

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana G. Jasnić

ODREĐIVANJE PROFILA EKSPRESIJE I  
UNUTARĆELIJSKE LOKALIZACIJE  
PROTEINA ANKRD2 U SRCU I  
SKELETNIM MIŠIĆIMA ČOVEKA

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jovana G. Jasnić

DETERMINATION OF EXPRESSION  
PROFILE AND LOCALIZATION OF  
ANKRD2 PROTEIN IN HUMAN CARDIAC  
AND SKELETAL MUSCLES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTORI:

dr **Snežana Kojić**, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku  
i genetičko inženjerstvo

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku  
i genetičko inženjerstvo

KOMISIJA:

dr **Snežana Kojić**, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku  
i genetičko inženjerstvo

dr **Dušanka Savić Pavićević**, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku  
i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane \_\_\_\_\_

*Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Želela bih da izrazim zahvalnost svim kolegama koji su posredno ili neposredno doprineli realizaciji ove disertacije na savetima i pomoći tokom ovih godina. Posebno se zahvaljujem svojim mentorima i članovima komisije:*

*dr Snežani Kojić, mentorki, hvala na velikoj pomoći i razgovorima tokom izrade i pisanja disertacije. Zahvalna sam na svemu što me je naučila, savetima, strpljenju i nestrpljenju, na instistiranju da uvek težim ka boljem, a pre svega na prijateljstvu.*

*dr Dragici Radojković, kao rukovodiocu Laboratorije za molekularnu biologiju, se zahvaljujem na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da postanem deo Lab03. Zahvalna sam i na savetima i pomoći koju mi je pružila tokom pisanja i poslednjih koraka u završavanju teze.*

*dr Dušanki Savić-Pavićević, na kritičkoj analizi ove teze i savetima koji su doprineli njenom poboljšanju.*

*Bilo je veliko zadovoljstvo raditi sa kolegama iz laboratorije 03 i deliti istraživačke brige. Svim članovima se zahvaljujem na pomoći i prijatnoj atmosferi, a posebno:*

*Sandri i Miri, na razgovorima i uzajamnom bodrenju.*

*Maji, Branku i Vanji, hvala na uvek veseloj atmosferi u ozloglašenoj sobi 13 i nepresušnoj energiji, na šalama ali i ozbiljnim razgovorima.*

*Članovima „mišićnog tima“ hvala za zajednički rad koji zbog vas ne deluje teško i naporno. Aleki, za pomoć, priču i smeh. Srđanu, što je uneo dašak svežine i pozitivnog duha u našu grupu.*



*Ivi, naučnom i životnom saputniku, prijatelju kroz sve dobre i loše stvari koje su nam se dešavale. Hvala ti što bez obzira koliko jake bile, uvek možemo da se oslonimo jedna na drugu. Hvala na prijateljstvu i ljubavi.*

*Mojoj divnoj prijateljici Jovani, hvala na istrajnom i strpljivom prijateljstvu, na miru koji uliva i bezrezervnoj podršci.*

*Najveću zahvalnost dugujem članovima svoje uže i šire porodice koji predstavljaju moje najveće prijatelje i podršku. Bez vas ne bih bila osoba kakva sam danas.*

*Mami, mojoj steni i najvećem osloncu, hvala na ljubavi i svemu što činiš za mene i sve nas.*

*Ovu tezu posvećujem mom **Tati***

## **Određivanje profila ekspresije i unutarćelijske lokalizacije proteina ANKRD2 u srcu i skeletnim mišićima čoveka**

### **REZIME**

Protein Ankrd2 pripada familiji mišićnih proteina sa ankirinskim ponovcima (eng. *Muscle Ankyrin Repeat Proteins* – MARP). U sarkomeri ima ulogu strukturnog elementa i signalnog molekula u procesu mehanotransdukcije. Pod dejstvom fizičkih i hemijskih stresora migrira u jedro, gde ostvaruje ulogu regulatora transkripcije. Ekspresija Ankrd2 je indukovana mehaničkim stresom i zavisna od stepena diferencijacije mišićne ćelije i faze razvića organizma.

Osim u skeletnim mišićima, protein ANKRD2 je u manjoj meri eksprimiran i u srcu čoveka. U cilju otkrivanja novih funkcija koje ANKRD2 ima u ovom organu određeni su njegov profil ekspresije i lokalizacija u srcu čoveka i upoređeni sa karakteristikama homolognog ANKRD1, koji je eksprimiran samo u srcu i detaljno okarakterisan. Utvrdili smo da je nivo ekspresije ANKRD2 dosta niži u poređenju sa ANKRD1 i da je pretežno lokalizovan u sarkomeri kardiomiocita. Interkalirajući diskovi su identifikovani kao novo mesto lokalizacije oba proteina.

S obzirom da su često i uspešno korišćen model sistem za proučavanje funkcije srčano-specifičnih gena, kardiomiociti neonatalnih pacova (KMNP) su okarakterisani po pitanju ekspresije i lokalizacije endogenog Ankrd2 i egzogenog ANKRD2. Ankrd2 je lokalizovan i u jedru i u citoplazmi KMNP, a sličnu dualnu lokalizaciju je pokazivao i egzogeno eksprimirani ANKRD2. Za razliku od inhibitornog dejstva na ekspresiju Ankrd1, kardiotoksični agens doksorubicin nije doveo do promene nivoa ekspresije proteina Ankrd2 u KMNP.

U ovoj tezi su okarakterisane tri izoforme ANKRD2 od 446 (L-ANKRD2), 360 (M-ANKRD2) i 333 (S-ANKRD2) aminokiselina. Diskriminacija izoformi u poprečno prugastim mišićima čoveka je postignuta korišćenjem specifično dizajniranih antitela i graničnika. Utvrdili smo brojne sličnosti između izoformi S- i M-ANKRD2, kao i značajne razlike koje mogu da se odraze na njihove specifične funkcije. Izoforna L-ANKRD2 nije detektovana ni u srcu, ni u skeletnim mišićima. Izoforme se prepisuju sa

dve iRNK, pa je ekspresija S-ANKRD2 i M-ANKRD2 regulisana na nivou transkripcije. Najverovatnije imaju različite funkcije i u diferencijaciji mišićnih ćelija jer su različito distribuirane u miotubama. Prikazani rezultati ukazuju da je S-ANKRD2 dominantna izoforma u poprečno prugastim mišićima čoveka, da najviše doprinosi generalnom profilu ekspresije proteina ANKRD2, pa je treba proglasiti kanonskom.

Rezultati ove teze predstavljaju osnovu za dalje funkcionalne analize proteina ANKRD2 i njegovih izoformi u poprečno prugastim mišićima.

**KLJUČNE REČI:** ANKRD2, ANKRD1, skeletni mišići, srce, čovek, kardiomiociti neonatalnih pacova, izoforme, regulacija ekspresije, interkalirajući diskovi, doksorubicin

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Molekularna biologija

**UDK BROJ:** 577.112.85:[611.73+611.12](043.3)

## **Determination of expression profile and localization of ANKRD2 protein in human cardiac and skeletal muscles**

### **ABSTRACT**

Ankrd2 is a member MARP (Muscle Ankyrin Repeat Proteins) protein family. In sarcomere, it has a role of a structural element and signaling molecule in mechanotransduction. Ankrd2 is highly responsive to physical and chemical stress, which results in its translocation to the nucleus where it acts as a transcriptional regulator. Expression of Ankrd2 is upregulated in response to mechanical stresses such as exercise and stretch, as well as during muscle development and myoblast differentiation.

Apart from skeletal muscles, ANKRD2 has been also detected in adult human heart, but at lower levels. In order to explore the cardiac-specific function of ANKRD2, we determined its expression and localization in human heart and compared them with the profiles of homologous cardiac protein ANKRD1. It was found that ANKRD2 is preferentially localized in sarcomere of cardiomyocytes and that level of its expression was lower when compared to ANKRD1. Intercalated disks were identified as a novel site of localization of both proteins.

Neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) are commonly used as a model system for functional analysis of cardiac-specific genes. One of the goals of this thesis was to characterize this model regarding expression and intracellular localization of endogenous Ankrd2 and exogenous ANKRD2. Nuclear and cytoplasmic localization of Ankrd2 was observed in NRCM, while similar dual localization was established for exogenous ANKRD2 as well. In the contrast to inhibitory effect on Ankrd1 expression, cardio-toxic drug doxorubicin did not change the protein level of Ankrd2 in NRCM.

In this thesis we also characterized three ANKRD2 isoforms, containing 446 (L-ANKRD2), 360 (M-ANKRD2) i 333 (S-ANKRD2) amino acids. Their discrimination in human striated muscles was achieved by specifically designed antibodies and PCR primers. Various similarities between S- and M-ANKRD2 isoforms were discovered, as well as several significant differences, which could reflect on their specific functions.

However, L-ANKRD2 isoform was detected neither in heart nor in skeletal muscles. We determined that S- and M-ANKRD2 isoforms are translated from different mRNA, hence regulation of their expression is achieved at transcriptional level. Due to their distinct distribution in myotubes, isoforms most likely have different functions in differentiation of muscle cells. Experimental evidence presented in this thesis strongly indicates that S-ANKRD2 is the dominant isoform in human striated muscles, it contributes the most to the general profile of ANKRD2 expression and should be nominated as the canonical one.

