα του DNA της πρωτεΐνης περιείχε τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν την CaM και είχε υποστεί πέψη με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπέστη πέψη και ο πλασμιδικός φορέας (pHSIE). Στο διάλυμα ενθέματος-πλασμιδίου προστέθηκε, σε ίση ποσότητα με το πλασμίδιο, T4 DNA λιγάση και κατάλληλη ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος και dH<sub>2</sub>O. Η κλωνοποίηση έγινε στους 16°C για 15h και το μείγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων One Shot® TOP10 *Escherichia coli*.

### **Μετασχηματισμός**

#### **Υλικά και Όργανα**

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

Για τον κάθε μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν 100μL των βακτηριακών κυττάρων One Shot® TOP10 *Escherichia coli*, τα οποία αφέθηκαν σε πάγο έως ότου επέλθει η τήξη τους. Στα κύτταρα αυτά προστέθηκαν 2-3μL του μείγματος κλωνοποίησης με ήπια ανάμιξη σε πάγο. Μετά από 30min, τα κύτταρα εμβαπτίστηκαν σε υδατόλουτρο στους 42°C για 45sec και επανατοποθετήθηκαν σε πάγο. 900μL του θρεπτικού μέσου LB προστέθηκαν στο κυτταρικό εναιώρημα και ακολούθησε επώαση στους 37°C για μία ώρα με συνεχή ανάδευση. 200μL της κυτταρικής καλλιέργειας επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με LB και τα κατάλληλα αντιβιοτικά και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16h.



## Ανάλυση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

### Υλικά και Όργανα

- Wizard® Plus SV Minipreps purification system (Promega)
- 50x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE αραιωμένο σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O με αναλογία 1:50
- αγαρόζη (BioRad)
- βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/mL (Sigma)
- 6x διάλυμα φόρτωσης (40% v/v σακχαρόζη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης)
- μάρτυρας μοριακών βαρών (1kb DNA ladder, Promega)
- εκμαγείο και χτένες
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- τράπεζα UV
- φωτογραφική μηχανή
- ρυθμιστικά διαλύματα περιοριστικών ενδονουκλεασών (NEB)
- BSA (NEB)
- περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoR I και Sal I (NEB)
- απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- μικροφυγόκεντρος
- υδατόλουτρο
- BigDye terminator sequencing kit (Perkin-Elmer)
- αναλύτης αλληλουχίας ABI Prism 377 sequencer (Perkin-Elmer)

Για να διαπιστωθεί ποιες από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, επιλέχθηκαν 10 αποικίες από κάθε τριβλίο. Για κάθε αποικία έγινε μικρής κλίμακας καλλιέργεια για να απομονωθεί στη συνέχεια το DNA από τα κύτταρα και να γίνει ο διαχωρισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η απομόνωση του πλασμιδικού DNA έγινε μέσω του Wizard® Plus SV Minipreps purification system σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η έκλυση του DNA έγινε με dH<sub>2</sub>O. 500ng πλασμιδικού DNA υποβλήθηκαν σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και το DNA

που αποκόπηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ενθέματος. Η τελική επιβεβαίωση έγινε μέσω αλληλούχισης στο πλασμιδιακό DNA μέσω του BigDye terminator sequencing kit σε θερμικό κυκλοποιητή και σε αναλυτή αλληλουχίας ABI Prism 377.

### **5.1.2. Πρωτεϊνική έκφραση, καθαρισμός και αποκοπή της ιντεΐνης της 6xHis-SUMO2-intein-CaM**

#### **Πρωτεϊνική έκφραση**

##### **Υλικά και Όργανα**

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

Για την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνικών μορφών (6xHis-SUMO2-intein-CaM-fusion protein), βακτηριακά κύτταρα BL21-Codon Plus (DE3)-RILP μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει την ετικέτα των έξι ιστιδινών (6His-tag), ακολουθώντας τη διαδικασία του μετασχηματισμού που περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση σε θρεπτικό υλικό LB που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό, στους 37°C για 14h με συνεχή ανάδευση, μέχρι η οπτική πυκνότητα (Optical Density - OD) να φτάσει την τιμή 0.6 στα 600 nm. Για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, προστέθηκαν 0.2 mM IPTG και η καλλιέργεια επώαστηκε στους 16°C για 18h. Τέλος, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 6000g για 15min σε θερμοκρασία 4°C. Η φύλαξη των κυττάρων έγινε στους -80°C.

## Καθαρισμός ενός σταδίου και αποκοπή ιντεΐνης

### Υλικά και Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα A, pH 8.5 (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Ιμιδαζόλη 20 mM, dH<sub>2</sub>O)
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (αναστολείς πρωτεασών (Pierce), 1 mg/mL λυσοζύμη, ρυθμιστικό διάλυμα A)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7.4 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αποκοπής, pH 6.0 (Bis-Tris 40 mM, Ιμιδαζόλη 20 mM, PBS)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, pH 6.0 (Bis-Tris 40 mM, Ιμιδαζόλη 500 mM, PBS)
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- Ρητίνη αγαρόζης Ni-NTA, Qiagen
- Snakeskin dialysis tubing 10 kDa MWCO, Pierce
- Φίλτρα (Millipore)
- Ομογενοποιητής υπερήχων
- Φυγόκεντρος

Η χρήση της συντετηγμένης συνοδού πρωτεΐνης SUMO (small ubiquitin-related modifier) έγινε για την επίτευξη καλύτερης διαλυτότητας και για τη σωστή αναδίπλωση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Η απομάκρυνση των συνοδών-πρωτεϊνών την τελευταία δεκαετία γίνεται με αυτο-αποκοπή των ιντεΐνών, οι οποίες εισάγονται συνήθως ανάμεσα στην συνοδό-πρωτεΐνη και την επιθυμητή πρωτεΐνη που εκφράζεται. Η αυτο-αποκοπή επιτυγχάνεται μέσω ήπιων αλλαγών στη θερμοκρασία και το pH κατά το στάδιο του καθαρισμού.

Σε συνέχεια, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης υπό θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησε επώαση μίας ώρας και ήπια κατεργασία με υπερήχους για τη λύση των κυττάρων. Ο διαχωρισμός των διαλυτών από τα μη διαλυτά κλάσματα πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση στα 20.000g για 20 min σε θερμοκρασία 4°C και κρατήθηκε μόνο το υπερκείμενο που περιείχε το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα. Μετά την εξισορρόπηση της ρητίνης με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 2mL ρητίνης αγαρόζης Ni-NTA

ανά λίτρο αρχικής καλλιέργειας προστέθηκαν στο υπερκείμενο και το εναιώρημα αναδεύτηκε για 30min στους 4°C, έτσι ώστε να επιτευχθεί η πρόσδεση των πρωτεϊνών που έφεραν την αλληλουχία των 6xHis, στην ρητίνη. Έπειτα, το εναιώρημα διήλθε μέσω στήλης με φίλτρο, οπότε τα σφαιρίδια της ρητίνης που είχαν δεσμεύσει τις 6xHis πρωτεΐνες παρέμειναν στη στήλη, ενώ απομακρύνθηκαν οι αδέσμευτες πρωτεΐνες. Ακολούθησαν εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα A, συνολικού όγκου 10 φορές τον όγκο της στήλης, και τέλος μία ακόμη έκπλυση με το ρυθμιστικό διάλυμα αποκοπής. Στη συνέχεια προστέθηκαν στη στήλη 2-3mL διαλύματος αποκοπής και η στήλη αφέθηκε σφραγισμένη για 3h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αυτο-αποκοπεί η ιντεΐνη. Ακολούθησε νέα έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα αποκοπής ώστε να εκλουστεί όλη η ποσότητα της CaM από τη ρητίνη της στήλης. Τα κλάσματα που παρελήφθησαν, υπέστησαν διαπύδηση με Snakeskin dialysis tubing 10kDa MWCO σε PBS στους 4°C για 16h. Μετά ακολούθησε συμπύκνωση του διαλύματος της πρωτεΐνης σε φίλτρα (Millipore) και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε μέσω BCA (Pierce). Τέλος, όλα τα κλάσματα αναλύθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου 15%.

## **5.2.Σύνθεση hRyR2 πεπτιδίων**

Πεπτίδια που αντιστοιχούν σε περιοχές του ανθρώπινου(h) υποδοχέα RyR2 με υψηλή πιθανότητα να αποτελούν θέσεις δέσμευσης της καλμοδουλίνης συντέθηκαν και απομονώθηκαν σε υψηλή καθαρότητα υπό τη μορφή λυοφιλοποιημένης σκόνης. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε στο Έργαστήριο Ανοσοπεπτιδικής Χημείας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος με τη πολύτιμη βοήθεια των Δρ. Ε. Λιβανίου και Δρ. Β. Βασιλακοπούλου.

### **5.2.1 Πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης (Solid-phase peptide synthesis,SPPS)**

Η τεχνική αυτή παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1963 από τον Merrifield (Merrifield, 1963) και αποτέλεσε ορόσημο στη χρήση των συνθετικών πεπτιδίων ως αντιδραστήρια στο πεδίο έρευνας της Χημείας και της Βιοϊατρικής. Η αρχή της πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης βασίζεται στα εξής:

1. Στην πρόσδεση του 1<sup>ου</sup> αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας σε ένα στερεό πολυμερές (ρητίνη). Η πρόσδεση γίνεται μέσω του ομοιοπολικού δεσμού που

αναπτύσσεται μεταξύ της  $\alpha$ -COOH του αμινοξέος και της ενεργού ομάδας ενός μορίου-συνδέτη (linker) που παρεμβάλλεται μεταξύ της ρητίνης και του 1<sup>ου</sup> αμινοξέος.

2. Στην ανάπτυξη του πεπτιδίου, πάνω στο πολυμερές, προσθέτοντας ένα αμινοξύ τη φορά, με τη μορφή του ενός σταδίου, μέχρι τη συναρμολόγηση της επιθυμητής αλληλουχίας. Τα αμινοξέα που προστίθενται κάθε φορά περιέχουν δύο προστατευτικές ομάδες. Η μία αποτελεί μόνιμη προστατευτική ομάδα (permanent protection group) της πλευρικής ομάδας του αμινοξέος, ενώ η άλλη αποτελεί παροδική προστατευτική ομάδα (temporary protection group) της  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> του αμινοξέος. Ο χαρακτηρισμός παροδική αναφέρεται στη δυνατότητα απομακρυνσης της προστατευτικής ομάδας από τα αντιδραστήρια της αντίδρασης σε αντίθεση με την μόνιμη, που δεν απομακρύνεται κατά τη διάρκεια των σταδίων της σύνθεσης.
3. Στην απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη στερεά φάση μετά την προσθήκη και του τελευταίου αμινοξέος.

### **Προστατευτικές ομάδες – Μεθοδολογία Fmoc**

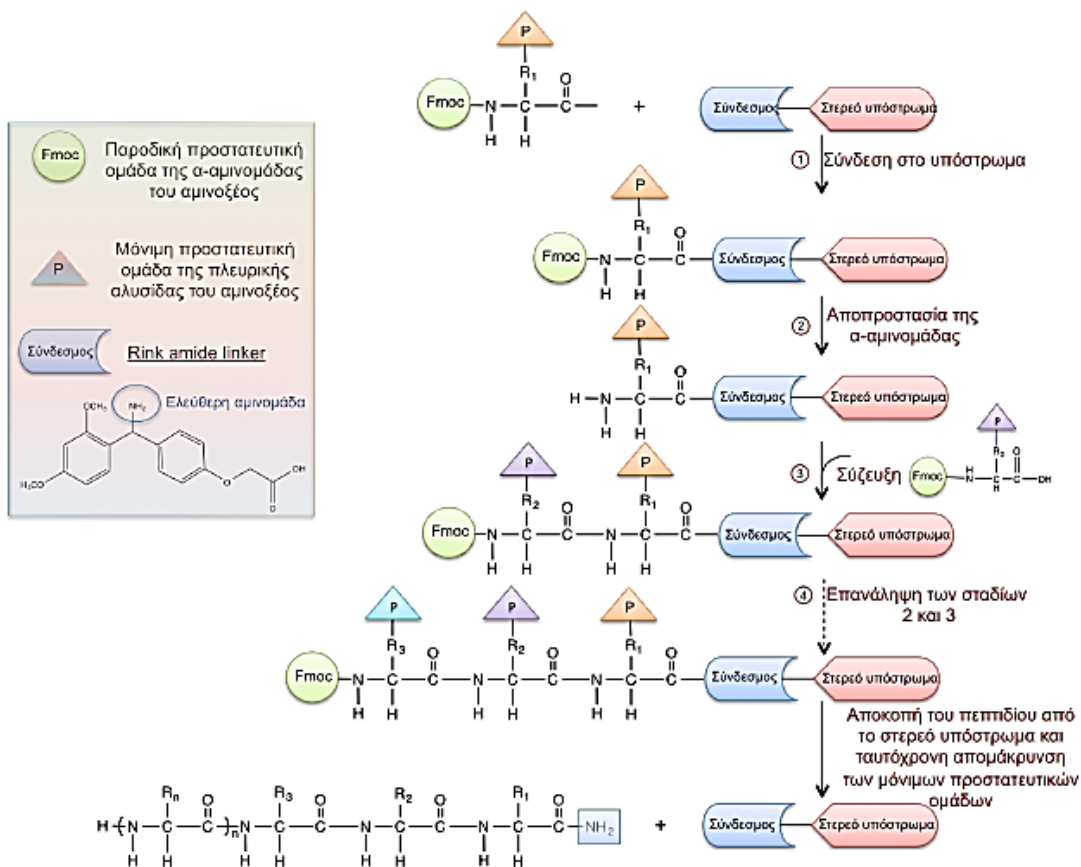
Κατά τη πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση, η προσωρινή προστασία των  $\alpha$ -αμινομάδων των αμινοξέων όσο και η μόνιμη προστασία των πλευρικών ομάδων, είναι απαραίτητη για την αποφυγή του πολυμερισμού ή/και των διακλαδισμένων παραπροϊόντων. Κατά τη σύνθεση των πεπτιδικών τμημάτων του hRyR2, χρησιμοποιήθηκαν οι προστατευτικές φθορομεθοξυκαρβονυλομάδες (Fmoc) για την προστασία της  $\alpha$ -αμινομάδας σε συνδυασμό με τριτοταγείς βουτυλομαδες/τριτυλομάδες για τις πλευρικές αμινομάδες. Η Fmoc απομακρύνεται σε ασθενώς βασικό περιβάλλον, ενώ οι μόνιμες βουτυλικές προστατευτικές ομάδες σε όξινες συνθήκες, γεγονός που επιτρέπει την απομάκρυνση των παροδικών ομάδων, παρουσία των μόνιμων.

Η μεθοδολογία της πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης με ομάδα Fmoc παροδικής προστασίας περιλαμβάνει συνοπτικά τα εξής στάδια :

1. Την ομοιοπολική σύζευξη του αμινοξέος που στο πεπτιδικό καρβοξυ-τελικό άκρο του πεπτιδίου που συντίθεται στη ρητινη μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου-συνδέτη (linker). Το αμινοξύ έχει προστατευμένες την  $\alpha$ -αμινομάδα και την πλευρική του ομάδα. Ο ομοιοπολικός δεσμός διατηρείται σταθερός καθόλη την σύνθεση.

2. Την απο-προστασία της α-αμινομάδας σε συνθήκες που η προστασία των πλευρικών ομάδων παραμένει σταθερή. Συγκεκριμένα, η ομάδα προστασίας Fmoc απομακρύνεται γρήγορα με πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, σε πολικό διαλύτη. Έτσι, η απομάκρυνση της Fmoc έγινε σε διάλυμα πιπεριδίνης 20-5-% σε DMF.
3. Την κατάλληλη ενεργοποίηση της καρβοξυλικής ομάδας του επόμενου αμινοξέος της αλληλουχίας και τη σύζευξη αυτού στην ελεύθερη αμινομάδα του προηγούμενου αμινοξέος, μέσω σχηματισμού ενός πεπτιδικού δεσμού.
4. Την επανάληψη των σταδίων της απο-προστασίας και της προσθήκης του επόμενου ενεργοποιημένου αμινοξέος έως ότου συντεθεί ολόκληρο το επιθυμητό πεπτίδιο.
5. Τέλος, την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ειδικά μείγματα αποκοπής, ανάλογα τη σύσταση των αμινοξέων του πεπτιδίου.

Όλα τα στάδια της SPPS έλαβαν χώρα σε ειδικό δοχείο ή κατάλληλα τροποποιημένη σύριγγα.



**Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε στάδιο της SPPS.**

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

- Διχλωρομεθάνιο (DCM)
- N, N'-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)
- Πιπεριδίνη
- Φασματοφωτόμετρο Shimadzu, UV-1800
- Ρητίνη (O-Cl Keton) GAMP

## **2. Αγκυροβόληση του πρώτου αμινοξέος**

- N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), Αιθυλο-2-κυανο-2-(υδροξυμίμο) οξικό (Oxyma), N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIC), Οξικός ανυδρίτης, δισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIEA)

- Νινυδρίνη, φαινόλη, απόλυτη αιθανόλη, πυριδίνη, υδατικό διάλυμα KCN 0,001 N

- Fmoc-αμινοξέα (Merck/Novabiochem)

## **3. Επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας**

- N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), Αιθυλο-2-κυανο-2-(υδροξυμίμο) οξικό (Oxyma), N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIC), HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate), Διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO)

- Οξικός ανυδρίτης, δισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIEA)

- Νινυδρίνη, φαινόλη, απόλυτη αιθανόλη, πυριδίνη, υδατικό διάλυμα KCN 0,001 N

- Fmoc-αμινοξέα, (Merck/Novabiochem)

## **4. Απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων και αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη**

- Τριφθοροξικό οξύ (TFA), τρισοπροπυλοσιλάνιο (TIS), 1,2 αιθανοδιθειόλη (EDT), διαιθυλαιθέρας (Et<sub>2</sub>O), θειοανισόλη, ανισόλη, βρωμίδιο του τετρα-n-βουτυλαμμωνίου (Bu<sub>4</sub>NBr)

- Πλαστικοί σωλήνες των 50 ml (falcons)

- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O

## **5. Καθαρισμός και ανάλυση πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)**

- Ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN), Sigma

- Τριφθοροξικό οξύ (TFA), Sigma

- Σύστημα ημιπαρασκευαστικής στήλης υγρής χρωματογραφίας υψηλής



απόδοσης αντίστροφης φάσης, (RP-HPLC) Waters αποτελούμενο από αντλία Model 600 και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) Model 486

- Σύστημα αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αντίστροφης φάσης, Waters, αποτελούμενο από αντλία Model 600E και ανιχνευτή τύπου 991 PDA.

- Στήλη 10 Nucleosil 7 C18 (250 x 12,7 mm ID), Macherey-Nagel
- Στήλη LiChrospher RP C18 (250 x 4,6 mm ID), Merck

Μετά τον καθαρισμό τα κλάσματα που περιέχουν τα πεπτίδια λυοφιλοποιούνται και αποθηκεύονται στους  $-35^{\circ}\text{C}$ . Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων γίνεται βάσει του μοριακού τους βάρους με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας με τη μέθοδο του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS) .

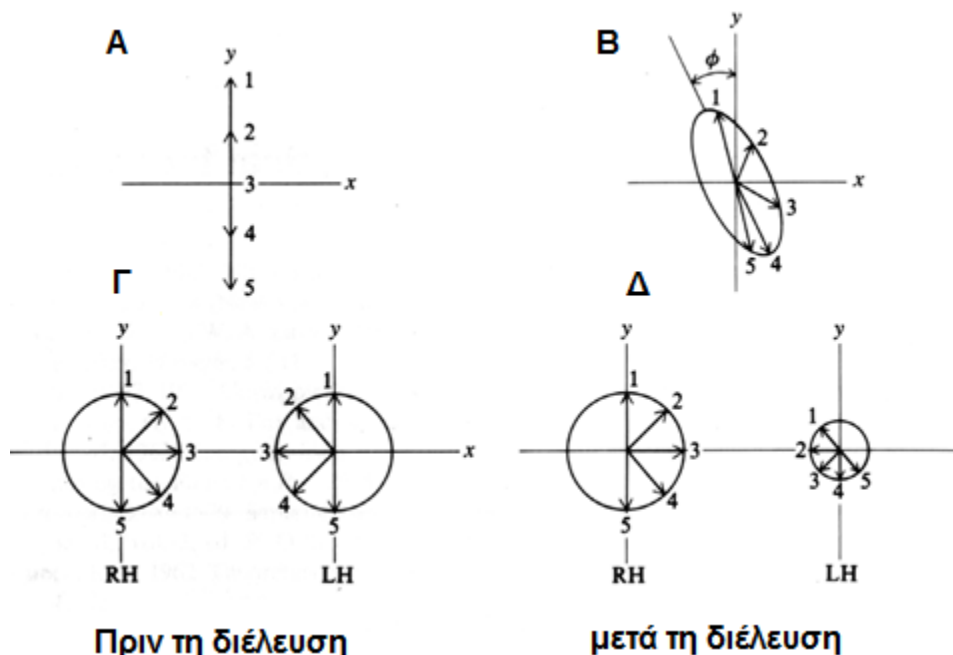
## Κεφάλαιο 6.Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχροϊσμού (Circular Dichroism-CD)

### 6.1.Γενικά στοιχεία

Οπτικά ενεργές ουσίες ονομάζονται αυτές που παρουσιάζουν τις παρακάτω χαρακτηριστικές ιδιότητες αλληλεπίδρασης με το φως :

1. Ισχύ οπτικής στρέψης (optical rotatory power), στρέφουν δηλαδή το επίπεδο πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός που διέρχεται μέσω αυτών
2. Κυκλική διπλοδιαθλαστικότητα (circular birefringence), παρουσιάζουν δηλαδή διαφορετικό δείκτη διάθλασης για δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως
3. Κυκλικό διχροϊσμό (circular dichroism), την αλλαγή δηλαδή της πόλωσης από γραμμική σε ελλειπτική όταν γραμμικά πολωμένο φως διέρχεται μέσω αυτών
4. Παρουσιάζουν διαφορετικό συντελεστή απορρόφησης για δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως.

Η στρέψη του επιπέδου πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός αποτελεί συνέπεια της κυκλικής διπλοδιαθλαστικότητας και ο κυκλικός διχροϊσμός συνέπεια της διαφοράς των συντελεστών απορρόφησης για αντίθετης φοράς κυκλικά πολωμένο φως. Από τις παραπάνω τέσσερις ιδιότητες οι δύο πρώτες (1 & 2) αφορούν στη διάθλαση και οι δύο τελευταίες (3 & 4) αφορούν στην απορρόφηση κυκλικά πολωμένου φωτός. Σύμφωνα με τις βασικές αρχές του ηλεκτρομανητισμού, η διάθλαση και η απορρόφηση συνδέονται καθώς ισχυρότερη απορρόφηση συνεπάγεται και ισχυρότερη διάθλαση. Έτσι, όποτε παρουσιάζεται ισχύς οπτικής στρέψης παρουσιάζεται και κυκλικός διχροϊσμός. Όταν λοιπόν μιλάμε για στρέψη του επιπέδου πόλωσης, ουσιαστικά αναφερόμαστε στη στρέψη του μεγάλου ημιάξονα της έλλειψης που διαγάφει το πολωμένο φως, ακόμη και σε περιοχές που το υλικό είναι διαφανές (Εικόνα 28) (Cantor & Schimmel, 1980).



**Εικόνα 28 :** Διανυσματική αναπαράσταση του ηλεκτρικού πεδίου στη διεύθυνση διάδοσης ακτινοβολίας για την περίπτωση ύπαρξης απορρόφησης οπτικά ενεργού ουσίας σε προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φως. Οι θέσεις 1 έως 5 αντιστοιχούν σε ίσα χρονικά διαστήματα. (Α) Προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φως. (Β) Εξερχόμενο ελλειπτικά πολωμένο φως με τον μεγάλο ημιάξονα της έλλειψης στραμμένο κατά γωνία  $\phi$  ως προς το αρχικό επίπεδο πόλωσης. (Γ) Ανάλυση γραμμικά πολωμένου φωτός σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες με αντίθετη φορά πόλωσης. (Δ) Η επίδραση της οπτικά ενεργού ουσίας στις κυκλικά πολωμένες συνιστώσες αντίθετης φοράς πόλωσης. Το άθροισμα των συνιστωσών του Δ δίνει το Β.

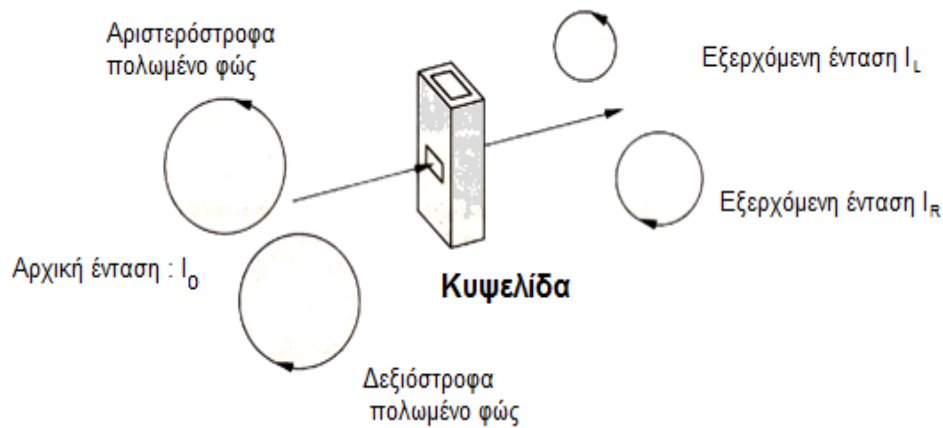
Η φορά της στρέψης του επιπέδου πόλωσης του γραμμικά πολωμένου φωτός είναι χαρακτηριστική της κατεύθυνσης διάδοσης και ανάλογη του πάχους του υλικού στο οποίο διέρχεται το φως. Ως ισχύς στρέψης ορίζεται η γωνία κατά την οποία στρέφεται το επίπεδο πόλωσης ανά μονάδα πάχους του υλικού.

Οι ανακάλυψη των οπτικά ενεργών ουσιών από τον Biot το 1815 ανέδειξε τη σύνδεση της οπτικής ενεργότητας με τη μοριακή δομή. Πράγματι, καθώς τα μόρια των υγρών δεν παρουσιάζουν κάποια προτιμητέα κατεύθυνση προσανατολισμού, η ισχύς οπτικής στρέψης θα πρέπει ουσιαστικά και αναγκαστικά να αποδοθεί σε κάποια ιδιαιτερότητα της δομής των μορίων καθ'αυτών. Σε αυτό το γεγονός στηρίζεται η χρήση της φασματοσκοπίας

οπτικής στρέψης και κυκλικού διχροϊσμού στη μελέτη της δομής, καθώς και των δομικών μεταπτώσεων των βιολογικών μορίων σε διάλυμα.

### Πειραματική διάταξη φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμου

Με την τεχνική του CD μετράται η ελλειπτικότητα  $\theta$  στην πόλωση που προκαλεί μία οπτικά ενεργός ουσία σε γραμμικά πολωμένο φως, συναρτήσει του μήκους κύματος  $\lambda$ . Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην ισοδυναμία των εικόνων Β και Δ του σχήματος . Δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως της ίδιας αρχικής έντασης  $I_0$  διέρχονται εναλλάξ στην κυψελίδα του υπο μελέτη δείγματος (Εικόνα 29).



**Εικόνα 29 :** Αντίθετης φοράς κυκλικά πολωμένες συνιστώσες της ίδιας έντασης  $I_0$  προσπίπτουν στην κυψελίδα που περιέχει την οπτικά ενεργό ουσία. Με  $I_L$  και  $I_R$  παριστάνονται οι διαφορετικές τιμές έντασης για την εξερχόμενη αριστερόστροφα και δεξιόστροφα πολωμένου φωτός ακτινοβολία αντίστοιχα.

Από τις τελικές τιμές της έντασης  $I_L$  και  $I_R$  της εξερχόμενης ακτινοβολίας υπολογίζεται η διαφορά των απορροφήσεων  $A_L$  και  $A_R$  και βάσει αυτής της διαφοράς υπολογίζεται τελικώς η ελλειπτικότητα  $\theta$  (σε μοίρες).

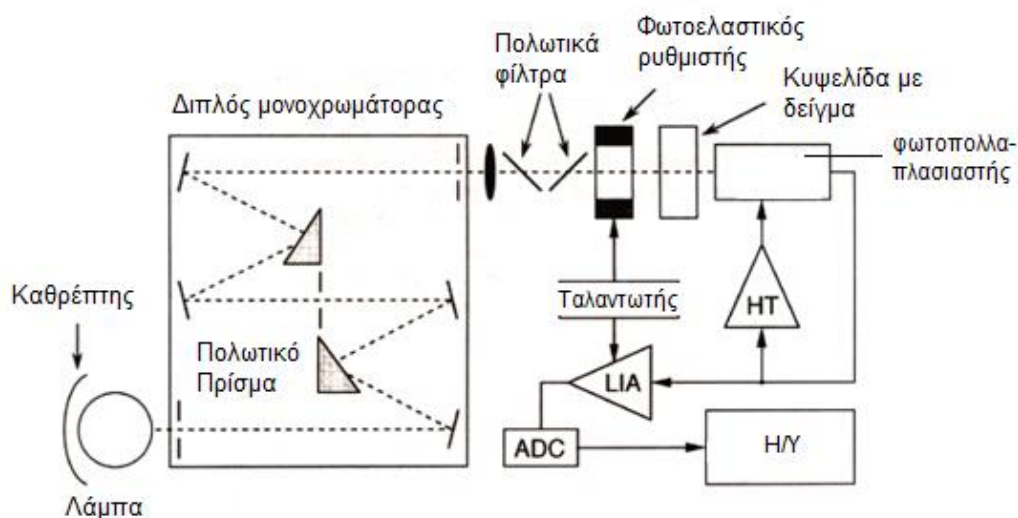
$$\theta = 2.303(A_L - A_R) \frac{180}{4\pi} \quad [\text{Εξίσωση 1}]$$

Η μοριακή ελλειπτικότητα  $[\theta]$ , ορίζεται από τη σχέση

$$\frac{100\theta}{cl} \quad [\text{Εξίσωση 2}]$$

όπου  $c$  η συγκέντρωση του δείγματος σε M και  $l$  το μήκος που διανύει η ακτινοβολία μέσα από το δείγμα σε cm.

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 30) παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση της διάταξης CD. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φωτοπολωσίμετρο JASCO-715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) με λειτουργικό εύρος μήκους κύματος στην περιοχή του ορατού (VIS) και του υπεριώδους (UV) ( $\lambda_{\min}=170$  nm).



**Εικόνα 30:** Η ακτινοβολία λυχνίας ξένου (Xe) διέρχεται από έναν διπλό μονοχρωμάτορα πόλωσης. Στη συνέχεια το γραμμικά πολωμένο φως, με τη βοήθεια ενός διαμορφωτή (modulator), μετατρέπεται σε κυκλικά πολωμένο, διέρχεται την κυψελίδα με το προς μελέτη δείγμα και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα μέσω ενός φωτοπολλαπλασιαστή. Το σήμα του φωτοπολλαπλασιαστή αποτελείται από μία συνιστώσα συνεχούς ρεύματος (DC) και μία εναλλασσομένου (AC). Ένας βρόχος θετικής ανάδρασης (positive feedback loop) εξασφαλίζει τη σταθερότητα της συνιστώσας DC ρυθμίζοντας την παροχή υψηλής τάσης του φωτοπολλαπλασιαστή. Η AC συνιστώσα, με συχνότητα αυτή του τροποποιητή, προκύπτει από την διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός από το δείγμα. Το πλάτος της συνιστώσας AC αποτελεί το μέτρο του κυκλικού διχροϊσμού. Μετά από διόρθωση (rectification) μέσω του ενισχυτή υψηλής ευαισθησίας ανίχνευσης φάσης (LIA: lock-in amplifier), η συνιστώσα AC μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα μέσω ενός μετατροπέα ADC και υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία στον υπολογιστή. Το φάσμα CD λαμβάνεται από σάρωση σε περιοχή μήκους κύματος με ταυτόχρονη μεταβολή του πλάτους διαμόρφωσης (Nolting, 1999).

## 6.2. Φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχροϊσμού και πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες, όπως σχεδόν τα περισσότερα βιολογικά μόρια, είναι οπτικά ενεργές ενώσεις. Τα χρωμοφόρα των πρωτεϊνών είναι ο πεπτιδικός δεσμός, τα αρωματικά αμινοξέα και ο δισουλφιδικός δεσμός. Τα επιμέρους αυτά δομικά στοιχεία απορροφούν ακτινοβολία σε διαφορετικού μήκους κύματος περιοχές και για αυτό το λόγο η φασματοπολωσιμετρία CD δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού αυτών των δομικών χαρακτηριστικών ενός πρωτεϊνικού μορίου σε διάλυμα.

Ο πεπτιδικός δεσμός απορροφά ακτινοβολία στην περιοχή του άπω υπεριώδους (far UV, 180 έως 250 nm). Το σήμα CD σε αυτή την περιοχή οφείλεται κυρίως στο ασύμμετρο περιβάλλον του πεπτιδικού δεσμού και όχι τόσο στο είδος και την αλληλουχία των αμινοξικών καταλοίπων. Συνεπώς, τα φάσματα CD οφείλονται κατά κύριο λόγο στη διαμόρφωση του πεπτιδικού σκελετού, δηλαδή στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής όπως η α-έλικα, η β-πτυχωτή επιφάνεια και το τυχαίο σπείραμα (random coil). Τα χαρακτηριστικού σχήματος και έντασης φάσματα CD παρουσιάζονται στην Εικόνα 31. Η α-έλικα στα CD φάσματα παρουσιάζει δύο χαρακτηριστικές αρνητικές κορυφές στα 208 nm και 222 nm και μία θετική κορυφή στα 293 nm. Η β-πτυχωτή επιφάνεια εμφανίζει μία ευρεία αρνητική κορυφή στα 218 nm και μία θετική στα 195 nm. Τέλος, το τυχαίο σπείραμα χαρακτηρίζεται από μία αρνητική κορυφή στα 200 nm και μία θετική στα 220 nm (Greenfield, 2006). Όταν το σήμα CD είναι μη μηδενικό στην περιοχή 180-250 nm τότε το πρωτεϊνικό μόριο βρίσκεται στην αναδιπλωμένη μορφή του.

Αξίζει να αναφερθεί πως όπως και στις περισσότερες φασματοσκοπικές τεχνικές, τα σήματα CD απεικονίζουν το μέσο όρο ολόκληρου του πρωτεϊνικού πλυθισμού. Οπότε, μπορεί να προσδιοριστεί το είδος και το ποσοστό των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής ενός πρωτεϊνικού μορίου και όχι σε ποια ακριβώς αμινοξικά κατάλοιπα υπάρχει η εκάστοτε διαμόρφωση. Για τον προσδιορισμό των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής μίας πρωτεΐνης συνήθως χρησιμοποιούνται προς σύγκριση φάσματα αναφοράς ομοπολυμερών που υιοθετούν εξολοκλήρου συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή (π.χ. L-λυσίνη).

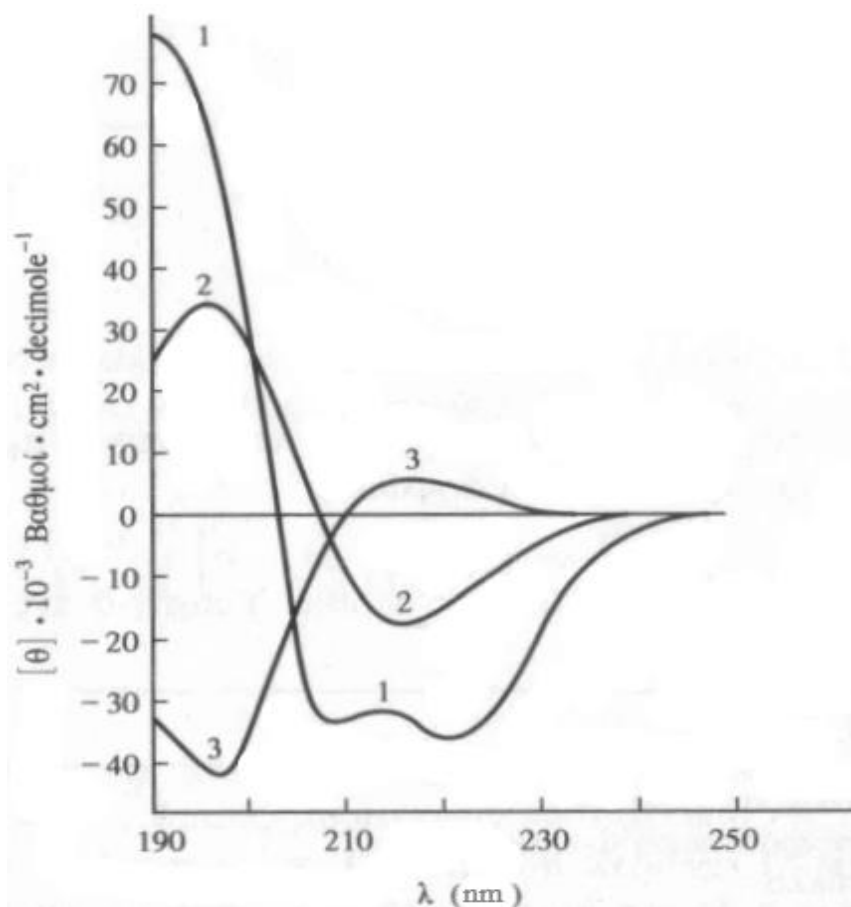
Οποιοδήποτε πρωτεϊνικό CD φάσμα μπορεί θεωρητικά να αναλυθεί ως γραμμικός συνδυασμός των χαρακτηριστικών φασμάτων των στοιχείων

δευτεροταγούς δομής του μορίου με την προσθήκη ενός όρου θορύβου, που αντικατοπτρίζει την συνεισφορά των αρωματικών χρωμοφόρων.

Οπότε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η εξίσωση :

$$\theta_{\lambda} = \sum F_i S_{\lambda,i} + \text{θόρυβος} \quad [\text{Εξίσωση 3}]$$

όπου  $\theta_{\lambda}$  ο κυκλικός διχροϊσμός της πρωτεΐνης σαν συνάρτηση του μήκους κύματος  $\lambda$ ,  $F_{i,\lambda}$  το κλάσμα συμμετοχής του κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής I στην όλη πρωτεϊνική διαμόρφωση και σε μήκος κύματος  $\lambda$  και όπου  $S_{\lambda,i}$  η ελλειπτικότητα σε μήκος κύματος  $\lambda$  του χαρακτηριστικού φάσματος κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής i.



**Εικόνα 31:** Κανονικοποιημένο φάσμα κυκλικού διχροϊσμού για την L-λυσίνη, όταν αυτή βρίσκεται σε διαφορετικές δομικές διαμορφώσεις ανάλογα με της ιδιότητες του διαλύματος. Η καμπύλη 1 αφορά στο φάσμα κυκλικού διχροϊσμού της α-έλικας, η καμπύλη 2 σε αυτό της β-πτυχωτής επιφάνειας και η καμπύλη 3 σε αυτό του τυχαίου σπειράματος.

Στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους (near UV, 250 nm έως 350 nm) απορροφούν ισχυρά ακτινοβολία τα αρωματικά αμινοξέα του πρωτεϊνικού μορίου. Η φαινυλαλανίνη παρουσιάζει κορυφή απορρόφησης στην περιοχή από 255 nm έως 270 nm, η τυροσίνη στην περιοχή από 275 nm έως 282 nm και η τρυπτοφάνη στην περιοχή από 290 nm έως 305 nm. Το σήμα CD σε αυτή την περιοχή μήκους κύματος (near UV) είναι μη μηδενικό μόνο όταν το άμεσο περιβάλλον των αρωματικών αμινοξέων είναι μη συμμετρικό, γιατί μόνο τότε το ηλεκτρονιακό νέφος των απεντοπισμένων ηλεκτρονίων του αρωματικού δακτυλίου συστρέφεται και αποκτά κατά κάποιον τρόπο «ελικοειδή» σχηματισμό. Ο σχετικά μικρός αριθμός των αρωματικών αμινοξέων, σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης, τα καθιστά ιδανικούς ανιχνευτές για αλλαγές ή και την ολοσχερή απώλεια της τριτοταγούς δομής. Για αυτό το λόγο τα CD φάσματα στο εγγύς UV θεωρούνται ενδεικτικά της τριτοταγούς δομής ενός πρωτεϊνικού μορίου. Όταν τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής διατηρούνται και παρουσιάζεται και σημαντικό σήμα στο εγγύς UV, μπορεί να υποθεθεί πως η προς μελέτη πρωτεΐνη είναι αναδιπλωμένη με αυστηρά καθορισμένη διαμόρφωση (Greenfield, 2004). Τέλος, το φάσμα CD στο εγγύς υπεριώδες είναι ευαίσθητο και σε μεταβολές στη δομή που οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων ή σε μεταβολή των συνθηκών του διαλύτη.

Συμπερασματικά η τεχνική της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχροϊσμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για:

1. Να διαπιστωθεί σχετικά γρήγορα η δευτεροταγής δομή και η σωστή αναδίπλωση μίας πρωτεΐνης που έχει παραχθεί με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA ή έχει απομονωθεί από κάποιο ιστό.
2. Να συγκριθούν δομικά μορφές της ίδιας πρωτεΐνης σε διαφορετικές συνθήκες (διαλύτη, T, pH κ.α.) ή και δομικές μεταβολές που προκαλούνται σε ένα πρωτεϊνικό μόριο από την ύπαρξη μεταλλάξεων.
3. Τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Αλλαγές στα φάσματα CD είναι ευθέως ανάλογες των πρωτεϊνικών συμπλόκων που δημιουργούνται και αυτές οι αλλαγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της συγγένειας σύνδεσης.
4. Τη μελέτη της σχετικής σταθερότητας ενός πρωτεϊνικού μορίου υπό διαφορετικές συνθήκες (T, pH, κ.α.).



### 6.3. Δευτεροταγής δομή και θερμική σταθερότητα των ανασυνδυασμένων CaM

Στην εργασία αυτή η τεχνική της φασματοπολωσιμετρίας CD χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σωστής αναδίπλωσης της ανασυνδυασμένης CaM και για να διαπιστωθεί η επίδραση που έχουν οι εκάστοτε μεταλλάξεις που μελετώνται στη δομή της CaMwt. Παράλληλα, μελετήθηκε με την τεχνική αυτή και η επίδραση που επιφέρει η εκάστοτε μετάλλαξη στην θερμική σταθερότητα του μορίου της CaM τόσο παρουσία όσο και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το φασματοπολωσίμετρο JASCO-715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με ένα σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας της κυψελίδας τύπου Peltier.

Οι ανασυνδυασμένες CaMwt και οι μεταλλαγμένες μορφές της διαλύθηκαν στους  $4^{\circ}\text{C}$  σε περίσσεια CD ρυθμιστικού διαλύματος (100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.4). Ακολούθησε φυγοκέντρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στις 10000 στροφές για 5min και το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίστηκε μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης με τη χρήση του συντελεστή μοριακής απόσβεσης  $\epsilon_{230\text{nm}} = 41,250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Klee, 1977). Προετοιμάσθηκαν πρωτεϊνικά δείγματα που περιλάμβαναν είτε 1 mM  $\text{CaCl}_2$  είτε 1mM EDTA.

Τα φάσματα των πρωτεϊνικών δειγμάτων (50  $\mu\text{M}$ ) στη περιοχή του άπω υπεριώδους (180 - 260 nm) συλλέχθηκαν με διαπερατές στην υπεριώδη ακτινοβολία κυψελίδες χαλαζία, οπτικής διαδρομής 0.02 cm στους  $4^{\circ}\text{C}$  παρουσία είτε 1 mM  $\text{CaCl}_2$  είτε 1 mM EDTA.

Οι καμπύλες θερμικής αποδιάταξης ('melting' curves) ελήφθησαν στα 221 nm (χαρακτηριστικό μήκος κύματος απορρόφησης της  $\alpha$ -έλικας) με θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων (12  $\mu\text{M}$ ) σταδιακά από τους  $4^{\circ}$  στους  $90^{\circ}\text{C}$  (αυξάνοντας κατά  $0.5^{\circ}\text{C}$  ανα μέτρηση σήματος) με μέσο ρυθμό θέρμανσης *ca.*  $30^{\circ}\text{C/h}$ .

Οι καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των ανασυνδυασμένων CaM προσαρμόστηκαν με χρήση του λογισμικού Origin (OriginLab) υποθέτοντας ένα εκ των δύο μοντέλων μετάβασης. Ανάλογα με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της μετάβασης δύο σταδίων (two-state transition) από τη φυσική (nature, N or folded) στη μετουσιωμένη (denaturated, D or unfolded, U) διαμόρφωση ή της μετάβασης τριών

σταδίων από τη φυσική (N) στη μετουσιωμένη (D) διαμόρφωση μέσω ενός ενδιάμεσου σταδίου (intermediate, I).

Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με το μοντέλο μετάβασης είναι οι ακόλουθες :

1. Μετάβαση δύο σταδίων (N→D)

$$\Delta\varepsilon = \frac{\Delta\varepsilon_N(T) + \Delta\varepsilon_D(T) \times \exp\left(\frac{\Delta H_{vH}}{RT} \left(\frac{T}{T_m} - 1\right)\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{vH}}{RT} \left(\frac{T}{T_m} - 1\right)\right)} \quad [\text{Εξίσωση 4}]$$

όπου R η παγκόσμια σταθερά αερίων και T η απόλυτη θερμοκρασία. Οι παράμετροι προσαρμογής ήταν η  $T_m$ , στην οποία το 50% της πρωτεΐνης είναι ξεδιπλωμένο (unfolded) και η ενθαλπία van't Hoff's,  $\Delta H_{vH}$  στο σημείο μετάβασης. Η κλίση και οι  $\Delta\varepsilon$ -όροι της φυσικής και μετουσιωμένης μορφής  $\Delta\varepsilon_{N,D}(T)$  θεωρήθηκαν ως γραμμικές συναρτήσεις. Εφόσον παρουσία ασβεστίου, δεν επιτεύχθηκε πλήρης μετουσίωση της πρωτεΐνης τα  $\Delta\varepsilon_D(T)$  απουσία ασβεστίου χρησιμοποιήθηκαν ως σταθερές. Οι συντελεστές προσαρμογής για τις προσαρμοσμένες καμπύλες έναντι των μετρήσεων ήταν  $r^2 > 0.99$ .

2. Μετάβαση τριών σταδίων (N→I→U)

$$\Delta\varepsilon(T) = \frac{I_n + S_n T + (I_I + S_I T) \times \exp\left(\frac{\Delta H_{vH,1}}{RT} \left(\frac{T}{T_{m,1}} - 1\right)\right) + (I_U + S_U T) \times \exp\left(\frac{\Delta H_{vH,1}}{RT} \left(\frac{T}{T_{m,1}} - 1\right)\right) + \frac{\Delta H_{vH,2}}{RT} \left(\frac{T}{T_{m,2}} - 1\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{vH,1}}{RT} \left(\frac{T}{T_{m,1}} - 1\right)\right) + \exp\left(\frac{\Delta H_{vH,1}}{RT} \left(\frac{T}{T_{m,1}} - 1\right)\right) + \frac{\Delta H_{vH,2}}{RT} \left(\frac{T}{T_{m,2}} - 1\right)} \quad [\text{Εξίσωση 5}]$$

όπου T η απόλυτη θερμοκρασία, I και S οι όροι και οι κλίσεις του σήματος στη φυσική ( $I_n$ ,  $S_n$ ), ενδιάμεση ( $I_I$ ,  $S_I$ ) και ξεδιπλωμένη ( $I_u$ ,  $S_u$ ) κατάσταση, R η παγκόσμια σταθερά αερίων,  $T_m$  και  $\Delta H_{vH}$  η θερμοκρασία και η ενθαλπία van't Hoff's στα σημεία μετάβασης. Καθώς δεν παρατηρήθηκε πλήρης μετουσίωση παρουσία ασβεστίου, χρησιμοποιήθηκαν τα  $I_u$  και  $S_u$  που ελήφθησαν απουσία ασβεστίου. Οι συντελεστές προσαρμογής για τις προσαρμοσμένες καμπύλες έναντι των μετρήσεων ήταν  $r^2 > 0.99$ .

Όλα τα φάσματα και μετρήσεις του κυκλικού διχροϊσμού έγιναν υπο την επίβλεψη του Dr. Konrad Beck (School of Dentistry, Cardiff University).

## Κεφάλαιο 7. Φασματοσκοπία φθορισμού

### 7.1.Γενικά στοιχεία

Φωταύγεια ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο εκπέμπεται ακτινοβολία (υπεριώδης, υπέρυθρη ή ορατή) από ένα υλικό, όταν αυτό διεγερθεί ηλεκτρονικά (Valeur, 2001).

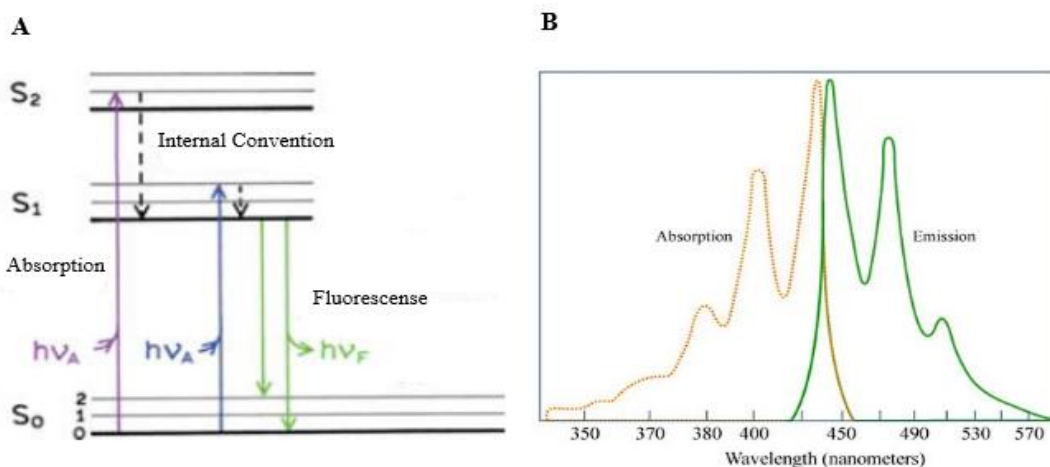
Υπάρχουν δύο τύποι φωταύγειας : ο φθορισμός και ο φωσφορισμός. Η αυθόρμητα εκπεμπόμενη ακτινοβολία κατά το φθορισμό λαμβάνει χώρα εντός ολίγων νάνο-δευτερολέπτων μετά την απορρόφηση της ακτινοβολίας διέγερσης, σε αντίθεση με το φωσφορισμό όπου η εκπομπή μπορεί να διαρκέσει ακόμη και ώρες (συνήθως όμως κυμαίνεται στην κλίμακα του δευτερολέπτου) (Atkins and De Paula, 2010).

Ο όρος φθορισμός (fluorescence) εισήχθη αρχικά από τον G.G.Stokes στα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα, παρόλο που η πρώτη αναφορά στο φαινόμενο ανήκει στον Ισπανό φυσικό N.Monardes το 1565. Ο Stokes στο άρθρο του “On the refrangibility of light” το 1852, παρουσίασε πως η εκπεμπόμενη ακτινοβολία κατά το φθορισμό έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος από την ακτινοβολία που απορροφήθηκε. Το φαινόμενο αυτό αργότερα ονομάστηκε μετατόπιση Stokes. Παρόλα αυτά η θεωρητική περιγραφή του φαινομένου, συνεπής με πειραματικά αποτελέσματα, δόθηκε το 1920 από τον Jablonski (Valeur, 2001).

Η απορρόφηση των φωτονίων της ακτινοβολίας, μεταφέρει το μόριο σε μια διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση. Ανάλογα με την ενέργεια του φωτονίου, τα ηλεκτρόνια του μορίου μπορούν να μεταβούν από τη θεμελιώδη κατάσταση ( $S_0$ ) σε ένα από τα υψηλότερα ενεργειακά δονητικά επίπεδα των διεγερμένων καταστάσεων ( $S_1, S_2$ , κ.ο) (Εικόνα 32A). Οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις αυτές λαμβάνουν χώρα πολύ γρήγορα ( $10^{-15}$ sec) σε σύγκριση με τις κινήσεις των πυρήνων του μορίου ( $10^{-12}$ sec), έτσι η ταχύτητα και η θέση τους μένουν σχεδόν ανεπηρέαστες από τις μεταξύ τους συγκρούσεις (Frank-Condon principle) (Permjakov, 1994). Συνήθως, όταν τα ηλεκτρόνια διεγερθούν στα υψηλότερα ενεργειακά δονητικά επίπεδα ( $S_1, S_2$ ), λόγω της απώλειας ενέργειας εξαιτίας των συγκρούσεων, γρήγορα επιστρέφουν και ‘χαλαρώνουν’ στην ενεργειακά υψηλότερη δονητική θέση της πρώτης ενεργειακής κατάστασης ( $S_1$ ). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται εσωτερική μετατροπή (internal convention) και συνήθως ολοκληρώνεται σε διάστημα

μικρότερο των  $10^{-12}$ sec. Λόγω αυτής της γρήγορης μετάβασης, το φάσμα εκπομπής είναι συνήθως ανεξάρτητο από το μήκος κύματος διέγερσης. Στη συνέχεια από το επίπεδο αυτό (S1) τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στη θεμελιώδη κατάσταση (So) με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας (Lakowicz, 2006).

Η μετάβαση στην θεμελιώδη κατάσταση δεν οδηγεί απαραίτητα και στη χαμηλότερη δονητική μορφή, οπότε το φάσμα εκπομπής θα αποτυπώνει τις διάφορες ενεργειακές καταστάσεις του μορίου. Η μετάβαση από και προς την θεμελιώδη κατάσταση στην χαμηλότερη ενεργειακά δονητική μορφή (So ↔ S1) είναι συνήθως ενεργειακά ισοδύναμη, σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταβάσεις που χαρακτηρίζονται από ενεργειακές απώλειες. Εξαιτίας αυτού στο φάσμα (Εικόνα 32B) μπορεί να υπάρχει επικάλυψη μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής στην περιοχή που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη μετάβαση. Το υπόλοιπο φάσμα εκπομπής αφορά σε χαμηλότερες ενέργειες και αυτό εξαρτάται από το περιβάλλον (διαλύτης) της διεγερμένης κατάστασης. Για παράδειγμα, όσο πιο πολικός είναι ο διαλύτης τόσο μεγαλύτερη μετατόπιση έχουμε προς χαμηλότερες ενέργειες, ακόμη και πιθανή σβέση του φθορισμού (Atkins & De Paula, 2010; Lakowicz, 2006).

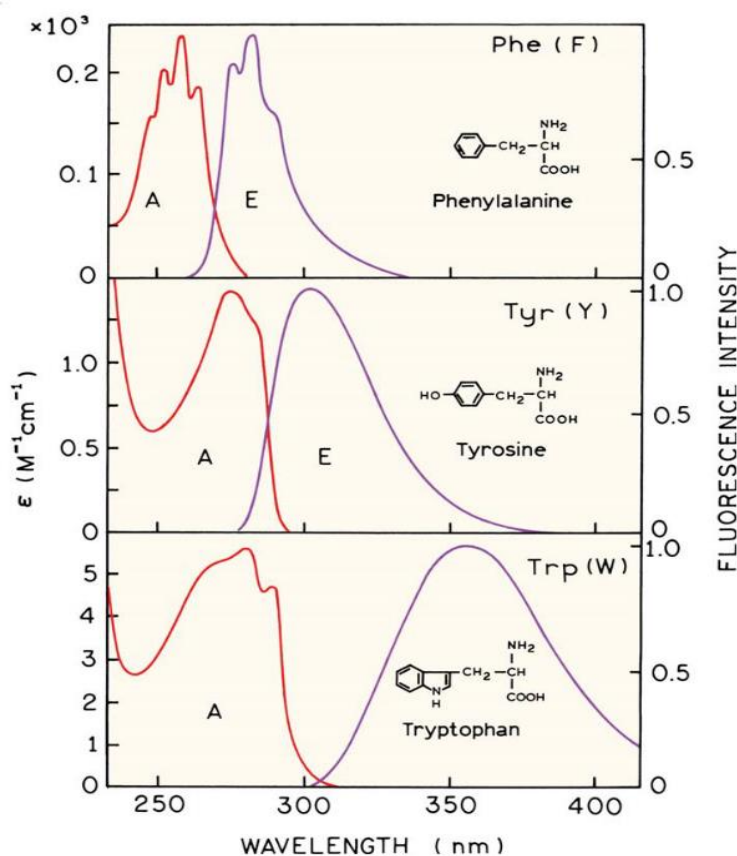


**Εικόνα 32:** **A.** Τυπικό διάγραμμα Jablonski. Η θεμελιώδης ηλεκτρονιακή κατάσταση (singlet ground state) συμβολίζεται με So, ενώ με S1 και S2 δύο δονητικά διαφορετικές διεγερμένες καταστάσεις (excited states). Η απορρόφηση ακτινοβολίας ( $h\nu_A$ ) οδηγεί από τη θεμελιώδη στις διεγερμένες καταστάσεις και έπειτα λόγω ενεργειακών απωλειών το διεγερμένο μόριο πέφτει σε χαμηλότερης ενέργειας δονητικά επίπεδα, έως όπου επιστρέψει στην θεμελιώδη κατάσταση με εκπομπή ακτινοβολίας φθορισμού ( $h\nu_F$ ). **B.** Χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής του περυλενίου (perylene), όπου διακρίνεται η μετατόπιση σε χαμηλότερες συχνότητες καθώς και οι μεταβάσεις που συμπίπτουν, δίνοντας την κατοπτρική εικόνα της απορρόφησης.

## 7.2. Φθορισμός πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες διαθέτουν τρία αρωματικά αμινοξέα τα οποία συνεισφέρουν στο φθορισμό. Αυτά είναι η φαινυλαλανίνη (Phe), η τυροσίνη (Tyr) και η τρυπτοφάνη (Trp). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 33, η τρυπτοφάνη διαθέτει έναν ινδολικό δακτύλιο, η τυροσίνη έχει ένα αρωματικό υδροξύλιο και η φαινυλαλανίνη μόνο ένα βενζολικό δακτύλιο.

Η τρυπτοφάνη εξαιτίας της ευαισθησίας του ινδολικού δακτυλίου, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πολικότητα του διαλύτη ή/και το τοπικό περιβάλλον. Σε ένα μη-πολικό περιβάλλον η τρυπτοφάνη εμφανίζει μετατόπιση προς το μπλε στο φάσμα εκπομπής της (blue shift). Καθώς λοιπόν, η τρυπτοφάνη συμμετέχει σε περισσότερους δεσμούς υδρογόνου ή εκτίθεται σε νερό, η εκπομπή μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (Lakowicz, 2006).



Εικόνα 33: Φάσματα απορρόφησης (A) και εκπομπής (E) των αρωματικών αμινοξέων σε pH 7 υδατικού διαλύματος.

**Πίνακας 8:** Χαρακτηριστικά μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού των αρωματικών αμινοξέων

Αμινοξύ	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (nm)	Μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής (nm)
Trp	280	350
Tyr	274	303
Phe	257	282

Από την Εικόνα 33 (και συμπερασματικά από τον πίνακα 8) βλέπουμε πως η εκπομπή της τρυπτοφάνης κυριαρχεί των άλλων δύο αμινοξέων, παρόλο που βρίσκεται σε μικρό ποσοστό στις πρωτεΐνες, καθώς απορροφά και εκπέμπει στο μεγαλύτερο μήκος κύματος.

Η εκπομπή της τυροσίνης σε υδατικό διάλυμα συμβαίνει στα 303nm και δεν εξαρτάται ιδιαίτερα από την πολικότητα του διαλύτη. Τα κατάλοιπα τυροσίνης απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στις πρωτεΐνες από αυτά της τρυπτοφάνης. Η αποδιέγερση των καταλοίπων της τυροσίνης μπορεί να γίνει με μεταφορά ενέργειας προς κοντινά κατάλοιπα τρυπτοφάνης αλλά και μέσω της μετάπτωσης σε μια διεγερμένη κατάσταση ιοντισμού μετά την αποπρωτονίωση του αρωματικού της υδροξυλίου (Lakowicz, 2006).

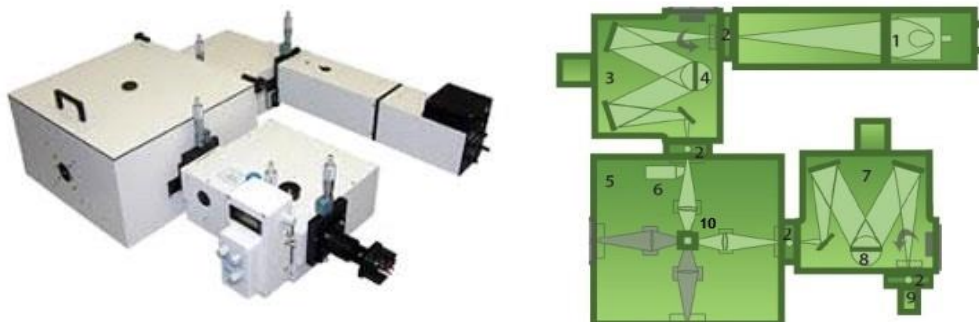
Ο φθορισμός των πρωτεϊνών γενικώς λαμβάνει χώρα μετά από διέγερση σε μήκη κύματος κοντά στα 280nm ή και μεγαλύτερα. Κατά συνέπεια η φαινυλαλανίνη, που απορροφά και εκπέμπει στα μικρότερα μήκη κύματος, συνήθως στα περισσότερα πειράματα δεν διεγείρεται και ο συντελεστής κβαντικής απόδοσής της κυμαίνεται κοντά στο 0.03. Αυτό σημαίνει πως και η εκπομπή της παρατηρείται συνήθως μόνο απουσία των καταλοίπων τυροσίνης και τρυπτοφάνης. Οι συντελεστές κβαντικής απόδοσης της τυροσίνης και τρυπτοφάνης είναι 0.14 και 0.13 αντίστοιχα.

Εξαιτίας της διαφοράς στους συντελεστές κβαντικής απόδοσης παρατηρείται μεταφορά ενέργειας μεταξύ των κοντινών αρωματικών καταλοίπων που ακολουθεί τη σειρά: Phe → Tyr → Trp (Lakowicz, 2006).

Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι μια από της πλέον συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους στη βιομοριακή φυσική. Παρέχει εξαιρετική ευαισθησία στις μεταβολές της διαμόρφωσης των βιομορίων και, παρόλο που δεν δίνει λεπτομερείς δομικές πληροφορίες, χρησιμοποιείται για τη μελέτη των δυναμικών χαρακτηριστικών των βιομορίων. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη της χημικής αποδιάταξης των πρωτεϊνών, αλλά και για την φυσικοχημική μελέτη της δέσμευσης μικρομορίων σε βιομόρια.

Σε αυτή την εργασία η μέθοδος της φασματοσκοπίας σταθερής κατάστασης χρησιμοποιήθηκε κυρίως για τη μελέτη της δέσμευσης του ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) στο μόριο της καλμοδουλίνης και των μεταλλαγμένων μορφών της, διότι η πρωτεΐνη αλλάζει διαμόρφωση κατά τη δέσμευση των  $\text{Ca}^{2+}$  με αποτέλεσμα να αλλάζει και η εκπομπή του φθορισμού των αρωματικών της αμινοξικών της καταλοίπων ανάλογα με το κατά πόσο εκτίθενται ή όχι στο διαλύτη. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα χημικής αποδιάταξης για τη μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων στο μόριο της CaM, τα οποία όμως λόγω της μεγάλης δομικής ευκαμψίας του μορίου δεν απέδωσαν αποτελέσματα και έτσι δεν αναφέρονται στην παρούσα εργασία.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση ενός φθορισμομέτρου. Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι το φθορισμόμετρο PTI Quantamaster 400 (Photon Technology International Incorporation, NJ, USA).



**Εικόνα 34:** Φωτογραφία και σχηματική αναπαράσταση της διάταξης PTI Quantamaster που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων φθορισμού σταθερής κατάστασης. 1) Λάμπα Xe 75Watt με ωφέλιμο εύρος ακτινοβολίας 185-680 nm. 2) Οπές διέλευσης ακτινοβολίας προσαρμόσιμης διαμέτρου. 3) Μονοχρωμάτορας διέγερσης. 4) Excitation grating. 5) Θάλαμος δείγματος. 6) Συσκευή διόρθωσης ακτινοβολίας διέγερσης. 7) Μονοχρωμάτορας εκπομπής. 8) emission grating. 9) Διάταξη φωτοπολλαπλασιαστή. 10) Θέση κυψελίδας δείγματος.

### **7.3.Μελέτη της δέσμευσης του ασβεστίου στην CaMwt και τα μεταλλάγματα της με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού σταθερής κατάστασης (Steady-state fluorescence spectroscopy)**

Η CaM είναι πρωτεΐνη που διαθέτει δύο από τα αρωματικά αμινοξέα που συνεισφέρουν στο φθορισμό, την τυροσίνη και την φαινυλαλανίνη. Αμινοξικά κατάλοιπα τρυπτοφάνης δεν συναντώνται στο μόριο αυτό. Στο C-λοβό της διαθέτει δύο αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης και τρία φαινυλαλανίνης, ενώ στο N-λοβό της πέντε αμινοξικά κατάλοιπα φαινυλαλανίνης. Έτσι, μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού μπορούν να προσδιοριστούν οι μεταβολές στη συγγένεια σύνδεσης του κάθε λοβού της πρωτεΐνης και των μεταλλαγμάτων της με το ασβέστιο.

Η δέσμευση των ιόντων ασβεστίου στις υψηλής συγγένειας θέσεις σύνδεσης III & IV του C-λοβού μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της παρακολούθησης της ασβεστο-εξαρτώμενης μεταβολής της έντασης της εκπομπής του φθορισμού της τυροσίνης ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 277 \text{ nm}/320 \text{ nm}$ ). Ενώ, η δέσμευση των ιόντων ασβεστίου στις χαμηλής συγγένειας θέσεις σύνδεσης I & II του N-λοβού, μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της



παρακολούθησης της ασβεστο-εξαρτώμενης μεταβολής της έντασης της εκπομπής του φθορισμού της φαινυλαλανίνης ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 250 \text{ nm}/280 \text{ nm}$ ). Με τη χρήση των συγκεκριμένων ζευγών διέγερσης και εκπομπής της τυροσίνης και της φαινυλαλανίνης μπορεί να παρατηρηθεί η μεταβολή της έντασης του φθορισμού για κάθε λοβό ξεχωριστά στο μόριο της CaM (VanScyoc and Shea, 2001).

Η ασβεστο-εξαρτώμενη μεταβολή της έντασης της εκπομπής φθορισμού της φαινυλαλανίνης, αντικατοπτρίζει την κατάληψη των χαμηλής συγγένειας θέσεων δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$ , I & II του N- λοβού της CaM καθώς έχει αποδειχθεί πως τα αμινοξικά κατάλοιπα της φαινυλαλανίνης του C-λοβού δεν εκπέμπουν, όταν το δείγμα της πρωτεΐνης διεγερθεί στα 250 nm και μετρηθεί η ένταση εκπομπής του φθορισμού στα 280 nm . Ακόμη, η εκπομπή των καταλοίπων της τυροσίνης του C-λοβού δεν επιδρά στα σήματα φθορισμού των καταλοίπων της φαινυλαλανίνης του N-λοβού (VanScyoc *et al.*, 2002).

Όλα τα πρωτεϊνικά δείγματα (CaMwt και μεταλλάξεις) μεταφέρθηκαν μέσω διαπίδυσης σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM KCl, 0.05 mM EGTA και 5 mM NTA, ώστε να αντιμετωπιστεί πιθανή επιμόλυνση ασβεστίου αλλά και για την εξισορρόπηση των μικρών διαφορών στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

Τα πρωτεϊνικά διαλύματα, τα φάσματα εκπομπής των οποίων συλλέχθηκαν, αποτελούνταν από 6  $\mu\text{M}$  πρωτεΐνης και 4 nM της φθορίζουσας ασβεστο-δεσμευτικής βαφής Fluo-5N καθώς και  $\text{CaCl}_2$  σε εύρος συγκεντρώσεων 0-15 mM ( $[\text{Total Ca}^{2+} = 0-15 \text{ mM}]$ ).

Η δέσμευση των ιόντων ασβεστίου στις θέσεις του αμινο-τελικού άκρου (N- domain binding sites) της CaM μελετήθηκε με επιλεκτική διέγερση των καταλοίπων της φαινυλαλανίνης στα 250 nm και παρακολούθηση της μεταβολής της έντασης των φασμάτων εκπομπής της στα 280 nm. Αναλόγως η δέσμευση των ιόντων ασβεστίου στις θέσεις του καρβόξυ-τελικού άκρου (C-domain binding sites μελετήθηκε παρακολουθώντας τη μεταβολή της έντασης των φασμάτων εκπομπής της τυροσίνης στα 320nm, μετά από επιλεκτική διέγερση στα 277 nm.

Η ελεύθερη συγκέντρωση του ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Free Ca}^{2+}]$ ) για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με διέγερση της βαφής Fluo-5N στα 467 nm και παρακολούθηση της

μεταβολής της έντασης φθορισμού στα 510 nm (ορατό φάσμα). Απουσία  $Ca^{2+}$ , η βαφή δεν εμφανίζει εκπομπή στο ορατό φάσμα, ενώ όταν συνδεθεί με κάποιο  $Ca^{2+}$  αποκτά πράσινη απόχρωση. Η ελεύθερη συγκέντρωση των  $Ca^{2+}$  προσδιορίζεται, διότι λόγω συνεργατικότητας των δύο θέσεων δέσμευσης  $Ca^{2+}$  στον κάθε λοβό, από το διάγραμμα της εκπομπής του φθορισμού σε συνάρτηση με την ελεύθερη συγκέντρωση του ασβεστίου μπορεί να προσδιοριστεί η  $K_d$  που αφορά στη σύνδεση των  $Ca^{2+}$  ( $K_d$  είναι περίπου η τιμή της ελεύθερης συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$  για  $Y=0,5$ ).

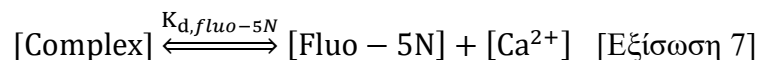
Οι μετρήσεις των φασμάτων εκπομπής πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση του φθορισμομέτρου Quantamaster-400 (Photon Technology International, Inc.), το οποίο διαθέτει λάμπα ξένου (Xe) ισχύος 75 Watt και κυψελίδα χαλαζία 4 mL με μήκος διαδρομής 1cm (Roth). Ο ρυθμός σάρωσης σε όλες τις μετρήσεις ήταν στα 0.5 nm/sec και 5 nm bandpasses.

Όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 4 φορές και το τελικό φάσμα προέκυψε από το μέσο όρο των φασμάτων που συλλέχθηκαν, αφαιρώντας κάθε φορά τα φάσματα των αντίστοιχων 'τυφλών' μετρήσεων.

Με βάση τις μετρήσεις των φασμάτων εκπομπής μπορεί να υπολογιστεί η ελεύθερη συγκέντρωση ασβεστίου σε κάθε δείγμα από την εξίσωση:

$$[Free Ca^{2+}] = K_{d,fluo-5N} \frac{F^{Max} - F}{F - F^{Min}} \quad [Εξίσωση 6]$$

όπου:  $F^{Min}$  και  $F^{Max}$  οι τιμές της έντασης φθορισμού της βαφής Fluo-5N στα 510 nm, σε συνθήκες απουσίας  $Ca^{2+}$  και σε συνθήκες κορεσμού  $Ca^{2+}$  αντίστοιχα,  $F$  η ένταση φθορισμού του προς μελέτη διαλύματος και  $K_{d,fluo-5N}$  η σταθερά διάστασης της ισορροπίας:



Η σταθερά  $K_{d,fluo-5N}$  της βαφής μετρήθηκε σε ξεχωριστά πειράματα και βρέθηκε ίση με  $92 \pm 3 \mu M$  στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή.

Στη συνέχεια, τα πειραματικά δεδομένα κανονικοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού Origin® 7.0 (OriginLab) ως προς την ένταση φθορισμού και προσαρμόστηκαν

με μη-γραμμικό τρόπο σε μια συνάρτηση Adair για δύο μη-ισοδύναμες θέσεις σύνδεσης που εμφανίζουν συνεργατικότητα:

$$Y = \frac{K_1[\text{Free Ca}^{2+}] + 2K_2[\text{Free Ca}^{2+}]^2}{2(1 + K_1[\text{Free Ca}^{2+}] + K_2[\text{Free Ca}^{2+}]^2)} \quad [\text{Εξίσωση 8}]$$

όπου:  $K_1 = k_1 + k_2$  το άθροισμα των μικροσκοπικών σταθερών ισορροπίας των δύο θέσεων δέσμευσης,  $K_2 = k_1 k_2 k_c$  η σταθερά ισορροπίας για δέσμευση και στις δύο θέσεις σύνδεσης, ενώ με  $Y$  συμβολίζεται ο βαθμός πληρότητας των θέσεων δέσμευσης (Ackers, Shea and Smith, 1983). Οι συντελεστές προσαρμογής για τις προσαρμοσμένες καμπύλες έναντι των μετρήσεων ήταν  $r^2 > 0.99$ .

Ο όρος  $Y$  είναι γραμμικός συνδυασμός του φθορισμού  $F_i$  όλων των χημικών ειδών που βρίσκονται στο δείγμα, ανάλογα με το πληθυσμό τους  $Y_i$  ( $Y = \sum Y_i F_i + \text{noise}$ ).

Το  $k_1$  αντικατοπτρίζει την πιθανότητα να είναι κατειλημμένη η μία θέση δέσμευσης του εκάστοτε λοβού με  $\text{Ca}^{2+}$ . Το  $k_2$  αφορά στην πιθανότητα να είναι κατειλημμένη και η δεύτερη θέση δέσμευσης του λοβού με  $\text{Ca}^{2+}$ . Το  $K_1$  δείχνει την πιθανότητα να είναι κατειλημμένη είτε η πρώτη είτε η δεύτερη θέση δέσμευσης με  $\text{Ca}^{2+}$  και το  $K_2$  αντικατοπτρίζει την πιθανότητα να είναι κατειλημμένες και οι δύο θέσεις  $\text{Ca}^{2+}$ .

Η σταθερά συνεργατικότητας των γειτονικών θέσεων δέσμευσης δεν μπορεί να εκτιμηθεί με αναλυτικό τρόπο και προκύπτει με βάση τη παραδοχή ότι κατ' ελάχιστο είναι ίση με (Pedigo and Shea, 1995b), (Pedigo and Shea, 1995a):

$$k_c^{\text{min}} = K_c = \frac{4K_2}{K_1} \quad [\text{Εξίσωση 9}]$$

Οι ζητούμενες φαινόμενες σταθερές διάστασης  $K_d$ , ορίζονται ως ο μέσος όρος των τιμών για τις 2 θέσεις σύνδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$  στον κάθε λοβό και προκύπτουν από την τετραγωνική ρίζα του  $K_2$  ( $\sqrt{K_2}$ ).

Η συνεργατικότητα των θέσεων σύνδεσης ασβεστίου είναι καλά μελετημένη και γνωστή (T.H Crouch et al., 1980) και το μοντέλο Adair, που χρησιμοποιείται για την

ανάλυση είναι το απλούστερο που μπορεί να εφαρμοστεί για τέτοιας μορφής σύνδεση (Ackers, Shea and Smith, 1983).

Οι μεταβολές στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs υπολογίζονται με τη βοήθεια της γνωστής εξίσωσης:

$$\Delta G_i = -RT \ln K_i \quad [\text{Εξίσωση 10}]$$

όπου  $K_i$  κάθε φορά οι κατάλληλες μακροσκοπικές σταθερές ισορροπίας.

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs λόγω συνεργατικότητας των δυο θέσεων δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$  στον κάθε λοβό δίνεται από την εξίσωση:

$$\Delta G_c = \Delta G_2 - 2\Delta G_1 - RT \ln(4) \quad [\text{Εξίσωση 11}]$$

Όπου  $\Delta G_1$  και  $\Delta G_2$  είναι οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs όταν είναι κατειλημμένη η μία εκ των δύο θέσεων δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$  και όταν είναι κατειλημμένες και οι δύο θέσεις αντίστοιχα (Pedigo and Shea, 1995b).

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α στο ΕΚΕΦΕ 'Δημόκριτος'.

## Κεφάλαιο 8. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης

### (Isothermal Titration Calorimetry-ITC)

#### 8.1.Γενικά στοιχεία

Η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (στο εξής ITC) είναι η μοναδική τεχνική με την οποία μπορούν άμεσα να προσδιοριστούν τα θερμοδυναμικά μεγέθη που χαρακτηρίζουν βιολογικές αλληλεπιδράσεις όπως (Velazquez-Camproy, Adrian Ohtaka *et al.*, 2004):

- Πρωτεΐνης-προσδέτη (protein-ligand binding)
- Πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (protein-protein binding)
- DNA-πρωτεΐνης (DNA-protein binding)
- Πρωτεΐνης-υδρογονανθράκων (protein-carbohydrate binding)
- Πρωτεΐνης-λιπιδίων (protein-lipid binding)
- Αντιγόνου-αντισώματος (antigen-antibody binding) κ.α.

Συγκεκριμένα, μέσω της τεχνικής ITC μπορούν να προσδιοριστούν με ακρίβεια θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά όπως η στοιχειομετρία της αντίδρασης (N) που δείχνει την αναλογία των αλληλεπιδρώντων μορίων, η σταθερά σύνδεσης ( $K_b$ ) που δείχνει πόσο ισχυρή είναι η δέσμευση, η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G_b$ ) που δείχνει πόσο σταθεροποιεί ενεργειακά η δέσμευση τα αλληλεπιδρώντα μόρια, η μεταβολή στην ενθαλπία ( $\Delta H_b$ ) που δείχνει τη μεταβολή του ενεργειακού περιεχομένου του συστήματος κατά την σύνδεση των μορίων, η μεταβολή στην εντροπία ( $\Delta S_b$ ) που δείχνει τη μεταβολή στην αταξία του συστήματος κατά τη σύνδεση και η μεταβολή στη θερμοχωρητικότητα υπο σταθερή πίεση ( $\Delta C_p$ ) του συστήματος κατά τη σύνδεση (Freire, Schön and Velazquez-Camproy, 2009). Η τεχνική ITC είναι η πιο άμεση μέθοδος μέτρησης της μεταβολής της θερμότητας που προκύπτει κατά την αλληλεπίδραση δύο βιομορίων σε σταθερή θερμοκρασία (Jelesarov and Bosshard, 1999).