Results of this thesis set the stage for further functional studies of ANKRD2 protein and its isoforms in striated muscles.

**KEYWORDS:** ANKRD2, ANKRD1, skeletal muscle, heart, human, neonatal rat cardiomyocytes, isoforms, gene expression regulation, intercalated disks, doxorubicin

**SCIENTIFIC FIELD:** Biology

**SCIENTIFIC DISCIPLINE:** Molecular biology

**UDC NUMBER:** 577.112.85:[611.73+611.12](043.3)

## SKRAĆENICE

ALS	amiotrofična lateralna skleroza
ANP	eng. <i>atrial natriuretic peptid</i>
AP	protein aktivator (eng. <i>activator protein</i> )
ATP	adenozin trifosfat (eng. <i>adenosine triphosphate</i> )
bHLH	transkripcioni faktor sekundarne strukture heliks-petlja-heliks (eng. <i>basic Helix-Loop-Helix</i> )
BSA	albumin seruma govečeta (eng. <i>bovine serum albumin</i> )
cDNK	komplementarni lanac molekula DNK (eng. <i>complementary DNA</i> )
CnA	kalcineurin 2 (eng. <i>calcineurin 2</i> )
CS-1	eng. <i>calsarcin-1</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	dilatirana kardiomiopatija (eng. <i>dilated cardiomyopathy</i> )
DIC	eng. <i>differential interference contrast</i>
DMSO	dimetilsulfoksid
ECM	ekstraćelijski matriks
ERK	kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima (eng. <i>extracellular signal-regulated kinases</i> )
EST	eng. <i>expressed sequence tag</i>
FATZ	protein Z diska koji se vezuje za filamin, aktinin i teletonin (eng. <i>Filamin, Actinin and Telethonin binding proteins of the Z-disk</i> )
FBS	serum fetusa govečeta (eng. <i>fetal bovine serum</i> )
FHL	eng. <i>four-and-a half LIM domain proteins</i>
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (eng. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
GFP	zeleni fluorescentni protein (eng. <i>green fluorescent protein</i> )
HAND2	protein eksprimiran u derivatima srca i nervne kreste (eng. <i>heart- and neural crest derivatives- expressed protein 2</i> )
HCM	hipertrofična kardiomiopatija (eng. <i>hypertrophic cardiomyopathy</i> )
HRP	peroksidaza rena (eng. <i>horseradish peroxidase</i> )

ID3	eng. <i>inhibitor of DNA Binding 3</i>
IKD	interkalirajući diskovi
IPTG	izopropil $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
KMNP	kardiomiociti neonatalnih pacova
LDB3	eng. <i>PDZ LIM domain binding 3</i>
LIM	strukturni domeni nazvani po proteinima u kojima su otkriveni <u>L</u> in11, <u>I</u> sl-1 i <u>M</u> ec-3
MAPK	kinaza aktivirana mitogenima (eng. <i>mitogen activated protein kinase</i> )
MARP	mišićni proteini sa ankirinskim ponovcima (eng. <i>Muscle Ankyrin Repeat Protein</i> )
MEF2C	eng. <i>myocyte enhancer factor 2C</i>
MEK1/2	eng. <i>MAPK/ERK kinase</i>
MLP	mišićni protein sa LIM domenima (eng. <i>muscle LIM protein</i> )
MRF	miogeni regulatorni faktori (eng. <i>myogenic regulatory factors</i> )
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
MuRF	eng. <i>Muscle-specific RING Finger proteins</i>
NBR1	eng. <i>neighbor of BRCA1 gene-1</i>
NCBI	eng. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- $\kappa$ B	nuklearni faktor $\kappa$ B (eng. <i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells</i> )
Ni-NTA	nikl-nitrosirćetna kiselina (eng. <i>nickel-nitroloacetic acid</i> )
NLS	signal za lokalizaciju u jedro (eng. <i>nuclear localization signal</i> )
N-RAP	eng. <i>nebulin-related anchoring protein</i>
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PEVK	slovni imboli za aminokiseline prolin, glutamin, valin i lizin (Pro-Glu-Val-Lys)
PICOT	eng. <i>protein kinase C- interacting cousin of thioredoxin</i>
PKA	protein kinaza zavisna od cAMP
PKC	protein kinaza C
PMI	vreme proteklo od smrti do obdukcije (eng. <i>postmortem interval</i> )

PML	protein promijelocitne leukemije (eng. <i>promyelocytic leukemia protein</i> )
PVDF	poliviniliden fluorid
qRT-PCR	kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. <i>quantitative Real Time PCR</i> )
RAF	eng. <i>rapid accelerated fibrosarcoma-1</i>
RT	reverzna transkripcija
SD	standardna devijacija
SDS-PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu sa natrijum dodecil sulfatom (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SMA	spinalna mišićna atrofija
SNB1	beta-1-sintrofin (eng. <i>syntrophin, beta 1</i> )
SQSTM1	sekvestozom1 (eng. <i>sequestosome-1</i> )
SRF	faktor odgovora na serum (eng. <i>serum response factor</i> )
TCAP	eng. <i>titin Cap</i>
TGF- $\beta$	transformišući faktor rasta tipa $\beta$ (eng. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
VMA	Vojnomedicinska akademija
YB1	protein koji se vezuje za Y boks (eng. <i>Y-box-binding protein 1</i> )
ZASP	eng. <i>Z-band Alternatively Spliced PDZ motif Proteins</i>
ZO	eng. <i>zonula occludens</i>



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Mišićno tkivo .....	2
1.1.1. Poprečno prugasti mišići .....	4
1.2. Sarkomera .....	5
1.2.1. Mehanosenzorni kompleksi sarkomere .....	8
Mehanosenzorni kompleks Z diska .....	9
Mehanosenzorni kompleks M linije .....	11
1.2.2. Mehanosenzorni kompleks I trake .....	11
1.3. Mišićni proteini sa ankirinskim ponovcima - MARP proteini.....	13
1.4. Protein Ankrd2.....	17
1.4.1. Strukturne karakteristike proteina Ankrd2 .....	17
1.4.2. Izoforme proteina ANKRD2 .....	19
1.4.3. Ekspresija proteina Ankrd2 .....	21
1.4.4. Regulacija ekspresije gena <i>Ankrd2</i> .....	22
1.4.5. Funkcija proteina Ankrd2.....	24
1.4.6. Protein ANKRD2 u patološkim stanjima.....	25
Protein ANKRD2 u neuromišićnim bolestima.....	25
Protein ANKRD2 u tumorima .....	26
<b>2. CILJ RADA .....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>30</b>
3.1. MATERIJAL.....	31
3.1.1. Humani uzorci.....	31
3.1.2. Eksperimentalne životinje.....	33
3.1.3. Bakterijski sojevi .....	33
3.1.4. Plazmidni konstrukti .....	34
3.1.5. Graničnici.....	34
3.1.6. Antitela.....	35
3.1.7. Čelijske linije .....	36
3.1.8. Komercijalni agensi .....	37
3.1.9. Kompjuterski progami .....	37

3.2. METODE .....	38
3.2.1. Kultivacija bakterija.....	38
3.2.2. Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali.....	38
3.2.3. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantnih proteina .....	39
3.2.4. Čelijska kultura .....	40
3.2.5. Izolacija primarnih kardiomiocita neonatalnih pacova.....	41
3.2.6. Tranzijentna transfekcija ćelija.....	42
3.2.7. Tretman ćelija doksorubicinom .....	43
3.2.8. Pripremanje proteinskih ekstrakata iz ćelija i tkiva .....	43
3.2.9. Merenje koncentracije proteina .....	44
3.2.10. Izolacija RNK .....	44
3.2.11. Reakcija reverzne transkripcije- sinteza cDNK.....	45
3.2.12. Reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom.....	46
3.2.13. Analiza DNK elektroforezom na agaraznom gelu.....	47
3.2.14. Kvantitativni PCR u realnom vremenu.....	47
3.2.15. Određivanje vijabilnosti ćelija MTT testom.....	48
3.2.16. Western blot.....	49
3.2.17. Vizuelizacija proteina u SDS-poliakrilamidnim gelovima.....	51
3.2.18. Esej imunoadsorpcije.....	51
3.2.19. Imunocitohemija .....	52
3.2.20. Imunohistohemija .....	52
3.2.21. Konfokalna mikroskopija .....	53
3.2.22. DIC mikroskopija .....	54
3.2.23. Statistička analiza .....	54
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>55</b>
4.1. Evaluacija specifičnosti antitela za detekciju proteina ANKRD2 i njegovih izoformi.....	56
4.2. Nivo ekspresije i unutarćelijska lokalizacija proteina ANKRD2 u srcu čoveka ..	62
4.2.1. Detekcija ANKRD2 i ANKRD1 u interkalirajućim diskovima kardiomiocita	64
4.3. Evaluacija kardiomiocita neonatalnih pacova kao model sistema za izučavanje proteina ANKRD2 .....	66

4.3.1. Ekspresija endogenog Ankrd2 u KMNP na proteinskom nivou.....	67
4.3.2. Lokalizacija endogenog i egzogenog Ankrd2 u kardiomiocitima neonatalnih pacova.....	68
Lokalizacija endogenog Ankrd2 u KMNP .....	68
Lokalizacija egzogenog ANKRD2 u KMNP .....	71
4.3.3. Uticaj doksorubicina na ekspresiju Ankrd2 u kardiomiocitima neonatalnih pacova.....	73
4.4. Karakterizacija izoformi proteina ANKRD2 .....	75
4.4.1. Ekspresija izoformi ANKRD2 u srcu i skeletnim mišićima čoveka .....	75
Ekspresija izoformi ANKRD2 na proteinskom nivou.....	75
Ekspresija izoformi ANKRD2 na nivou RNK .....	80
4.4.2. Unutarćelijska lokalizacija izoformi ANKRD2 u srcu i skeletnim mišićima..	84
Lokalizacija izoformi u skeletnim mišićima .....	84
Lokalizacija izoformi u srcu .....	86
4.4.3. Ekspresija izoformi ANKRD2 u mioblastima i miotubama čoveka.....	88
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>91</b>
5.1. Analiza ANKRD2 u posmrtnim tkivima čoveka .....	92
5.2. Ekspresija proteina ANKRD2 u srcu čoveka.....	93
5.2.1. MARP proteini u interkalirajućim diskovima kardiomiocita .....	94
5.3. Kardiomiociti neonatalnih pacova: adekvatan model sistem za proučavanje ANKRD2 u srcu .....	96
5.3.1. Doksorubicin različito utiče na ekspresiju Ankrd2 i Ankrd1 u kardiomiocitima neonatalnih pacova.....	99
5.4. Izoforma S-ANKRD2 najviše doprinosi opštem profilu ekspresije proteina ANKRD2 .....	100
5.5. Izoforme ANKRD2 su produkti translacije različitih iRNK.....	106
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>108</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>111</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>127</b>

1. Uvod

## 1.1. Mišićno tkivo

Mišići su organi odgovorni za održavanje i promenu položaja tela, kretanje i pokretanje unutrašnjih organa. U organizmu većine životinja i čoveka, mišićno tkivo je procentualno najzastupljenije. Izgrađeno je od visokospecijalizovanih ćelija u kojima proteinski filamenti aktina i miozina omogućavaju kontrakcije koje menjaju dužinu i oblik ćelija. Prema izgledu, strukturi, funkciji, načinu kontrakcije, tipu inervacije (da li su odgovorni za izvođenje voljnih ili nevoljnih pokreta), kontraktilne ćelije se klasifikuju u tri velike grupe- skeletne, srčane i glatke mišićne ćelije. U literaturi se pominju i mioepitelijalne ćelije, koje se nalaze u žlezdama gde svojim kontrakcijama učestvuju u lučenju hormona (Alberts et al. 2002) (Slika 1).

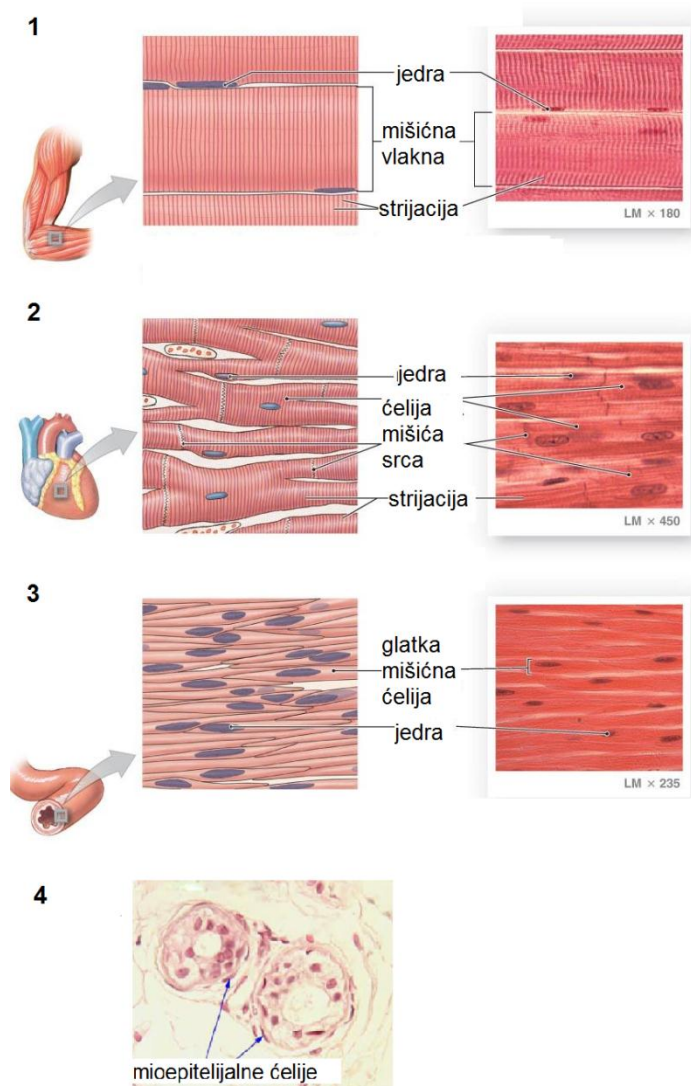
Energija neophodna za rad mišića je uglavnom obezbeđena oksidacijom masti i ugljenih hidrata, kao i anaerobnim hemijskim procesima. U ovim hemijskim reakcijama nastaje adenozin trifosfata (ATP) koji predstavlja „gorivo” za kontrakcije. Mišićne ćelije transformišu hemijsku energiju u mehanički rad i razvijaju silu neophodnu za pokretanje tela i njegovih delova, promenu veličine i oblika organa i održavanje svih vitalnih funkcija organizma.

Mišićna tkiva imaju zajedničko embrionalno poreklo od mezodermalnog sloja germinativnih ćelija embriona, i u manjoj meri od ektoderma. Na početku miogeneze, primarni mioblasti migriraju iz somita na mesta gde će nastati mišići. Najveći deo mišićnih vlakana (više od 90%) nastaje od sekundarnih mioblasta čiji je razvoj pod velikim uticajem spoljašnjih faktora i inervacije. Aktivacija različitih regulatornih faktora određuje model ekspresije seta mišićno specifičnih gena, a samim tim funkciju i morfologiju mišićnih ćelija. Za razliku od glatkih i mioepitelijalnih mišićnih ćelija, ćelije srca i skeletnih mišića imaju specifičnu organizaciju kontraktilnih jedinica koja ovim ćelijama obezbeđuje karakterističan izgled poprečne ispruganosti.

Glatke mišićne ćelije imaju vretenast oblik i uglavnom jedno centralno postavljeno jedro. Ulaze u sastav unutrašnjih organa (sistem za varenje, materica, bešika i dr.), krvnih i limfnih sudova. Glatke mišićne ćelije su vrlo često su povezane u takozvani sincicijum i tada se za njih upotrebljava naziv visceralni glatki mišići. Za

razliku od poprečno prugastih mišića, glatki mišići su sposobni za dugotrajne kontrakcije i teško se zamaraju.

Mioepitelijalne ćelije potiču od ektoderma, locirane su među epitelijalnim ćelijama i slično njima bogate su keratinima (Adriance et al. 2005). Osim u žlezdama, nalaze se i u mišiću oka (Alberts et al. 2002).



**Slika 1. Tipovi mišićnih ćelija.** 1- ćelije skeletnog mišića, 2- ćelije glatkog mišića, 3- mišićne ćelije srca, 4- mioepitelijalne ćelije. Na panelima 1, 2 i 3 levo je šematski prikaz, dok je sa desne strane uzorak tkiva bojen hematoksilinom i eozinom. Preuzeto i adaptirano sa: [oedy.dvrlists.com](http://oedy.dvrlists.com) i [jscr.oxfordjournals.org](http://jscr.oxfordjournals.org)

### 1.1.1. Poprečno prugasti mišići

Srčani i skeletni mišići spadaju u poprečno prugaste mišiće, čiji naziv potiče od prepoznatljivih poprečnih crvenih i belih linija koje su posledica strukture sarkomere.

Srčani mišić je izgrađen od radne muskulature, koja je odgovorna za kontrakcije, i sprovodne muskulature, u kojoj se generišu i sprovode impulsi do kontraktilnih vlakana. Neprestani i nevoljni pokreti kardiomiocita koji obezbeđuju pumpanje krvi su pod kontrolom autonomnog nervnog sistema. Kardiomiociti imaju po jedno ili dva centralno postavljena jedra i zvezdast oblik. Poprečna prugastost nije toliko izražena kao kod ćelija skeletnih mišića zbog prisustva velikog broja mitohondrija koje mogu zauzumiati i do 40% volumena kardiomiocita. Zbog povećane proizvodnje energije, srčani mišić je izuzetno otporan na umor, iako je opterećen konstantnim kontrakcijama. Kardiomiociti komuniciraju i povezani su kompleksnim strukturama nazvanim interkalirajući diskovi (IKD). Međucelijske veze unutar ovih struktura obezbeđuju brzo sprovođenje hemijskih i električnih signala i širenje akcionog potencijala, zbog čega se srčani mišić često opisuje i kao fiziološki sincicijum.