## 8.2.Βασική αρχή της τεχνικής ITC-οργανολογία

Το όργανο ITC είναι ένα θερμιδόμετρο ροής-θερμότητας (heat-flux calorimeter) που λειτουργεί σύμφωνα με την αρχή της δυναμικής αντιστάθμισης ισχύος. Η εξαρτώμενη μεταβλητή είναι το ποσό της ισχύος ( $\mu\text{cal}/\text{sec}$ ) που απαιτείται κάθε χρονική στιγμή για να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασιακή διαφορά (κοντά στο μηδέν) μεταξύ του κελιού του δείγματος (sample cell) και του κελιού αναφοράς (reference cell).

Ένα θερμιδόμετρο ITC αποτελείται από δύο πανομοιότυπα κελιά ( $\sim 250 \mu\text{L}$ ) σε σχήμα νομίσματος (coin-shaped cells), κατασκευασμένα από υλικό υψηλής αγωγιμότητας (hastelloy), τα οποία περιβάλλονται από ένα αδιαβατικό περίβλημα (Εικόνα 35A). Το περίβλημα ψύχεται από την κυκλοφορία νερού που παρέχεται από ένα υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας. Ένα σύστημα θερμοζευγών υψηλής ευαισθησίας ανιχνεύει ακόμη και τις πολύ μικρές θερμοκρασιακές διαφορές μεταξύ των δύο κελιών και μεταξύ των κελιών και του αδιαβατικού περιβλήματος. Για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας του συστήματος, ενεργοποιούνται όταν κρίνεται απαραίτητο οι θερμικές αντιστάσεις που είναι προσαρμοσμένες τόσο στα κελιά όσο και στο περίβλημα, παρέχοντας την απαραίτητη θερμότητα σε όλο το σύστημα.

Στο κελί αναφοράς συνήθως τοποθετείται νερό ή το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ως διάλυμα αναφοράς. Στο κελί του δείγματος τοποθετείται η αλληλεπιδρώσα ουσία με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος ή η ουσία με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (σε περίπτωση χαμηλής διαθεσιμότητας ενός εκ των δύο αλληλεπιδρώντων μορίων). Η τυπική συγκέντρωση του διαλύματος που τοποθετείται στο κελί του δείγματος είναι της τάξης των  $10^{-5}\text{M}$ , με απαιτούμενο όγκο για επιτυχημένη πλήρωση τα  $400 \mu\text{L}$ . Αρχικά, πριν ξεκινήσει η διαδικασία της τιτλοδότησης, το σύστημα ανατροφοδότησης παρέχει συνεχόμενα σχετικά μικρής έντασης ισχύ ( $<1 \text{ mW}$ ) στο κελί του δείγματος, το οποίο προσδιορίζει τη στάθμη αναφοράς (baseline) του πειράματος. Η πειραματική μεταβλητή που καταγράφεται σε μια ισόθερμη τιτλοδότηση είναι η παρεχόμενη στα κελιά ισχύς ώστε αυτά να διατηρούν την θερμοκρασία τους σταθερή σε συνάρτηση με το χρόνο. Στο κελί του δείγματος εφαρμόζεται σύριγγα ( $40 \mu\text{L}$ ) που περιέχει το διάλυμα του δεύτερου αλληλεπιδρώντος μορίου, με τη βοήθεια ενός ρομποτικού βραχίονα που εκτελεί προκαθορισμένες εγχύσεις

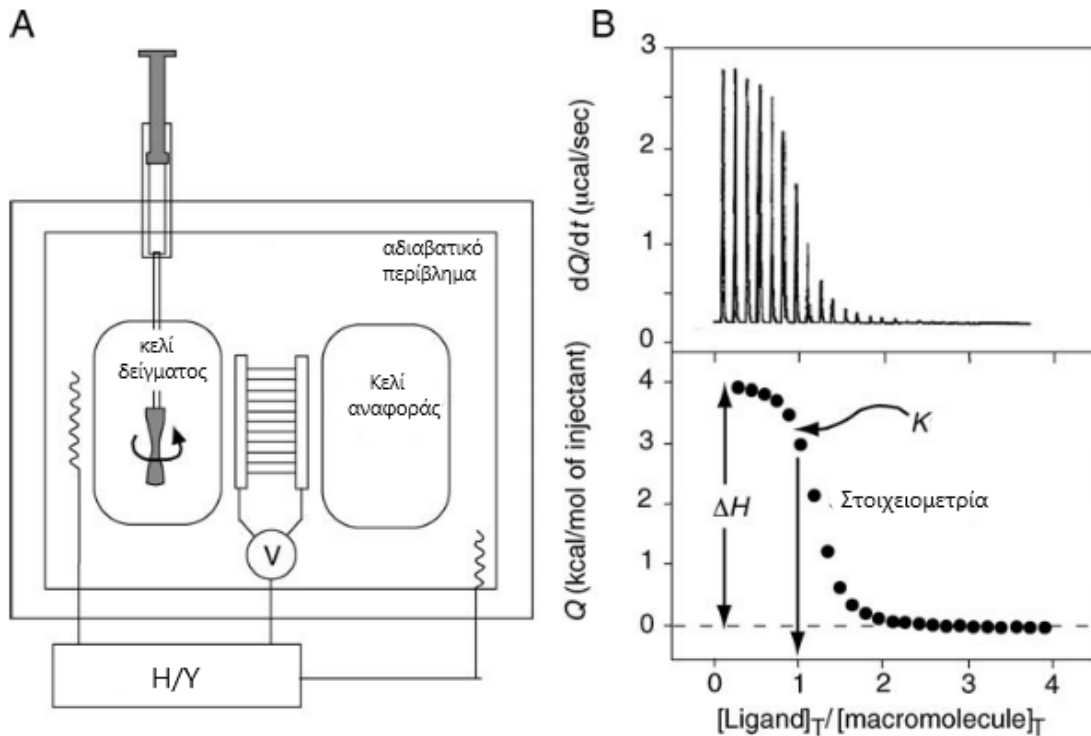
στο κελί του δείγματος με εξαιρετική ακρίβεια. Η συγκέντρωση του διαλύματος που τοποθετείται στη σύριγγα εξαρτάται από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης και γενικά ακολουθεί τη σχέση

$$C_{syringe} = 10 \times N \times C_{sample}$$

Όπου  $N$  η στοιχειομετρία της αντίδρασης και  $C_{sample}$  η συγκέντρωση στο κελί του δείγματος.

Κάθε έγχυση πυροδοτεί την αντίδραση αλληλεπίδρασης και ανάλογα με τη συγγένεια σύνδεσης και τη συγκέντρωση των δύο αντιδρώντων μορίων στο κελί του δείγματος, δημιουργείται συγκεκριμένη ποσότητα του συμπλόκου των δύο μορίων. Ανάλογα με το εάν αυτή η αντίδραση είναι εξώθερμη ή ενδόθερμη, εκλύεται ή απορροφάται θερμότητα κατά το σχηματισμό του συμπλόκου. Μία εξώθερμη αντίδραση προκαλεί απελευθέρωση θερμότητας με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας στο κελί του δείγματος ενώ μία ενδόθερμη αντίδραση απορροφά θερμότητα με αποτέλεσμα να πέσει η θερμοκρασία στο κελί του δείγματος. Η μεταβολή αυτή δημιουργεί θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ του κελιού αναφοράς και του κελιού του δείγματος, η οποία εξισοροπείται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα από το σύστημα ανάδρασης της συσκευής που είτε μειώνει είτε αυξάνει την παρεχόμενη ισχύ στο σύστημα. Μετά από κάθε έγχυση το σύστημα επανέρχεται σε ισορροπία και η θερμοκρασία αποκαθίσταται. Κάθε έγχυση καταγράφεται σαν μία διακριτή κορυφή από τη στάθμη αναφοράς του σήματος (Εικόνα 35B). Η ισχύς που παρέχεται κατά τη διάρκεια μιας τιτλοδότησης είναι ανάλογη του ποσοστού των μορίων της σύριγγας που αλληλεπιδρούν με τα μόρια του κελιού του δείγματος και για το λόγο αυτό είναι καθοριστικός ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των αλληλεπιδρώντων μορίων. Στις αρχικές εγχύσεις, η πλειονότητα των μορίων της σύριγγας δεσμεύονται από τα μόρια του κελιού του δείγματος και αυτό καταγράφεται με ισχυρά εξωθερμα ή ενδόθερμα σήματα (έντονες κορυφές σήματος). Όσο εξελίσσεται η τιτλοδοτηση τόσο μειώνονται οι διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης στο κελί του δείγματος με συνέπεια να μειώνεται και το μέγεθος των καταγραφόμενων κορυφών. Όταν το αντιδρών μόριο στο κελί του δείγματος κορεστεί οι κορυφές του σήματος πλέον είναι τόσο μικρές που πλησιάζουν τη στάθμη αναφοράς. Η ολοκλήρωση του εμβαδού που σχηματίζεται

κάτω από την εκάστοτε κορυφή αντιστοιχεί στην ποσότητα της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται σε κάθε έγχυση (Velazquez-Campoy, Adrian Ohtaka *et al.*, 2004).



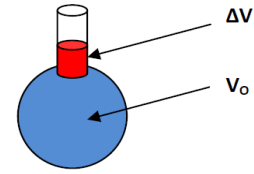
**Εικόνα 35:** (A) Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης ενός τυπικού θερμιδομέτρου ITC. (B) Αποτελέσματα ενός τυπικού πειράματος ITC ενδόθερμης αλληλεπίδρασης. Στο πάνω πλαίσιο φαίνονται οι κορυφές που καταγράφονται, κάθε μία εκ των οποίων αντιστοιχεί σε μία έγχυση. Το σήμα που καταγράφεται είναι η θερμική ισχύς που απαιτείται ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία στο κελί του δείγματος όσο το δυνατόν πιο κοντά στη θερμοκρασία του κελιού αναφοράς. Η ολοκλήρωση του εμβαδού των κορυφών αντιστοιχεί στη θερμότητα που απορροφάται (ή εκλύεται σε εξώθερμη αλληλεπίδραση) και στη συνέχεια α κανονικοποιείται ανα mole του αντιδρώντος που προτίθεται στο κελί του δείγματος (κάτω πλαίσιο). Από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της καμπύλης και με τη χρήση κατάλληλων σε κάθε περίπτωση θερμοδυναμικών μοντέλων υπολογίζονται τα βασικά θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά της αντίδρασης από ένα και μόνο πείραμα (Velazquez-Campoy, Adrian Ohtaka *et al.*, 2004).

### 8.3. Μοντελοποίηση απλής αλληλεπίδρασης δύο μορίων

Στην περίπτωση της απλής αλληλεπίδρασης δύο μορίων με στοιχειομετρία 1:1, η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων ακολουθεί το παρακάτω μοντέλο (MicroCal, 2004):



Αν θεωρηθεί πως  $M$  είναι το μόριο στο κελί του δείγματος,  $Mt^\circ$  (mole/L) είναι η αρχική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος στο κελί του δείγματος (πριν τις εγχύσεις). Ο ενεργός όγκος του κελιού είναι  $V_o$ , ο όγκος της  $i$ -στης έγχυσης είναι  $dV_i$  και ο ολικός όγκος του διαλύματος της σύριγγας που εγχύεται στο κελί του δειγματος είναι  $\Delta V$  (σχήμα δεξιά).



Κατά τις εγχύσεις αποκαθίσταται ταχύτατα χημική ισορροπία στο διάλυμα του κελιού του δείγματος, το οποίο βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση (~ 400 στροφές/min). Ο όγκος του κελιού είναι ο όγκος που αντιλαμβάνονται οι αισθητήρες του οργάνου, ενώ ο όγκος  $\Delta V$  δε συμβάλλει θερμικά στα πειραματικά αποτελέσματα. Οπότε, οι διαδοχικές εγχύσεις του διαλύματος της σύριγγας μειώνουν την ενεργό συγκέντρωση του διαλύματος που βρίσκεται στο κελί του δείγματος. Σύμφωνα με την αρχή διατήρησης των μαζών, κάθε χρονική στιγμή η συγκέντρωση του μορίου στο κελί του δείγματος θα είναι:

$$M_t^\circ V_o = M_t V_o + \frac{M_t + M_t^\circ}{2} \Delta V \quad [\text{Εξίσωση 12}]$$

όπου  $M_t$  η συγκέντρωση των μορίων στο κελί του δείγματος στην  $i$ -στη έγχυση. Κάνοντας την παραδοχή ότι όλα τα μόρια που εγχέονται από τη σύριγγα παραμένουν στον όγκο  $V_o$ , η συγκέντρωση των μορίων ( $X$ ) του διαλύματος της σύριγγας όταν αυτά εγχυθούν στο κελί του δείγματος στην  $i$ -στη έγχυση θα είναι αναλογικά με τα παραπάνω:

$$X_t = X_t^\circ \left( 1 - \frac{\Delta V}{2V_o} \right) \quad [\text{Εξίσωση 13}]$$

όπου  $X_t^\circ$  η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος στη σύριγγα.

Η σταθερά σύνδεσης της αλληλεπίδρασης είναι:

$$K_b = \frac{\theta}{(1 - \theta)[X]} \quad [\text{Εξίσωση 14}]$$

όπου  $\theta$  το ποσοστό των αρχικών μορίων του κελιού δείγματος που έχουν αλληλεπιδράσει με μόρια του διαλύματος σύριγγας και  $[X]$  η συγκέντρωση του διαλύματος σύριγγας που δεν έχει αλληλεπιδράσει με μόρια του κελιού δείγματος στο όγκο  $V_o$ .

Ισχύει επίσης η σχέση:

$$X_t = [X] + N\theta[M]_t \quad [Εξίσωση 15]$$

όπου N η στοιχειομετρία της αντίδρασης. Από εξισώσεις 14 και 15 προκύπτει η σχέση:

$$\theta^2 - \theta \left[ 1 + \frac{X_t}{NM_t} + \frac{1}{M_tNK_b} \right] + \frac{X_t}{NM_t} = 0 \quad [Εξίσωση 16]$$

Το ολικό ποσό της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται από το διάλυμα στον όγκο  $V_0$  υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$Q = N\theta M_t \Delta H_b V_0 \quad [Εξίσωση 17]$$

όπου  $\Delta H_b$  η ενθαλπία της αλληλεπίδρασης κανονικοποιημένη ανα mole διαλύματος σύριγγας που προστίθενται. Αντικαθιστώντας στην εξίσωση 17 τον όρο  $\theta$  από την εξίσωση 16 προκύπτει η εξίσωση:

$$Q = \frac{V_0 \Delta H_b [M]_t K_b [L]}{1 + K_b [L]} \left[ 1 + \frac{X_t}{NM_t} + \frac{1}{M_tNK_b} - \sqrt{\left( 1 + \frac{X_t}{NM_t} + \frac{1}{M_tNK_b} \right)^2 - \frac{4X_t}{NM_t}} \right] \quad [Εξίσωση 18]$$

Η παραπάνω τιμή της παραμέτρου Q υπολογίζεται μετά το πέρας της i-στης έγχυσης και συμβολίζεται με  $Q_i$ . Η εξίσωση αυτή ισχύει μόνο για το διάλυμα που βρίσκεται στον όγκο  $V_0$ . Καθώς όμως, κατά την i-στη έγχυση και μετά το πέρας αυτής, κάποιος όγκος του κελιού του δείγματος δε θα βρίσκεται εξολοκλήρου στον όγκο  $V_0$ , ο οποίος όμως συμμετέχει θερμικά στα αποτελέσματα (θεωρώντας πως η κινητική και η ανάμιξη λαμβάνουν χώρα αρκετά γρήγορα), είναι απαραίτητο να διορθωθεί η παραπάνω εξίσωση παίρνοντας τελικά τη μορφή:

$$\Delta Q_i = Q_i + \frac{dV_i}{V_0} \left[ \frac{Q_i + Q_{i-1}}{2} \right] - Q_{i-1} \quad [Εξίσωση 19]$$

Όπου  $\Delta Q_i$  η θερμότητα που καταγράφεται κατά την i-στη έγχυση.

Άρα, τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται με την εξής διαδικασία:

1. Αρχικά εκτιμώνται οι παράμετροι N,  $K_b$  και  $\Delta H_b$
2. Υπολογίζονται από την εξίσωση οι τιμές  $\Delta Q_i$  για κάθε έγχυση και συγκρίνονται με τις πραγματικές πειραματικές τιμές

3. Επανεκτιμώνται οι αρχικές τιμές των παραμέτρων με τυπικές διαδικασίες Marquardt και επαναλαμβάνεται η διαδικασία μέχρις ότου η νέα εκτίμηση των τιμών των παραμέτρων να ταυτίζεται με την προηγούμενη.

#### **8.4.Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων CaM με τα συνθετικά πεπτίδια hRyR2**

Στη διατριβή αυτή, για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της ανασυνδυασμένης CaM αγρίου τύπου και των μεταλλαγμάτων της με τα συνθετικά πεπτίδια hRyR2 χρησιμοποιήθηκε το μικροθερμιδομετρικό σύστημα ITC200 (GE Healthcare). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο σε συνθήκες κορεσμού με  $\text{Ca}^{2+}$ , όσο και σε συνθήκες πλήρους απουσίας ελεύθερων  $\text{Ca}^{2+}$ . Για το σκοπό αυτό, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες διαλύθηκαν στους  $4^{\circ}\text{C}$  σε δύο είδη ρυθμιστικού διαλύματος (buffer):

**Buffer 1 (holo-buffer):** 100mM KCl, 10Mm HEPES (pH 7.4) και 10Mm  $\text{CaCl}_2$

**Buffer 2 (apo-buffer):** 100mM KCl, 10Mm HEPES (pH 7.4) και 10mM EDTA

Τα πεπτίδια hRyR2 που συντέθηκαν υπο τη μορφή λυοφιλιωμένης σκόνης διαλύθηκαν αντίστοιχα απευθείας στα παραπάνω ρυθμιστικά διαλύματα που διαλύθηκαν και οι CaM ώστε να αποφευχθούν διαφορές στη σύσταση των διαλυμάτων, οι οποίες προκαλούν θερμικό «θόρυβο» εξαιτίας των ενθαλπών ανάμιξης των ανόμοιων συστατικών (artifacts).

Σε όλα τα διαλύματα πριν από κάθε πείραμα, απομακρύνθηκαν τυχόν φυσαλίδες.

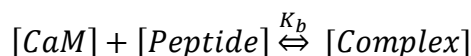
Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, στο κελί του δείγματος τοποθετούνταν κάθε φορά  $40\mu\text{M}$  πρωτεϊνικού διαλύματος CaM και η σύριγγα τιτλοδότησης πληρωνόταν με  $450\mu\text{M}$  του διαλύματος πεπτιδίου.

Η ακολουθία τιτλοδότησης περιλάμβανε μια αρχική έγχυση  $1\mu\text{L}$  διαλύματος πεπτιδίου, ακολουθούμενη από 14 πανομοιότυπες εγχύσεις  $2.5\mu\text{L}$  σε χρονική απόσταση  $300\text{ s}$ . Η θερμοκρασία των πειραμάτων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις  $25^{\circ}\text{C}$ , η ταχύτητα ανάδευσης στα  $1000\text{rpm}$  και παρεχόμενη ισχύς στο κελί αναφοράς στα  $6\text{mcal/sec}$ .

Οι θερμικές συνεισφορές από την απλή διάλυση πεπτιδίων στο ρυθμιστικό διάλυμα και την αραίωση του πρωτεϊνικού διαλύματος στο θερμοδομετρικό κελί υπολογίστηκαν σε ξεχωριστά πειράματα ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία και αφαιρέθηκαν από όλα τα τελικά θερμογράμματα.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Microcal Origin 7 (OriginLab, Northampton, MA) με χρήση του μοντέλου απλής αλληλεπίδρασης δυο μορίων μίας θέσης σύνδεσης (one site binding model) που περιγράφηκε στην παράγραφο 8.2, προσδοκώντας πως η CaM αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο RyR2 με στοιχειομετρία 1:1.

Ο σχηματισμός συμπλόκου πρωτεΐνης-πεπτιδίου περιγράφεται από μία χημική ισορροπία της μορφής:



όπου  $[CaM]$  και  $[Peptide]$  οι συγκεντρώσεις της μη-δεσμευμένης πρωτεΐνης και πεπτιδίου αντίστοιχα,  $[Complex]$  είναι η συγκέντρωση του συμπλόκου και  $K_b$  η μικροσκοπική σταθερά σύνδεσης της αλληλεπίδρασης. Με τη μη-γραμμική προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο θερμοδυναμικό μοντέλο μιας θέσης σύνδεσης πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της στοιχειομετρίας ( $N$ ), της σταθεράς σύνδεσης ( $K_b$ ) και της μεταβολής της ενθαλπίας ( $\Delta H_b$ ) της αλληλεπίδρασης για τη συγκεκριμένη δέσμευση. Η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs κατά την αλληλεπίδραση υπολογίζεται με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$\Delta_r G = RT \ln K_b = \Delta_r H - T \Delta_r S \quad [\text{Εξίσωση 20}]$$

όπου  $R$  η παγκόσμια σταθερά αερίων και  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία της τιτλοδότησης.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α στο ΕΚΕΦΕ ‘Δημόκριτος’.

## Γ. Αποτελέσματα

### 9. Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένης CaM WT και μεταλλαγμάτων της.

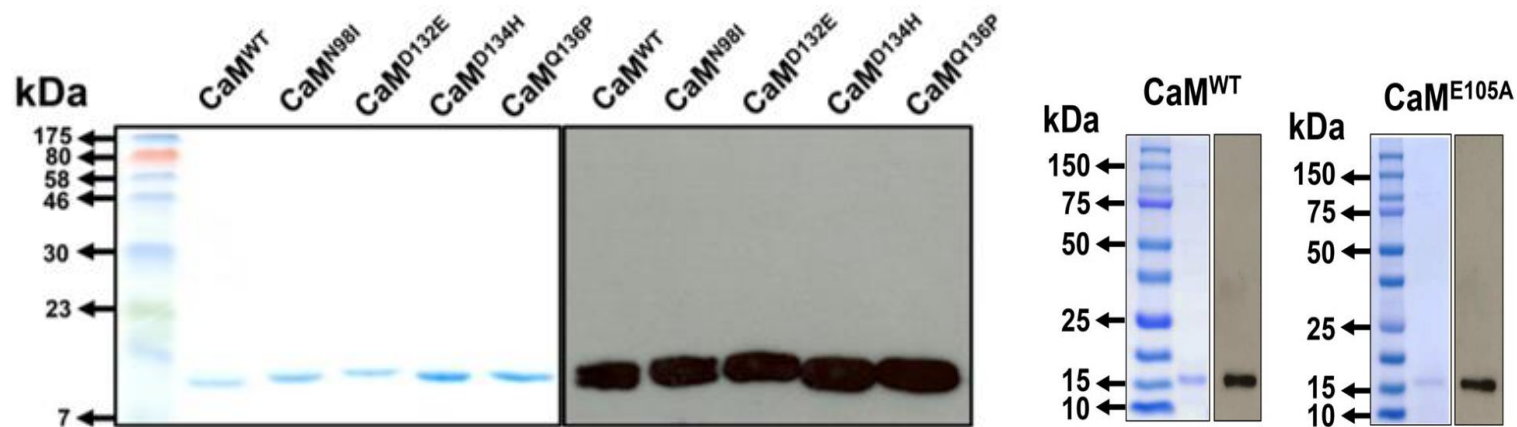
Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής έγινε σε συνεργασία με το Ουαλικό Ινστιτούτο Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Cardiff η έκφραση της ανασυνδυασμένης CaM αγρίου τύπου (CaMwt) και εννέα μεταλλάξεών της (N98I, D132E, D134H, Q136P, E105A, D96H, A103V, E141G και E141K) εκ των συνολικά δεκαοκτώ δημοσιευμένων. Σε προηγούμενο στάδιο της συγκεκριμένης μελέτης το 2014 είχε πραγματοποιηθεί η έκφραση των μεταλλάξεων (N54I, D96V, N98S, D130G, F142L και F90L) για τις ανάγκες των τότε πειραματικών μελετών (Nomikos *et al.*, 2014; Vassilakopoulou *et al.*, 2015). Οι μεταλλάξεις D96H, A103V, E141G και E141K, δεν απέδωσαν υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, οπότε οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM που εκφράστηκαν με επιτυχία παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

**Πίνακας 9:** Μεταλλάξεις της CaM που εκφράστηκαν για της ανάγκες της παρούσας διατριβής

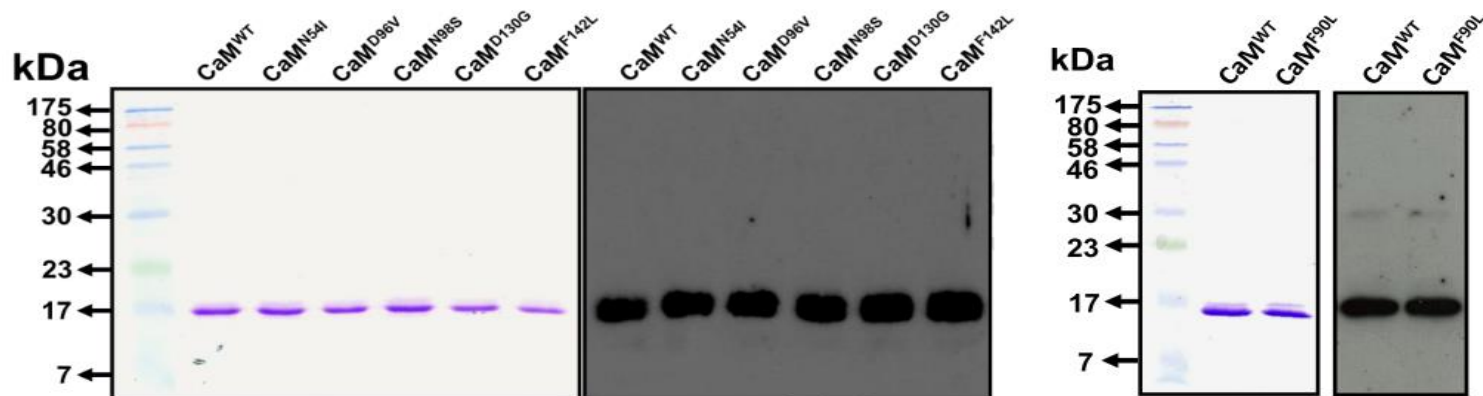
Μετάλλαξη	Γονίδιο	Φαινότυπος	Θέση στο μόριο της CaM	Βιβλιογραφία
<b>N54I</b>	CALM1	CPVT	I-II linker	(Nyegaard <i>et al.</i> , 2012)
<b>F90L</b>	CALM1-2	IVF/SUD	I-II linker	(Marsman <i>et al.</i> , 2014)
<b>D96V</b>	CALM2	LQTS	EF-hand III	(Crotti <i>et al.</i> , 2013)
<b>N98S</b>	CALM1-2	CPVT, LQTS, SUD	EF-hand III	(Nyegaard <i>et al.</i> , 2012),(Makita <i>et al.</i> , 2014)
<b>N98I</b>	CALM2	LQTS	EF-hand III	(Makita <i>et al.</i> , 2014)
<b>E105A</b>	CALM1	LQTS	EF-hand III	(Takahashi, Ishikawa and Makita, 2016)
<b>D130G</b>	CALM1-2-3	LQTS	EF-hand IV	(Crotti <i>et al.</i> , 2013)
<b>D132E</b>	CALM2	LQTS/CPVT overlap	EF-hand IV	(Makita <i>et al.</i> , 2014)
<b>D134H</b>	CALM2	LQTS	EF-hand IV	(Makita <i>et al.</i> , 2014)

<b>Q136P</b>	CALM2	LQTS	EF-hand IV	(Makita et al., 2014)
<b>F142L</b>	CALM1-2	LQTS	C-terminal region	(Crotti et al., 2013)

Για την έκφραση των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών έγινε μετασχηματισμός των κυττάρων BL21-Codon Plus (DE3)-RILP με τα αντίστοιχα ανασυνδυσασμένα πλασμίδια. Η επαγωγή της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών στις κυτταρικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε σε 0.2 mM IPTG στους 16 °C για 18 h. Ακολούθησε η λύση των βακτηριακών κυττάρων και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας. Οι πρωτεΐνες που ελήφθησαν σε διαλυτή μορφή και υψηλή καθαρότητα ήταν οι **CaMwt** και οι μεταλλάξεις **N54I, D96V, N98S, D130G, F142L, F90L, N98I, D132E, D134H, Q136P** και **E105A**. Οι D96H, A103V, E141G και E141K δεν απέδωσαν υδατοδιαλυτές μορφές πρωτεΐνης με τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Οι καθαρισμένες πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και ακολούθησε είτε η χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant-Blue είτε η μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF, όπου ακολούθησε αποτύπωση κατά Western με την χρήση αντι-CaM αντισώματος (Εικόνα 36). Στην Εικόνα 37 παρουσιάζονται τα παλαιότερα αποτελέσματα προς σύγκριση. Όπως φαίνεται για κάθε μορφή ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης φαίνεται μία μοναδική ζώνη περίπου στα 17.4 kDa, η οποία αντιστοιχεί στην προβλεπόμενη για την CaM μοριακή μάζα και επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης.



**Εικόνα 36 :** Αποτελέσματα καθαρισμού της αγρίου τύπου CaM και των μεταλλάξεων N98I, D132E, D134H, Q136P και E105A σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (15% SDS-PAGE) μέσω επισήμανσης Coomassie Brilliant Blue (αριστερό πλαίσιο) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με anti-CaM rabbit μονοκλωνικό αντίσωμα (1:10,000 διάλυση) (δεξιό πλαίσιο).



**Εικόνα 37 :** Αποτελέσματα καθαρισμού της αγρίου τύπου CaM και των μεταλλάξεων N54I, D96V, N98S, D130G, F142L και F90L σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου ( 15% SDS-PAGE) μέσω επισήμανσης Coomassie Brilliant Blue (αριστερό πλαίσιο) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με anti-CaM rabbit μονοκλωνικό αντίσωμα (δεξιό πλαίσιο).

## 10.Συνθετικά πεπτίδια ανθρώπινου (human) RyR2

Τα πεπτίδια που αντιστοιχούν σε περιοχές του υποδοχέα hRyR2 με υψηλή πιθανότητα να αποτελούν θέσεις δέσμευσης της καλμοδουλίνης συντέθηκαν και απομονώθηκαν σε υψηλή καθαρότητα υπό τη μορφή λυοφιλοποιημένης σκόνης. Τα πεπτίδια που συντέθηκαν αφορούν στην κύρια θέση πρόσδεσης (πεπτίδιο B) της CaM στον RyR2 και σε περιοχές του καρβοξυ-τελικού άκρου (αα. 4240-4277) του υποδοχέα που πιθανώς αποτελούν επιπλέον περιοχές δέσμευσης της CaM. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσοπεπτιδικής Χημείας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος με τη πολύτιμη βοήθεια των Δρ. Ε. Λιβανίου και Δρ. Β. Βασιλακοπούλου.

Τα πεπτίδια που συντέθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Η καθαρότητα όλων των πεπτιδίων μελετήθηκε με αναλυτική RP-HPLC. Όλα τα πεπτίδια είχαν καθαρότητα πάνω από 95%.

**Πίνακας 10 :** Αμινοξική αλληλουχία συνθετικών πεπτιδίων RyR2

Ακολουθία Ανθρώπινης RyR2	Αμινοξικά κατάλοιπα
Peptide A - [4240-4254]	TVRSALFALRYNILT
Peptide B - [3584-3602]	KAVWHKLLSKQRKRAVVAC
Peptide D - [4255-4277]	LMRMLSLKSLKKQMKKVKKMTVK
Peptide E - [4265-4277]	KKQMKKVKKMTVK
Peptide F - [4255-4271]	LMRMLSLKSLKKQMKKV
Peptide F scrambled	KSLKQRKMLKMLKVLMS

Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων έγινε με φασματομετρία μαζών με την μέθοδο ιοντισμού με ψεκασμό (ESI-MS). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν προέκυψαν αποκλίσεις από την σύγκριση των τιμών των MB των πεπτιδίων βάσει των πειραματικών δεδομένων των φασμάτων ESI-MS και των θεωρητικών δεδομένων βάσει της πρωτοταγούς τους δομής όπως φαίνεται στον παρακατω πίνακα.

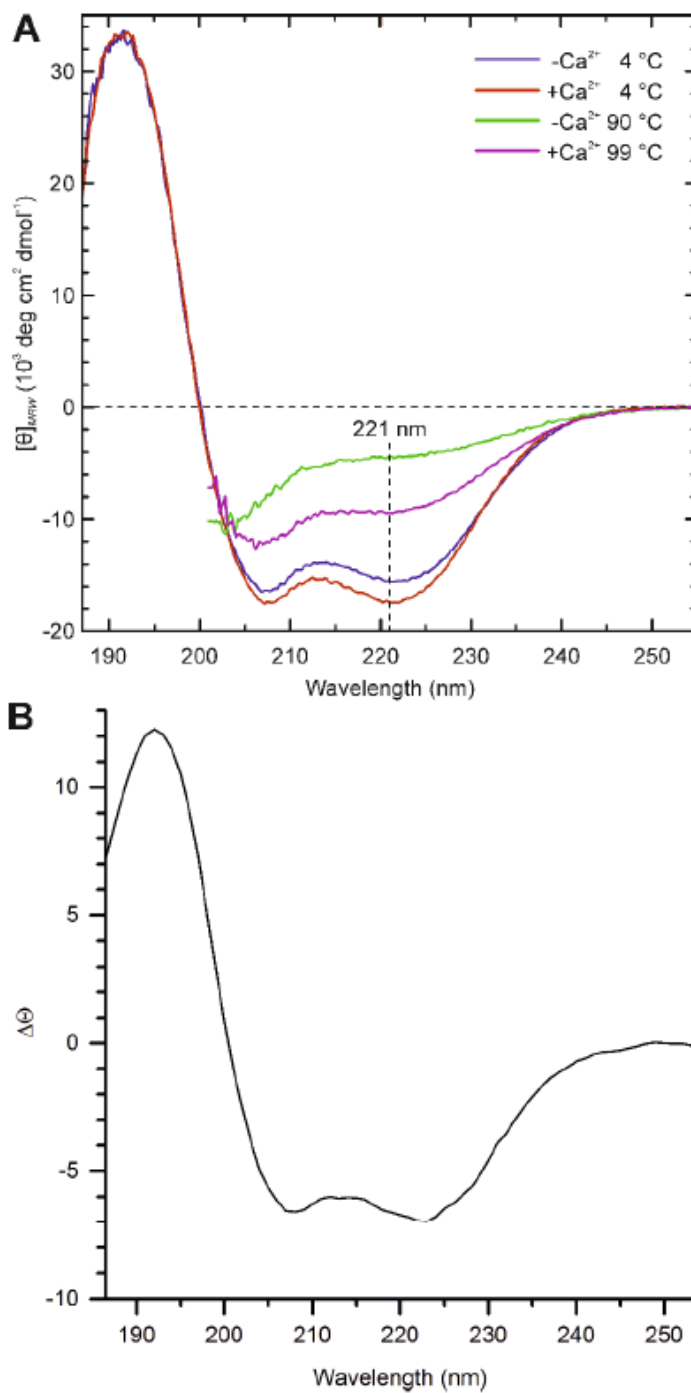


**Πίνακας 11:** Πειραματική και θεωρητική μοριακή μάζα των συνθετικών πεπτιδίων RyR2

<b>Πεπτίδιο hRyR2</b>	<b>Πειραματική τιμή</b>	<b>Θεωρητική τιμή</b>
Peptide A	1737,0	1737,0
Peptide B	2221,0	2220,7
Peptide D	2778,0	2777,6
Peptide E	1605,2	1604,1
Peptide F	2061,5	2061,7
Peptide F scrambled	2061,7	2061,7

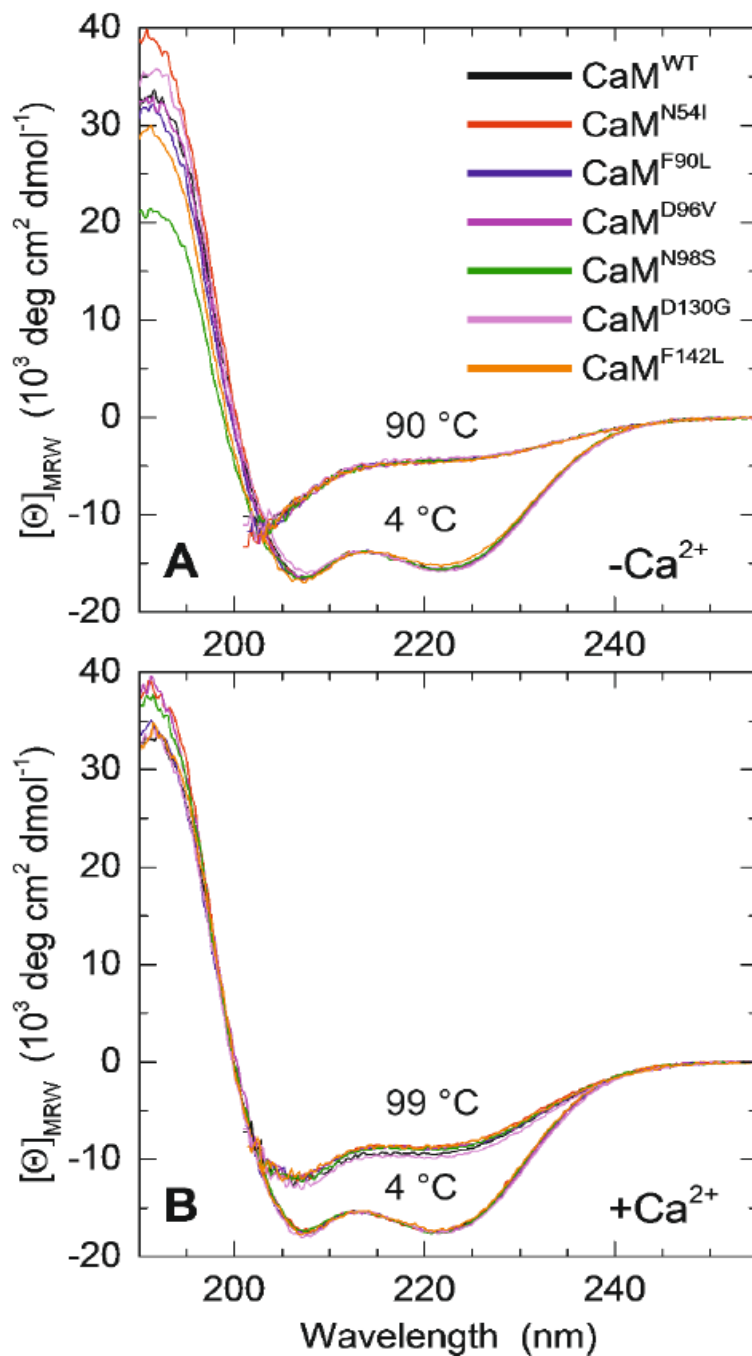
## **11.Επιβεβαίωση δευτεροταγούς δομής των μεταλλαγμένων μορφών CaM με χρήση φασματοπολωσιμετρίας CD.**

Το φάσμα της CaMwt στο απω υπεριώδες μετρήθηκε σε συνθήκες χαμηλής και υψηλής θερμοκρασίας τόσο παρουσία όσο και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Το φάσμα φαίνεται στην Εικόνα 38Α, ενώ στην Εικόνα 38Β παρουσιάζεται προς σύγκριση το CD φάσμα της CaM (από Protein CD Data Bank). Όπως φαίνεται από τη σύγκριση των δύο φασμάτων στους  $4^{\circ}\text{C}$  η δευτεροταγής δομή της CaMwt και της 'ιθαγενούς' CaM είναι όμοια, εμφανίζοντας θετική κορυφή στα 192 nm και δύο αρνητικές κορυφές στα 208 nm και 221 nm, οι οποίες συμφωνούν με τα CD φάσματα των πρωτεϊνών που διαθέτουν α-έλικες. Επίσης, παρατηρείται μεταβολή στο CD φάσμα παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , η οποία αντιστοιχεί στην αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου όταν προσδένει  $\text{Ca}^{2+}$  (Protasevich et al., 1997). Σε υψηλές θερμοκρασίες οι αρνητικές κορυφές ελαττώνονται, το οποίο αντιστοιχεί στην ελάττωση των αμινοξικών καταλοίπων που συμμετέχουν στο σχηματισμό της α-έλικας, όσο η πρωτεΐνη ξεδιπλώνει.