Skeletni mišići, zajedno sa skeletom čine sistem organa za kretanje. Oni obezbeđuju pokretanje čitavog tela i odgovorni su za izvođenje voljnih pokreta. Ćelije skeletnih mišića su višejedarne i grupisane u snopove. Sarkomere zauzimaju najveći deo citoplazme, tako da su jedra i ostale organele potisnute ka membrani. Pojedinačna mišićna vlakna skeletnih mišića mogu ispoljavati dva osnovna fenotipa. Mišićna vlakna tipa I ili spora mišićna vlakna su bogata mitohondrijama. Spori mišići su veoma prokrvljeni, zbog čega imaju karakterističnu crvenu boju. Ova vlakna omogućavaju dugotrajne kontrakcije male snage. Energiju za kontrakcije obezbeđuju sagorevanjem masti, proteina i ugljenih hidrata uz veliku potrošnju kiseonika (Scott et al. 2001). Brza mišićna vlakna ili vlakna tipa II obezbeđuju brze i snažne kontrakcije, ali se brzo zamaraju. Razlikuju se po brzini kontrakcija i snazi, kao i po izvoru energije koji koriste (tipovi IIa, b i x) (Scott et al. 2001). Brza mišićna vlakna najčešće koriste anaerobne izvore energije koji se brzo troše, pa se koriste u aktivnostima za koje je potrebna snaga (McKoy et al. 1998).

Značajna karakteristika skeletnih mišićnih ćelija je njihova „plastičnost“, odnosno sposobnost adaptacije i remodelovanja, kojima se obezbeđuje adekvatan odgovor na fiziološke zadatke. Jedan od primera je promena fenotipa, tj. prelaz iz jednog tipa mišićnog vlakna u drugi, pri čemu se menja sastav kontraktilnih proteina i metaboličkih enzima (zbog promene izvora energije) (Smerdu and Erzen 2001).

## 1.2. Sarkomera

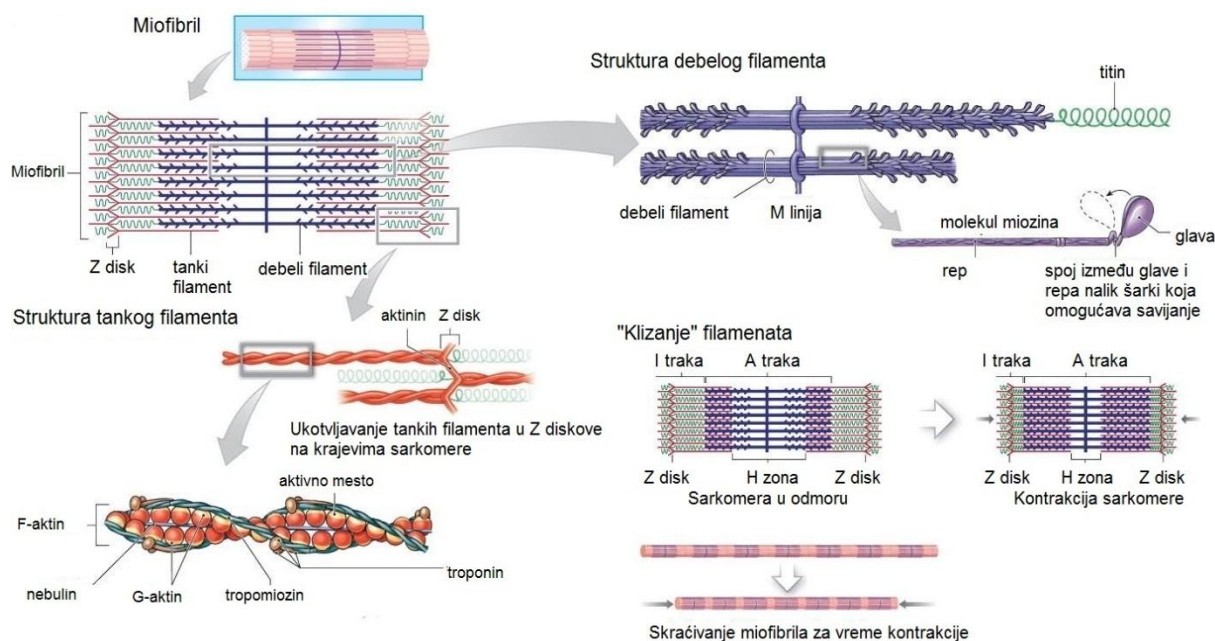
Visok stepen organizacije poprečno prugastih mišića je preduslov za kontrakcije srca i skeletnih mišića. Grupa proteina koji se svrstavaju u proteine sarkomernog citoskeleta je neophodna za ovakvu organizaciju zbog kombinovanja specifičnih mehaničkih, arhitektonskih i signalnih funkcija (Gautel and Djinović-Carugo 2016). Sarkomera predstavlja osnovnu strukturnu i funkcionalnu jedinicu miofibrila koji čine kontraktilnu mašineriju mišića. Karakteristična ispruganost miofibrila koja je lako uočljiva na svetlosnom mikroskopu je posledica bočnog spajanja sarkomera u kojima se smenjuju svetliji i tamniji regioni (Clark et al. 2002). Ovi regioni odražavaju organizaciju sistema filamenata u sarkomeri. Detaljna struktura sarkomere je utvrđena elektronskom mikroskopijom. Tamniji region se označava kao A traka sarkomere, jer je pod polarizovanim svetlom anizotropan. U središnjem delu A trake primetna je svetlija zona poznata kao H pruga. Svetliji regioni sarkomere su siromašniji proteinima i nazivaju se I trakama zato što pokazuju izotropne karakteristike. U središtu I traka se nalaze Z diskovi koji se uočavaju kao tamnije trake (Slika 2) (Clark et al. 2002).

U regionu I trake su prevashodno lokalizovani tanki filamenti aktina, dok se u A traci ovi filamenti preklapaju sa debelim miozinskim filamentima. U H zoni nisu prisutni aktinski filamenti i zato je ovaj region svetliji. U M liniji, koja se nalazi u centru H zone, se preklapaju karboksi-krajevi antiparalelnih titinskih i debelih miozinskih filamenata (Clark et al. 2002). U M liniji se uglavnom nalazi protein miomezin. Pojedinačne sarkomere su oivičene Z diskovima koji se nalaze u sredini I traka, i u njima su ukotvljeni filamenti aktina (Slika 2).





Tanki aktinski filamenti imaju strukturu heliksa oko kojeg su spiralno postavljeni proteini tropomiozin i troponin. Tropomiozin preklapa mesta na molekulu aktina za koja se vezuje miozin, a njegovo izmeštanje omogućava kontrakciju. Do pomeranja tropomiozina dolazi usled vezivanja jona kalcijuma za subjedinicu troponina koja interaguje sa tropomiozinom, pri čemu dolazi do strukturne promene u tropomiozinu. Druge dve subjedinice troponina učestvuju u kontrakciji. U sastav tankih filamenata ulazi i protein nebulin. Debeli filamenti izgrađeni su od miozina koji se sastoji od „repića“ i regiona glave. Globularne glave se vezuju za aktinske filamente i omogućavaju „klizanje“ miozina duž njih. Na taj način se sarkomera skraćuje, odnosno kontrahuje (Slika 3). Pored aktinskih i miozinskih filamenata, kod kičmenjaka je prisutan i treći sistem u čiji sastav ulazi gigantski protein titin (Gautel et al. 1999).



**Slika 3. Šematski prikaz sarkomere, tankih i debelih filamenata i skraćivanja filamenata u procesu kontrakcije.** Preuzeto i prilagođeno sa: [www2.highlands.edu](http://www2.highlands.edu)

U Z disku su usidreni aktinski filamenti. U obilju proteina koji su lokalizovani u ovoj strukturi, izdvajaju se  $\alpha$ -aktinin, CapZ, titin i nebulin/nebulet (Knöll et al. 2002). Z disk povezuje sarkomeru sa membranom mišićne ćelije, sarkolemom (Pardo et al. 1983; Lyon et al. 2015).

Pored proteina koji su odavno opisani kao strukturne i funkcionalne komponente sarkomere, u poslednjih dvadesetak godina identifikovani su proteini koji osim strukturne, imaju i regulatornu ulogu i/ili učestvuju u signalnim putevima. Među njima su teletonin/T-cap, miotilin, obskurin, miopaladin, FATZ (eng. *Filamin, Actinin and Telethonin binding proteins of the Z-disk*), miozenin i ZASP (eng. *Z-band Alternatively Spliced PDZ motif Proteins*)/ cypher/ oracle/ LDB3 (eng. *PDZ LIM domain binding 3*) (Faulkner et al. 2001; Clark et al. 2002). S obzirom da je veliki broj proteina uključen u organizaciju sarkomere, nije iznenađujuće da su mutacije u genima koji ih kodiraju povezane sa desetinama oboljenja mišića (Laing and Nowak 2005).

### 1.2.1. Mehanosenzorni kompleksi sarkomere

Mišićne ćelije obezbeđuju odgovor na mehaničke signale. Detekcija signala i naknadno stvaranje i prenos sile je kompleksan proces. Veliki broj proteina je uključen u prenos mehaničkog signala i proces mehanotransdukcije. Iako ključnu poziciju u ovom procesu zauzima sarkomera sa svojim signalnim kompleksima, bitnu ulogu imaju i sarkolema, kao i interkalirajući diskovi u srcu (Lyon et al. 2015; Gautel and Djinić-Carugo 2016).