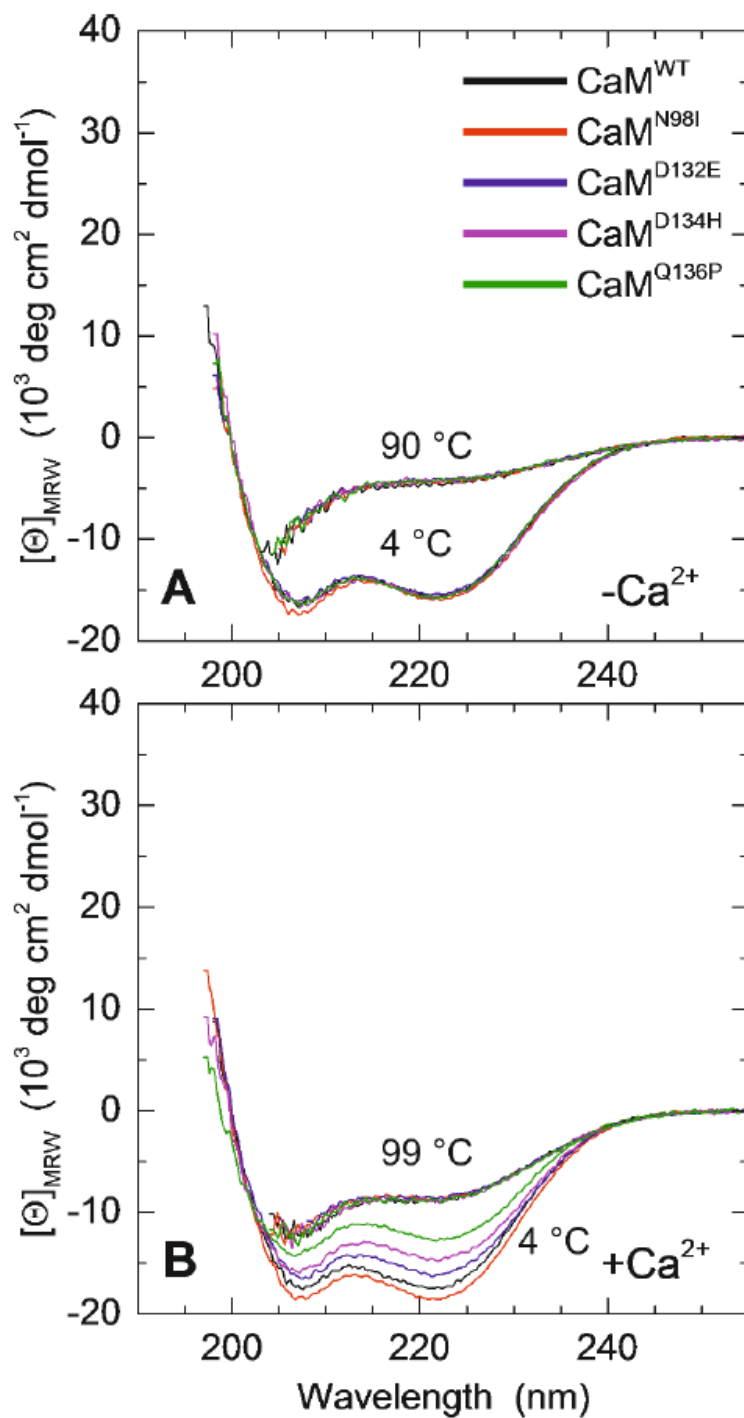


**Εικόνα 38:** (A) Φάσματα CD στο άπω υπεριώδες της CaMwt σε 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.4 παρουσία Ca<sup>2+</sup> (1 mM CaCl<sub>2</sub>) ή απουσία Ca<sup>2+</sup> (1 mM EDTA), στους 4°C και 99°C (με Ca<sup>2+</sup>) και στους 4°C και 90°C (χωρίς Ca<sup>2+</sup>) (B) Φάσμα CD της 'ιθαγενούς' CaM στους 4°C (CD Protein Data Bank)

Τα φάσματα στο άπω υπεριώδες των CaM μεταλλάξεων μετρήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής και υψηλής θερμοκρασίας τόσο παρουσία όσο και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Τα εν λόγω φάσματα παρουσιάζονται στις Εικόνες 39 και 40. Όπως παρατηρείται όλα τα φάσματα CD των μεταλλαγμένων CaM ομοιάζουν με τα φάσματα της εικόνας 38Α που αφορούν στην CaMwt, παρουσιάζοντας θετική κορυφή στα 192 nm και αρνητικές κορυφές στα 208 nm και 221 nm. Σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρείται και πάλι ελάττωση των αρνητικών κορυφών, χαρακτηριστικό του ξεδιπλώματος των πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι απουσιάζει κορυφή που να αντιστοιχεί σε τυχαίο σπείραμα (195 nm) ή σε συσσωματώματα, μπορεί να ειπωθεί πως όλες οι ανασυνδυασμένες μεταλλαγμένες μορφές της CaM έχουν σωστή αναδίπλωση. Ωστόσο, στους 4°C και παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  παρατηρείται μια διαφοροποίηση μεταξύ των N98I, D132E, D134H και Q136P και σε σύγκριση με τη CaMwt, η οποία σχετίζεται με την σύνδεση του  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Εικόνα 39:** Φάσματα CD στο άπω υπεριώδες των CaMwt και μεταλλάξεων N54I, F90L, D96V, N98S, D130G και F142L σε 100mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.4 παρουσία Ca<sup>2+</sup> (1mM CaCl<sub>2</sub>) ή απουσία Ca<sup>2+</sup> (1mM EDTA). (A) Φάσματα CD απουσία Ca<sup>2+</sup> στους 4°C και 90°C (B) Φάσματα CD παρουσία Ca<sup>2+</sup> στους 4°C και 90°C



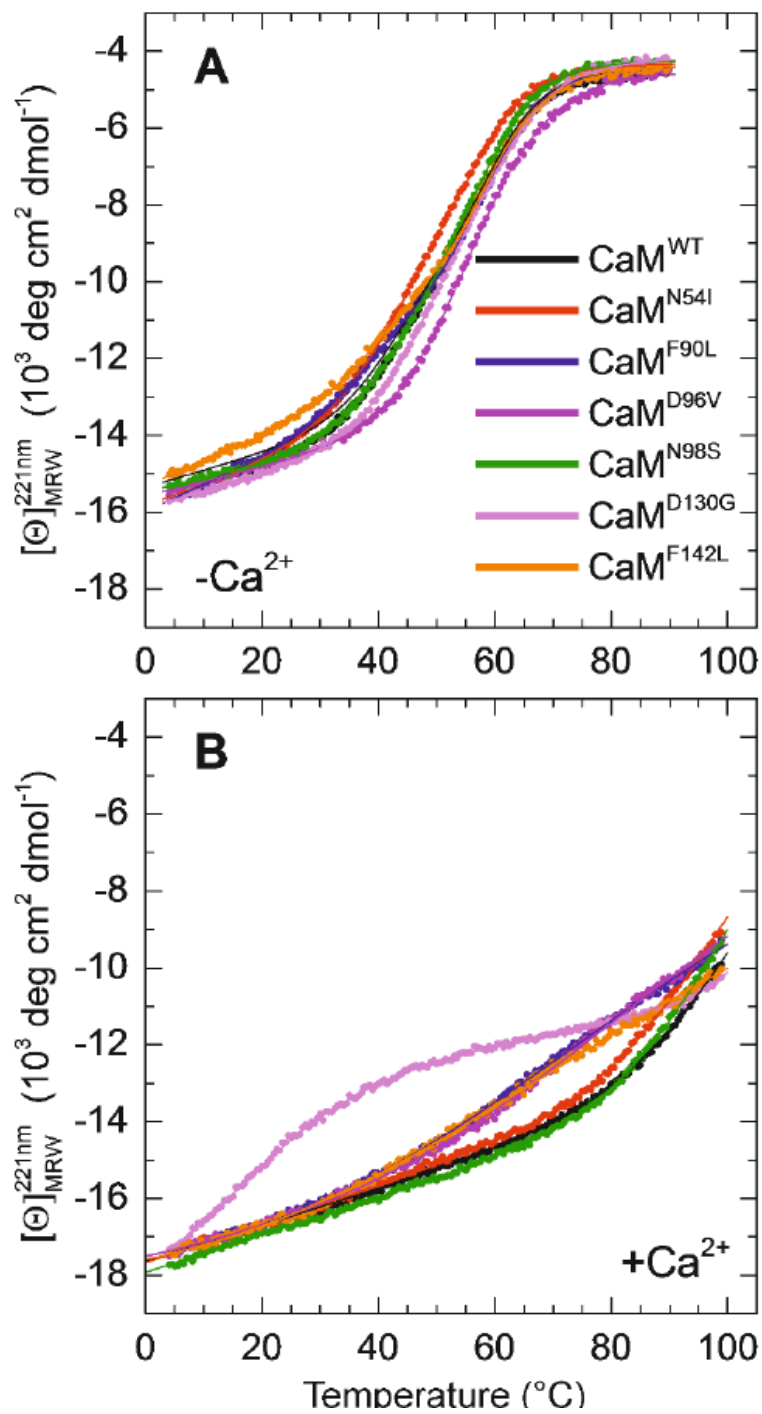
**Εικόνα 40** : Φάσματα CD στο άπιο υπεριώδες των CaMwt και μεταλλάξεων N98I, D132E, D134H και Q136P σε 100mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.4 παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (1mM  $\text{CaCl}_2$ ) ή απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (1mM EDTA). (A) Φάσματα CD απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 4°C και 90°C (B) Φάσματα CD παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 4°C και 99°C

## **12.Μελέτη της θερμικής αποδιάταξης των μεταλλαγμένων μορφών της CaM με χρήση φασματοπολωσιμετρίας CD**

Η θερμική αποδιάταξη της CaMwt και των μεταλλαγμένων μορφών της CaM μετρήθηκε καταγράφοντας τις αλλαγές του σήματος CD στα 221 nm (χαρακτηριστικό μήκος κύματος απορρόφησης της α-έλικας) με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας τόσο παρουσία όσο και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , όπως φαίνεται στις Εικόνες 41 και 42.

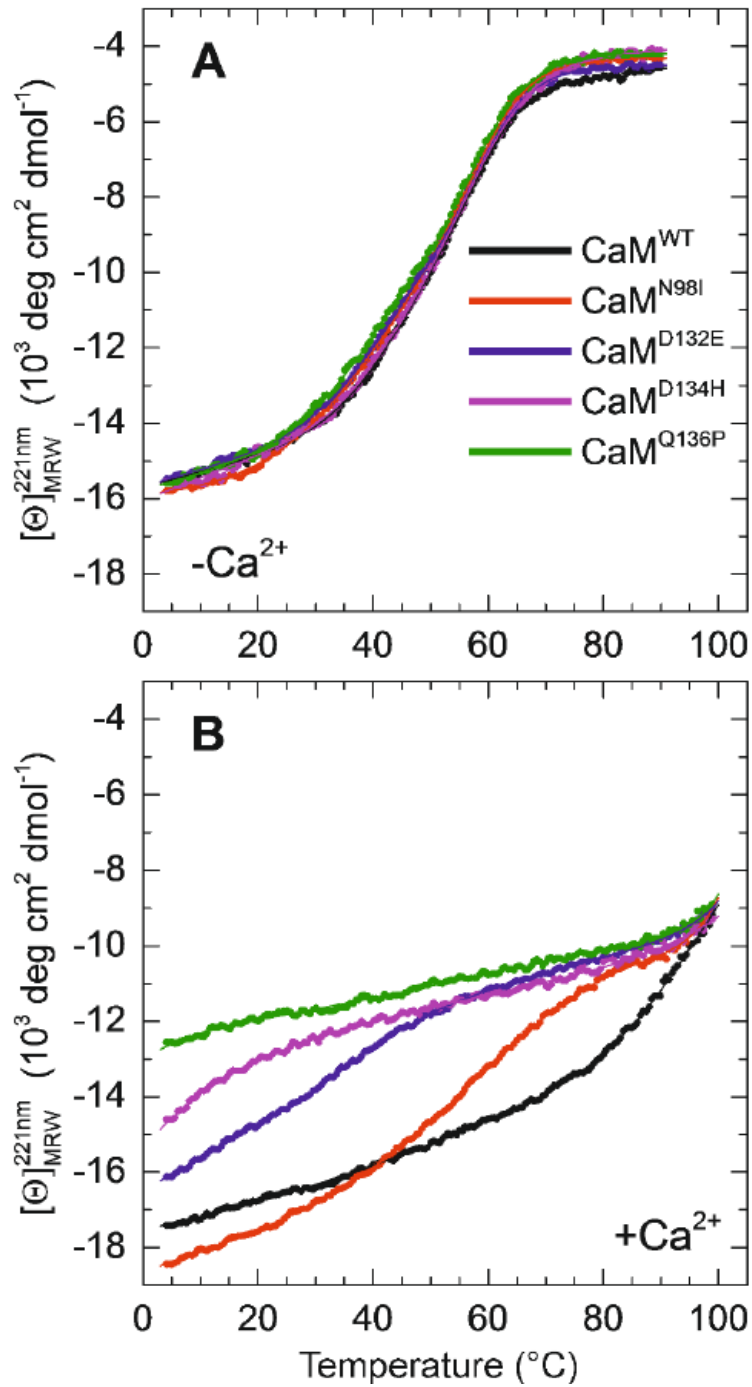
Όπως δείχνουν τα διαγράμματα A των Εικόνων 41 και 42, απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  αυξάνοντας τη θερμοκρασία από τους 4°C, η μεταβολή στη μοριακή ελλειπτικότητα  $[\theta]$  για όλες τις μεταλλάξεις είναι όμοια και συγκρίσιμη με της CaMwt και ολοκληρώνεται στους 90°C. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 12, όλες οι μεταλλάξεις έχουν παρόμοια  $T_m$  με την CaMwt υποθέτοντας 3-σταδίων μετάβαση, εκτός της F90L που περιγράφεται καλύτερα με 2-σταδίων μετάβαση.

Παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , παρατηρείται πως όσο η θερμοκρασία αυξάνει, η  $[\theta]$  μειώνεται καθώς οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνουν, ωστόσο όχι με τον ίδιο ρυθμό και δεν ξεδιπλώνουν πλήρως όπως παρατηρείται απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Μεγάλη διαφοροποίηση παρατηρείται για τις D130G, D132E, D134H, Q136P και N98I, που όπως φαίνεται αποσταθεροποιούνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από την CaMwt. Για τον προσδιορισμό των  $T_m$  και  $\Delta H_{\text{NH}}$  χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα αποδιάταξης 2-σταδίων και 3-σταδίων που όμως δεν κατέστη δυνατό να περιγράψουν με επιτυχία τη θερμοδυναμική συμπεριφορά της αποδιάταξης, δίνοντας μη ρεαλιστικές τιμές θερμοκρασιών που προκύπτει από τον περιορισμό του θερμοκρασιακού εύρους που μπορεί να αποτιμήσει η μέθοδος. Στο συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος (~4°C - 90°C) (Εικόνες 41B και 42B) καμία πρωτεΐνη δε φαίνεται να ξεδιπλώνει πλήρως. Για να μπορέσει να γίνει μια σύγκριση της αποσταθεροποίησης μεταξύ των μεταλλάξεων παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  προσδιορίστηκαν κατά προσέγγιση οι θερμοκρασίες στο μέσο των καμπυλών για το συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος και παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Πιθανή μείωση της θερμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης υποδεικνύει πως το μόριο έχει πιο σύντομη διάρκεια ζωής και κατ'επέκταση μειωμένη λειτουργικότητα.



**Εικόνα 41:** Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης της CaMwt και των μεταλλάξεων N54I, F90L, D96V, N98S, D130G και F142L στα 221nm απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (A) και παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (B)





**Εικόνα 42:** Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης της CaMwt και των μεταλλάξεων N98I, D132E, D134H και Q136P στα 221 nm απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (A) και παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (B)

**Πίνακας 12:** Θερμοδυναμικοί παράμετροι θερμικής αποδιάταξης της CaMwt και των μεταλλαγμένων μορφών της

CaM	-Ca <sup>2+</sup>				Ca <sup>2+</sup>
	T <sub>m1</sub> (°C)	ΔH <sub>vH1</sub> (kJ/mole)	T <sub>m2</sub> (°C)	ΔH <sub>vH2</sub> (kJ/mole)	T(°C)
<b>WT</b>	45.6 ± 1.1	133 ± 10	60.2 ± 0.7	212 ± 15	~ 90
<b>N54I</b>	47.0 ± 1.7	110 ± 9	60.5 ± 1.8	197 ± 19	~ 80
<b>F90L</b>	58.0 ± 0.2	-126 ± 2.9			~ 56
<b>D96V</b>	55.0 ± 1.1	153 ± 7	73 ± 6	175 ± 24	~ 59
<b>N98I</b>	47.6 ± 3.3	-100 ± 3	59 ± 12	-196 ± 9	~ 50
<b>N98S</b>	46.9 ± 1.8	119 ± 11	60.2 ± 1.3	180 ± 7	~ 82
<b>D130G</b>	48.7 ± 2.4	136 ± 11	62.4 ± 2.6	162 ± 25	~ 19
<b>D132E</b>	42 ± 3.4	-129 ± 9	59.4 ± 1.3	-193 ± 8	~ 30
<b>D134H</b>	46.3 ± 0.6	-136 ± 15	60.3 ± 0.3	-155 ± 7	~ 15
<b>Q136P</b>	45.7 ± 4.3	-112 ± 10	56.5 ± 1.2	-191 ± 6	~ 11
<b>F142L</b>	41.5 ± 1.4	150 ± 21	58.4 ± 0.5	176 ± 11	~ 54

### **13.Μελέτη της δέσμευσης του $\text{Ca}^{2+}$ στην CaMwt και τις μεταλλαγμένες μορφές της με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού σταθερής καταστασης.**

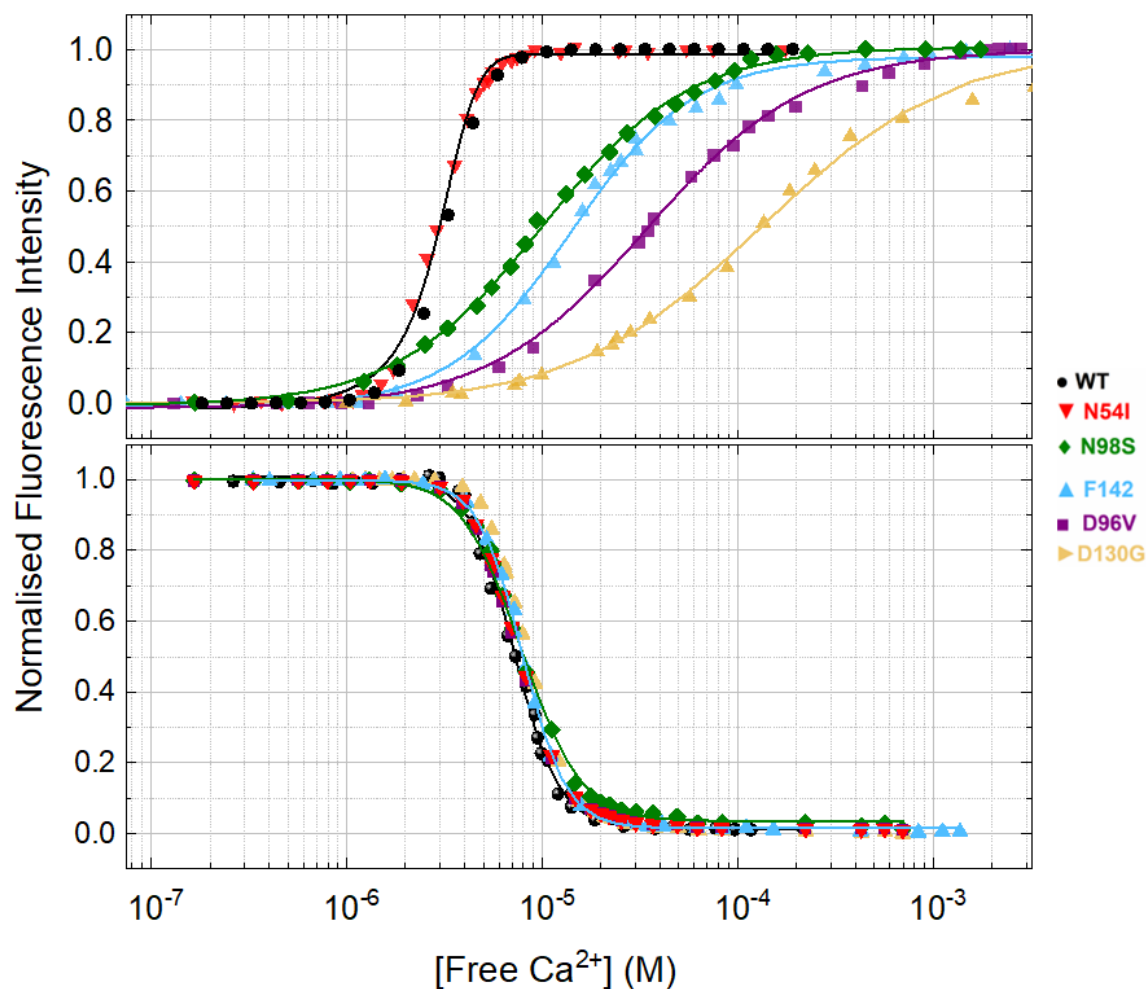
Η επίδραση των μεταλλάξεων στην ικανότητα της CaM να δεσμεύει  $\text{Ca}^{2+}$  μελετήθηκε μέσω της καταγραφής της εκπομπής του φθορισμού από την CaMwt και τις μεταλλαγμένες μορφές της με την σταδιακή προσθήκη κατάλληλης  $[\text{Ca}^{2+}]$  (0-15mM). Η εκπομπή του φθορισμού μετράται για κάθε λοβό ξεχωριστά. Τόσο η CaMwt όσο και οι μεταλλάξεις της παρουσιάζουν εκπομπή του φθορισμού της τυροσίνης, που αυξάνει όσο αυξάνει και η ελεύθερη  $[\text{Ca}^{2+}]$  στο διάλυμα, σε μήκος κύματος διέγερσης 277nm και εκπομπής 320nm, που αντιστοιχεί στη δέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$  C-λοβό. Η εκπομπή φθορισμού που παρατηρείται με διέγερση στα 250nm και καταγραφή της εκπομπής στα 280nm, οφείλεται στην φαινυλαανίνη, της οποίας η εκπομπή μειώνεται όσο αυξάνει η ελεύθερη  $[\text{Ca}^{2+}]$  στο διάλυμα και αντιστοιχεί στην δέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$  στο N-λοβό. Τα πειραματικά δεδομένα από τέσσερις διαφορετικές επαναλήψεις προσαρμόζονται με μη-γραμμικό τρόπο σε μια συνάρτηση Adair για δύο μη-ισοδύναμες θέσεις σύνδεσης που εμφανίζουν συνεργατικότητα. Οι τέσσερις μετρήσεις δίνουν τα σημεία και το σφάλμα τους. Η μη γραμμική προσαρμογή δίνει τις παραμέτρους και το σφάλμα τους, λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά σημεία και τα σφάλμα τα τους. Τα  $\Delta G_i$  υπολογίζονται από τις εξισώσεις 10 και 11 που παρουσιάζονται στην ενότητα 7.3 και το σφάλμα τους από τις απλές εξισώσεις διάδοσης σφαλμάτων (error propagation calculations), γνωρίζοντας τα σφάλματα όλων των παραμέτρων που περιέχονται σε αυτές από τη μη γραμμική προσαρμογή.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 13 και 14 και στις εικόνες 43 και 44.

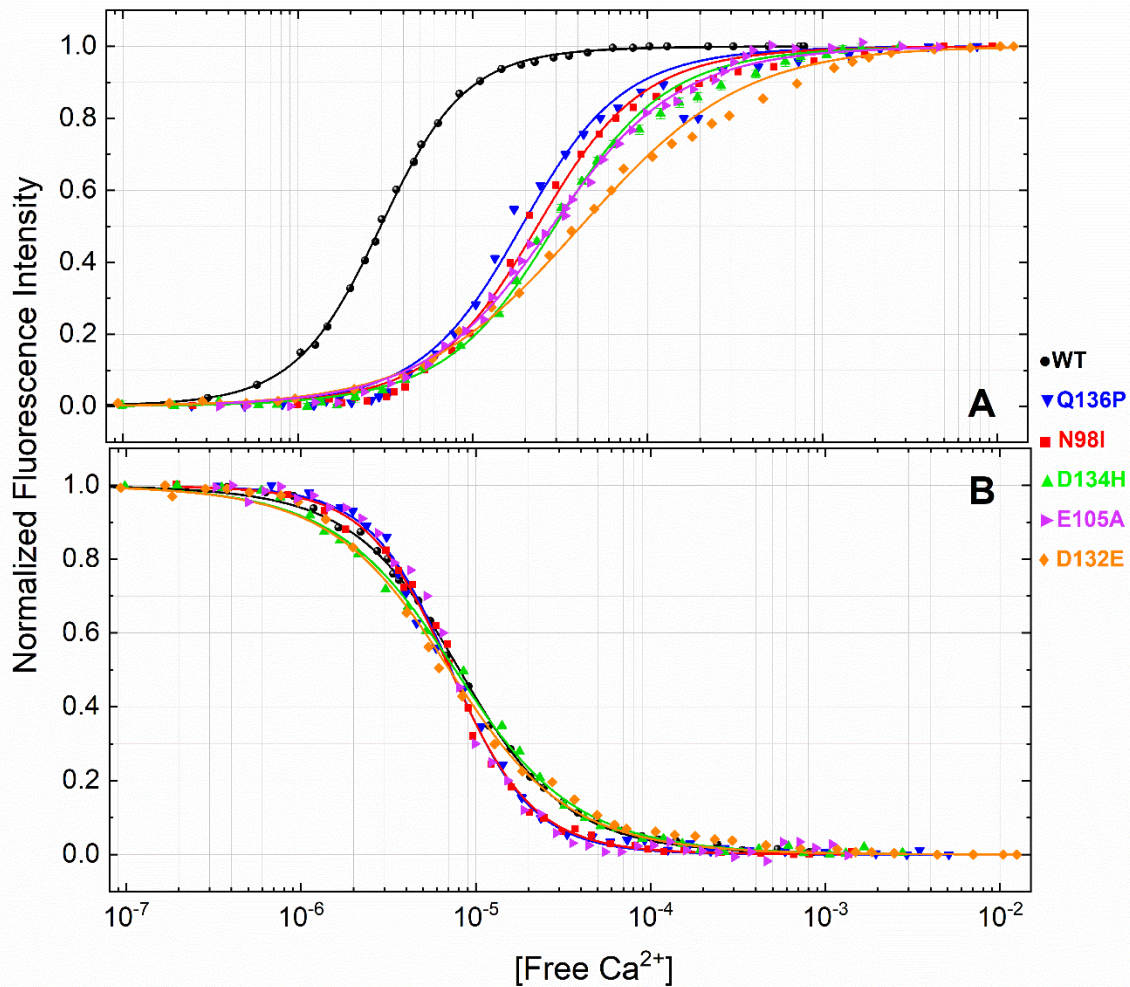
Όπως φαίνεται όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM παρουσιάζουν ελάχιστη ή καθόλου διαφορά σε σύγκριση με την CaMwt στη δέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$  στο N-λοβό (Εικόνα 43B και 44B). Αυτό είναι λογικό για τις μεταλλάξεις που βρίσκονται στο C-λοβό της CaM αλλά έκπληξη προκαλεί το γεγονός πως ίδια συμπεριφορά ακολουθεί και η μετάλλαξη N54I που είναι και η μόνη που ανήκει στο N-λοβό. Στις εικόνες 43A και 44A βλέπουμε πως όλες οι μεταλλάξεις (εκτός της N54I) εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια σύνδεσης με το  $\text{Ca}^{2+}$  στις θέσεις δέσμευσης του C-λοβού της CaM.

Με βάση τα αποτελέσματα και τις τιμές  $K_d$  (πίνακες 13 και 14) βλέπουμε πως την πιο μικρή επίδραση στη συγγένεια σύνδεσης των C-τελικών θέσεων δέσμευσης της CaM με το  $Ca^{2+}$  έχουν οι μεταλλάξεις N98S και F142L, οι οποίες παρουσιάζουν 3.5 και 4.8 φορές μεγαλύτερες τιμές  $K_d$  σε σύγκριση με την CaMwt, αντίστοιχα. Οι επόμενες μεταλλάξεις με τη μικρότερη επίδραση είναι οι Q136P και N98I με τιμές  $K_d$  6.5 και 8.1 φορές μεγαλύτερες της CaMwt, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθούν οι E105A, D134H, D96V και D132E με τιμές  $K_d$  9.6, 10, 12 και 14 φορές μεγαλύτερες της CaMwt, αντίστοιχα. Τη μεγαλύτερη μείωση στη συγγένεια σύνδεσης των C-τελικών θέσεων δέσμευσης της CaM με το  $Ca^{2+}$ , παρουσιάζει η μετάλλαξη D130G, με τιμή  $K_d$  46 φορές μεγαλύτερη της CaMwt. Η N54I δεν επιφέρει σχεδόν καμία αλλαγή στη συγγένεια σύνδεσης με το  $Ca^{2+}$ .

Για τις CALM2 μεταλλάξεις N98I, E105A, D132E, D134H και Q136P που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο του μορίου της CaM και την CaMwt υπολογίστηκαν: η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs που συνοδεύει τη δέσμευση του  $Ca^{2+}$  στην 1<sup>η</sup> θέση δέσμευσης ( $\Delta G_1$ ), η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs όταν πληρώνεται με  $Ca^{2+}$  και η 2<sup>η</sup> θέση δέσμευσης ( $\Delta G_2$ ) και τέλος η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs λόγω συνεργατικότητας των δύο θέσεων δέσμευσης  $Ca^{2+}$  ( $\Delta G_c$ ). Η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs είναι όμοια για κάθε μία μετάλλαξη μόνο όταν πληρώνεται η 1<sup>η</sup> θέση δέσμευσης  $Ca^{2+}$ , ενώ σημαντική μείωση παρατηρείται καθώς πληρώνεται και η 2<sup>η</sup> θέση δέσμευσης  $Ca^{2+}$ . Αυτό το φαινόμενο συνδέεται άμεσα με την απώλεια στη συνεργατικότητα μεταξύ των δύο θέσεων δέσμευσης  $Ca^{2+}$  του C-τελικού άκρου της CaM, όπως υποδεικνύουν και οι τιμές  $\Delta G_c$ . Για τις μεταλλάξεις Q136P, N98I, D134H και E105A οι τιμές  $\Delta G_c$  ήταν 1.9, 2.1, 2.7 και 4.5 φορές μεγαλύτερη από την CaMwt, αντίστοιχα. Η τιμή της  $\Delta G_c$  της μετάλλαξης D132E πλησίασε το 0.6 kJ/mole, υποδεικνύοντας ολική απώλεια της συνεργατικότητας μεταξύ των δύο θέσεων δέσμευσης  $Ca^{2+}$  στο C-τελικό άκρο της CaM.



**Εικόνα 43:** Κανονικοποιημένα φάσματα εκπομπής φθορισμού για την αγρίου τύπου **CaMwt** και τις **N54I**, **D96V**, **N98S**, **D130G** και **F142L** μεταλλαγμένες μορφές της ως συνάρτηση της ελεύθερης συγκέντρωσης ασβεστίου στο διάλυμα ([Free Ca<sup>2+</sup>]) σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος: **(A)** 320nm (277nm διέγερση)(C-τελικό άκρο CaM) και **(B)** 280nm (250nm διέγερση)(N-τελικό άκρο CaM). Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στην καλύτερη μη γραμμική αντιστοίχιση των πειραματικών δεδομένων σε ένα μοντέλο Adair για δύο θέσεις σύνδεσης που εμφανίζουν συνεργατικότητα.



**Εικόνα 44:** Κανονικοποιημένα φάσματα εκπομπής φθορισμού για την αγρίου τύπου **CaMwt** και τις **N98I**, **E105A**, **D132E**, **D134H** και **Q136P** μεταλλαγμένες μορφές της ως συνάρτηση της ελεύθερης συγκέντρωσης ασβεστίου στο διάλυμα ( $[Free Ca^{2+}]$ ) σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος: **(A)** 320 nm (277 nm διέγερση) (C-τελικό άκρο CaM) και **(B)** 280 nm (250 nm διέγερση) (N-τελικό άκρο CaM). Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στην καλύτερη μη γραμμική αντιστοίχιση των πειραματικών δεδομένων σε ένα μοντέλο Adair για δύο θέσεις σύνδεσης που εμφανίζουν συνεργατικότητα.

**Πίνακας 13:** Φαινόμενες σταθερές διάστασης κατά τη δέσμευση του ασβεστίου στο N-τελικό και C-τελικό άκρο της CaM στους 25°C. Οι τιμές και τα αντίστοιχα σφάλματα προκύπτουν από τη μη γραμμική αντιστοίχιση των πειραματικών δεδομένων σε ένα μοντέλο Adair για δύο θέσεις σύνδεσης που εμφανίζουν συνεργατικότητα.

Πρωτεΐνη CaM	$K_d$	
	N-τελικό άκρο ( $\mu\text{M}$ )	C-τελικό άκρο ( $\mu\text{M}$ )
<b>WT</b>	$7.2 \pm 0.1$	$2.9 \pm 0.1$
<b>N54I</b>	$7.2 \pm 0.1$	$2.9 \pm 0.1$
<b>D96V</b>	$7.2 \pm 0.1$	$34.3 \pm 1.2$
<b>N98S</b>	$7.2 \pm 0.1$	$10.1 \pm 0.3$
<b>D130G</b>	$7.2 \pm 0.1$	$132 \pm 12$
<b>F142L</b>	$7.2 \pm 0.1$	$13.9 \pm 0.4$

**Πίνακας 14:** Φαινόμενες σταθερές διάστασης και μεταβολές στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs κατά τη δέσμευση του ασβεστίου στο N-τελικό και C-τελικό άκρο της CaM στους 25°C. Οι τιμές και τα αντίστοιχα σφάλματα προκύπτουν από τη μη γραμμική αντιστοίχιση των πειραματικών δεδομένων σε ένα μοντέλο Adair για δύο θέσεις σύνδεσης που εμφανίζουν συνεργατικότητα.

Πρωτεΐνη CaM	Τελικό άκρο CaM	$K_d$	$\Delta G_1$	$\Delta G_2$	$\Delta G_c$
		( $\mu\text{M}$ )	(kJ/mole)	(kJ/mole)	(kJ/mole)
<b>WT</b>	C-	$2.97 \pm 0.03$	$-28.4 \pm 0.2$	$-63.1 \pm 0.1$	$-9.8 \pm 0.3$
	N-	$8.08 \pm 0.09$	$-28.7 \pm 0.2$	$-58.2 \pm 0.1$	$-4.3 \pm 0.3$
<b>N98I</b>	C-	$23.40 \pm 0.08$	$-25.9 \pm 0.4$	$-52.9 \pm 0.2$	$-4.5 \pm 0.8$
	N-	$7.15 \pm 0.12$	$-25.8 \pm 0.6$	$-58.8 \pm 0.1$	$-10.6 \pm 1.2$
<b>E105A</b>	C-	$28.7 \pm 0.03$	$-26.6 \pm 0.2$	$-51.8 \pm 0.2$	$-2.2 \pm 0.4$
	N-	$8.10 \pm 0.10$	$-28.6 \pm 0.2$	$-58.1 \pm 0.1$	$-4.3 \pm 0.3$

<b>D132E</b>	C-	$41.55 \pm 0.15$	$-27.1 \pm 0.2$	$-50.1 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.4$
	N-	$7.09 \pm 0.23$	$-29.8 \pm 0.3$	$-58.8 \pm 0.2$	$-2.7 \pm 0.6$
<b>D134H</b>	C-	$29.56 \pm 0.08$	$-25.8 \pm 0.3$	$-51.7 \pm 0.2$	$-3.6 \pm 0.5$
	N-	$7.64 \pm 0.19$	$-29.7 \pm 0.2$	$-58.5 \pm 0.2$	$-2.5 \pm 0.4$
<b>Q136P</b>	C-	$19.03 \pm 0.07$	$-26.2 \pm 0.4$	$-53.9 \pm 0.2$	$-5.0 \pm 0.8$
	N-	$7.24 \pm 0.17$	$-24.9 \pm 0.9$	$-58.7 \pm 0.2$	$-12.3 \pm 1.9$



#### 14.Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συνθετικών πεπτιδίων hRyR2 με την CaMwt με χρήση θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC)

Τα πεπτίδια hRyR2 που συντέθηκαν υπο τη μορφή λυοφιλιωμένης σκόνης διαλύθηκαν σε 100 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.4) και 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα διαλύθηκε και η ανασυνδυασμένη CaMwt στους 4°C. Το πεπτίδιο B (αα. 3584-3602) αφορά στην κύρια θέση πρόσδεσης (CaMBD2) της CaM στον υποδοχέα RyR2. Τα πεπτίδια A (αα. 4240-4254), D (αα. 4255-4277), E (αα. 4265-4277) και F (αα. 4255-4271) αποτελούν περιοχές του καρβοξυ-τελικού άκρου του RyR2. Στο τμήμα αυτό του RyR2, όπως εκτενώς έχει αναλυθεί στο θεωρητικό μέρος της διατριβής, περιλαμβάνεται η περιοχή CaMBD3 (αα. 4246-4276) που αποτελεί μία πιθανή περιοχή πρόσδεσης της CaM στον RyR2, πέραν της κύριας CaMBD2 (Lau, Chan and Van Petegem, 2014;Brohus *et al.*, 2019).

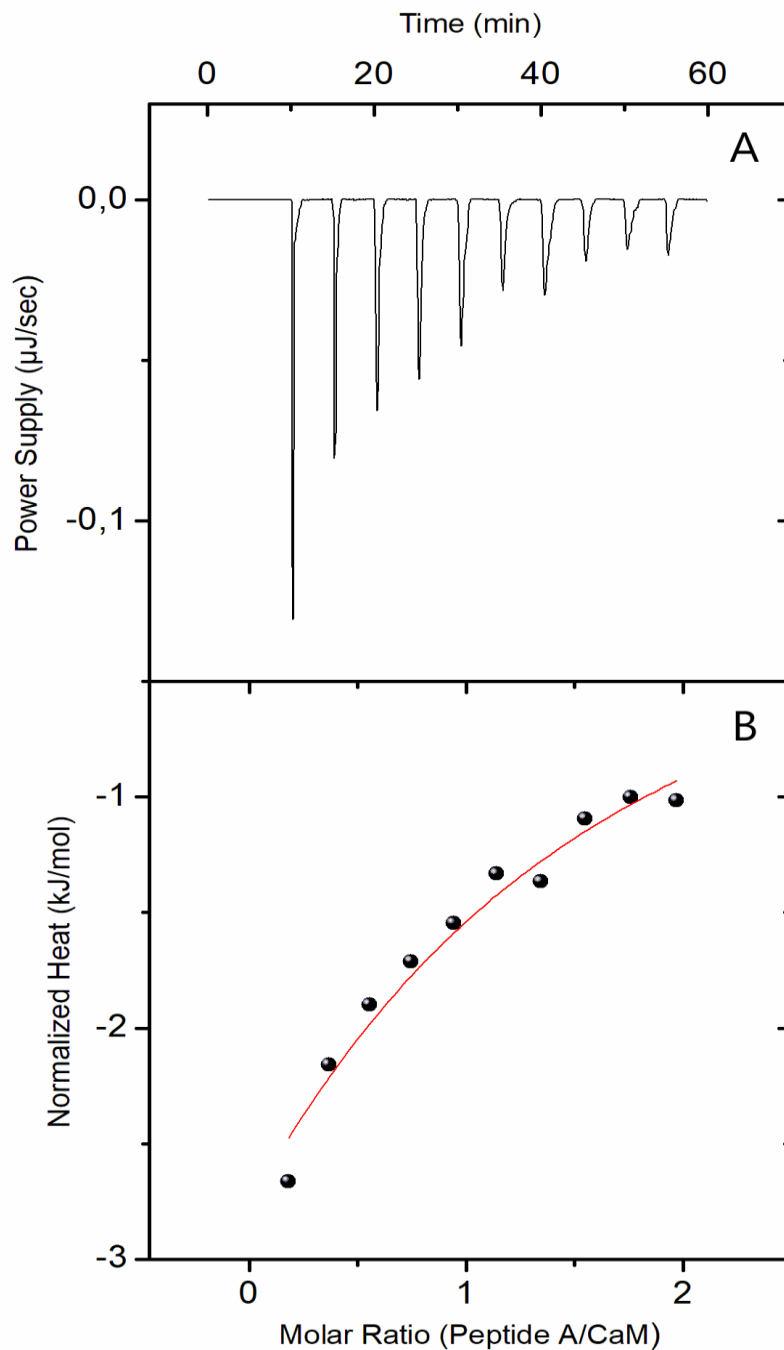
Τα ITC πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 298.15 K **παρουσία Ca<sup>2+</sup>** με την CaMwt να τοποθετείται στο κελί του δείγματος και το πεπτίδιο hRyR2 στη σύριγγα. Στις εικόνες 45-49 παρουσιάζονται η μεταβολή της ισχύος (kJ/sec) που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση του πεπτιδίου στην CaMwt (A) και το κανονικοποιημένο (ως προς τη συγκέντρωση του πεπτιδίου) θερμικό σήμα (kJ/mole) ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου-CaMwt στο κελί του δείγματος (B). Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται οι θερμοδυναμικές παράμετροι που αντιστοιχούν στην εκάστοτε αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με την CaMwt.

Η CaMwt αλληλεπιδρά με όλα τα πεπτίδια που δοκιμάστηκαν με στοιχειομετρία 1:1. Οι αρνητικές και θετικές κορυφές της παροχής ισχύος που παρατηρούνται (σχήματα A των Εικόνων 45-49), δηλώνουν την έκλυση ή την απορρόφηση θερμότητας αντίστοιχα που προκύπτει από την εκάστοτε αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με την CaMwt.

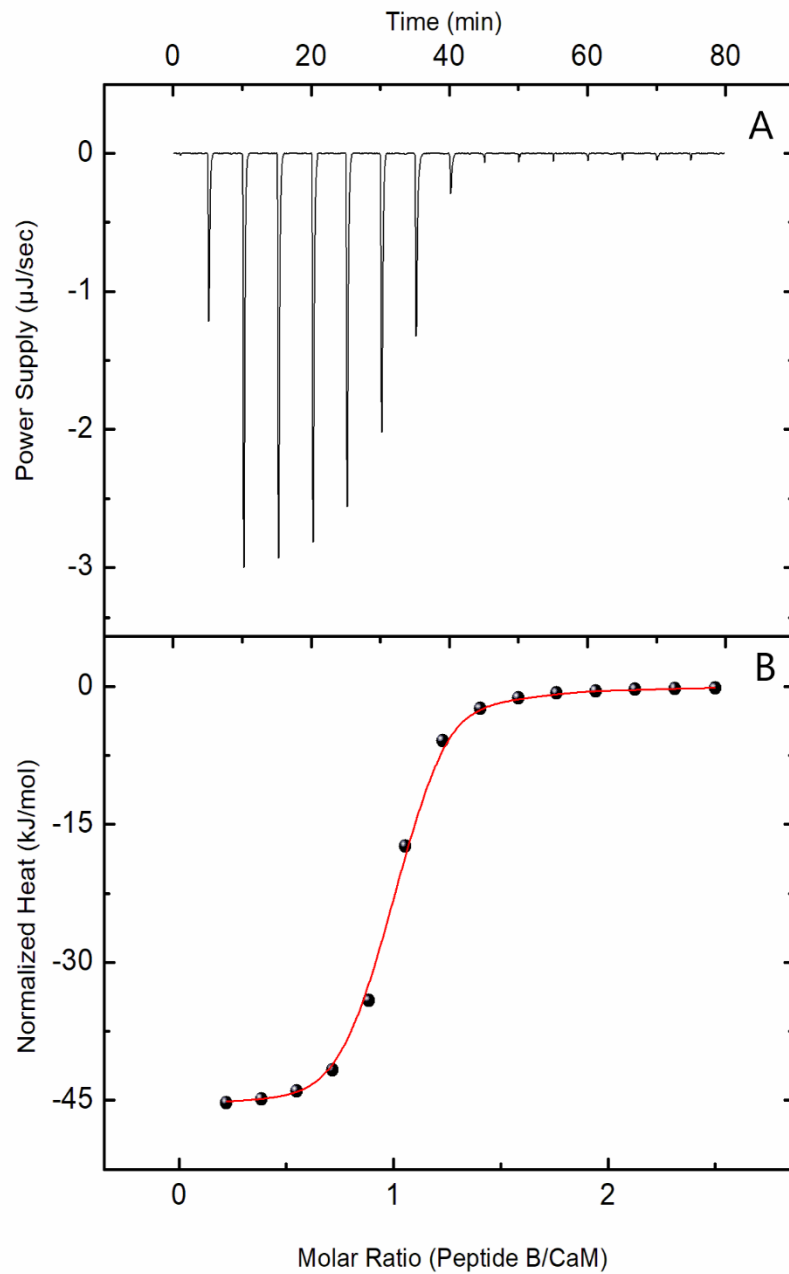
Η αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο A είναι μια εξαιρετικά ασθενής εξώθερμη ( $\Delta H_r$  -9,8 kJ/mole) διαδικασία με  $K_d$  342.5  $\mu$ M. Αντιθέτως η αλληλεπίδραση της CaMwt με το πεπτίδιο B δίνει μία ισχυρά εξώθερμη αντίδραση ( $\Delta H$  -45.9 kJ/mole) και μάλιστα ενθαλπικά καθοδηγούμενη (καθώς  $\Delta S < 0$ ) με τιμή  $K_d$  0.35  $\mu$ M. Το γεγονός πως η ενθαλπία οδηγεί την αλληλεπίδραση αυτή, υποδηλώνει πως η CaMwt και το πεπτίδιο B έχουν μεταξύ τους ισχυρή συμπληρωματικότητα και η μεγάλη συγγένεια σύνδεσης που

παρουσιάζουν επιβεβαιώνει πως το πεπτίδιο B αφορά στην κύρια θέση πρόσδεσης της CaM (CaMBD2) στον υποδοχέα RyR2. Τα πεπτίδια D, E και F αλληλεπιδρούν με την CaMwt με παρόμοιο τρόπο. Και οι τρεις αλληλεπιδράσεις είναι ενδόθερμες με τιμές Kd 1.77  $\mu$ M, 2.71  $\mu$ M και 0.6  $\mu$ M, αντίστοιχα. Το πεπτίδιο F είναι το δεύτερο πεπτίδιο μετά το πεπτίδιο B που αλληλεπιδρά με μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με την CaM. Η αλληλεπίδραση πεπτιδίου F – CaMwt είναι εντροπικά καθοδηγούμενη ( $\Delta S > 0$ , όταν  $\Delta H > 0$ ) διαδικασία, το οποίο υποδηλώνει πως το πεπτίδιο F παρουσιάζει λιγότερο ειδική σύνδεση με την CaMwt απ' ότι το πεπτίδιο B.

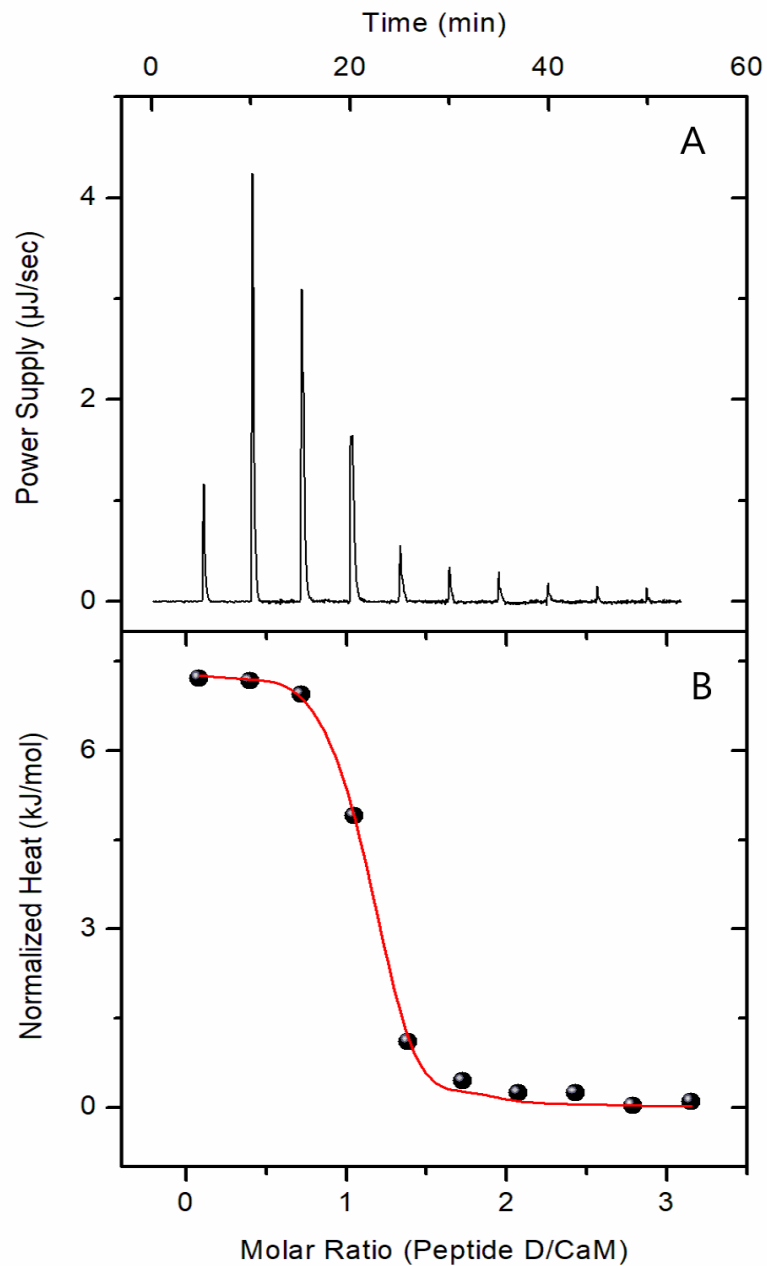
Το πεπτίδιο F, αποτελεί μια αλληλουχία που δοκιμάζεται πρώτη φορά σε πειράματα αλληλεπίδρασης με την CaM με αυτή τη μέθοδο. Είναι μία αρκετά μικρότερη περιοχή της περιοχής CaMBD3 και ίσως αυτό να δείχνει πως το λειτουργικό κομμάτι με το οποίο αλληλεπιδρά η CaM με τον RyR2 στην ευρύτερη περιοχή να είναι η αλληλουχική περιοχή που ορίζει το πεπτίδιο F. Για να επιβεβαιωθεί πως η συγκεκριμένη αλληλουχία του πεπτιδίου F είναι και η λειτουργική, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα ITC με ένα τυχαίο πεπτίδιο (scrambled) που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Η αλληλεπίδραση του scrambled πεπτιδίου με την CaMwt τόσο παρουσία, όσο και απουσία  $Ca^{2+}$  δεν ήταν επιτυχής, το οποίο αποδεικνύει πως η συγκεκριμένη αλληλουχία του πεπτιδίου F είναι και η λειτουργική για τη σύνδεση της CaM σε αυτό. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο B. (Εικόνες 50 και 51)



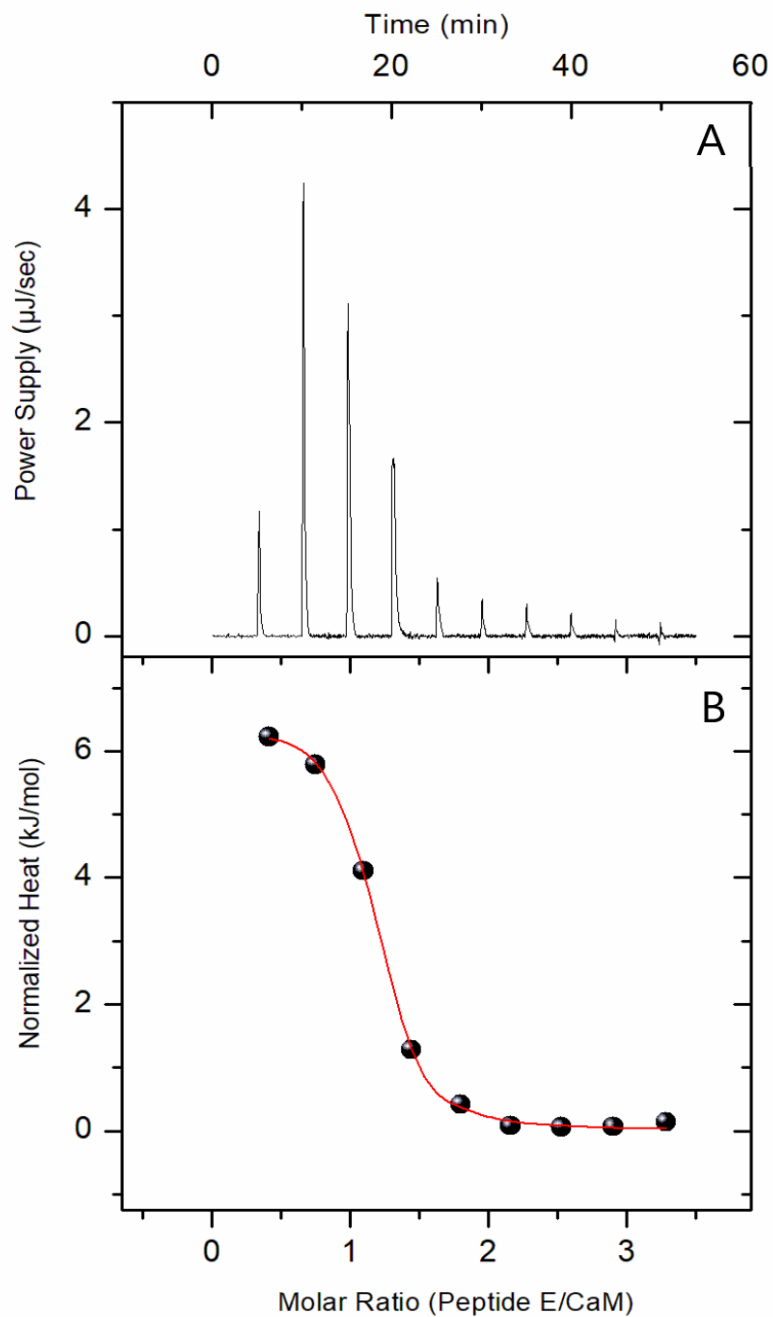
**Εικόνα 45:** (A) Μεταβολή της ισχύος που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450  $\mu\text{M}$  πεπτιδίου A σε 40  $\mu\text{M}$  CaMwt στους 298.15K, παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Κανονικοποιημένο θερμικό σήμα ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου A-CaMwt στο θερμιδομετρικό κελί.



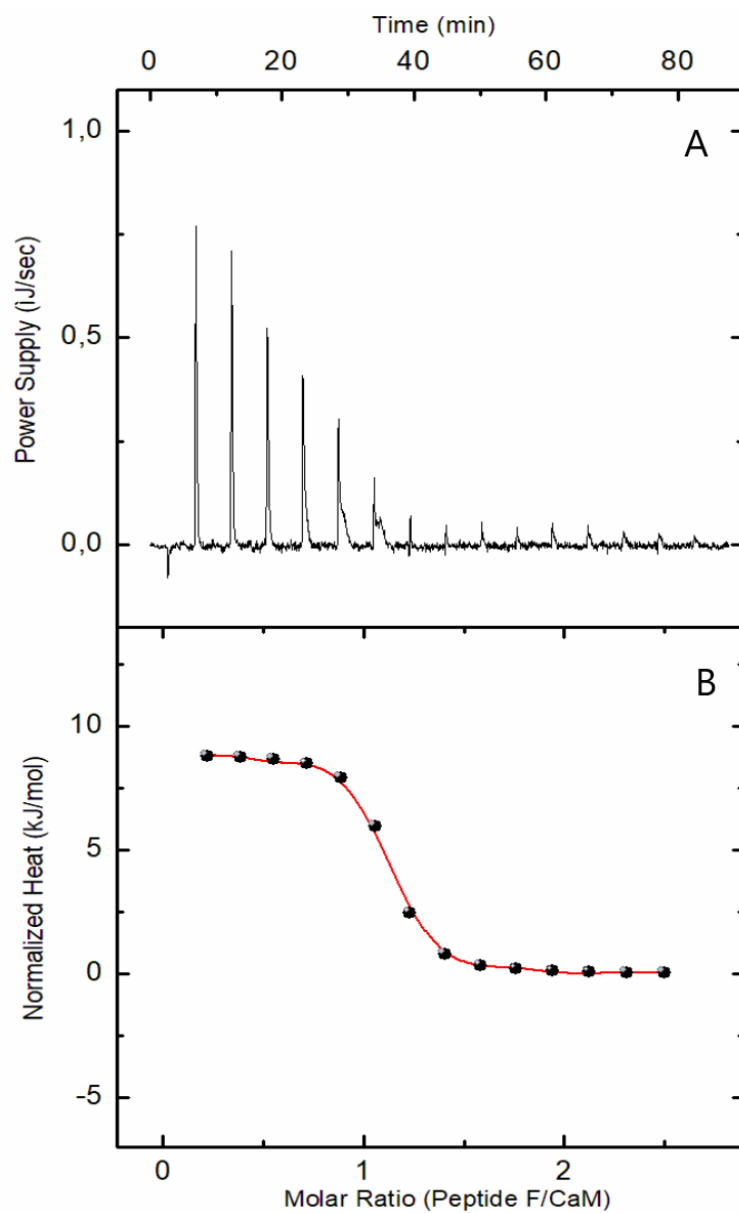
**Εικόνα 46:** (A) Μεταβολή της ισχύος που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450  $\mu\text{M}$  πεπτιδίου B σε 40  $\mu\text{M}$  CaMwt στους 298.15K, παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Κανονικοποιημένο θερμικό σήμα ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου B-CaMwt στο θερμιδομετρικό κελί.



**Εικόνα 47:** (A) Μεταβολή της ισχύος που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450μM πεπτιδίου D σε 40μM CaMwt στους 298.15K, παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Κανονικοποιημένο θερμικό σήμα ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου D-CaMwt στο θερμιδομετρικό κελί.



**Εικόνα 48:** (A) Μεταβολή της ισχύος που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450  $\mu\text{M}$  πεπτιδίου E σε 40  $\mu\text{M}$  CaMwt στους 298.15K, παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Κανονικοποιημένο θερμικό σήμα ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου E-CaMwt στο θερμιδομετρικό κελί.

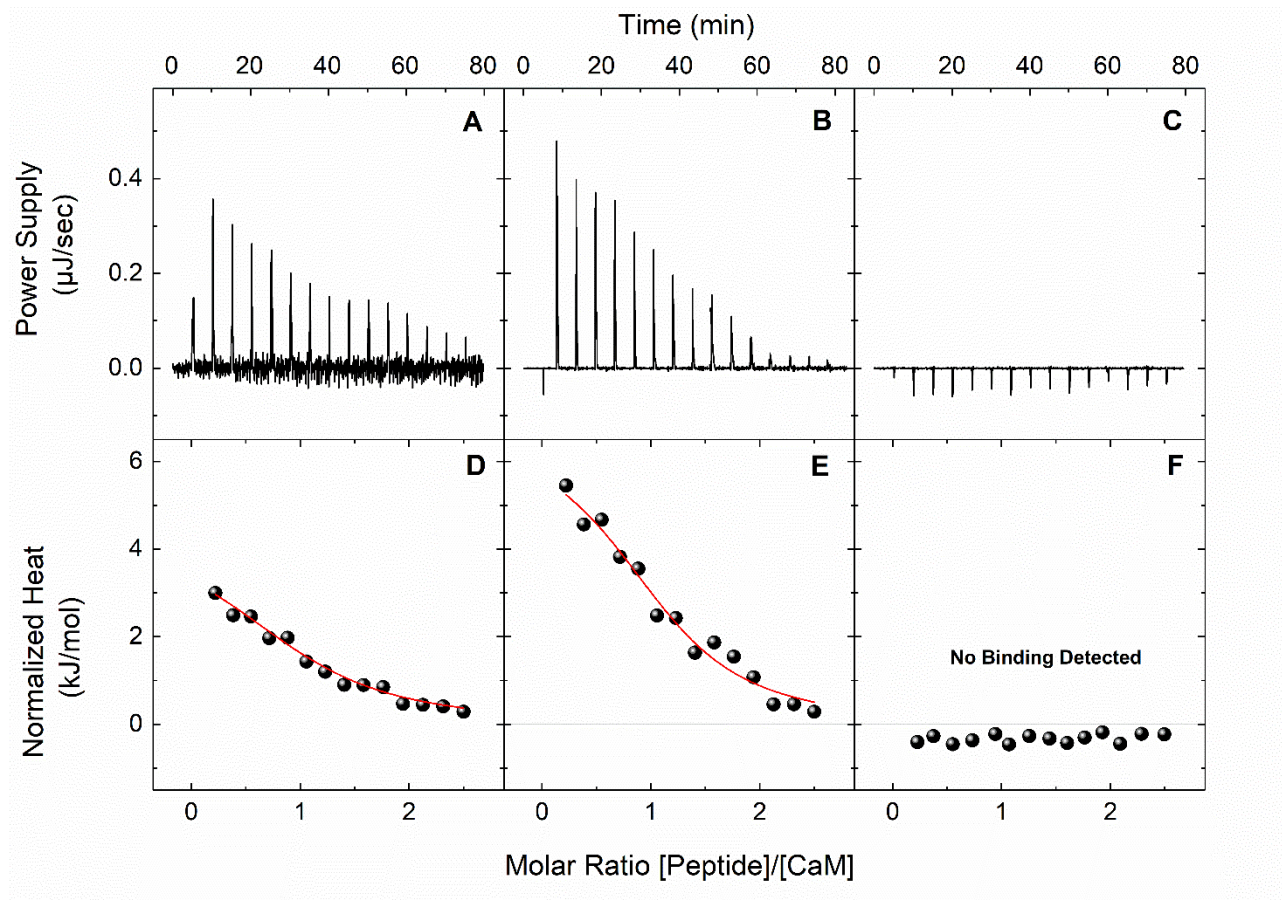


**Εικόνα 49:** (A) Μεταβολή της ισχύος που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450  $\mu\text{M}$  πεπτιδίου F σε 40  $\mu\text{M}$  CaMwt στους 298.15K, παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Κανονικοποιημένο θερμικό σήμα ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου F-CaMwt στο θερμιδομετρικό κελί.

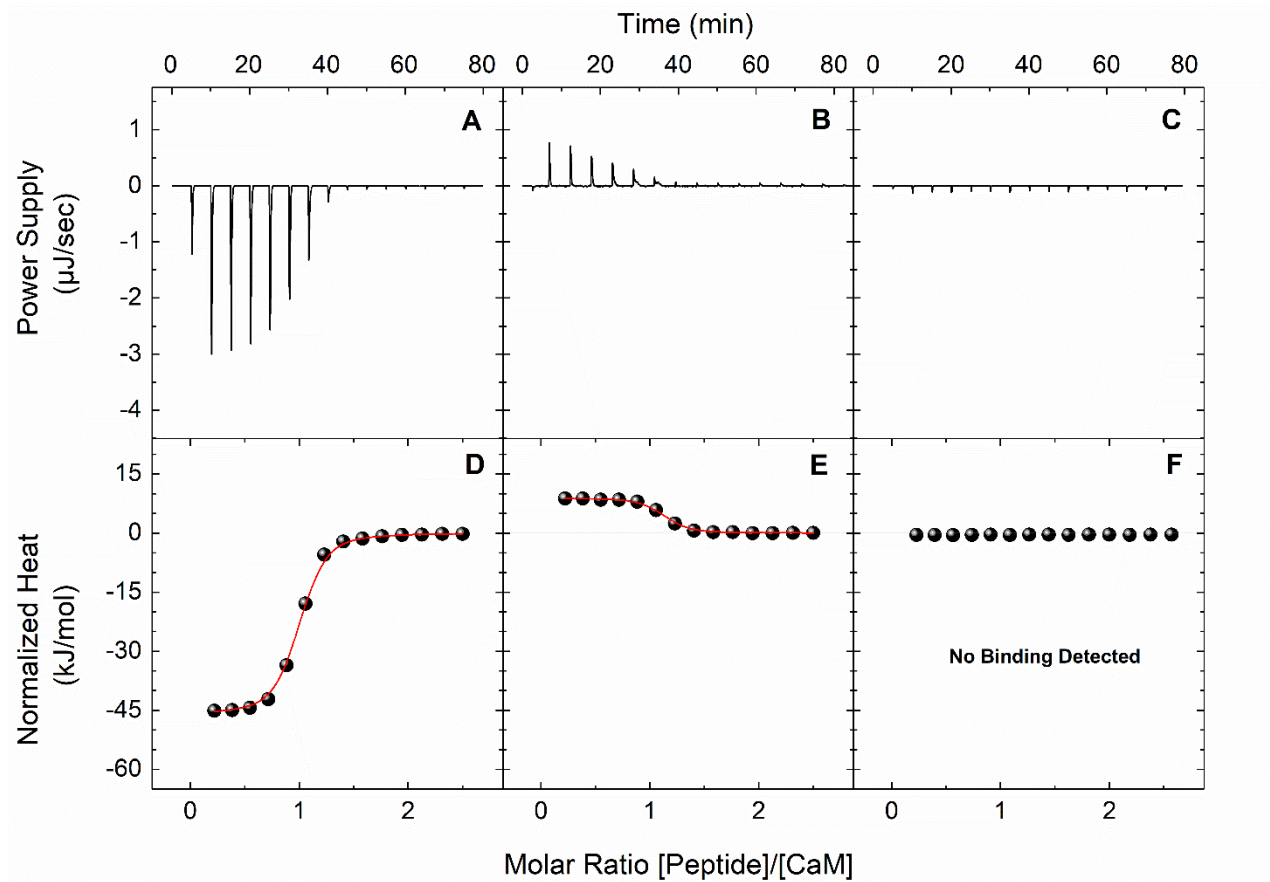
**Πίνακας 15:** Θερμοδυναμικοί παράμετροι της αλληλεπίδρασης της CaMwt με τα συνθετικά πεπτίδια hRyR2 παρουσία Ca<sup>2+</sup>

<b>Πεπτίδιο</b>	<b>Kd</b>	<b><math>\Delta G_r</math></b>	<b><math>\Delta H_r</math></b>	<b><math>\Delta S_r</math></b>	<b>N</b>
<b>hRyR2</b>	<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>(kJ/mole)</b>	<b>(kJ/mole)</b>	<b>(kJ/mole K)</b>	
<b>A</b>	342.5 ± 10.0	-19.8 ± 0.08	-9.8 ± 0.04	0.03 ± 0.29	0.86 ± 0.01
<b>B</b>	0.35 ± 0.01	-36.8 ± 0.20	-45.9 ± 1.4	-0.03 ± 1.40	0.93 ± 0.01
<b>D</b>	1.77 ± 0.30	-32.8 ± 0.42	7.4 ± 0.08	0.13 ± 1.42	0.99 ± 0.01
<b>E</b>	2.71 ± 0.15	-31.6 ± 0.13	11.3 ± 0.08	0.14 ± 0.54	0.87 ± 0.01
<b>F</b>	0.60 ± 0.05	-35.5 ± 0.21	8.9 ± 0.4	0.15 ± 0.5	1.05 ± 0.01





**Εικόνα 50:** (A,B,C) Μεταβολή της ισχύος που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450μM πεπτιδίου B, F και Scrambled pep F σε 40μM CaMwt στους 298.15K, απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . (D,E,F) Κανονικοποιημένο θερμικό σήμα ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου B, F, Scrambled pep F-CaMwt στο θερμοδομετρικό κελί.



**Εικόνα 51:** (A,B,C) Μεταβολή της ισχύος που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450μM πεπτιδίου B, F, Scrambled per F σε 40μM CaMwt στους 298.15K, παρουσία  $Ca^{2+}$ . (D,E,F) Κανονικοποιημένο θερμικό σήμα ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου B, F, Scrambled per F-CaMwt στο θερμιδομετρικό κελί

## 15.Μελέτη της αλληλεπίδρασης της CaMwt και μεταλλάξεων της με τα συνθετικά πεπτίδια B και F του υποδοχέα hRyR2 με θερμοδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC)

Το πεπτίδιο B, που αφορά στην κύρια θέση πρόσδεσης της CaM (CaMBD2) στον υποδοχέα RyR2 και το πεπτίδιο F που αποτελεί μία πιο ειδική αλληλουχία μιας επιπλέον πιθανής περιοχής αλληλεπίδρασης της CaM στον RyR2 (CaMBD3) χρησιμοποιήθηκαν σε επιπλέον πειράματα θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης με ορισμένες εκ των μεταλλαγμένων μορφών της CaM που σχετίζονται με θνησιγενή σύνδρομα κοιλιακών αρρυθμιών. Οι μεταλλάξεις που δοκιμάστηκαν στα πειράματα αυτά ήταν οι μεταλλάξεις που βρίσκονται στο γονίδιο CALM2 : N98I, D132E, D134H και Q136P. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο σε συνθήκες παρουσίας όσο και απουσίας  $Ca^{2+}$ .

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 8.3.

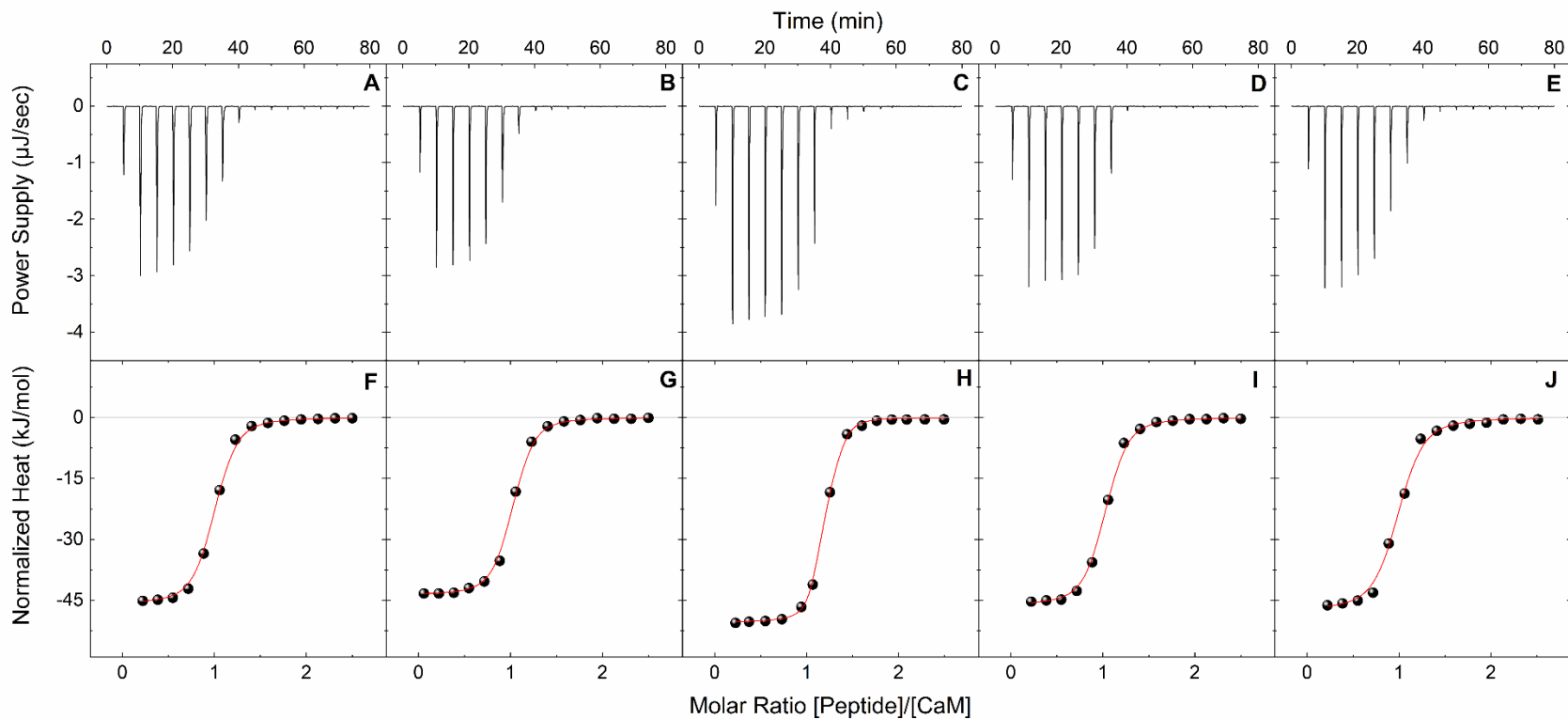
Έτσι, τα πεπτίδια B και F και οι ανασυνδυασμένες CaM (wt, N98I, D132E, D134H και Q136) διαλύθηκαν σε δύο είδη ρυθμιστικού διαλύματος : (**holo-buffer**): 100 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.4) και 10 mM  $CaCl_2$  και (**apo-buffer**): 100 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.4) και 10 mM EDTA. Όπως και στην προηγούμενη ενότητα στο κελί του δείγματος τοποθετήθηκε η CaM και το πεπτίδιο στη σύριγγα. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 298.15 K, παρουσία και απουσία  $Ca^{2+}$ .

Τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των μεταλλάξεων με το πεπτίδιο B παρουσία (**holo-buffer**) και απουσία (**apo-buffer**)  $Ca^{2+}$  παρουσιάζονται στις εικόνες 52 και 53 αντίστοιχα και οι θερμοδυναμικές παράμετροι των αλληλεπιδράσεων στους πίνακες 16 και 17.

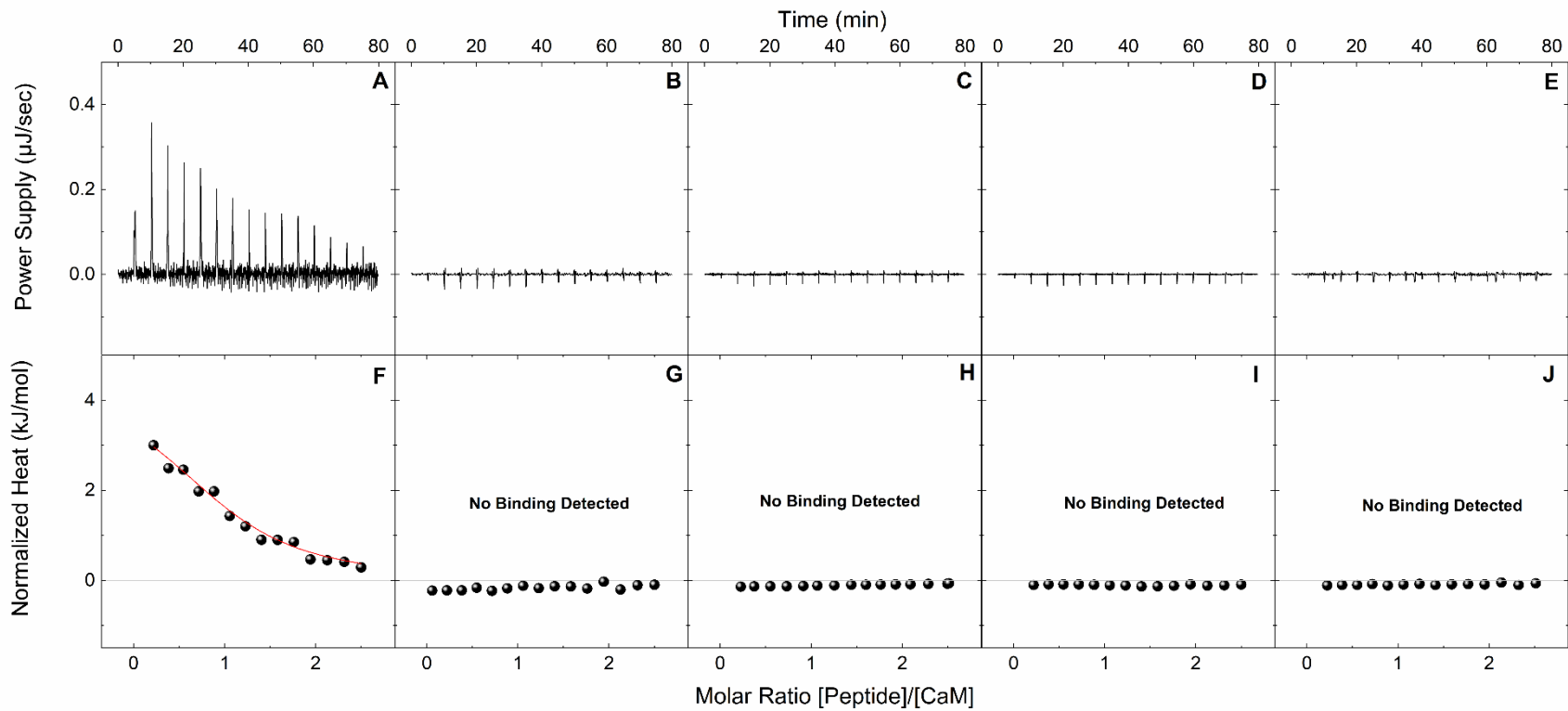
Παρουσία  $Ca^{2+}$ , παρατηρείται πως η τιτλοδότηση του πεπτιδίου B σε όλες τις μεταλλάξεις προκαλεί μείωση στην παροχή ισχύος, συμπεριφορά όμοια με αυτή της CaMwt, υποδηλώνοντας έκλυση θερμότητας. Σε όλες τις περιπτώσεις, ανεξάρτητα με τη μετάλλαξη η αντίδραση είναι εξώθερμη. Όλες οι μεταλλάξεις, όπως φαίνεται στον πίνακα 16, εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με το πεπτίδιο B με τιμές  $K_d$  μικρότερες του 1  $\mu$ M. Ωστόσο, οι τιμές  $K_d$  των μεταλλάξεων D134H και Q136P για το πεπτίδιο B

εμφανίζουν ελάχιστη αύξηση σε σχέση με την CaMwt. Αντίθετα, οι τιμές  $K_d$  των N98I και D132E είναι μικρότερες της CaMwt, υποδηλώνοντας πως αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης για το πεπτίδιο B από την CaMwt. Η στοιχειομετρία όλων των αλληλεπιδράσεων σύνδεσης είναι 1:1 και όπως φαίνεται στον πίνακα 16 είναι ενθαλπικά καθοδηγούμενες.