Multiproteinski kompleksi za mehanotransdukciju tzv. signalozomi su lokalizovani u tri regiona sarkomere (u Z disku, I traci i M liniji) i pozicionirani su duž molekula titina (Slika 4) (Miller et al. 2003; Granzier and Labeit 2004; Linke 2008). Titin i proteaza kalpain 3 su lokalizovani u svim signalozomima. Proteini koji interaguju sa titinom i kalpainom 3 mogu da imaju i strukturnu i regulatornu ulogu.

Titin, najveći protein sisara (maksimalna molekulska težina od 4,2 MDa) (Bang et al. 2001), se smatra važnim regulatornim čvorom koji povezuje i koordiniše različite

signalne puteve (Krüger and Linke 2011). Amino-kraj titina je ukotvljen u Z disku, dok se nizvodno nalazi region sa osobinama molekulske opruge koji se savija tokom kontrakcije (Improta et al. 1996). Elementi opruge, tj. elastični regioni se sastoje od dva različita motiva: tandemski motivi nalik imunoglobulinima i PEVK domen. Ovi motivi su razdvojeni N2A ili N2B elementom koji je karakterističan za izoformu titina eksprimiranu u srcu (Miller et al. 2003; Granzier and Labeit 2005, 2006). Izduživanje sarkomere počinje odvijanjem domena nalik imunoglobulinima, koje prati naknadno istežanje PEVK domena. Glavna uloga titina u poprečno prugastim mišićima je da obezbedi elastičnost sarkomere da bi se očuvala prostorna i vremenska organizacija kontraktilnih filamenata (Tskhovrebova and Trinick 2003).

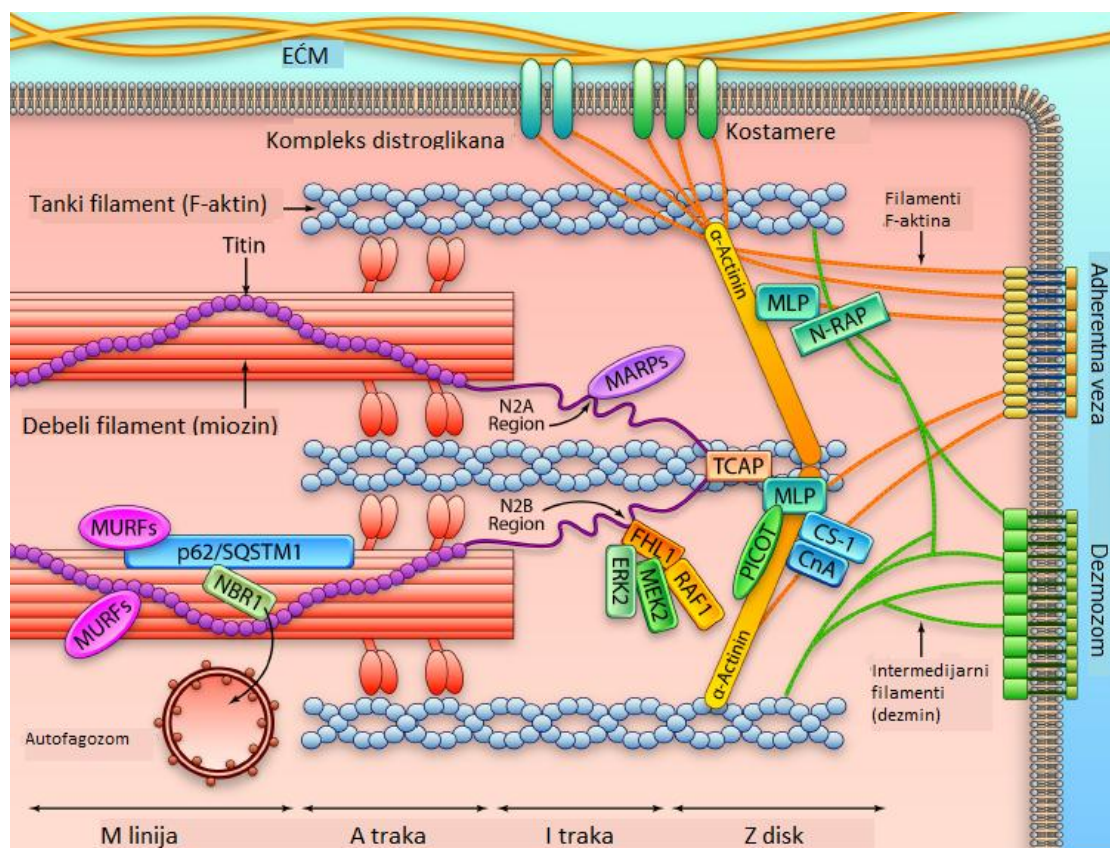
Kalpain 3 (ili p94), je cistein proteaza zavisna od kalcijuma (Sorimachi et al. 1989). Aktivira se auto-proteolitičkim uklanjanjem propeptida sa aktivnog mesta (Sorimachi et al. 1995), ali je inaktivan kada je vezan za titin (Ono et al. 2006). U jednom od funkcionalnih regiona se nalaze tri autolitička mesta (Kinbara et al. 1998), dok se u drugom nalaze signal za lokalizaciju u jedro i mesto interakcije sa titinom (Sorimachi et al. 1997). Substrati proteaze kalpain 3 su strukturni proteini (Guyon et al. 2003; Taveau et al. 2003), proteini uključeni u ćelijski metabolizam (Cohen et al. 2006; Ono et al. 2007; Kramerova et al. 2008) i regulaciju ekspresije gena i proteina (Richard et al. 1995; Baghdiguian et al. 1999; Ono et al. 2007).

#### *Mehanosenzorni kompleks Z diska*

Pored titina i kalpaina 3, u signalozomu Z diska se nalaze proteini teletonin/T-cap, mišićni LIM proteini (MLP), kao i protein ZASP (Knöll et al. 2002; Martinelli et al. 2014).

Teletonin/T-cap povezuje titin za Z diskom tako što interaguje sa domenima nalik imunoglobulinu na amino-kraju titina i omogućava vezivanje dva filamenata titina u izuzetno stabilan kompleks (Gregorio et al. 1998; Mues et al. 1998; Lee et al. 2006; Zou et al. 2006). Kroz interakciju sa MLP, teletonin je uključen u detekciju mehaničkog

istezanja (Knöll et al. 2002), a pokazano je da mutacije u genu za teletonin dovode do ozbiljnih poremećaja u srcu sisara (Knöll et al. 2011).



**Slika 4. Šematski prikaz specifičnih proteinskih kompleksa sarkomere uključenih u mehanotransdukciju.** Na slici su naznačeni proteini koji ulaze u sastav signalnih kompleksa Z diska, kao i I i M trake. CnA-calcineurin 2, CS-1-calsarcin-1, EĆM-ekstraćelijski matiks, ERK2-extracellular-regulated kinase-2, FHL1-four-and-a-half LIM domain proteins, MARPs-muscle ankyrin repeat proteins, MEK-mitogen activated protein kinase-2, MLP-muscle LIM proteins, MURF2-muscle-specific RING finger 2, NBR1-neighbor of BRCA1 gene-1, N-RAP-nebulin-related anchoring protein, p62/SQSTM1-p62/sequestosome-1, PICOT-protein kinase C-interacting cousin of thioredoxin, RAF-rapid accelerated fibrosarcoma-1, TCAP-titin Cap. Preuzeto i adaptirano iz Lyon et al. 2015.

MLP ima strukturnu ulogu u održavanju normalnog mišićnog fenotipa, a uključen je i u oporavak mišića posle povrede (Barash et al. 2005). Ključan je za povezivanje kalcineurina sa Z diskom (Heineke et al. 2005). Kalcineurin je uključen u

regulaciju ekspresije gena karakterističnih za tip mišićnog vlakna (Chin et al. 1998), i zajedno sa MLP utiče na ekspresiju teškog lanca miozina u sporim vlaknima (da Costa et al. 2007).

Protein ZASP učestvuje u mehanizmima održavanja integriteta Z diska (Faulkner et al. 1999). Zbog LIM domena koji omogućavaju protein-protein interakcije, ZASP je uključen i u regulaciju ekspresije gena, ćelijsku adheziju i pokretljivost, kao i u signalnu transdukciju (Martinelli et al. 2014).

### *Mehanosenzorni kompleks M linije*

U M liniji sarkomere se preklapaju karboksi-krajevi titina u kojima se nalaze katalitički kinazni domeni (Mayans et al. 1998). U ovom regionu, osim sa proteazom kalpain 3 (Kinbara et al. 1997), titin interaguje i sa proteinima familije MuRF (eng. *Muscle-specific RING Finger proteins*) (Centner et al. 2001; Pizon et al. 2002; Witt et al. 2005). MuRF1 i MuRF2, pod dejstvom signala stresa, prelaze u jedro gde interakcijom sa SRF (eng. *serum response factor*) utiču na represiju transkripcije (Lange et al. 2005). Titin kinaza, osim kinazne aktivnosti, reguliše transkripciju u odgovoru na mehaničke signale (Lange et al. 2005) i ima važnu ulogu u adaptaciji mišićne ćelije na stres (Puchner et al. 2008). Za aktivno mesto ovog enzima se može vezati i protein NBR1 (eng. *neighbor of BRCA1 gene-1*) koji targetuje ubikvitin-asocirani protein p62/SQSTM1 u sarkomeru. p62/SQSTM1 interaguje sa ubikvitin ligazom MuRF2 čija je translokacija u jedro indukovana mehaničkom neaktivnošću (Lange et al. 2005) (Slika 4).

### **1.2.2. Mehanosenzorni kompleks I trake**

Ankrd2, predmet ove teze, i drugi proteini familije MARP (eng. *Muscle Ankyrin Repeat Protein*) su komponenta signalozoma I trake koji će detaljno biti opisan u ovom poglavlju.

Za organizaciju mehanosenzornog kompleksa I trake ključni su regioni titina N2A i N2B, koji imaju strukturu nalik na oprugu. MARP proteini preko ankirinskih ponovaka interaguju sa N2A, na pozicijama I80/I81 (Miller et al. 2003) (Slika 4). Smatra se da povezuju detekciju stresa sa promenama u ekspresiji mišićnih gena, s obzirom da se pod uticajem mehaničkog stresa translociraju u jedro i regulišu transkripciju ciljnih gena (Miller et al. 2003). Za isti region ali na pozicijama I82/I83, se vezuje mišićna proteaza kalpain 3 (Ojima et al. 2005). Pošto je prisutna i u drugim signalnim kompleksima sarkomere, njena moguća uloga je da učestvuje u koordinaciji prenosa signala sa različitih delova sarkomere. Značaj ovog signalozoma je demonstriran na primeru mdm (eng. *muscular dystrophy with myositis*) miševa koji predstavljaju model sistem tibijalne mišićne distrofije čoveka. Mišićna distrofija je kod ovih miševa izazvana recesivnom mutacijom u genu za titin (Garvey et al. 2002), koja za posledicu ima ekspresiju forme titina kome nedostaju 83 ak unutar N2A regiona gde se nalazi mesto vezivanja kalpaina 3. Homozigotni mdm miševi ispoljavaju tešku i izrazito progresivnu mišićnu distrofiju koja dovodi do smrti jedinki par meseci posle rođenja (Garvey et al. 2002; Witt et al. 2004). Zanimljivo je da su u skeletnim mišićima mdm miševa MARP proteini više eksprimirani u poređenju sa „wild type“ (Witt et al. 2004).

U srcu je za formiranje mehanosenzornog kompleksa u ovom delu sarkomere odgovoran region titina u kome se nalazi jedinstvena N2-Bus sekvenca za koju se vezuju transkripcioni ko-aktivatori FHL1 i FHL2 (eng. *four-and-a half LIM domain proteins*) (Slika 4). Slično proteinima MARP familije, FHL1 i FHL2 se mogu relokalizovati iz sarkomere u jedro (Lange et al. 2002; Sheikh et al. 2008). FHL1 formira kompleks sa članovima familije kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK, eng. *mitogen activated protein kinase*) MEK1/2 i njihovim aktivatorima Raf-1 i ERK2 (Sheikh et al. 2008), a FHL2 interaguje sa regionom titina Mis2 koji je lokalizovan u M liniji (Lange et al. 2002).



### 1.3. Mišićni proteini sa ankirinskim ponovcima - MARP proteini

Mišićna ćelija predstavlja kompleksan sistem koji se odlikuje intenzivnim metabolizmom i vrlo dinamičnom transdukcijom signala i odgovorom na različite stimulse (Tee and Peppelenbosch 2010). Odgovor mišićne ćelije na konstantan mehanički stres je omogućen izuzetnom komunikacijom između proteina od kojih su neki odgovorni za prenos signala od mehanosenzornih kompleksa sarkomere do jedra.

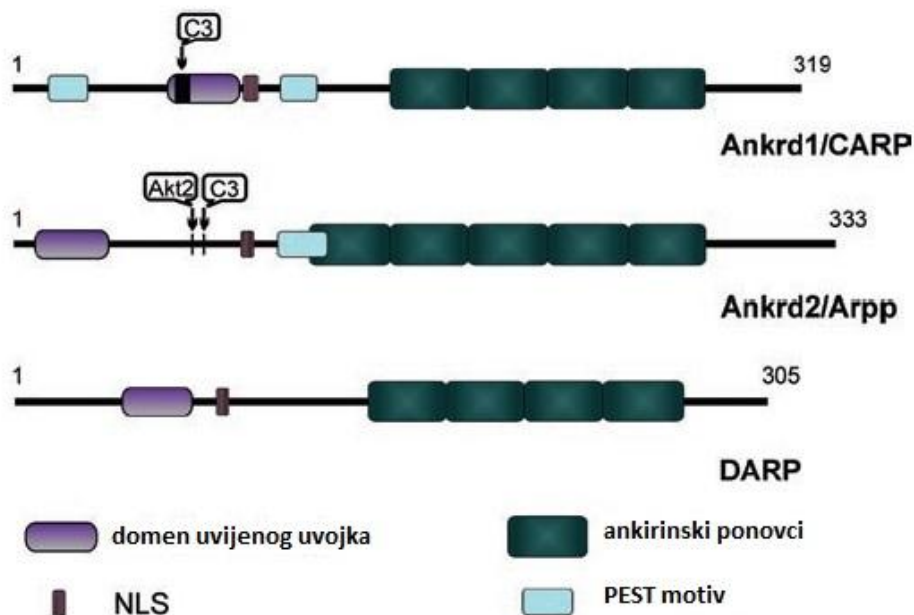
Među proteinima koji se transportuju između ćelijskih odeljaka i omogućavaju prenos signala iz citoplazme u jedro, posebno mesto imaju članovi proteinske familije MARP. U Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo se već duži niz godina izučavaju članovi familije MARP, proteini Ankrd1 i Ankrd2. Pretpostavlja se da oni prenose mehaničke signale od I trake sarkomere do jedra na osnovu toga što mehanički stres menja njihovu ekspresiju, i što deluju kao transkripcioni regulatori u jedru (Jeyaseelan et al. 1997; Pallavicini et al. 2001; Zolk et al. 2002; Kojic et al. 2004; Tsukamoto et al. 2008). Njihova lokalizacija je podložna promenama u fiziološkim uslovima kao što je diferencijacija mišićne ćelije (Baumeister et al. 1997; Bean et al. 2008). U tom procesu Ankrd1 i Ankrd2 učestvuju u regulaciji transkripcije gena uključenih u diferencijaciju i nizvodne su mete miogenih regulatornih faktora (Blais et al. 2005). Takođe, ovi proteini mogu da se transportuju u jedro i u uslovima fizičkog ili hemijskog stresa kada regulišu ekspresiju gena koji učestvuju u odgovoru na stimulus (Chu et al. 1995; Tsukamoto et al. 2008; Kojic et al. 2011).

Identifikovana su i okarakterisana tri člana familije MARP: Ankrd1/CARP/MARP1 (Ankyrin repeat domain 1/ Cardiac ankyrin repeat protein/ Cardiac adriamycin responsive protein/ Muscle ankyrin repeat protein 1) (Chu et al. 1995; Baumeister et al. 1997; Jeyaseelan et al. 1997; Kuo et al. 1999), Ankrd2/Arpp/MARP2 (Ankyrin repeat domain protein 2/ Ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region/ Muscle ankyrin repeat protein 2) (Kemp et al. 2000; Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001) i DARP/MARP3 (Diabetes-related ankyrin repeat protein/ Muscle ankyrin repeat protein 3) (Ikeda et al. 2003).



Ova tri proteina su vrlo homologna kada se porede njihove primarne sekvence i struktura proteina. *In silico* analizom sekvenci identifikovano je nekoliko zajedničkih funkcionalnih domena proteina MARP familije: tandemski ankirinski ponovci, domen uvijenog uvojka (eng. *coiled-coil domain*), PEST sekvenca i signal za lokalizaciju u jedro (eng. *nuclear localization signal* - NLS). Na Slici 5 su obeležene pozicije ovih domena na šematskom prikazu MARP proteina.

Ankirinski ponovci su jedan od najčešćih motiva u proteinima, bez obzira na njihovu funkciju i odgovorni su za ostvarivanje protein-protein interakcija. Struktura im je evolutivno vrlo očuvana pa se nalaze u proteinima kako prokariota tako i eukariota. Ankirinski ponovci se sastoje od 33 aminokiseline i njihov broj može biti različit (Mosavi et al. 2004). Kod proteina MARP familije iznosi 4 ili 5, u zavisnosti od korišćenog programa za predikciju (Kojic et al. 2011). U regionu sa ankirinskim ponovcima proteina Ankrd1 i Ankrd2 nalaze se vezivna mesta za proteine sarkomere kao što su titin (Miller et al. 2003), kalsekvestrin-2 (Torrado et al. 2005) i teletonin/T-cap (Belgrano et al. 2011).



**Slika 5. Šematski prikaz strukture MARP proteina i glavnih funkcionalnih domena.** Akt2- mesto fosforilacije Akt2 kinazom. C3- mesto sečenja proteazom kalpain 3. Preuzeto i prilagođeno iz Kojic et al. 2011.