Απουσία  $Ca^{2+}$ , όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 53, μόνο η CaMwt φαίνεται να αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο B. Η αύξηση της παροχής ισχύος, δηλώνει πως απορροφάται θερμότητα κατά την σύνδεση του πεπτιδίου B στην CaM, έτσι η αντίδραση αυτή είναι ενδόθερμη. Όπως φαίνεται στον πίνακα 17, οι θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου B με την CaMwt απουσία  $Ca^{2+}$  διαφέρουν από αυτούς που παρατηρούνται παρουσία  $Ca^{2+}$ . Η συγγένεια σύνδεσης της CaMwt για το πεπτίδιο B σε apo-buffer είναι ασθενέστερη απ' ό,τι σε holo-buffer με τιμές  $K_d$  14.03  $\mu$ M και 0.35  $\mu$ M αντίστοιχα. Επίσης, σε apo-buffer η αλληλεπίδραση της CaMwt με το πεπτίδιο B είναι εντροπικά καθοδηγούμενη και όχι ενθαλπικά όπως σε holo-buffer. Αυτές οι συνεισφορές της εντροπίας συνήθως προκύπτουν από υδρόφοβα κατάλοιπα στην διεπιφάνεια της πρωτεΐνης με το διαλύτη που 'κρύβονται' από το νερό καθώς λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση.



**Εικόνα 52:** (Πάνω) Μεταβολή της ισχύος (μJ/sec) που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450 μM πεπτιδίου B σε 40 μM A)WT, B)N98I, C)D132E, D)D134H και E)Q136P CaM στους 298.15K, παρουσία Ca<sup>2+</sup>. (Κάτω) Κανονικοποιημένο (ως προς τη C<sub>πεπτιδίου</sub>) θερμικό σήμα (kJ/mol) ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου- F)WT, G)N98I, H)D132E, I)D134H και J)Q136P CaM στο θερμιδομετρικό κελί.



**Εικόνα 53:** (Πάνω) Μεταβολή της ισχύος (μJ/sec) που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450 μM πεπτιδίου B σε 40 μM A)WT, B)N98I, C)D132E, D)D134H και E)Q136P CaM στους 298.15K, απουσία Ca<sup>2+</sup>. (Κάτω) Κανονικοποιημένο (ως προς τη C<sub>πεπτιδίου</sub>) θερμικό σήμα (kJ/mol) ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου- F)WT, G)N98I, H)D132E, I)D134H και J)Q136P CaM στο θερμιδομετρικό κελί.

**Πίνακας 16:** Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου B με τις CaMwt, N98I, D132E, D134H και Q136P παρουσία Ca<sup>2+</sup> στους 298.15K

	<b>K<sub>d</sub></b> <b>(μM)</b>	<b>N</b>	<b>Δ<sub>r</sub>H</b> <b>(kJ/mole)</b>	<b>Entropic Term</b> <b>[-T·Δ<sub>r</sub>S]</b> <b>(kJ/mole)</b>	<b>Δ<sub>r</sub>G</b> <b>(kJ/mole)</b>	
<b>Peptide B</b>	WT	0.35 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-45.9 ± 1.4	9.1 ± 1.4	-36.8 ± 0.2
	N98I	0.29 ± 0.01	0.94 ± 0.01	-43.8 ± 1.3	6.5 ± 1.3	-37.3 ± 0.1
	D132H	0.16 ± 0.01	1.09 ± 0.01	-50.8 ± 1.6	11.9 ± 1.6	-38.9 ± 0.2
	D134H	0.36 ± 0.03	0.97 ± 0.01	-46.2 ± 1.5	9.5 ± 1.6	-36.7 ± 0.2
	Q136P	0.42 ± 0.02	0.97 ± 0.01	-47.9 ± 1.5	11.5 ± 1.6	-36.4 ± 0.1

**Πίνακας 17:** Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου B με τις CaMwt, N98I, D132E, D134H και Q136P απουσία Ca<sup>2+</sup> στους 298.15K

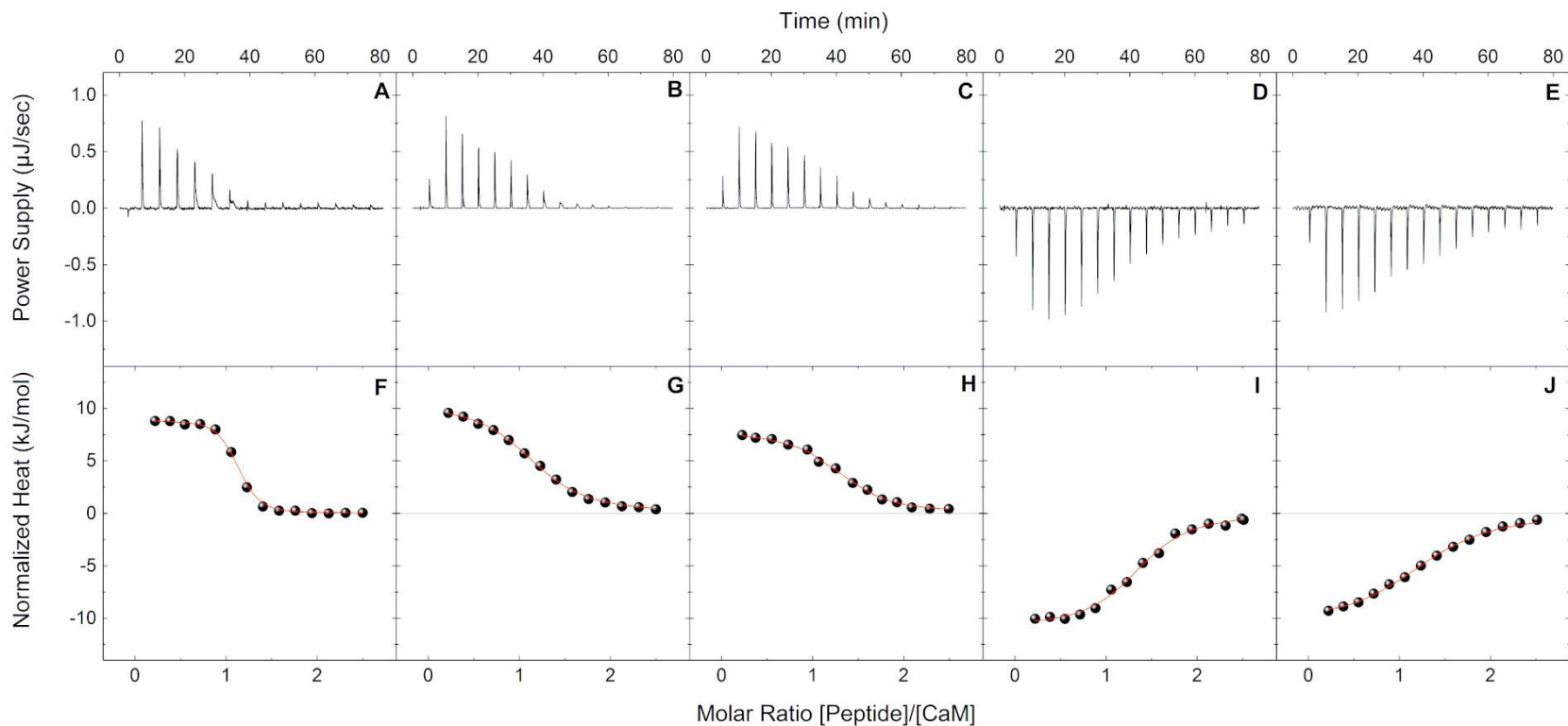
	<b>K<sub>d</sub></b> <b>(μM)</b>	<b>N</b>	<b>Δ<sub>r</sub>H</b> <b>(kJ/mole)</b>	<b>Entropic Term</b> <b>[-T·Δ<sub>r</sub>S]</b> <b>(kJ/mole)</b>	<b>Δ<sub>r</sub>G</b> <b>(kJ/mole)</b>	
<b>Peptide B</b>	WT	14.03 ± 2.40	1.04 ± 0.01	6.3 ± 0.9	-34.0 ± 1.0	-27.7 ± 0.4
	N98I			No binding detected		
	D132H			No binding detected		
	D134H			No binding detected		
	Q136P			No binding detected		

Τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των μεταλλάξεων με το πεπτίδιο F παρουσία (holo-buffer) και απουσία (apo-buffer)  $Ca^{2+}$  παρουσιάζονται στις εικόνες 54 και 55 αντίστοιχα και οι θερμοδυναμικές παράμετροι των αλληλεπιδράσεων στους πίνακες 18 και 19.

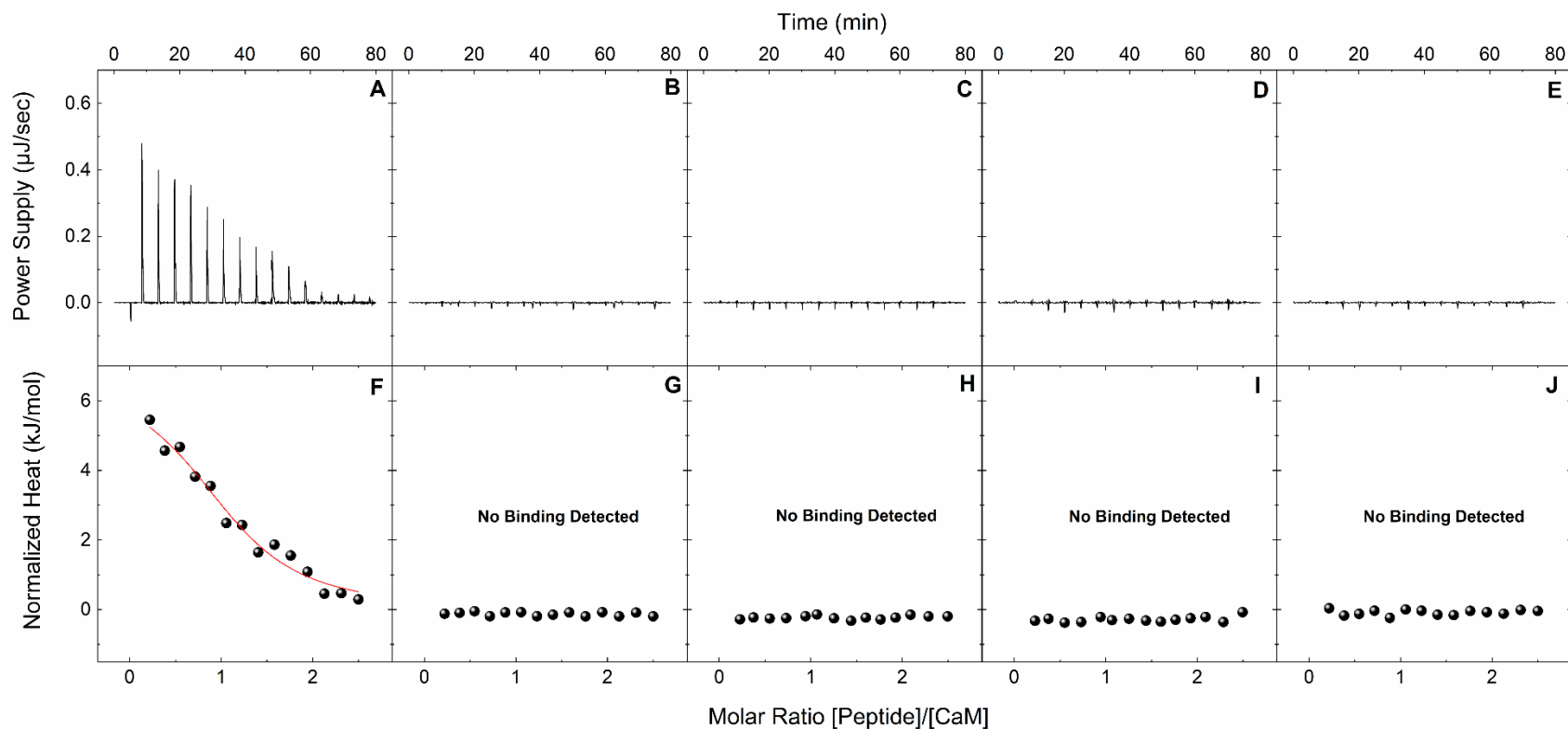
Παρουσία  $Ca^{2+}$ , παρατηρούνται αλλαγές στην παροχή ισχύος κατά την τιτλοδότηση του πεπτιδίου F. Όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM αλληλεπιδρούν με το πεπτίδιο F αλλά με διαφορετικό θερμοδυναμικό προφίλ. Η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου F με τις N98I και D132E προκαλεί αύξηση της παρεχόμενης ισχύος, που σημαίνει πως απορροφάται θερμότητα και άρα πρόκειται για ενδόθερμες αντιδράσεις. Όμοια συμπεριφορά παρουσιάζει και η CaMwt. Παρόλα αυτά, οι N98I και D132E εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια σύνδεσης για το πεπτίδιο F σε σχέση με την CaMwt, όπως φαίνεται από τις τιμές  $K_d$  του πίνακα 18. Από την άλλη, η αλληλεπίδραση των D134H και Q136P με το πεπτίδιο F προκαλεί έκλυση θερμότητας, οπότε πρόκειται για εξώθερμες αντιδράσεις.

Απουσία  $Ca^{2+}$ , μόνο η CaMwt αλληλεπιδρά και πάλι με το πεπτίδιο F, αυτή τη φορά με συγγένεια σύνδεσης 30 φορές μικρότερη απ' ό,τι σε συνθήκες παρουσίας  $Ca^{2+}$ , αλλά και πάλι με το ίδιο εντροπικά καθοδηγούμενο τρόπο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως η CaMwt απουσία  $Ca^{2+}$  προσδένεται στα πεπτίδια B και F με σχετικά όμοιες συγγένειες σύνδεσης ( $K_d$  16.58 και 14.03  $\mu$ M αντίστοιχα). Καμία από τις μεταλλαγμένες CaM δεν έδωσε αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο F απουσία  $Ca^{2+}$ .





**Εικόνα 54:** (Πάνω) Μεταβολή της ισχύος ( $\mu\text{J}/\text{sec}$ ) που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση  $450 \mu\text{M}$  πεπτιδίου F σε  $40 \mu\text{M}$  A)WT, B)N98I, C)D132E, D)D134H και E)Q136P CaM στους 298.15K, παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . (Κάτω) Κανονικοποιημένο (ως προς τη  $C_{\text{πεπτιδίου}}$ ) θερμικό σήμα ( $\text{kJ}/\text{mol}$ ) ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου- F)WT, G)N98I, H)D132E, I)D134H και J)Q136P CaM στο θερμιδομετρικό κελί.



**Εικόνα 55:** (Πάνω) Μεταβολή της ισχύος (μJ/sec) που παρέχεται στο κελί αναφοράς κατά την τιτλοδότηση 450 μM πεπτιδίου F σε 40 μM A)WT, B)N98I, C)D132E, D)D134H και E)Q136P CaM στους 298.15K, απουσία Ca<sup>2+</sup>. (Κάτω) Κανονικοποιημένο (ως προς τη C<sub>πεπτιδίου</sub>) θερμικό σήμα (kJ/mol) ως συνάρτηση της αναλογίας πεπτιδίου- F)WT, G)N98I, H)D132E, I)D134H και J)Q136P CaM στο θερμοδομετρικό κελί.

**Πίνακας 18:** Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου F με τις CaMwt, N98I, D132E, D134H και Q136P παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 298.15K

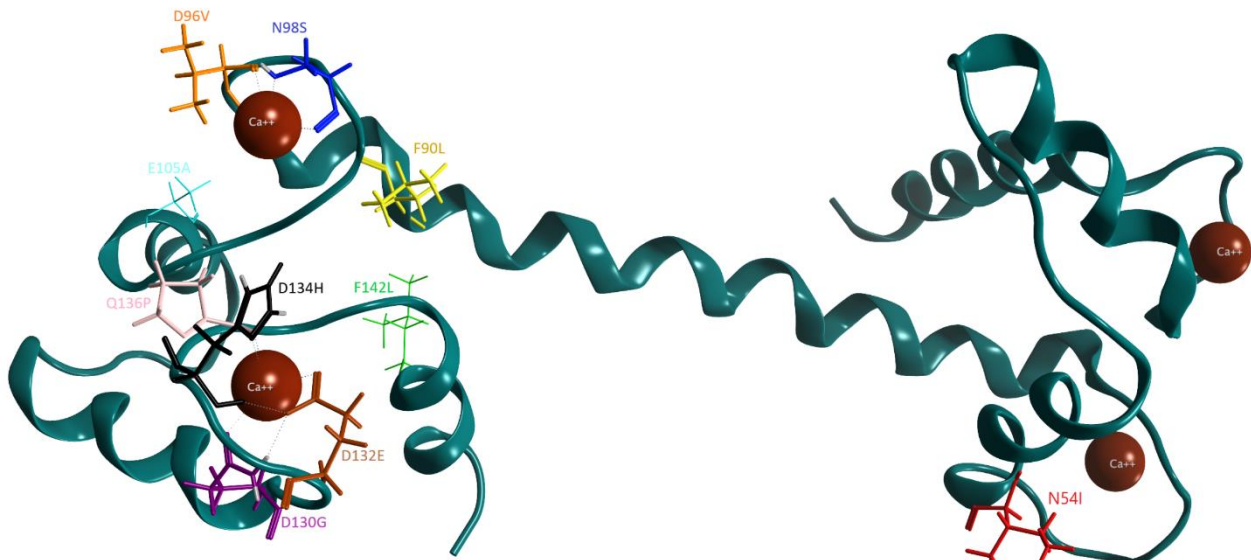
	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	N	$\Delta_r H$ (kJ/mole)	Entropic Term [-T $\cdot\Delta_r S$ ] (kJ/mole)	$\Delta_r G$ (kJ/mole)	
Peptide F	WT	$0.60 \pm 0.05$	$1.05 \pm 0.01$	$8.9 \pm 0.4$	$-44.4 \pm 0.5$	$-35.5 \pm 0.2$
	N98I	$2.99 \pm 0.28$	$1.04 \pm 0.01$	$9.5 \pm 0.4$	$-41.0 \pm 0.5$	$-31.5 \pm 0.3$
	D132H	$2.13 \pm 0.15$	$1.06 \pm 0.01$	$8.1 \pm 0.4$	$-40.5 \pm 0.5$	$-32.4 \pm 0.2$
	D134H	$2.54 \pm 0.39$	$1.16 \pm 0.02$	$-10.9 \pm 0.4$	$-21.1 \pm 0.6$	$-31.9 \pm 0.4$
	Q136P	$5.92 \pm 0.50$	$1.09 \pm 0.01$	$-10.5 \pm 0.4$	$-19.3 \pm 0.5$	$-29.8 \pm 0.2$

**Πίνακας 19:** Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου F με τις CaMwt, N98I, D132E, D134H και Q136P απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 298.15K

	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	N	$\Delta_r H$ (kJ/mole)	Entropic Term [-T $\cdot\Delta_r S$ ] (kJ/mole)	$\Delta_r G$ (kJ/mole)	
Peptide F	WT	$16.58 \pm 3.22$	$0.96 \pm 0.01$	$6.6 \pm 0.5$	$-33.9 \pm 0.7$	$-27.3 \pm 0.5$
	N98I	No binding detected				
	D132H	No binding detected				
	D134H	No binding detected				
	Q136P	No binding detected				

## Συζήτηση αποτελεσμάτων

Για τη διαξαγωγή των βιοφυσικών πειραμάτων, εκφράστηκαν και απομονώθηκαν με επιτυχία σε υψηλή καθαρότητα η CaMwt και οι CaM-μεταλλαγμένες μορφές N54I, F90L, D96V, N98I, N98S, E105A, D130G, D132E, D134H, Q136P, F142L οι οποίες έχουν συσχετισθεί με θνησιγενείς αρρυθμογενείς φαινότυπους. Για όλες τις πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού. Η ταυτότητα όλων των πρωτεϊνών που παράχθηκαν επιβεβαιώθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης με χρήση του κατάλληλου αντισώματος αναγνώρισης της CaM. Οι μεταλλαγμένες μορφές D96H, A103V, E141G και E141K, δεν κατέστη δυνατό να αποδώσουν υδατοδιαλυτές μορφές πρωτεΐνης με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε. Η θέση των μεταλλάξεων στο μόριο της CaM για τις οποίες έγινε βιοφυσική μελέτη σε αυτή τη διατριβή φαίνονται στην Εικόνα 56.



**Εικόνα 56:** Μεταλλάξεις στο μόριο της CaM (PDB 1CLL). Στον C- λοβό της CaM βρίσκονται οι D96V, F90L, N98S, N98I, E105A, D130G, D132E, D134H Q136P και F142L ενώ στον N-λοβό βρίσκεται μόνο η N54I.

Η δευτεροταγής δομή και η θερμική σταθερότητα της ανασυνδυασμένης CaMwt και των μεταλλαγμένων μορφών της μελετήθηκαν μέσω φασματοπολωσιμετρίας CD σε συνθήκες υψηλής και χαμηλής θερμοκρασίας, τόσο παρουσία όσο και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ .

Τα φάσματα CD στο άπω υπεριώδες για την CaMwt επιβεβαίωσαν τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης μετά από σύγκριση με τα αντίστοιχα φάσματα της ‘ιθαγενούς’ CaM. Η παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (4°C) προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου της CaMwt γι’ αυτό παρατηρείται μικρή μετατόπιση του φάσματος προς τα κάτω (καμπύλες μπλε-κόκκινη) (Εικόνα 38). Όπως παρατηρείται, απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 90°C η CaMwt, χάνει τη δομή α-έλικας. Ωστόσο, στους 99°C παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  η CaMwt, φαίνεται να ξεδιπλώνει λόγω των ελαττωμένων κορυφών στο φάσμα, αλλά να διατηρεί στοιχεία α-έλικας, γεγονός που υποδεικνύει πως η δέσμευση  $\text{Ca}^{2+}$  σταθεροποιεί τη διαμόρφωση της CaMwt ακόμη και σε τόσο υψηλή θερμοκρασία.

Οι μεταλλαγμένες μορφές N54I, F90L, D96V, N98S, D130G και F142L παρουσιάζουν όμοια φάσματα με την CaMwt τόσο παρουσία όσο και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  σε όλες τις θερμοκρασίες (Εικόνα 39). Στους 4°C, η ομοιότητα αυτή υποδεικνύει πως η συνολική δομή των μεταλλαγμένων CaM είναι όμοια με αυτή της CaMwt, οπότε οι πρωτεΐνες είναι ορθά αναδιπλωμένες σε κάθε περίπτωση, οι κορυφές υποδηλώνουν διαμόρφωση α-έλικας και άρα οι μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της CaM. Όμοια παρατήρηση είχε γίνει και για τις μεταλλάξεις N54I και N98S (Søndergaard, Tian, *et al.*, 2015). Επίσης, η απουσία κορυφής στα 195nm (τυχαίο σπείραμα) υποδηλώνει επιπλέον πως οι παραπάνω μεταλλάξεις είναι ορθά αναδιπλωμένες.

Απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 4°C, 90°C και παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 99°C τα φάσματα CD για τις μεταλλαγμένες μορφές N98I, D132E, D134H και Q136P ακολουθούν όμοια συμπεριφορά σε σχέση με τη CaMwt άρα οι πρωτεΐνες είναι ορθά αναδιπλωμένες. Η διαβάθμιση που παρατηρείται στα CD φάσματα, παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  στους 4°C, για τις μεταλλάξεις N98I, D132E, D134H και Q136P, υποδεικνύει πως οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις, αν και σωστά αναδιπλωμένες, εμφανίζουν διαφοροποίηση στη δευτεροταγή τους δομή σε σχέση με την CaMwt αλλά και μεταξύ τους, που οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό πλήρωσης με  $\text{Ca}^{2+}$  στα EF-hands. Αυτό οδηγεί σε διαφοροποίηση των μορίων που

συμμετέχουν στο σχηματισμό της α-έλικας και γι' αυτό προκύπτουν ανομοιογένειες στη δευτεροταγή δομή των εν λόγω μεταλλάξεων σε σχέση με τη δομή της CaMwt. Στη διαβάθμιση αυτή που παρατηρείται, φαίνεται πως οι D132E, D134H και Q136P εμφανίζουν μετατοπισμένα προς τα πάνω φάσματα ενώ η N98S προς τα κάτω σε σχέση με την CaMwt, γεγονός που δείχνει ελαττωμένη δέσμευση  $Ca^{2+}$  για τις τρεις πρώτες σε σχέση με την N98S και με βάση τη συμπεριφορά που ακολουθούν τα φάσματα της CaM κατά την δέσμευση  $Ca^{2+}$  (Εικόνα40).

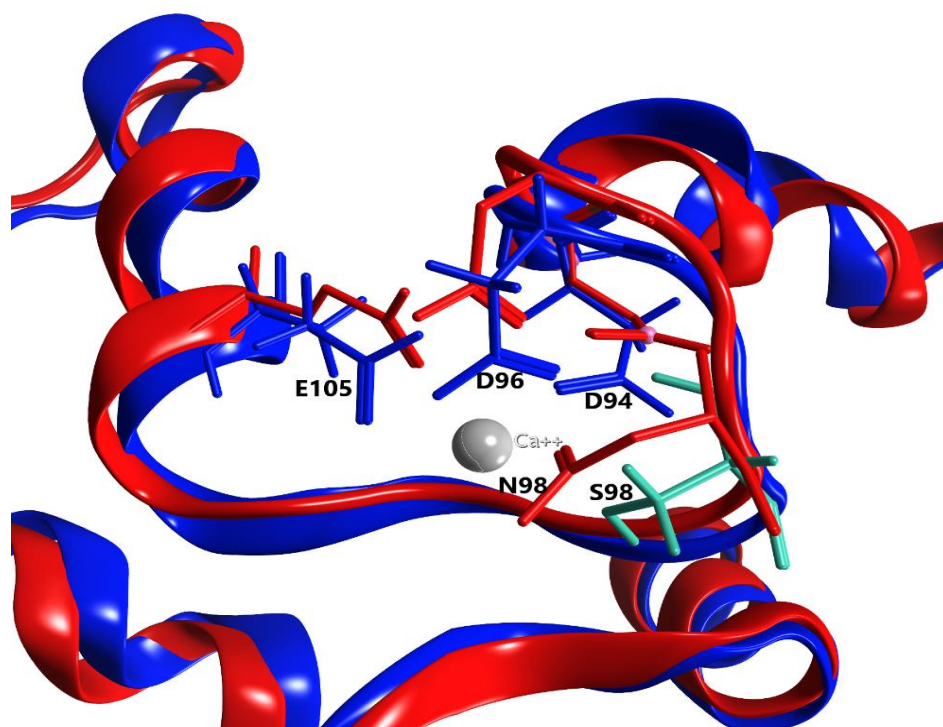
Μέσω πειραμάτων καταγραφής του σήματος CD στα 221nm με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα των μεταλλαγμένων CaM τόσο παρουσία όσο και απουσία  $Ca^{2+}$ . Απουσία  $Ca^{2+}$ , η θερμική σταθερότητα των μεταλλαγμένων CaM παρουσίασε όμοια προφίλ με αυτό της CaMwt. Παρουσία  $Ca^{2+}$  όμως, με εξαίρεση τις N54I και N98S, όλες οι υπόλοιπες μεταλλαγμένες CaM παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στα θερμικά τους προφίλ σε σύγκριση με την CaMwt. Απ'ό,τι φαίνεται η δέσμευση του  $Ca^{2+}$  προκαλεί μείωση της θερμοδυναμικής σταθερότητας και πιο προφανής και μεγάλη αποσταθεροποίηση παρατηρείται για τις D130G, N98I, D132E, D134H, Q136P και ακολουθούν οι D96V, F90L, F142L και E105A (Εικόνα 4B1 και 4B2). Η απώλεια στην θερμική σταθερότητα που παρουσιάζουν οι μεταλλαγμένες CaM σε σχέση πάντα με την CaMwt είναι μια συχνή παρατήρηση που έχει υποδειχθεί και σε πρότερες μελέτες (Crotti *et al.*, 2013; Søndergaard *et al.*, 2015).

Η μελέτη της δέσμευσης του  $Ca^{2+}$  στον C-λοβό και τον N-λοβό της CaM πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού με επιλεκτική διέγερση στο κατάλληλο μήκος κύματος. Όπως παρατηρήθηκε, όλες οι μεταλλάξεις με εξαίρεση την N54I προκαλούν μείωση της συγγένειας σύνδεσης του  $Ca^{2+}$  στο C-λοβό, ενώ δεν επηρεάζουν τη συγγένεια σύνδεσης στο N-λοβό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως οι μεταλλάξεις αυτές ανήκουν στο C-λοβό της CaM. Και άλλες μελέτες έρχονται σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση (Nyegaard *et al.*, 2012 ;Crotti *et al.*, 2013; Makita *et al.*, 2014; Nomikos *et al.*, 2014; Søndergaard, Sorensen, *et al.*, 2015). Σύμφωνα με τις τιμές  $K_d$  που προέκυψαν από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων της εκπομπής φθορισμού, η σειρά με την οποία οι μεταλλάξεις εμφανίζουν μείωση στη συγγένεια σύνδεσης  $Ca^{2+}$  στο C-λοβό με το σε σχέση με την CaMwt είναι: CaMwt  $\approx$  N54I > N98S

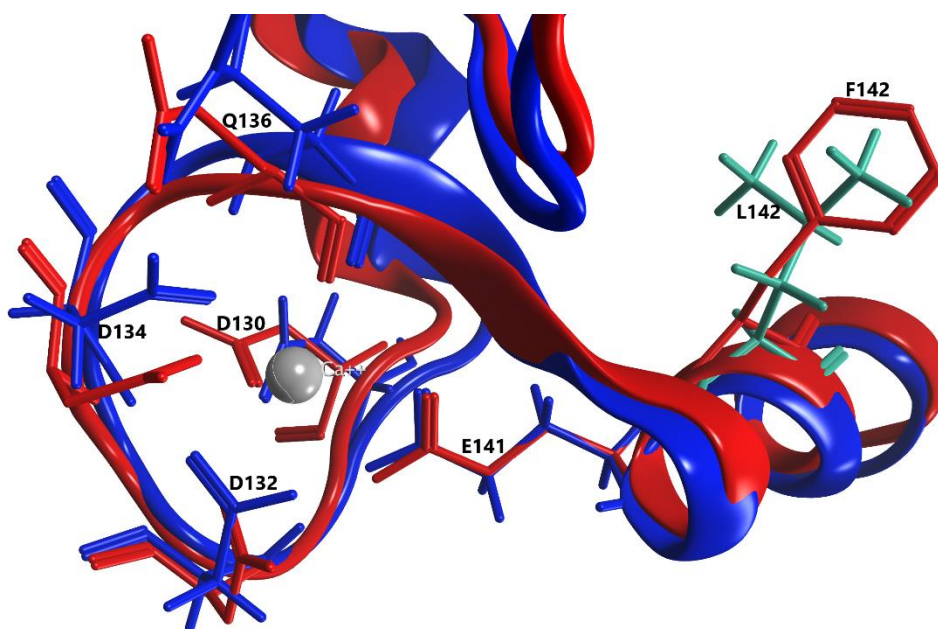
> F142L > Q136P > N98I > E105A > D134H > D96V > D132E > D130G. Ο περαιτέρω υπολογισμός για τις N98I, E105A, D132E, D134H και Q136P, της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs κατά τη δέσμευση του 1<sup>ου</sup> Ca<sup>2+</sup>, του 2<sup>ου</sup> Ca<sup>2+</sup> και της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs λόγω συνεργατικότητας των δύο θέσεων δέσμευσης, έδειξε πως η σημαντική μείωση παρατηρείται κατά την πλήρωση και της 2<sup>ης</sup> θέσης δέσμευσης του C-λοβού με Ca<sup>2+</sup>, το οποίο υποδηλώνει πως οι μεταλλάξεις προκαλούν απώλεια στη συνεργατικότητα των δύο θέσεων δέσμευσης Ca<sup>2+</sup> στο συγκεκριμένο λοβό.

Η μείωση στη συγγένεια πρόσδεσης του Ca<sup>2+</sup> υποδεικνύει έναν πιθανό μηχανισμό παθογένειας, σύμφωνα με τον οποίο η ρύθμιση του RyR2 από το Ca<sup>2+</sup> μέσω της CaM παρεμποδίζεται εξαιτίας της μειωμένης ευαισθησίας που προσδίδουν οι εν λόγω μεταλλάξεις στην CaM για το Ca<sup>2+</sup>. Ωστόσο, δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί λειτουργικά πως ακριβώς αυτό συμβαίνει με τη συγκεκριμένη τεχνική.

Για την καλύτερη κατανόηση σε μοριακό επίπεδο του τι συμβαίνει στο εκάστοτε δομικό μοτίβο EF-hand, παρουσιάζονται στις Εικόνες 57-65 τα μοριακά μοντέλα των μεταλλαγμένων δομών της CaM σε υπέρθεση με την CaMwt δομή. Όλα τα μοριακά μοντέλα δημιουργήθηκαν με χρήση του προγράμματος Molecular Operating Environment (MOE), το οποίο δίνει τη δυνατότητα της δημιουργίας των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών σε διαμόρφωση ελάχιστης ενέργειας. Όλα τα μοντέλα αφορούν στη δομική περιοχή EF-hand του C-λοβού που βρίσκεται η εκάστοτε μετάλλαξη. Στις εικόνες με μπλέ χρώμα αναπαραστάται η μεταλλαγμένη δομή και με κόκκινο χρώμα η CaMwt. Η μετάλλαξη παρουσιάζεται με ανοιχτό γαλάζιο χρώμα και τα κύρια αμινοξέα (Asp(D), Glu(E) και Asn(N)) που συμμετέχουν στην πρόσδεση του ασβεστίου στην CaM, έχουν το χρώμα της αντίστοιχης αλυσίδας. Σε όλα τα μοριακά μοντέλα που ακολουθούν είναι ορατή μια μεταβολή στη δομική διαμόρφωση στο μοτίβο EF-hand, άλλοτε μικρότερη άλλοτε μεγαλύτερη, η οποία αντικατοπτρίζει σε ένα βαθμό πώς οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM επηρεάζουν τη δέσμευση του Ca<sup>2+</sup> στο πρωτεϊνικό μόριο σε σχέση με την CaMwt.

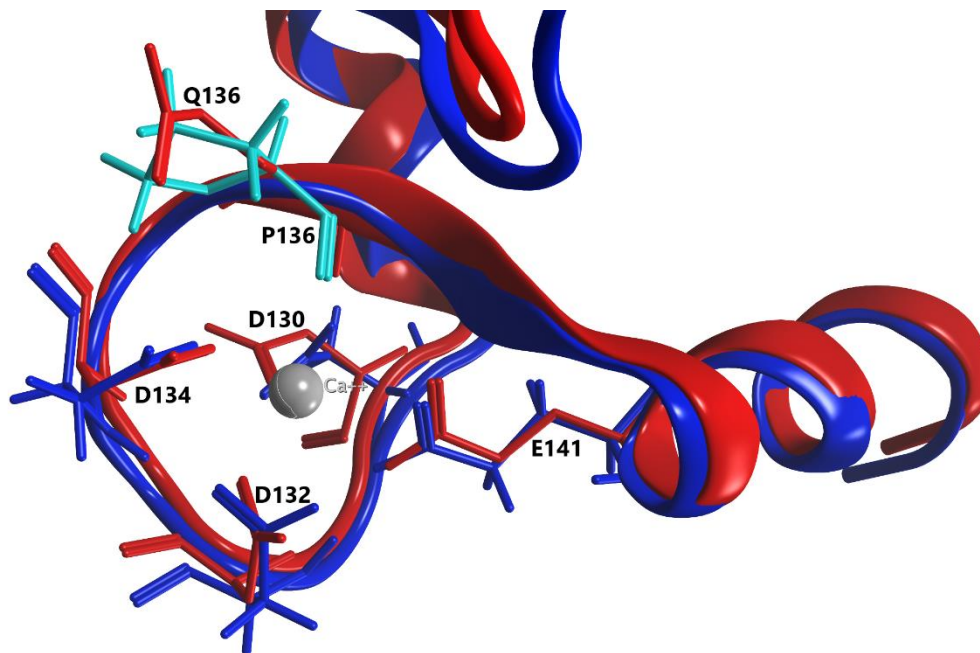


**Εικόνα 57:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand III της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της N98S (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα.

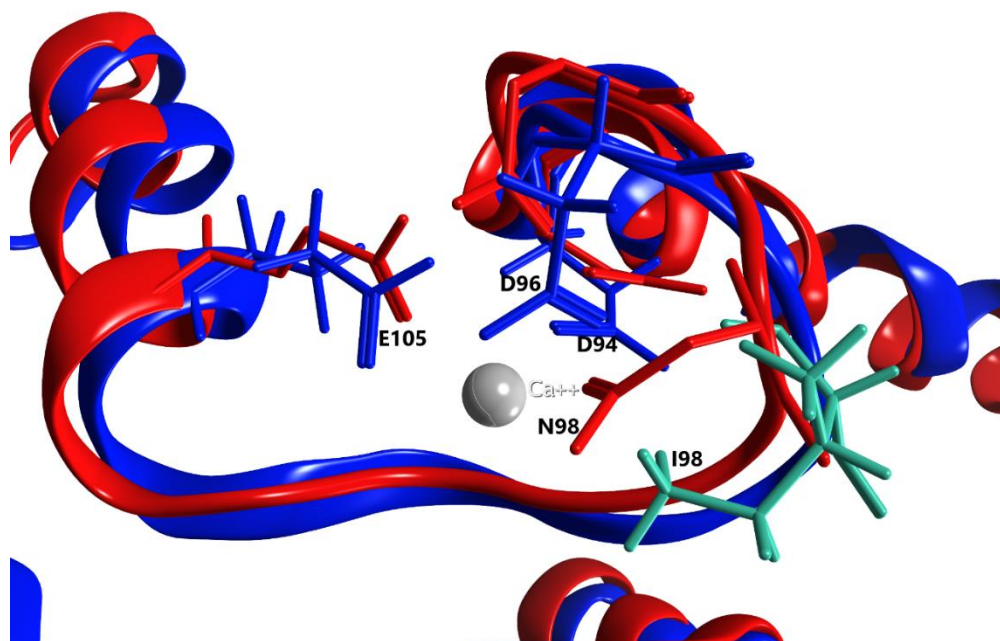


**Εικόνα 58:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand IV της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της F142L (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα.