Uvijeni uvojci su strukturni motivi koji, pored toga što slično ankirinskim ponovcima omogućavaju protein-protein interakcije, posreduju i u oligomerizaciji proteina. Čine ih  $\alpha$ -heliksi koji se međusobno uvijaju u superuvojnicu, po čemu su i dobili naziv (Burkhard et al. 2001). Kao što je prikazano na Slici 5, domen uvijenog uvojka se nalazi na amino-kraju proteina MARP familije. Ovi domeni su odgovorni za formiranje homodimera (Kojic et al. 2004; Torrado et al. 2004; Witt et al. 2005; Torrado et al. 2008), a nedavno je pokazano da svi MARP proteini međusobno formiraju i heterodimere, i to u antiparalelnoj konformaciji (Lun et al. 2014).

PEST sekvence su dobile naziv po aminokiselinama koje ulaze u sastav ovih domena: prolin (P), glutaminska kiselina (E), serin (S) i treonin (T) (Rogers et al. 1986). Imaju funkciju signala za degradaciju proteina i prisutne su kod kratkoživećih proteina koji podležu brzom proteolitičkoj degradaciji. Neke PEST sekvence mogu biti konstitutivni proteolitički signali, dok mnoge predstavljaju kondicione signale koji se aktiviraju na različite načine (Rechsteiner and Rogers 1996). U proteinu ANKRD1 su predviđene dve PEST sekvence, dok je u ANKRD2 predviđena jedna (Kojić 2002; Lun et al. 2014). PEST motivi doprinose nestabilnosti proteina (Rechsteiner and Rogers 1996) pa je razumljivo da mutacije ili delecije u kodirajućem regionu *Ankrd1* dovode do povećanja stabilnosti proteina (Badi et al. 2009).

Signali za lokalizaciju u jedro su prisutni kod svih članova MARP familije. Oni predstavljaju aminokiselinske sekvence koje učestvuju u transportu proteina iz citoplazme u jedro. Ovi domeni su bogati aminokiselinama lizinom (K) ili argininom (R) i mogu biti jednodelni ili dvodelni, u kom slučaju se sastoje od dva razdvojena niza (Dingwall and Laskey 1991).

Uprkos sličnoj modularnoj strukturi i generalnoj ekspresiji u poprečno prugastim mišićima, proteini MARP familije se međusobno razlikuju po tkivno-specifičnim obrascima ekspresije. Protein *Ankrd1* se najviše eksprimira u miokardu (Zou et al. 1997; Ishiguro et al. 2002), i neznatno u skeletnim mišićima (Baumeister et al. 1997; Jeyaseelan et al. 1997; Zou et al. 1997). Međutim, njegova ekspresija može biti stimulirana denervacijom, ekscentričnim kontrakcijama ili intenzivnom fizičkom aktivnošću u skeletnim mišićima (Chen et al. 2002; Tsukamoto et al. 2002; Barash et al.

2004), kao i tokom hipertrofije i oštećenja miokarda (Aihara et al. 2000a; Mikhailov and Torrado 2008). Promenjena ekspresija ANKRD1 je povezana i sa patološkim stanjima mišića kao što su spinalna mišićna atrofija (Nakada et al. 2003a), Dišenova i kongenitalna mišićna distrofija (Nakada et al. 2003b) i amiotrofična lateralna skleroza (Nakamura et al. 2002).

Protein Ankrd2 je prevashodno eksprimiran u skeletnim mišićima i u manjoj meri u nekim delovima srca (Kemp et al. 2000; Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). Njegova ekspresija zavisi i od različitih stimulusa i uslova, što će biti detaljnije opisano u narednim odeljcima. Ekspresija proteina Ankrd2 je takođe detektovana u bubregu (Kemp et al. 2000; Pallavicini et al. 2001) i mrkom masnom tkivu (Rakicevic et al. 2011), u kome se eksprimira i treći član familije- protein DARP. Ekspresija Ankrd2 i DARP u mrkom masnom tkivu ide u prilog hipotezi o zajedničkom poreklu ovog i poprečno prugastog mišićnog tkiva (Atit et al. 2006; Seale et al. 2008). DARP je ravnomerno distribuiran između skeletnih mišića i srca (Ikeda et al. 2003). Uključen je u energetske metabolizam ćelije jer je njegova ekspresija povišena kod životinja rezistentnih na insulin, kao i u pacijenata sa dijabetesom tipa 2 (Ikeda et al. 2003).

Zanimljivo je da utišavanje ekspresije proteina MARP familije kod miša nema vidljive fenotipske posledice jer se proteini MARP familije najverovatnije međusobno funkcionalno dopunjuju. Međutim, u mišićima miševa koji ne eksprimiraju nijedan od ovih proteina uočen je veći broj sporih vlakana, kontraktilni fibrili su opušteniji i dužina sarkomere u odmoru je veća (Barash et al. 2007). Poslednja dva parametra direktno zavise od izoforme titina koja je eksprimirana, pa je moguće da MARP proteini regulišu ekspresiju titina i posredno utiču na integritet sarkomere. Nedavno je utvrđeno da MARP proteini vezivanjem za N2A region titina inhibiraju njegovu fosforilaciju od strane protein kinaze zavisne od cAMP (PKA). Odsustvo MARP proteina rezultira hiperfosforilacijom titina kinazom PKA pri čemu se povećava opuštenost mišića usled smanjene ukočenosti titina (Lun et al. 2014). U mišiću srca miševa koji ne eksprimiraju ni jedan od MARP proteina nisu uočene anomalije u razvoju srca ili njegovoj funkciji, ni u bazalnim uslovima, niti u odgovoru na mehanički stres (Bang et al. 2014). Međutim, kod miševa koji ne eksprimiraju Ankrd1, površinske rane na koži teže

zarastaju i predeo rane je izrazito nekrotičan u odnosu na *wild type* miševе (Samaras et al. 2015).

#### 1.4. Protein Ankrd2

Kemp i saradnici su otkrili Ankrd2 miša tokom izučavanja proteina koji učestvuje u procesu hipertrofije mišića. Njegova količina je bila značajno povećana u mišićima izloženim pasivnom istezanju. Prepoznali su ga kao homologa humanog proteina sa ankirinskim ponovcima ANKRD1 i po tome ga nazvali Ankrd2 (Kemp et al. 2000). Grupa iz Japana je nešto kasnije identifikovala Ankrd2 u toku istraživanja vezanih za karakterizaciju tumor supresora p53. Pretraživanjem cDNK biblioteke ćelija tumora jednjaka čoveka koristeći antitelo na hipotetički protein kodiran nekodirajućim lancem iRNK za p53, identifikovan je protein koji je, zbog strukturnih karakteristika, nazvan Arpp (eng. *Ankyrin Repeat, PEST sequence, Proline-rich*) (Moriyama et al. 2001). U isto vreme je, pretraživanjem biblioteke EST (eng. *expressed sequence tags*) specifično eksprimiranih u mišićnom tkivu čoveka (Lanfranchi et al. 1996), identifikovan protein ANKRD2 (Pallavicini et al. 2001).

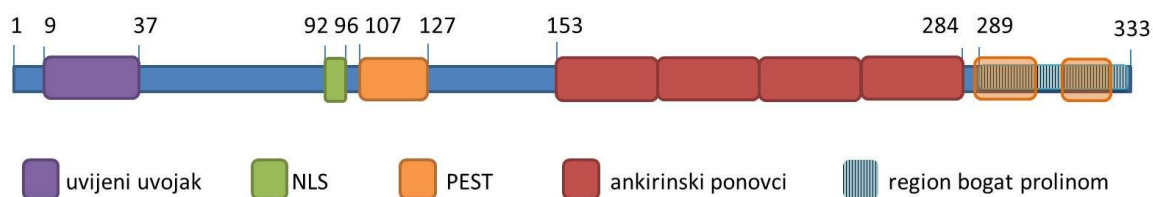
##### 1.4.1. Strukturne karakteristike proteina Ankrd2

ANKRD2 se sastoji od 333 aminokiselina (ak) i ima molekulska masu od 37,150 kDa (Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001). Pokazuje 52,7% identičnosti sa proteinom ANKRD1 (Pallavicini et al. 2001). Takođe je utvrđen visok stepen sličnosti (89%) sa mišjim homologom Ankrd2 (Moriyama et al. 2001). U proteinu ANKRD2, čija je struktura šematski predstavljena na Slici 6, su prisutni različiti funkcionalni domeni:

- Signal za lokalizaciju u jedro (NLS) na poziciji 92-96 ak (RKKRK) (Kojić 2002; Kojic et al. 2011)
- Tandemski organizovana 4 ankirinska ponovka na pozicijama 153-185, 186-218, 219-251 i 252-284 ak (Moriyama et al. 2001; Kojić 2002)

- Jedna jača PEST sekvenca na poziciji 107-127 ak (Moriyama et al. 2001) i dve slabije PEST sekvence na pozicijama 287-301 i 313-324 ak (Kojić 2002)
- Domen uvijenog uvojka (9-37 ak)
- Višestruka potencijalna mesta za fosforilaciju različitim kinazama kao što su c-AMP zavisna kinaza, kazein kinaza II, kalmodulin zavisna protein kinaza II, cGMP zavisna kinaza i protein kinaza C (Pallavicini et al. 2001)
- Prolinom bogat region na karboksi-kraju proteina koji sadrži nekoliko sekvenci za fosforilaciju (Moriyama et al. 2001).