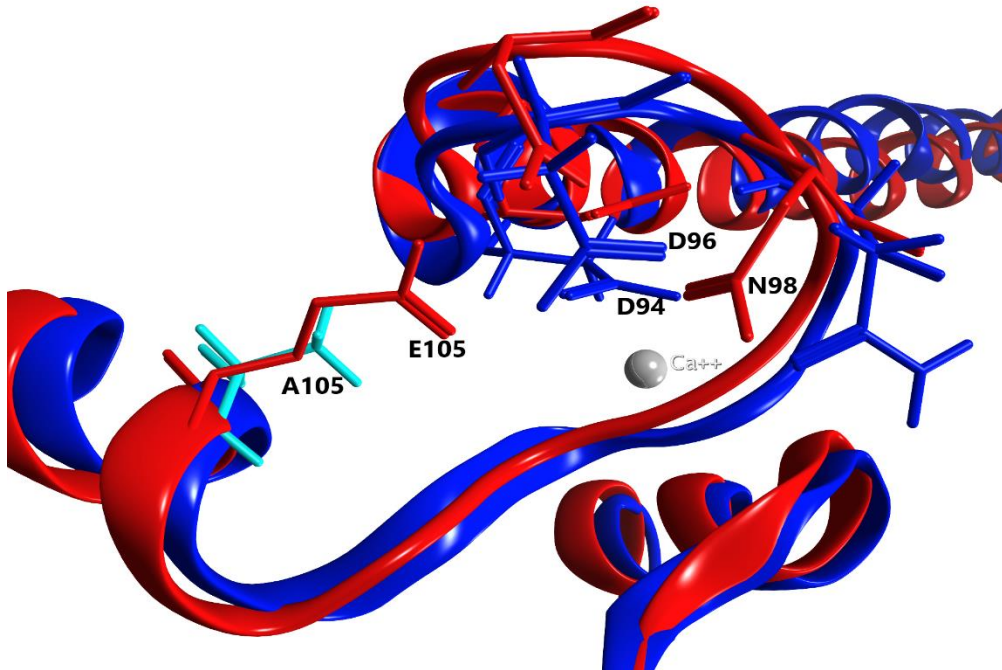




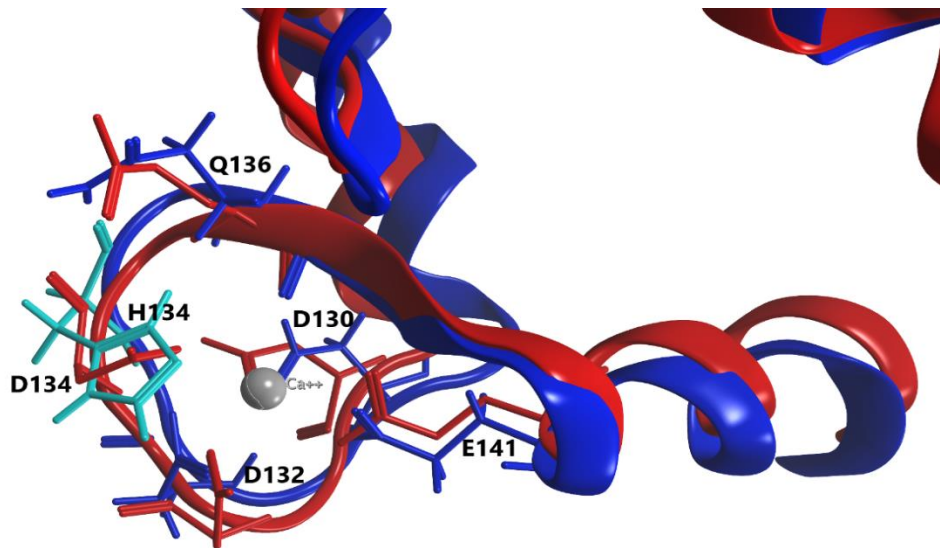
**Εικόνα 59:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand IV της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της Q136P (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα.



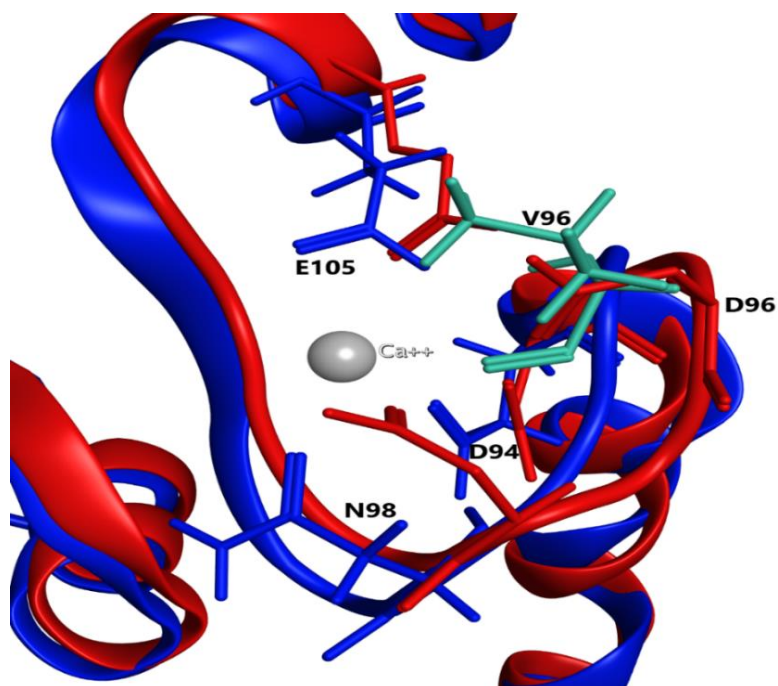
**Εικόνα 60:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand III της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της N98I (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα



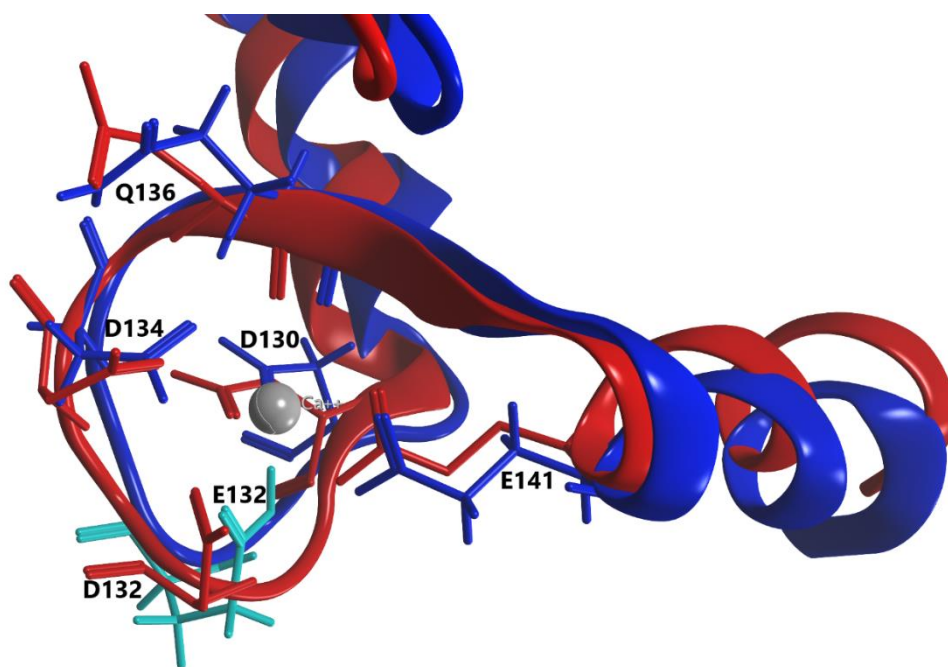
**Εικόνα 61:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand III της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της E105A (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα



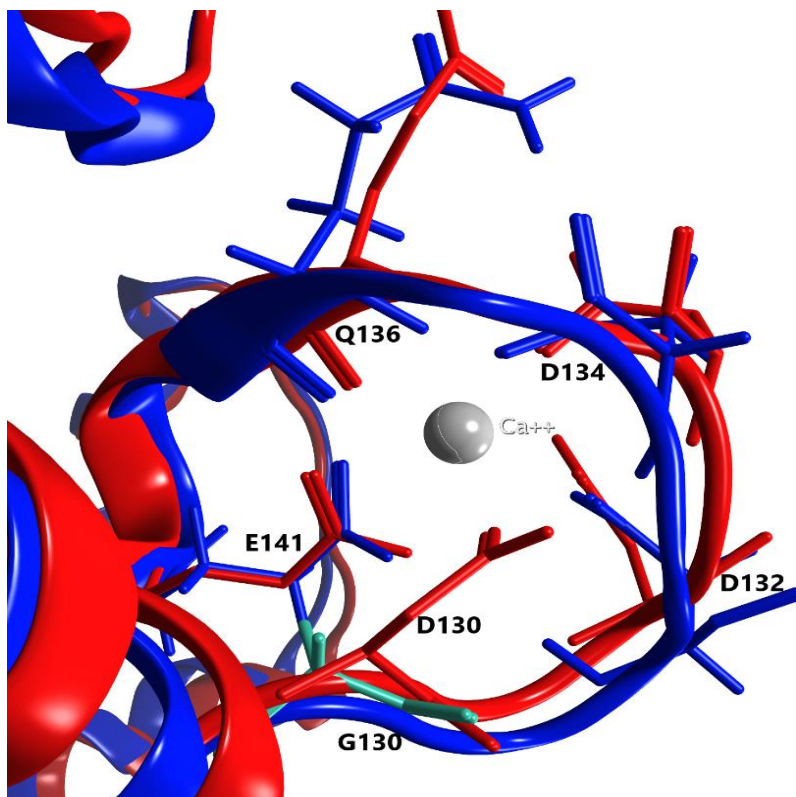
**Εικόνα 62:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand IV της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της D134H (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα



**Εικόνα 63:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand III της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της D96V (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα



**Εικόνα 64:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand IV της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της D132E (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα



**Εικόνα 65:** Μοριακό μοντέλο του δομικού μοτίβου EF-hand IV της CaMwt (PDB 1CLL) (κόκκινο) και της D130G (μπλε) σε υπέρθεση. Το μεταλλαγμένο αμινοξύ παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα

Όσον αφορά τη μετάλλαξη N54I, η οποία είναι και η μόνη που βρίσκεται στο N-λοβό, φαίνεται πως ούτε η συγγένεια σύνδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$  στον N-λοβό επηρεάζεται. Προηγούμενες μελέτες, έρχονται σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση (Hwang, Hyun-SeokNitu *et al.*, 2014). Μία πολύ πρόσφατη μελέτη, με χρήση φασματοσκοπίας NMR, προσδιόρισε την δομή της apo- και  $\text{Ca}^{2+}$ - CaM-N54I σε διάλυμα αλλά και την κρυσταλλική δομή της N54I σε σύμπλεξη με την CaMBD2 του RyR2. Η σύγκριση των δομών αυτών με τις αντίστοιχες της CaMwt έδειξε πως η μετάλλαξη N54I προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο της CaM οι οποίες εκθέτουν υδρόφοβα τμήματα του μορίου στο διαλύτη, τα οποία μεταβάλλουν σημαντικά την ενδομοριακή δυναμική του και αποσταθεροποιούν το N-λοβό της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση την αλληλεπίδραση του με τον RyR2, αποδίδοντας σε αυτό πιθανώς την αρρυθμογενή συμπεριφορά της συγκεκριμένης μετάλλαξης (Holt *et al.*, 2020).

Η παραπάνω μελέτη της δέσμευσης του  $\text{Ca}^{2+}$  στην CaMwt και τις μεταλλάξεις της, είναι η πρώτη μελέτη που χαρακτηρίζει τις περισσότερες εκ των μέχρι τώρα

δημοσιευμένων μεταλλάξεων της CaM που συσχετίζονται με αρρυθμιογενή σύνδρομα σε ένα ενιαίο πειραματικό σύστημα, το οποίο μπορεί να προσδώσει ασφαλέστερη σύγκριση μεταξύ τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί εξίσου για το χαρακτηρισμό και των νέων μεταλλάξεων της CaM που συνεχίζουν να προσδιορίζονται.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της CaMwt με τον ανθρώπινο RyR2 συντέθηκαν πεπτίδια που αφορούν στην κύρια CaMBD στον RyR2 (πεπτίδιο B) και σε πιθανές δευτερεύουσες περιοχές πρόσδεσης που βρίσκονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο του υποδοχέα (πεπτίδια A, D, E και F). Η μελέτη της αλληλεπίδρασης CaMwt-hRyR2 πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με χρήση της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC). Η εν λόγω μελέτη πραγματοποιήθηκε, μεταξύ άλλων, και σε μια προσπάθεια ανεύρεσης μίας δεύτερης πιθανής περιοχής πρόσδεσης της CaM στον hRyR2, πέραν της κύριας.

Παρόλο που όλα τα συνθετικά πεπτίδια φάνηκε να αλληλεπιδρούν παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  με την CaMwt, μόνο το πεπτίδιο B και το πεπτίδιο F παρουσίασαν μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με την CaMwt.

Η αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο B, ήταν αναμενόμενη καθώς πρόκειται για την αλληλουχία που αντιστοιχεί στην κύρια CaMBD στον RyR2. Η CaMwt αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο B παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  με στοιχειομετρία 1:1, δίνοντας μία ισχυρά εξώθερμη και ενθαλπικά καθοδηγούμενη αντίδραση ( $K_d = 0.35\mu\text{M}$ ), που υποδηλώνει πως μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης και του πεπτιδίου αναπτύσσονται πολλαπλοί δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που προσδίδουν σε αυτό το σύμπλοκο εξαιρετικά σημαντική συμπληρωματικότητα. Απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , η CaMwt αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο B δίνοντας μια ασθενέστερη ενδόθερμη αντίδραση, εντροπικά καθοδηγούμενη. Η τιμή  $K_d$  αυτής της σύνδεσης ήταν περίπου 40 φορές μεγαλύτερη της τιμής της σύνδεσης παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Η εναλλαγή αυτή από την ενθαλπικά καθοδηγούμενη στην εντροπικά καθοδηγούμενη αλληλεπίδραση λόγω παρουσίας του  $\text{Ca}^{2+}$ , οφείλεται πιθανώς στο γεγονός του ότι η CaM καθώς δεσμεύει  $\text{Ca}^{2+}$  υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές που επηρεάζουν και την σύνδεσή της με το πεπτίδιο B.

Η CaMwt αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο F παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  και πάλι με στοιχειομετρία 1:1, αλλά αυτή τη φορά πρόκειται για μία ενδόθερμη αντίδραση και μάλιστα εντροπικά καθοδηγούμενη ( $K_d = 0.60\mu\text{M}$ ), που υποδηλώνει πως η σύνδεση της CaM με το πεπτίδιο

F είναι λιγότερο ειδική από αυτή με το πεπτίδιο B. Η αλληλεπίδραση της CaMwt με το πεπτίδιο F απουσία  $Ca^{2+}$ , είναι εξίσου ενδόθερμη και εντροπικά καθοδηγούμενη αλλά αυτή τη φορά η συγγένεια σύνδεσης παρουσιάζεται εξαιρετικά ασθενέστερη ( $K_d = 16.58 \mu M$ ). Αυτή η διαφορά στη συγγένεια σύνδεσης εξηγείται και από τον ενισχυμένο εντροπικό όρο στην αλληλεπίδραση παρουσία  $Ca^{2+}$ , που μπορεί να περιγραφεί από διάφορους πιθανούς μηχανισμούς, όπως πιθανές διαφορές στην ελαστικότητα του συμπλέγματος ή/και στην υδρόφοβη περιοχή που περικλύει ο διαλύτης. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός πως η απουσία  $Ca^{2+}$  δημιουργεί συνθήκες ασθενέστερης αλληλεπίδρασης της CaMwt τόσο με το πεπτίδιο B, όσο και με το πεπτίδιο F και μάλιστα με παραπλήσιες συγγένειες σύνδεσης.

Στη συνέχεια, και εφόσον διαπιστώθηκε πως η CaMwt αλληλεπιδρά τόσο με το πεπτίδιο B, όσο και με το πεπτίδιο F με σημαντική συγγένεια σύνδεσης, μελετήθηκε και η αλληλεπίδραση των νέων μεταλλαγμένων μορφών της CaM με τα εν λόγω πεπτίδια, σε μία προσπάθεια εξαγωγής ορισμένων συμπερασμάτων για την επίδραση που μπορεί να έχουν αυτές οι μεταλλάξεις στη σύνδεση της CaM στον hRyR2, αλλά και ποια πιθανή συσχέτιση μπορεί να γίνει μεταξύ των φαινοτύπων που προκαλούν.

Οι μεταλλάξεις που δοκιμάστηκαν σε αλληλεπίδραση με τα πεπτίδια B και F ήταν οι N98I, D132E, D134H και Q136P, οι οποίες αφορούν όλες στο γονίδιο CALM2. Οι μεταλλάξεις N98I και D134H είναι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί κυρίως σε ασθενείς με σύνδρομο LQTS, ενώ οι μεταλλάξεις D132E και Q136P αφορά σε μία μίξη των φαινοτύπων LQTS και CPVT.

Καμία εκ των μεταλλάξεων δεν αλληλεπιδράσε με τα πεπτίδια B και F σε συνθήκες απουσίας  $Ca^{2+}$ , το οποίο υποδεικνύει πως οι μεταλλάξεις αυτές παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση της CaM με τα πεπτίδια σε αυτές τις συνθήκες.

Παρουσία  $Ca^{2+}$ , η N98I αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο B όμοια με την CaMwt με τη διαφορά πως παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης ( $K_d = 0.29 \mu M$ ). Το ίδιο ισχύει και με την αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο F, όπου η N98I συνδέεται με όμοιο τρόπο με την CaMwt αλλά με χαμηλότερη συγγένεια σύνδεσης ( $K_d = 2.99 \mu M$ ). Άρα η N98I ενισχύει την αλληλεπίδραση μεταξύ CaM-πεπτιδίου B και παρεμποδίζει σχετικά την σύνδεση CaM-πεπτιδίου F.

Όμοια με την CaMwt αλληλεπιδρά και η D132E με το πεπτίδιο B και μάλιστα με συγγένεια σύνδεσης σχεδόν στο 50% μεγαλύτερη αυτή της CaMwt. Το ίδιο ισχύει και με την αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο F, όπου η D132E συνδέεται με όμοιο τρόπο με την CaMwt αλλά με χαμηλότερη συγγένεια σύνδεσης ( $K_d = 2.13 \mu\text{M}$ ). Άρα θα μπορούσαμε να πούμε και για την D132E πως προκαλεί σημαντική ενίσχυση της σύνδεσης της CaM με το πεπτίδιο B και σχετική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης CaM-πεπτιδίου F.

Οι μεταλλάξεις D134H και Q136P αλληλεπιδρούν με το πεπτίδιο B εξίσου με όμοιο τρόπο με την CaMwt και λόγω των ελαφρώς αυξημένων τιμών  $K_d$  θα μπορούσαμε να πούμε πως παρουσιάζουν μη σημαντική παρεμπόδιση στη σύνδεση της CaM με το πεπτίδιο B. Ενώ στην αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο F οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζουν σημαντικές διαφορές. Οι D134H και Q136P αλληλεπιδρούν με το πεπτίδιο F, δίνοντας και οι δυο εξώθερμες αντιδράσεις, με την Q136P να εμφανίζει και τη μεγαλύτερη απώλεια στη συγγένεια σύνδεσης με το πεπτίδιο F ( $K_d = 5.92 \mu\text{M}$ ) σε σχέση με την CaMwt. Αυτή η διαφορά στο θερμοδυναμικό προφίλ αλληλεπίδρασης που παρουσιάζουν οι εν λόγω μεταλλάξεις για το πεπτίδιο F, πιθανώς υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιας άλλης περιοχής πρόσδεσης στον RyR2 ή η διαμόρφωση των συμπλόκων που σχηματίζουν με το πεπτίδιο F είναι πολύ διαφορετική αυτής των CaMwt, N98I και D132E.

## Συμπεράσματα

Στα καρδιακά κύτταρα, η CaM είναι σημαντικός ρυθμιστής του μηχανισμού σύζευξης διέγερσης-συστολής (ECC) και της ομοιόστασης  $Ca^{2+}$  μέσω της  $Ca^{2+}$  - εξαρτώμενης αλληλεπίδρασής της με πρωτεΐνες κλειδιά όπως οι υποδοχείς RyR2, τα τασιοελεγχόμενα κανάλια νατρίου και καλίου και τα L-τύπου κανάλια ασβεστίου με τρόπο που οδηγεί σε μείωση του ρυθμού του μηχανισμού ECC.

Είναι γνωστό πως η ανασταλτική δράση που επιφέρει η CaM στον RyR2 εξαρτάται από το  $Ca^{2+}$  (Yamaguchi *et al.*, 2003; Xu and Meissner., 2004; Søndergaard *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). Η εξάλειψη της κύριας περιοχής πρόσδεσης της CaM στον RyR2 (αα 3583-3603) ή σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή που αποτρέπουν την πρόσδεση της CaM, φαίνεται να μειώνουν το όριο τερματισμού της απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  από το SR, επηρεάζουν την ανασταλτική δράση της CaM και προσδιορίζουν πιθανώς έναν ρόλο της περιοχής πρόσδεσης της CaM στο μηχανισμό αλληλεπίδρασής της με τον υποδοχέα (Tian *et al.*, 2013). Ανοιχτό παραμένει επίσης το ενδεχόμενο ύπαρξης επιπλέον περιοχών πρόσδεσης της CaM στον RyR2, πέραν της κύριας που είναι ήδη καλά καθιερωμένη. Με βάση τις μελέτες των τελευταίων χρόνων, ο μηχανισμός που μπορεί να περιγράψει καλύτερα την αλληλεπίδραση της CaM με τον RyR2 στο μηχανισμό ECC έχει ως εξής: σε συνθήκες ενδοκυτταρικής χαλάρωσης ο C-λοβός της CaM είναι σχεδόν κορεσμένος με  $Ca^{2+}$  και κυρίως βρίσκεται συνδεδεμένος στην κύρια CaMBD2 κοντά στο Trp3587, ενώ ο N-λοβός δεν έχει δεσμεύσει ακόμη  $Ca^{2+}$ , δεν είναι προσδεμένος στην CaMBD2 και πιθανότατα αλληλεπιδρά με κάποια άλλη CaMBD του RyR2. Κατά τη διέγερση του καρδιομυοκυττάρου, καθώς η  $[Ca^{2+}]_i$  αυξάνει, ο N-λοβός δεσμεύει και αυτός  $Ca^{2+}$ , η CaM πια αποκτά την διαμόρφωση CaCaM και κατ' επέκταση αυτό επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με τις CaMBDs, με μία πιθανότητα ο N-λοβός να προσδένεται πλέον στην CaMBD2 κοντά στο Phe3603 (Søndergaard *et al.*, 2020). Ωστόσο, με βάση τις διαθέσιμες cryo-EM δομές του RyR2 σε αλληλεπίδραση με την CaM δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί πλήρως ένας συγκεκριμένος μηχανισμός αλλά μπορεί να προσδιοριστεί ένα πιο συγκεκριμένο πιθανό πλαίσιο αλληλεπίδρασης. Είναι παρόλα αυτά περισσότερο από ξεκάθαρο πως η πρόσδεση του  $Ca^{2+}$  στην CaM και οι θέσεις πρόσδεσης της CaM στον



RyR2 κατέχουν, σε πρώτη φάση, κεντρικό ρόλο στην αποσαφήνιση του πολύπλοκου μοριακού μηχανισμού αυτής της αλληλεπίδρασης που είναι υπό διερεύνηση.

Οι καλμοδουλινοπάθειες, δηλαδή αρρυθμογενείς καταστάσεις που προκύπτουν αποκλειστικά και μόνο από μεταλλάξεις στα CALM γονίδια περιλαμβάνουν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους φαινότυπους όπως οι CPVT και LQTS. Έχει προσδιοριστεί πως σε ένα γενικό πλαίσιο οι μεταλλάξεις της CaM που προκαλούν LQTS φαινότυπους, προκαλούν κυρίως μείωση της  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενης απενεργοποίησης (CDI,  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation) των καναλιών Cav1.2, η οποία οδηγεί με τη σειρά της σε παρατεταμένα δυναμικά δράσης (Pipilas *et al.*, 2016). Ενώ οι μεταλλάξεις της CaM που προκαλούν CPVT φαινότυπους, επηρεάζουν τη συγγένεια σύνδεσης της CaM με τον RyR2, αυξάνοντας την πιθανότητα το κανάλι να υιοθετήσει την ανοικτή του διαμόρφωση, οδηγώντας σε αυθόρμητη έκλυση  $Ca^{2+}$  από το SR (Chazin and Johnson, 2020). Ωστόσο, δεδομένου ότι οι μελέτες που έχουν υποδείξει τα παραπάνω αφορούν στην τελευταία δεκαετία και είναι εν εξελίξει, καθώς επίσης και το γεγονός πως υπάρχουν μεταλλάξεις της CaM που προκαλούν μικτούς φαινότυπους CPVT και LQTS, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός πως τόσο οι CAML-LQTS όσο και οι CALM-CPVT μεταλλάξεις μπορεί να σχετίζονται και με δυσλειτουργίες στην αλληλεπίδραση μεταξύ CaM και RyR2. Ο μοριακός μηχανισμός παθογένειας των καλμοδουλινοπαθειών είναι αρκετά πολύπλοκος και για τον προσδιορισμό του απαιτείται να ληφθούν υπόψη πολλοί διαφορετικοί παράμετροι όπως η γονιδιακή συσχέτιση, η θέση της μετάλλαξης στο μόριο της CaM, η αλλαγή που επιφέρει η μετάλλαξη στη δομική διαμόρφωση της CaM, οι αλληλεπιδράσεις της CaM με όλες τις πρωτεΐνες και τα ιοντικά κανάλια που συμμετέχουν στο μηχανισμό ECC, πως επηρεάζονται και με ποιο τρόπο αυτές οι αλληλεπιδράσεις κ.α.

Με βάση το παραπάνω πλαίσιο και προσπαθώντας να εμπλουτίσει το πεδίο της έρευνας γύρω από της μεταλλάξεις της CaM, την αλληλεπίδραση με τον RyR2 και τα αρρυθμογεννή σύνδρομα, η παρούσα διατριβή μελέτησε ορισμένες μεταλλάξεις της CaM, ως προς την επίδραση που έχουν στη δομή της, τη θερμική της σταθερότητα και την ικανότητα δέσμευσης  $Ca^{2+}$  στο μόριό της. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της CaMwt και ορισμένων μεταλλάξεων της με συνθετικά πεπτίδια του RyR2, που αφορούν σε περιοχές πρόσδεσης της CaM. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 20.

Διαπιστώθηκε πως η CaMwt και όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM είναι σωστά αναδιπλωμένες και άρα διατηρούν την τριτοταγή τους διαμόρφωση. Απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM δεν επιφέρουν καμία αλλαγή στη δευτεροταγή δομή της CaMwt. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως κατά την δέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$  οι μεταλλαγμένες μορφές N98I, D132E, D134H και Q136P παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στη δευτεροταγή τους δομή που σχετίζεται με την ελαττωμένη δέσμευση που εμφανίζουν για το  $\text{Ca}^{2+}$ . Όλες οι μεταλλάξεις, εκτός των N54I και N98S, προκαλούν σε διαφορετικό βαθμό απώλειες στη θερμική σταθερότητα του μορίου της CaM που σχετίζεται με τη δέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$ , το οποίο είναι παρατήρηση και σε άλλες μελέτες (Crotti *et al.*, 2013; Søndergaard *et al.*, 2015).

Καμία μετάλλαξη δεν επηρεάζει την πρόσδεση του  $\text{Ca}^{2+}$  στον N-λοβό. Αντίθετα, όλες οι μεταλλάξεις βρέθηκε να μειώνουν τη συγγένεια σύνδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$  στο C-λοβό, με εξαίρεση την N54I, η οποία εντοπίζεται στο βρόγχο μεταξύ των EF1&2 του N-λοβού. Γενικώς, αυτή η απώλεια στη συγγένεια σύνδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$  συμπίπτει με την απώλεια της θερμικής σταθερότητας των μεταλλαγμένων μορίων σε σύγκριση με την CaMwt και υπάρχουν μελέτες που έρχονται σε συμφωνία με αυτό (Nyegaard *et al.*, 2012; Crotti *et al.*, 2013; Makita *et al.*, 2014; Nomikos *et al.*, 2014; Søndergaard, Sorensen, *et al.*, 2015). Περεταίρω θερμοδυναμική ανάλυση της δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$  για τις N98I, D132E, D134H και Q136P υπέδειξε πως οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν απώλεια στη συνεργατικότητα των δύο θέσεων δέσμευσης  $\text{Ca}^{2+}$  στο C-λοβό οδηγώντας στη μειωμένη δέσμευση  $\text{Ca}^{2+}$  στο μόριο της CaM. Όμοια παρατήρηση έχει γίνει και για την F90L σε προηγούμενο στάδιο (Nomikos *et al.*, 2014). Η συσχέτιση της μείωσης της συγγένειας πρόσδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$  που προκαλούν οι μεταλλάξεις στην CaM και το γεγονός πως παρατηρείται διαφοροποίηση της δευτεροταγούς δομής στις N98I, D132E, D134H και Q136P υποδεικνύει έναν πιθανό μηχανισμό παθογένειας, σύμφωνα με τον οποίο η ρύθμιση του RyR2 από το  $\text{Ca}^{2+}$  μέσω της CaM παρεμποδίζεται εξαιτίας της μειωμένης ευαισθησίας που προσδίδουν οι εν λόγω μεταλλάξεις στην CaM για το  $\text{Ca}^{2+}$ . Φαίνεται πως οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM, υιοθετούν τη λειτουργική τους διαμόρφωση σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$ .

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια πάνω στην αλληλεπίδραση της CaM με συγκεκριμένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στην κύρια θέση πρόσδεσης της CaM στον RyR2 (CaMBD2) και με δευτερεύουσες αλληλουχίες που πιθανώς αντιστοιχούν σε επιπλέον θέσεις πρόσδεσης στον υποδοχέα (CaMBD1, CaMBD3) (Huang *et al.*, 2013; Lau, Chan and Van Petegem, 2014; Brohus *et al.*, 2019).

Σε αυτή την εργασία, τα αποτελέσματα των ITC πειραμάτων υπέδειξαν πως οι δύο αλληλουχίες του ανθρώπινου RyR2 οι οποίες βρέθηκε να αλληλεπιδρούν με υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την CaMwt, τόσο παρουσία όσο και απουσία Ca<sup>2+</sup>, είναι το πεπτίδιο B (3584-3602αα) που αφορά στην κύρια CaMBD και το πεπτίδιο F (4255-4271αα). Το πεπτίδιο F αποτελεί μια πιο περιορισμένη αλληλουχία της περιοχής CaMBD3 που ορισμένες μελέτες έχουν υποδείξει ως πιθανή περιοχή αλληλεπίδρασης της CaM με τον RyR2 (Huang *et al.*, 2013; Lau, Chan and Van Petegem, 2014). Το γεγονός πως το πεπτίδιο F, ως μια πιο περιορισμένη αλληλουχία της CaMBD3, διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την CaM, αποτελεί ένα καινούριο εύρημα. Αυτές οι δύο περιοχές (B και F) πιθανώς να δημιουργούν μία εσωτερική ειδική θέση σύνδεσης για την CaM (intra-subunit CaM-binding pocket), με τις εναλλαγές της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των Ca<sup>2+</sup> να λειτουργεί ως 'διακόπτης' για την επιτυχή αλληλεπίδραση της CaM με τον RyR2 και τελικά τη ρύθμισή του, όπως έχει υποστηρίξει με παρόμοιο τρόπο προηγούμενη μελέτη από τους Huang *et al.*

Η θερμοδυναμική ανάλυση της αλληλεπίδρασης της CaMwt με τα πεπτίδια B και F έδειξε πως η πρωτεΐνη παρουσιάζει ισχυρή αλληλεπίδραση και με τα δύο, ωστόσο ο τρόπος που συμβαίνει αυτό στην κάθε περίπτωση είναι διαφορετικός και υποδηλώνει μια λιγότερο ειδική σύνδεση με το πεπτίδιο F. Τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων της CaMwt με το πεπτίδιο B (CaMBD2) έρχονται σε συμφωνία με πρότερες μελέτες (Lau, Chan and Van Petegem, 2014).

Η μελέτη της επίδρασης των μεταλλάξεων N98I, D132E, D134H και Q136P της CaM στον RyR2, που πραγματοποιήθηκε μέσω της αλληλεπίδρασης με τα συνθετικά πεπτίδια B και F, υπέδειξε πως όλες οι μεταλλάξεις αυτές παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες σύνδεσης με τα δύο πεπτίδια, τόσο παρουσία όσο και απουσία Ca<sup>2+</sup>.

Ανεξάρτητα από τον κλινικό φαινότυπο που προκαλούν οι παραπάνω υπό μελέτη μεταλλάξεις, η απουσία  $Ca^{2+}$  αποκλείει την αλληλεπίδραση και των τεσσάρων μεταλλαγμένων CaM με τα δύο πεπτίδια. Πιθανώς οι μεταλλάξεις αυτές να παρεμποδίζουν την CaM να λάβει τη λειτουργική της διαμόρφωση σε αυτές τις συνθήκες και αυτό με τη σειρά του να εμποδίζει τη σωστή αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα RyR2.

Παρουσία  $Ca^{2+}$ , παρατηρείται διαφοροποίηση ως προς τις αλληλεπιδράσεις, με τις N98I και D132E να ενισχύουν την αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο B ακολουθώντας όμοιο θερμοδυναμικό προφίλ με αυτό της CaMwt, ενώ οι D134H και Q136P παρουσιάζουν μη σημαντική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης. Και οι τέσσερις μεταλλάξεις φαίνεται να μειώνουν την αλληλεπίδραση της CaM με το πεπτίδιο F και χαρακτηριστικό είναι πως οι D134H και Q136P δίνουν διαφορετικό θερμοδυναμικό προφίλ αλληλεπίδρασης σε σχέση με την CaMwt. Αυτό το τόσο σημαντικά διαφορετικό θερμοδυναμικό αποτύπωμα μπορεί να υποδεικνύει μια άλλη περιοχή πρόσδεσης στον RyR2 ή μια διαφορετική διαμόρφωση του συμπλέγματος πρωτεΐνης-πεπτιδίου για τις μεταλλαγμένες μορφές D134H και Q136P.

Τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμένων CaM, N98I, D132E, D134H και Q136P, με την κύρια θέση πρόσδεσης της CaM στον RyR2 και με τη δευτερεύουσα περιοχή πρόσδεσης F, που πιθανώς να παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της CaM με τον RyR2, έδωσαν σε ένα γενικό πλαίσιο μικρές μεταβολές στη συγγένεια σύνδεσης σε σχέση με την CaMwt που δεν επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης της CaM στον υποδοχέα, παρουσία  $Ca^{2+}$ . Παρόλα αυτά, η μικρή ενίσχυση ή παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης που επιφέρουν οι μεταλλάξεις αυτές πιθανώς να επηρεάζουν όμως το συγχρονισμό των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τον καρδιακό παλμό και αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε παθογένεια.

Η παρεμπόδιση της σύνδεσης της CaM στον RyR2 έχει βρεθεί πως προκαλεί δυσλειτουργίες στη ρύθμιση του RyR2 με τρόπο που μπορεί να προκληθούν αρρυθμογενείς καταστάσεις. Ωστόσο, φαίνεται πως και η ενίσχυση της αλληλεπίδρασης CaM-RyR2, μπορεί εξίσου να προκαλέσει αρρυθμογενείς φαινότυπους μέσω της αδυναμίας που εμφανίζουν οι μεταλλαγμένες μορφές της CaM να αναστείλουν με επιτυχία το άνοιγμα του RyR2. Η ενισχυμένη σύνδεση ορισμένων μεταλλαγμένων μορφών CaM

σε συγκεκριμένες περιοχές του RyR2 μπορεί να προκύπτει σε βάρος της δέσμευσης σε κάποια άλλη περιοχή ή εξαιτίας αλλαγών στις σχετικές συγγένειες σύνδεσης.

Προσφάτως, μελετήθηκε η επίδραση που επιφέρουν αρρυθμιογενείς μεταλλάξεις της CaM, μεταξύ αυτών και οι μεταλλάξεις που μελετώνται σε αυτή την εργασία, στη ρύθμιση της ελεγχόμενης από τον RyR2 έκλυσης  $Ca^{2+}$  κατά τη διαδικασία SOICR (store-overload induced  $Ca^{2+}$  release), όπως επίσης και η επίδρασή τους στην CaM-εξαρτώμενη αναστολή της έκλυσης  $Ca^{2+}$  από τον RyR2 σε διαπερατά κύτταρα HEK293. Τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης έδειξαν πως οι N98I, D132E και Q136P επηρεάζουν το όριο ενεργοποίησης του RyR2 κατά την υπερφόρτωση του SR, με αποτέλεσμα αυτές οι μεταλλάξεις να προκαλούν έκλυση  $Ca^{2+}$  στα καρδιομυοκύτταρα κατά τη διαστολική φάση. Επιπρόσθετα, οι N98I, D132E και D134H φάνηκε να επηρεάζουν τον τερματισμό της έκλυσης  $Ca^{2+}$  από τον RyR2, υποδεικνύοντας πως αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένη έκλυση  $Ca^{2+}$ , που οφείλεται στη μειωμένη αναστολή του RyR2 κατά τη διέγερση του καρδιομυοκυττάρου. Παράλληλα, η ίδια μελέτη έδειξε πως οι αρρυθμιογενείς μεταλλάξεις τις CaM αποδίδουν μειωμένη συγγένεια σύνδεσης με το πεπτίδιο που αφορά στην κύρια CaMBD (3581-3611aa), επηρεάζοντας την  $Ca^{2+}$  - εξαρτώμενη σύνδεση της CaM στον RyR2. Ενδιαφέρον παρουσίασε το εύρημα πως ο C-λοβός της CaM που έφερε τη μετάλλαξη, φάνηκε να προσδένει στην CaMBD σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  από αυτές του κορεσμού σε σύγκριση με τον Cwt-λοβό, σε συνθήκες χαλάρωσης του καρδιομυοκυττάρου και κατά την πρόιμη συστολή, επιβεβαιώνοντας την πρόταση των συγγραφέων πως η παθολογική ελαττωματική αλληλεπίδραση μεταξύ CaM και RyR2, μπορεί όχι μόνο να μειώσει την αναστολή του υποδοχέα αλλά και να διευκολύνει την έκλυση  $Ca^{2+}$  μέσω αυτού (Søndergaard *et al.*, 2019).

Για όλες τις μεταλλάξεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, έχει προσδιοριστεί σε προηγούμενα στάδια από την ερευνητική μας ομάδα, η ικανότητα σύνδεσης με τον RyR2 μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης καθώς επίσης και πειράματα πρόσδεσης της [ $^3H$ ]ρυανοδίνης, που αποτελεί μέτρο της ανοιχτής διαμόρφωσης του RyR2, ώστε να προσδιοριστεί η ικανότητα τους να ρυθμίζουν την ενεργότητα του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν πως οι N54I και D96V

ενισχύουν την σύνδεση με τον RyR2, οι F90L, N98I, D130G, D132E, D134H και Q136P εμφανίζουν ελαττωμένη σύνδεση και οι N98S και F142L δεν επηρεάζουν τη σύνδεση με τον υποδοχέα. Ωστόσο, βρέθηκε πως όλες οι μεταλλάξεις πέραν των N98S και F142L μειώνουν την ενεργότητα του RyR2 (Nomikos *et al.*, 2014; Vassilakopoulou *et al.*, 2015).

Επίσης, *in vivo* πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μελέτη που δημοσιεύτηκε από την ερευνητική μας ομάδα το 2019, η οποία εμπεριέχει και τμήμα των αποτελεσμάτων της εν λόγω διατριβής, στα οποία έγινε έκφραση της CaMwt και της CaM E105A μετάλλαξης σε zebrafish έμβρυα, όπου παρατηρήθηκε πως η έκφραση αυτή δεν επηρέασε την ανάπτυξη των εμβρύων, καθώς δεν παρατηρήθηκαν ούτε μορφολογικές διαφορές ούτε διαφορά στο ρυθμό επιβίωσης των εμβρύων. Ωστόσο, αυτό που παρουσίασε εξαιρετικό ενδιαφέρον ήταν πως σε σύγκριση με τα έμβρυα που εμπεριείχαν την CaMwt, τα έμβρυα που έφεραν τη μετάλλαξη E105A, είχαν μια ελάχιστη διαφορά στην μορφολογία της καρδιάς τους, παρουσιάζοντας περίπου 31.5% διόγκωση του καρδιακού θαλάμου. Ταυτόχρονα, η έκφραση της E105A προκάλεσε στα zebrafish έμβρυα καρδιακή αρρυθμία και αυξημένο καρδιακό παλμό, φαινόμενα που υποδεικνύουν κοιλιακή ταχυκαρδία. Η CaM-E105, εμφανίζει 10 φορές μικρότερη συγγένεια σύνδεσης για το Ca<sup>2+</sup> στο C-λοβό της CaM, σε σύγκριση με την CaMwt, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα της θερμικής αποδιάταξης που υποδεικνύουν πως η E105A προκαλεί απώλεια στη σταθερότητα του μορίου της CaM. Ταυτόχρονα στην ίδια μελέτη, η βιοχημική ανάλυση μέσω ανοσοκατακρίμησης και πρόσδεσης της [<sup>3</sup>H]ρυανοδίνης στον RyR2, έδειξαν πως η μετάλλαξη αυτή μειώνει σημαντικά την αλληλεπίδραση μεταξύ CaM και RyR2 σε όλες τις συγκεντρώσεις Ca<sup>2+</sup>, οδηγώντας σε σημαντική μείωση της συνδεσης της [<sup>3</sup>H]ρυανοδίνης στον RyR2 (Da'as *et al.*, 2019).

Τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα αποτελέσματα παρουσιάζουν μια σύνθετη εικόνα προαρρυθμικών μεταλλάξεων της CaM με ποικίλες και αλληλεπικαλυπτόμενες συνέπειες στη λειτουργία διαφόρων σημαντικών πρωτεϊνών (RyR2, Cav1.2, CaMKII) με συγκλίνουσες κλινικές εκδηλώσεις (CPVT, LQTS, IVF, SUD). Η εργασία αυτή, ενισχύει τη μέχρι τώρα έρευνα γύρω από τη μελέτη της επίδρασης αρρυθμιογενών μεταλλάξεων της CaM, τόσο στο ίδιο το μόριο της CaM, όσο και τις επιπτώσεις τους στη σωστή αλληλεπίδραση μεταξύ CaM-RyR2 και τελικά στη ρύθμιση του υποδοχέα και ολόκληρου

του μηχανισμού ECC. Είναι περισσότερο από ξεκάθαρο πως οι περισσότερες μεταλλάξεις παρουσιάζουν, σε διαφορετικό βαθμό η καθεμία, μείωση στη συγγένεια σύνδεσης με το  $Ca^{2+}$  και μειωμένη θερμική σταθερότητα σε σχέση με την CaMwt. Η απώλεια στη συγγένεια σύνδεσης με το  $Ca^{2+}$  φαίνεται να προκύπτει από την απώλεια στη συνεργατικότητα μεταξύ των δύο θέσεων δέσμευσης του  $Ca^{2+}$ , κυρίως στο C-λοβό. Οι μεταλλάξεις της CaM φάνηκε να προκαλούν τόσο ενίσχυση όσο και παρεμπόδιση στη σύνδεση με τον RyR2, σε διαφορετικό βαθμό η κάθε μία. Σε κάθε περίπτωση, φάνηκε πως προκαλούν μείωση στην ικανότητα της CaM να αναστείλει το άνοιγμα του υποδοχέα (Vassilakopoulou *et al.*, 2015). Επίσης, βρέθηκε πως ορισμένες μεταλλάξεις έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη σύνδεση της CaM σε συγκεκριμένες θέσεις στον RyR2 (CaMBD2, πεπτίδιο F) και να μεταβάλλουν με διαφορετικό τρόπο το θερμοδυναμικό προφίλ της αλληλεπίδρασης με τρόπο που εξαρτάται από την παρουσία ή μη του  $Ca^{2+}$ .

Ωστόσο, είναι προφανές πως τα παραπάνω δεδομένα, που βασίζονται κατά κύριο λόγο σε *in silico* και *in vitro* αναλύσεις, δεν είναι ικανά να δώσουν μια ξεκάθαρη εικόνα για το τρόπο με τον οποίο οι εν λόγω παρατηρήσεις οδηγούν σε κλινικούς φαινότυπους. Παρόλα αυτά, δίνουν παραπάνω πληροφορία για τον ρόλο των ιοντικών καναλιών (RyR2) στον μηχανισμό ECC, για το ρόλο της CaM στη διαδικασία αυτή και δημιουργούν μια σύνδεση για το πως μεταλλάξεις στο μόριο της CaM μπορεί να κατέχουν σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του όλου μηχανισμού. Για τον προσδιορισμό του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο οι CaM μεταλλάξεις οδηγούν σε θνησιγενείς αρρυθμίες και σε καρδιακές παθολογίες απαιτείται περαιτέρω έρευνα γύρω από την ταυτοποίηση και την μελέτη επιπλέον μεταλλάξεων της CaM, την επίδραση αυτών τόσο στον RyR2 αλλά και στα υπόλοιπα ιοντικά κανάλια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του μηχανισμού ECC, δομικές αναλύσεις καλύτερης διακριτικής ικανότητας των υποδοχέων RyR2 και περαιτέρω *in vivo* μελέτες (χρήση zebrafish) και κυτταρικές μελέτες, που να μπορούν να συσχετισθούν με τα *in vitro* δεδομένα.

**Πίνακας 20:** Συνολικά αποτελέσματα

CaM μετάλλαξη	Αλλοίωση δευτεροταγούς δομής CaMwt		Θερμική σταθερότητα		Συγγένεια σύνδεσης με το Ca <sup>2+</sup> στο C- λοβό	Πρόσδεση της CaM στο πεπτίδιο B (CaMBD2)		Πρόσδεση της CaM στο πεπτίδιο F	
	- Ca <sup>2+</sup>	+ Ca <sup>2+</sup>	- Ca <sup>2+</sup>	+ Ca <sup>2+</sup>		- Ca <sup>2+</sup>	+ Ca <sup>2+</sup>	- Ca <sup>2+</sup>	+ Ca <sup>2+</sup>
N54I	×	×	↔	↔	↔				
D96V	×	×	↔	↓	↓				
N98I	×	✓	↔	↓	↓	×	↑	×	↓
N98S	×	×	↔	↔	↓				
E105A	×	×	↔	↓	↓				
D130G	×	×	↔	↓	↓				
D132E	×	✓	↔	↓	↓	×	↑	×	↓
D134H	×	✓	↔	↓	↓	×	↔	×	↓
Q136P	×	✓	↔	↓	↓	×	↓	×	↓
F142L	×	×	↔	↓	↓				



## Βιβλιογραφία

- Ackers, G. K., Shea, M. A. and Smith, F. R. (1983) ‘Free energy coupling within macromolecules’, *Journal of Molecular Biology*, 170(1), pp. 223–242. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80234-4.
- Amador, F. J. *et al.* (2009) ‘Crystal structure of type I ryanodine receptor amino-terminal  $\beta$ -trefoil domain reveals a disease-associated mutation “hot spot” loop’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), pp. 11040–11044. doi: 10.1073/pnas.0905186106.
- Arnáiz-Cot, J. J. *et al.* (2013) ‘Cardiac calcium signalling pathologies associated with defective calmodulin regulation of type 2 ryanodine receptor’, *Journal of Physiology*, 591(17), pp. 4287–4299. doi: 10.1113/jphysiol.2013.256123.
- Atkins, P. and De Paula, J. (2010) *Physical chemistry*. 9th edn. Edited by W. H. Freeman. Oxford University Press.
- Badone, B. *et al.* (2018) ‘Calmodulinopathy: Functional Effects of CALM Mutations and Their Relationship With Clinical Phenotypes’, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5(December), pp. 1–13. doi: 10.3389/fcvm.2018.00176.
- Bai, X. C. *et al.* (2016) ‘The Central domain of RyR1 is the transducer for long-range allosteric gating of channel opening’, *Cell Research*. Nature Publishing Group, 26(9), pp. 995–1006. doi: 10.1038/cr.2016.89.
- Balshaw, D. M. *et al.* (2001) ‘Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor)’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), pp. 20144–20153. doi: 10.1074/jbc.M010771200.
- Baltogiannis, G. G. *et al.* (2019) ‘CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature’, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(July), pp. 8–11. doi: 10.3389/fcvm.2019.00092.
- Belevych, A. E. *et al.* (2013) ““Ryanopathy””: Causes and manifestations of RyR2

- dysfunction in heart failure’, *Cardiovascular Research*, 98(2), pp. 240–247. doi: 10.1093/cvr/cvt024.
- Berchtold, M. W. *et al.* (1993) ‘Localization of the Human Bona Fide Calmodulin Genes CALM1, CALM2, and CALM3 to Chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3’, *Genomics*, pp. 461–465. doi: 10.1006/geno.1993.1211.
- Berchtold, M. W. *et al.* (2016) ‘The Arrhythmogenic Calmodulin Mutation D129G Dysregulates Cell Growth, Calmodulin-dependent Kinase II Activity, and Cardiac Function in Zebrafish’, *Journal of Biological Chemistry*, 291(52), pp. 26636–26646. doi: 10.1074/jbc.M116.758680.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003) ‘Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), pp. 517–529. doi: 10.1038/nrm1155.
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2000) ‘the Versatility and Signalling’, *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), pp. 11–21. doi: 10.1038/35036035.
- Bers, D. M. (2002) ‘Cardiac Excitation-Contraction Coupling’, *Nature*, 415(January), pp. 198–205. doi: 10.1016/B978-0-12-378630-2.00221-8.
- Bers, D. M. (2004) ‘Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function’, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37(2), pp. 417–429. doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.026.
- Bers, D. M. (2014) ‘Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: Basis and roles in cardiac dysfunction’, *Annual Review of Physiology*, 76(November 2013), pp. 107–127. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153308.
- Bezzarides, V. J. *et al.* (2019) ‘Gene therapy for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia by inhibition of Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent kinase II’, *Circulation*, 140(5), pp. 405–419. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038514.Gene.
- Bootman, M. D. *et al.* (2012) ‘Calcium Signalling and Regulation of Cell Function’, *eLS*, (February). doi: 10.1002/9780470015902.a0001265.pub3.

Borko, ubomír *et al.* (2014) ‘Structural insights into the human RyR2 N-terminal region involved in cardiac arrhythmias’, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(11), pp. 2897–2912. doi: 10.1107/S1399004714020343.

Branden, C. and Tooze, J. (1999) *Introduction to protein structure*. 2nd edn. Garland Publishing.

Brohus, M. *et al.* (2019a) ‘Ca<sup>2+</sup>-dependent calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor (RyR2) calmodulin-binding domains’, *Biochemical Journal*, 476(2), pp. 193–209. doi: 10.1042/BCJ20180545.

Brohus, M. *et al.* (2019b) ‘Ca<sup>2+</sup>-dependent calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor (RyR2) calmodulin-binding domains’, *Biochemical Journal*, 476(2), pp. 193–209. doi: 10.1042/BCJ20180545.

Cannell, M. B., Cheng, H. and Lederer, W. J. (1995) ‘The control of calcium release in heart muscle’, *Science*, 268(5213), pp. 1045–1049. doi: 10.1126/science.7754384.

Carafoli, E. and Krebs, J. (2016) ‘Why calcium? How calcium became the best communicator’, *Journal of Biological Chemistry*, 291(40), pp. 20849–20857. doi: 10.1074/jbc.R116.735894.

Chazin, W. J. and Johnson, C. N. (2020) ‘Calmodulin mutations associated with heart arrhythmia: A status report’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), pp. 1–12. doi: 10.3390/ijms21041418.

Cheng, H. *et al.* (1996) ‘Excitation contraction coupling in heart: New insights from Ca<sup>2+</sup> sparks’, *Cell Calcium*, 20(2), pp. 129–140. doi: 10.1016/S0143-4160(96)90102-5.

Chi, X. *et al.* (2019a) ‘Molecular basis for allosteric regulation of the type 2 ryanodine receptor channel gating by key modulators’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(51), pp. 25575–25582. doi: 10.1073/pnas.1914451116.

Chi, X. *et al.* (2019b) ‘Molecular basis for allosteric regulation of the type 2 ryanodine receptor channel gating by key modulators’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(51), pp. 25575–25582. doi:

10.1073/pnas.1914451116.

Chin, D. and Means, A. R. (2000) 'Calmodulin: A prototypical calcium sensor', *Trends in Cell Biology*, 10(8), pp. 322–328. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01800-6.

Clapham, D. E. (2007) 'Calcium Signaling', *Cell*, 131(6), pp. 1047–1058. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.028.

Cornea, R. L. *et al.* (2009) 'FRET-based mapping of calmodulin bound to the RyR1 Ca<sup>2+</sup> release channel', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), pp. 6128–6133. doi: 10.1073/pnas.0813010106.

Crotti, L. *et al.* (2013) 'Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants', *Circulation*, 127(9), pp. 1009–1017. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001216.

Crotti, L. *et al.* (2019) 'Calmodulin mutations and life-threatening cardiac arrhythmias: Insights from the International Calmodulinopathy Registry', *European Heart Journal*, 40(35), pp. 2964-2975A. doi: 10.1093/eurheartj/ehz311.

Crouch, T. H., & Klee, C. B. (1980). *Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. Biochemistry*, 19(16), 3692–3698. doi:10.1021/bi00557a009

Dridi, H. *et al.* (2020) 'Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target', *Nature Reviews Cardiology*. Springer US, 17(11), pp. 732–747. doi: 10.1038/s41569-020-0394-8.

Efremov, R. G. *et al.* (2015) 'Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor', *Nature*. Nature Publishing Group, 517(7532), pp. 39–43. doi: 10.1038/nature13916.

Eisner, D. A. *et al.* (2017) 'Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart', *Circulation Research*, 121(2), pp. 181–195. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230.

Fedrizzi, L., Lim, D. and Carafoli, E. (2008) 'Calcium and signal transduction', *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36(3), pp. 175–180. doi: 10.1002/bmb.20187.

- Fernández-Falgueras, A. *et al.* (2017) 'Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances', *Biology*, 6(1), p. 7. doi: 10.3390/biology6010007.
- Fischer, T. H., Maier, L. S. and Sossalla, S. (2013) 'The ryanodine receptor leak: How a tattered receptor plunges the failing heart into crisis', *Heart Failure Reviews*, 18(4), pp. 475–483. doi: 10.1007/s10741-012-9339-6.
- Freire, E., Schön, A. and Velazquez-Campoy, A. (2009) 'Isothermal Titration Calorimetry. General Formalism Using Binding Polynomials', in *Methods in Enzymology*, pp. 127–155. doi: 10.1016/S0076-6879(08)04205-5.
- Fruen, B. R. *et al.* (2000) 'Differential Ca<sup>2+</sup> sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279(3 48-3), pp. 724–733. doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.3.c724.
- Fruen, B. R. *et al.* (2003) 'Regulation of the RYR1 and RYR2 Ca<sup>2+</sup> release channel isoforms by Ca<sup>2+</sup>-insensitive mutants of calmodulin', *Biochemistry*, 42(9), pp. 2740–2747. doi: 10.1021/bi0267689.
- Gangopadhyay, J. P. and Ikemoto, N. (2008) 'Interaction of the Lys3614-Asn3643 calmodulin-binding domain with the Cys4114-Asn4142 region of the type 1 ryanodine receptor is involved in the mechanism of Ca<sup>2+</sup>/agonist- induced channel activation', *Biochemical Journal*, 411(2), pp. 415–423. doi: 10.1042/BJ20071375.
- des George, A. *et al.* (2016) 'Structural basis for gating and activation of RyR1', *Cell*, 167(1), pp. 145–157. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Gong, D. *et al.* (2019) 'Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin', *Nature*. Springer US, 572(7769), pp. 347–351. doi: 10.1038/s41586-019-1377-y.
- González, A. *et al.* (2018) 'Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives', *Journal of the American College of Cardiology*, 71(15), pp. 1696–1706. doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.021.
- Gonzalez, D. R. *et al.* (2010) 'Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure', *Journal of*

- Biological Chemistry*, 285(37), pp. 28938–28945. doi: 10.1074/jbc.M110.154948.
- Greenfield, N. J. (2004) ‘Circular dichroism analysis for protein-protein interactions’, *Methods for Molecular Biology*, 261, pp. 55–77. doi: 10.1385/1-59259-762-9:055.
- Greenfield, N. J. (2006) ‘Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure’, *Nature Protocols*, 1(6), pp. 2876–2890. doi: 10.1038/nprot.2006.202.Using.
- Guo, T. *et al.* (2011) ‘FRET detection of calmodulin binding to the cardiac RyR2 calcium release channel’, *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 101(9), pp. 2170–2177. doi: 10.1016/j.bpj.2011.09.030.
- Guo, W. *et al.* (2016) ‘The EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding domain is not required for cytosolic Ca<sup>2+</sup> activation of the cardiac ryanodine receptor’, *Journal of Biological Chemistry*, 291(5), pp. 2150–2160. doi: 10.1074/jbc.M115.693325.
- Hakamata, Y. *et al.* (1992) ‘Primary Structure and Tissue Distribution of a Novel Calcium Channel from Rabbit Brain’, *Febs Letter*, 312(1), pp. 229–235. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38073.x.
- Harris, A. S., Croall, D. E. and Morrow, J. S. (1988) ‘The calmodulin-binding site in  $\alpha$ -fodrin is near the calcium-dependent protease-I cleavage site’, *Journal of Biological Chemistry*, 263(30), pp. 15754–15761.
- Heijman, J. *et al.* (2014) ‘Calcium dysregulation in atrial fibrillation: The role of CaMKII’, *Frontiers in Pharmacology*, 5(30), pp. 1–10. doi: 10.3389/fphar.2014.00030.
- Heijmana, J. *et al.* (2017) ‘Serine/Threonine Phosphatases in Atrial Fibrillation’, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 103(1), pp. 110–120. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.12.009.Serine/Threonine.
- Hoeflich, K. P. and Ikura, M. (2002) ‘Calmodulin in action: Diversity in target recognition and activation mechanisms’, *Cell*, 108(6), pp. 739–742. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00682-7.
- Holt, C. *et al.* (2020) ‘The arrhythmogenic N53I variant subtly changes the structure and dynamics in the calmodulin N-terminal domain, altering its interaction with the cardiac

ryanodine receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 295(22), pp. 7620–7634. doi: 10.1074/jbc.RA120.013430.

Huang, X. *et al.* (2012) 'Calmodulin-binding locations on the skeletal and cardiac ryanodine receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), pp. 30328–30335. doi: 10.1074/jbc.M112.383109.

Huang, X. *et al.* (2013) 'Two potential calmodulin-binding sequences in the ryanodine receptor contribute to a mobile, intra-subunit calmodulin-binding domain', *Journal of Cell Science*, 126(19), pp. 4527–4535. doi: 10.1242/jcs.133454.

Hwang, Hyun-Seok Nitu, F. R. *et al.* (2014) 'Divergent Regulation of Ryr2 Calcium Release Channels by Arrhythmogenic Human Calmodulin Missense Mutants', *Circulation Journal*, 114(7), pp. 1114–1124. doi: 10.2217/ahe.11.91.Anxiety.

Jelesarov, I. and Bosshard, H. R. (1999) 'Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition', *JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION*, 12, pp. 3–18. doi: 10.1002/(SICI)1099-1352(199901/02)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6.

Kotta, M. C. *et al.* (2018) 'Calmodulinopathy: A Novel, Life-Threatening Clinical Entity Affecting the Young', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5(December), pp. 1–10. doi: 10.3389/fcvm.2018.00175.

Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd edn. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.

Lamb (2000) 'Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: Comparisons with cardiac muscle', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27, pp. 1–9.

Landstrom, A. P., Dobrev, D. and Wehrens, X. H. T. (2017) 'Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias', *Circulation Research*, 120(12), pp. 1969–1993. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310083.Calcium.

Lanner, J. T. *et al.* (2010) 'Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, pp. 1–21.

- Lau, K. (2014) 'Binding and structural insights of the ryanodine receptor', *Electronic Theses and Dissertations (ETDs) 2008+*, (September). Available at: <https://circle.ubc.ca/handle/2429/50503>.
- Lau, K., Chan, M. M. Y. and Van Petegem, F. (2014) 'Lobe-specific calmodulin binding to different ryanodine receptor isoforms', *Biochemistry*, 53(5), pp. 932–946. doi: 10.1021/bi401502x.
- Lau, K. and Van Petegem, F. (2014) 'Crystal structures of wild type and disease mutant forms of the ryanodine receptor SPRY2 domain', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms6397.
- Laver, D. R., Baynes, T. M. and Dulhunty, A. F. (1997) 'Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: Evidence for two independent mechanisms', *Journal of Membrane Biology*, 156(3), pp. 213–229. doi: 10.1007/s002329900202.
- Lobo, P. A. and Van Petegem, F. (2009) 'Crystal Structures of the N-Terminal Domains of Cardiac and Skeletal Muscle Ryanodine Receptors: Insights into Disease Mutations', *Structure*. Elsevier Ltd, 17(11), pp. 1505–1514. doi: 10.1016/j.str.2009.08.016.
- Lukyanenko, V., Wiesner, T. F. and Györke, S. (1998) 'Termination of Ca<sup>2+</sup> release during Ca<sup>2+</sup> sparks in rat ventricular myocytes', *Journal of Physiology*, 507(3), pp. 667–677. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.667bs.x.
- Luo, M. and Anderson, M. E. (2013) 'Mechanisms of altered Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure', *Circulation Research*, 113(6), pp. 690–708. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301651.
- Makita, N. *et al.* (2014) 'Novel calmodulin mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility', *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(4), pp. 466–474. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000459.
- Marks, A. R. (2013) 'Calcium cycling proteins and heart failure : mechanisms and therapeutics Find the latest version : Review series Calcium cycling proteins and heart failure : mechanisms and therapeutics', *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), pp. 46–52. doi: 10.1172/JCI62834.46.



Marsman, R. F. *et al.* (2014) 'A mutation in CALM1 encoding calmodulin in familial idiopathic ventricular fibrillation in childhood and adolescence', *Journal of the American College of Cardiology*, 63(3), pp. 259–266. doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.091.

Marx, S. O. *et al.* (2000) 'PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts', *Cell*, 101(4), pp. 365–376. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80847-8.

Maximciuc, A. A. *et al.* (2006) 'Complex of Calmodulin with a Ryanodine Receptor Target Reveals a Novel, Flexible Binding Mode', *Structure*, 14(10), pp. 1547–1556. doi: 10.1016/j.str.2006.08.011.

Meissner, G. (1994) 'RYANODINE RECEPTOR/Ca<sup>2+</sup> RELEASE CHANNELS AND THEIR REGULATION BY ENDOGENOUS EFFECTORS', *Annual Reviews of Physiology*, 56, pp. 485–508.

Meissner, G. *et al.* (1997) 'Regulation of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) by Ca<sup>2+</sup> and monovalent cations and anions', *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), pp. 1628–1638. doi: 10.1074/jbc.272.3.1628.

Meissner, G. (2017) 'The structural basis of ryanodine receptor ion channel function.', *The Journal of general physiology*, 149(12), pp. 1065–1089. doi: 10.1085/jgp.201711878.

Menegazzi, P. *et al.* (1994) 'Identification and Characterization of Three Calmodulin Binding Sites of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor', *Biochemistry*, 33(31), pp. 9078–9084. doi: 10.1021/bi00197a008.

Merrifield, R. B. (1963) 'Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide', *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), pp. 2149–2154. doi: 10.1021/ja00897a025.

MicroCal (2004) 'ITC Data Analysis in Origin®', *Reading*, (January), p. 121.

Moore, C. P. *et al.* (1999) 'Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup> calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel', *Biochemistry*, 38(26), pp. 8532–8537. doi: 10.1021/bi9907431.

- Nakai, J. *et al.* (1990) 'Primary structure and functional expression from cDN A of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel', *FEBS Letters*, 271(1–2), pp. 169–177. doi: 10.1016/0014-5793(90)80399-4.
- Nakamura, Y. *et al.* (2019) 'Ryanodine receptor–bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia', *JCI Insight*, 4(11). doi: 10.1172/jci.insight.126112.
- Niggli, E. (2009) 'How to shut down Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release?', *The Journal of Physiology*, 587(21), pp. 5003–5004. doi: 10.1113/jphysiol.2009.181578.
- Nishimura, S. *et al.* (2018) *Mutation-linked, excessively tight interaction between the calmodulin binding domain and the C-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor as a novel cause of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*, *Heart Rhythm*. Heart Rhythm Society. doi: 10.1016/j.hrthm.2018.02.006.
- Nomikos, M. *et al.* (2014) 'Altered RyR2 regulation by the calmodulin F90L mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation and early sudden cardiac death', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 588(17), pp. 2898–2902. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.007.
- Nyegaard, M. *et al.* (2012) 'Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death', *American Journal of Human Genetics*, 91(4), pp. 703–712. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.015.
- O'Brien, J., Meissner, G. and Block, B. A. (1993) 'The fastest contracting muscles of nonmammalian vertebrates express only one isoform of the ryanodine receptor', *Biophysical Journal*, 65(6), pp. 2418–2427. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81303-1.
- Ogawa, H. *et al.* (2020) 'Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel revealed by recent advancements in structural studies', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. Springer International Publishing, (0123456789). doi: 10.1007/s10974-020-09575-6.
- Otsu, K. *et al.* (1990) 'Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum', *Journal of*

*Biological Chemistry*, 265(23), pp. 13472–13483.

Oyamada, H. *et al.* (1994) 'Primary Structure and Distribution', *Journal of Biological Chemistry*, 269(25), pp. 17206–17214.

Pedigo, S. and Shea, M. A. (1995a) 'Discontinuous Equilibrium Titrations of Cooperative Calcium Binding to Calmodulin Monitored by 1-D 1H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy', *Biochemistry*, 34(33), pp. 10676–10689. doi: 10.1021/bi00033a044.

Pedigo, S. and Shea, M. A. (1995b) 'Quantitative Endoproteinase GluC Footprinting of Cooperative Ca<sup>2+</sup> Binding to Calmodulin: Proteolytic Susceptibility of E31 and E87 Indicates Interdomain Interactions', *Biochemistry*, 34(4), pp. 1179–1196. doi: 10.1021/bi00004a011.

Peng, W. *et al.* (2016) 'Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2', *Science*, 5324(September), pp. 1–17.

Permyakov, E. (1994) *Luminescent spectroscopy of proteins*. CRC Press.

Van Petegem, F. (2012) 'Ryanodine receptors: Structure and function', *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp. 31624–31632. doi: 10.1074/jbc.R112.349068.

Van Petegem, F. (2015) 'Ryanodine receptors: Allosteric ion channel giants', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 427(1), pp. 31–53. doi: 10.1016/j.jmb.2014.08.004.

Pipilas, D. C. *et al.* (2016) 'Novel Calmodulin Mutations Associated With Congenital Arrhythmia Susceptibility', 13(10), pp. 2012–2019. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000459doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000459/-/DC1.

Priori, S. and Chen, S. R. W. (2011) 'Inherited dysfunction of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Handling and Arrhythmogenesis', *Circulation Research*, 108(7), pp. 871–883. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226845.Inherited.

Protasi, F. (2002) 'Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp. 650–658. doi: 10.2741/a801.

Radermacher, M. *et al.* (1994) 'Cryo-electron microscopy and three-dimensional

reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle', *Journal of Cell Biology*, 127(2), pp. 411–423. doi: 10.1083/jcb.127.2.411.

Respress, J. L. *et al.* (2012) 'Role of RyR2 Phosphorylation at S2814 during Heart Failure Progression', *Circulation Research*, 110(11), pp. 1474–1483. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268094.Role.

Rodney, G. G. *et al.* (2001) 'Calcium binding to calmodulin leads to an N-terminal shift in its binding site on the ryanodine receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), pp. 2069–2074. doi: 10.1074/jbc.M008891200.

Saito, A. *et al.* (1988) 'Ultrastructure of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum', *the journal of cell biology*, 107(1), pp. 211–219. doi: 10.1016/0143-4160(88)90032-2.

Samsó, M. and Wagenknecht, T. (2002) 'Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), pp. 1349–1353. doi: 10.1074/jbc.M109196200.

Sham, J. S. K., Cleemann, L. and Morad, M. (1995) 'Functional coupling of Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), pp. 121–125. doi: 10.1073/pnas.92.1.121.

Shan, J., Kushnir, A., *et al.* (2010) 'Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), pp. 4388–4398. doi: 10.1172/JCI32726.

Shan, J., Betzenhauser, M. J., *et al.* (2010) 'Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and  $\beta$ -adrenergic receptor blockade in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), pp. 4375–4387. doi: 10.1172/JCI37649.

Sharma, M. R. *et al.* (1998) 'Cryoelectron microscopy and image analysis of the cardiac ryanodine receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), pp. 18429–18434. doi: 10.1074/jbc.273.29.18429.

Søndergaard, M. T., Tian, X., *et al.* (2015) 'Arrhythmogenic calmodulin mutations affect

the activation and termination of cardiac ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release', *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), pp. 26151–26162. doi: 10.1074/jbc.M115.676627.

Søndergaard, M. T., Sorensen, A. B., *et al.* (2015) 'Calmodulin mutations causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia confer opposing functional and biophysical molecular changes', *FEBS Journal*, 282(4), pp. 803–816. doi: 10.1111/febs.13184.

Søndergaard, M. T., Liu, Y., Brohus, M., *et al.* (2019) 'Diminished inhibition and facilitated activation of RyR2-mediated Ca<sup>2+</sup> release is a common defect of arrhythmogenic calmodulin mutations', *FEBS Journal*. doi: 10.1111/febs.14969.

Søndergaard, M. T., Liu, Y., Guo, W., *et al.* (2019) 'Role of cardiac ryanodine receptor calmodulin-binding domains in mediating the action of arrhythmogenic calmodulin N-domain mutation N54I'. doi: 10.1111/febs.15147.

Søndergaard, M. T. *et al.* (2020) 'Role of cardiac ryanodine receptor calmodulin-binding domains in mediating the action of arrhythmogenic calmodulin N-domain mutation N54I', *FEBS Journal*, 287(11), pp. 2256–2280. doi: 10.1111/febs.15147.

Song, D. W. *et al.* (2011) 'Ryanodine receptor assembly: A novel systems biology approach to 3D mapping', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 105(3), pp. 145–161. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.09.021.

Sorensen, A. B., Søndergaard, M. T. and Overgaard, M. T. (2013) 'Calmodulin in a Heartbeat', *FEBS Journal*, 280(21), pp. 5511–5532. doi: 10.1111/febs.12337.

Sumitomo, N. *et al.* (2003) 'Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: Electrocardiographic characteristics and optimal therapeutic strategies to prevent sudden death', *Heart*, 89(1), pp. 66–70. doi: 10.1136/heart.89.1.66.

Swindells, M. B. and Ikura, M. (1996) 'Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications for binding I–Q motifs', *Nature Structural Biology*, 3(6), pp. 501–504.

Takahashi, K., Ishikawa, T. and Makita, N. (2016) 'A novel de novo calmodulin mutation

- in a 6-year-old boy who experienced an aborted cardiac arrest', *HeartRhythm Case Reports*. Elsevier, 3(1), pp. 69–72. doi: 10.1016/j.hrcr.2016.09.004.
- Takeshima, H. *et al.* (1989) 'Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor', *Nature*, 339(6224), pp. 439–445. doi: 10.1038/339439a0.
- Terentyev, D. *et al.* (2008) 'Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in chronic heart failure', *Circulation Research*, 103(12), pp. 1466–1472. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184457.
- Tian, X. *et al.* (2013) 'Calmodulin modulates the termination threshold for cardiac ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release', *Biochemical Journal*, 455(3), pp. 367–375. doi: 10.1042/BJ20130805.
- Tung, C. C. *et al.* (2010) 'The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule', *Nature*. Nature Publishing Group, 468(7323), pp. 585–588. doi: 10.1038/nature09471.
- Valeur, B. (2001) *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. doi: 10.1016/0306-4492(76)90041-1.
- VanScyoc, W. S. *et al.* (2002) 'Calcium Binding to Calmodulin Mutants Monitored by Domain-Specific Intrinsic Phenylalanine and Tyrosine Fluorescence', *Biophysical Journal*. Elsevier, 83(5), pp. 2767–2780. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75286-7.
- VanScyoc, W. S. and Shea, M. A. (2001) 'Phenylalanine fluorescence studies of calcium binding to N-domain fragments of Paramecium calmodulin mutants show increased calcium affinity correlates with increased disorder', *Protein Science*, 10(9), pp. 1758–1768. doi: 10.1110/ps.11601.
- Vassilakopoulou, V. *et al.* (2015) 'Distinctive malfunctions of calmodulin mutations associated with heart RyR2-mediated arrhythmic disease', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1850(11), pp. 2168–2176. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.07.001.
- Velazquez-Campoy, Adrian Ohtaka, H. *et al.* (2004) 'Isothermal Titration Calorimetry

Isothermal', in *Current Protocols in Cell Biology*. doi: 10.2174/9781681087092118010006.

Wagenknecht, T. *et al.* (1989) 'Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum', *Nature*, pp. 167–170. doi: 10.1038/338167a0.

Wagenknecht, T. *et al.* (1997) 'Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), pp. 32463–32471. doi: 10.1074/jbc.272.51.32463.

Wehrens, X. H. T. *et al.* (2003) 'FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death', *Cell*, 113(7), pp. 829–840. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00434-3.

Wehrens, X. H. T. *et al.* (2004) 'Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor.', *Circulation research*, 94(6). doi: 10.1161/01.res.0000125626.33738.e2.

Wehrens, X. H. T. and Marks, A. R. (2003) 'Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease', *Trends in Biochemical Sciences*, 28(12), pp. 671–678. doi: 10.1016/j.tibs.2003.10.003.

Wehrens, X. H. T. and Marks, A. R. (eds) (2005) *RYANODINE RECEPTORS Structure, function and dysfunction in clinical disease*.

Wei, R. *et al.* (2016) 'Structural insights into Ca<sup>2+</sup>-activated long-range allosteric channel gating of RyR1', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 26(9), pp. 977–994. doi: 10.1038/cr.2016.99.

Willegems, K. and Efremov, R. G. (2017) 'Structural Details of the Ryanodine Receptor Calcium Release Channel and Its Gating Mechanism', in *Membrane Dynamics and Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology 981*, pp. 179–204.

Woodcock, E. A. and Matkovich, S. J. (2005) 'Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(9), pp. 1746–1751. doi: 10.1016/j.biocel.2005.04.011.

Xiao, B. *et al.* (2005) 'Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure', *Circulation Research*, 96(8), pp. 847–855. doi:

10.1161/01.RES.0000163276.26083.e8.

Xiao, B. *et al.* (2006) 'Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon  $\beta$ -adrenergic stimulation in normal and failing hearts', *Biochemical Journal*, 396(1), pp. 7–16. doi:

10.1042/BJ20060116.

Xiong, L. *et al.* (2006) 'A  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain in RyR1 that interacts with the calmodulin binding site and modulates channel activity', *Biophysical Journal*, 90(1), pp. 173–182. doi: 10.1529/biophysj.105.066092.

Xiong, L. W. *et al.* (2002) 'Lobe-dependent regulation of ryanodine receptor type 1 by calmodulin', *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), pp. 40862–40870. doi:

10.1074/jbc.M206763200.

Xu, L. and Meissner, G. (2004) 'Mechanism of Calmodulin Inhibition of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  Release Channel (Ryanodine Receptor)', *Biophysical Journal*, 86(2), pp. 797–804. doi: 10.1016/S0006-3495(04)74155-7.

Xu, X. *et al.* (2010) 'Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(3), pp. 660–666. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.046.

Yamaguchi, N. *et al.* (2003) 'Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor).', *The Journal of biological chemistry*, 278(26), pp. 23480–6. doi: 10.1074/jbc.M301125200.

Yamaguchi, N. *et al.* (2013) 'Cardiac hypertrophy associated with impaired regulation of cardiac ryanodine receptor by calmodulin and S100A1', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 305(1), pp. 86–95. doi:

10.1152/ajpheart.00144.2013.

Yamaguchi, N., Xin, C. and Meissner, G. (2001) 'Identification of Apocalmodulin and



Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Regulatory Domain in Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channel, Ryanodine Receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), pp. 22579–22585. doi: 10.1074/jbc.M102729200.

Yan, Z. *et al.* (2015) 'Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution', *Nature*, 517(7532), pp. 50–55. doi: 10.1038/nature14063.

Yi Yang *et al.* (2014) 'Cardiac Myocyte Z-line Calmodulin is Mainly RyR2-Bound and Reduction is Arrhythmogenic and Occurs in Heart Failure', *Circulation Research*, 114(2), pp. 295–306. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Yuchi, Z. *et al.* (2015) 'Crystal structures of ryanodine receptor SPRY1 and tandem-repeat domains reveal a critical FKBP12 binding determinant', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6, pp. 1–13. doi: 10.1038/ncomms8947.

Yuchi, Z., Lau, K. and Van Petegem, F. (2012) 'Disease mutations in the ryanodine receptor central region: Crystal structures of a phosphorylation hot spot domain', *Structure*. Elsevier Ltd, 20(7), pp. 1201–1211. doi: 10.1016/j.str.2012.04.015.

Yuchi, Z. and Van Petegem, F. (2016) 'Ryanodine receptors under the magnifying lens: Insights and limitations of cryo-electron microscopy and X-ray crystallography studies', *Cell Calcium*. Elsevier Ltd, 59(5), pp. 209–227. doi: 10.1016/j.ceca.2016.04.003.

Zalk, R. *et al.* (2015) 'Structure of a mammalian ryanodine receptor', *Nature*, 517(7532), pp. 44–49. doi: 10.1038/nature13950.Structure.

Zima, A. V. *et al.* (2008) 'Termination of Cardiac Ca<sup>2+</sup> Sparks: Role of Intra-SR [Ca<sup>2+</sup>], Release Flux, and Intra-SR Ca<sup>2+</sup> Diffusion', *Circulation Research*, 103(8), pp. e105–e115. doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial.

Zima, A. V. and Blatter, L. A. (2006) 'Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters', *Cardiovascular Research*, 71(2), pp. 310–321. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.02.019.

Zima, A. V. and Mazurek, S. R. (2016) 'Functional impact of ryanodine receptor oxidation on intracellular calcium regulation in the heart', *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 171, pp. 39–62. doi: 10.1007/112\_2016\_2.