Gen *ANKRD2* se nalazi na dugom kraku hromozoma 10, na poziciji 10q23.31-23.32 i prostire se na oko 12 kb. Transkript ima dužinu od 1451 nukleotida i otvoren okvir čitanja od 999 bp za kraću izoformu (S-ANKRD2), odnosno 1080 bp za dužu izoformu (M-ANKRD2). Gen *ANKRD2* ima 9 egzona od kojih egzoni 5, 6, 7 i 8 kodiraju po jedan ankirinski ponovak. U 280 nukletioda dugom fragmentu 5' regiona uzvodno od mesta inicijacije transkripcije nalazi se nekoliko mesta vezivanja različitih transkripcionih faktora (Pallavicini et al. 2001). Zanimljivo je da je i *Ankrd2* miša vrlo slično organizovan, sa transkriptom od 1101 bp i otvorenim okvirom čitanja od 996 bp (Pallavicini et al. 2001).



**Slika 6. Strukturna organizacija proteina ANKRD2.** Na slici su prikazani funkcionalni domeni: ankirinski ponovci i domen uvijenog uvojka odgovorni za protein-protein interakcije, signal za lokalizaciju u jedro (NLS), PEST sekvence koje funkcionišu kao signali za brzu degradaciju proteina (naznačene su i dve potencijalne PEST sekvence) i region bogat prolinom. Brojevi na slici predstavljaju pozicije aminokiselina.

### 1.4.2. Izoforme proteina ANKRD2

U proteinskim bazama podataka (Tabela 1) prijavljeno je nekoliko izoformi ANKRD2, ali su eksperimentalno izučavane dve. Većina informacija o proteinu ANKRD2 je dostupna iz objavljenih radova u kojima su prikazani rezultati dobijeni analizom izoforme od 333 ak (UniProtKB: A0A0A0MRN9; GenBank: CAC19412.1; ENSEMBL: ANKRD2-001), u ovoj tezi nazvanoj S-ANKRD2. U bazi NCBI je kao kanonska navedena duža izoforma od 360 ak, u ovoj tezi označena kao M-ANKRD2 (UniProtKB/Swiss-Prot: Q9GZV1.3; ENSEMBL: ANKRD2-202; NCBI Reference Sequence: NP\_065082.2, isoform a). M-ANKRD2 izoforma je korišćena samo u eksperimentima homo- i heterodimerizacije ANKRD2 sa drugim proteinima MARP familije, i nazvana je srčanom izoformom (Lun et al. 2014). S- i M-ANKRD2 se razlikuju u 27 ak na amino-kraju proteina. U bazi ENSEMBL takođe su navedene još dve hipotetičke izoforme koje bi mogle nastati kao rezultat alternativnog iskrajanja egzona 7 *ANKRD2* (Tabela 1). Sekvenciranje iRNK iz tkiva srca i skeletnih mišića odraslog čoveka (Martinelli et al. 2014) nije dalo eksperimentalni dokaz alternativnog iskrajanja na osnovu čega je zaključeno da se ove dve izoforme ne eksprimiraju u humanom tkivu, bar ne u fiziološkim uslovima. Prvi put su izoforme proteina ANKRD2 pomenute u radu Miller i saradnika, koji su ukazali na mogućnost postojanja tri izoforme (2003). Protein kojem je na osnovu migracije u denaturišućem poliakrilamidnom gelu određena molekulska masa od 37,5 kDa odgovara izoformi S-ANKRD2 od 333 ak.

**Tabela 1. Izoforme proteina ANKRD2 registrovane u bazama podataka ENSEMBL i NCBI.**

Naziv izoforme ENSEMBL	Naziv izoforme NCBI	Dužina transkripta (bp) ENSEMBL	Dužina aminokiselinske sekvence (ak)
ANKRD2-202	NP_065082.2, isoform a	1449	360
ANKRD2-201	NP_001123453.1, isoform b	1350	327
ANKRD2-001	CAC19412.1	1451	333
ANKRD2-002	/	1072	300
/	NP_001278147.1, isoform c	/	446

```

GGCTGGAGCCTGCAG CCAGCAGTTCCTTTI TGCAACTCAGTTGCC TTGGCTAAGGCCCAA CCAGTCCCAAGTGCT
G W S M Q P A V P F C N S V A L A K A Q P V P S A
CAGGACAGAGGCTGG ACGGGCTCCTTCCTG CACCCCTGCTCTTGG GACACAGTGCCTCC GGCTCTAATAGGCCA
Q D R G W T G S F L H P C S W D T V P S G S N R P
GGAGITGGGGGGCA ACTGGCTCTGCTCCC TGGCCCTGGCTCCCC CTGCTCCCTGGGGCT GCCCGAGGTGAAGGT
G V G G A T G S A P W P W L P L L P G A A R G E G
GACAGTGGGGGAGG CAGGTGGAGAATGG GCCAGTGACTCATG GCAAGGGCGCCAGC TGGCAGGGGTGGGT
D R W G R Q V E N W A S E L M A K A P S W A G V G
GCTCTGGCCTATAAA GCCCCCGAGGCCCTG TGGCCTGCAGAGGCG GTTATGSACGGCACC ATGGAGGACTCCGAG
A L A Y K A P E A L W P A E A V M D G T M E D S E
CGGTGCAGAGGGCC ACAGCGCTCATCGAG CAGCGGCTGGCACAG GAGGAGGAGAATGAG AAACCTCCGAGGAGAC
A V Q R A T A L I E Q R L A Q E E E N E K L R G D
GCACGCCAGAAGCTG CCGATGGACTTGCTG GTGCTGGAGGATGAG AAGCACCACGGGGCT CAGAGTGCAGCCCTG
A R Q K L P M D L L V L E D E K H H G A Q S A A L
CAGAAGGTGAAGGGC CAAGAGCGCGTGGC AAGACGTCCCTGGAC CTGCGCGGGGAGATC ATCGATGTGGCGGG
Q K V K G Q E R V R K T S L D L R R E I I D V G G
ATCCAGAACCCTATC GAGCTGCGGAAGAAA CGCAAGCAGAAGAAG CGGGACGCTCTGGCC GCCTCGCATGAGCCG
I Q N L I E L R K K R K Q K K R D A L A A S H E P
CCCCAGAGCCCGAG GAGATCATTGGCCCT GTGGATGAGGAGACC TTCCTGAAAGCTGCG GTGGAGGGGAAAATG
P P E P E E I T G P V D E E T F L K A A V E G K M
AAGGTCATTGAGAAG TTCCTGGCTGACGGG GGGTCAGCCGACACG TCGACCCAGTTCCGT CGGACAGCACTGCAC
K V I E K F L A D G G S A D T C D Q F R R T A L H
CGAGTTCCTGGAA GGCCACATGGAAATC CTGGAGAAGCTTCTA GATAATGGGGCCACT GTGGACTTCCAGGAT
R A S L E G H M E I L E K L L D N G A T V D F Q D
CGGCTGGACTGCACA GCCATGCATTGGGCC TGCCCGGGGGGCCAC TTAGAGGTGGTAAA CTTCTGCAAAGCCAT
R L D C T A M H W A C R G G H L E V V K L L Q S H
GGAGCAGACACCAAT GTGAGGATAAGCTG CTGAGCACCCCGCTG CACGTGGCAGTCCGG ACAGGGCAGGTGGAG
G A D T N V R D K L L S T P L H V A V R T G Q V E
ATTGTGGAGCATTI CTATCCCTGGGCTG GAAATCAATGCCAGA GACAGGGAAGGGGAT ACTGCCCTGCATGAC
I V E H F L S L G L E I N A R D R E G D T A L H D
GCTGTGAGGCTCAAC CGCTACAAAATCATC AAACCTGCTGCTCCTG CATGGGGCTGACATG ATGACCAAGAACCCTG
A V R L N R Y K I I K L L L L H G A D M M T K N L
GCAGGAAAGACCCCG ACGGACCTGGTGAG CTCTGGCAGGCTGAT ACCCGGCACGCCCTG GAGCATCTGAGCCG
A G K T P T D L V Q L W Q A D T R H A L E H P E P
GGGGCTGAGCATAAC GGGCTGGAGGGGCCCT AATGATAGTGGGCGA GAGACCCCTCAGCCT GTGCCAGCCCAAGTGA
G A E H N G L E G P N D S G R E T P Q P V P A Q M

```

**Slika 7. Nukleotidna sekvenca transkripta i proteinske sekvence svih potencijalnih izoformi ANKRD2.** Kodoni za koje se pretpostavlja da predstavljaju start translacije izoformi ANKRD2 od 446, 360 i 333 ak su uokvireni.

Za izoformu M-ANKRD2 od 360 ak je određena molekulska masa od 40 kDa. Detektovana je i treća izoforma u srcu čoveka metodom reverzne transkripcije i u srcu odraslog pacova metodom western blot. Ova izoforma, za koju je predloženo da je isključivo eksprimirana u srcu, ima dužinu od 446 ak, molekulska masu od 50 kDa i u ovoj tezi je nazvana L-ANKRD2. U NCBI bazi podataka je navedena kao izoforma c (NCBI Reference Sequence: NP\_001278147.1, isoform c). U poređenju sa najkraćom izoformom S-ANKRD2, na amino-kraju ima dodatnih 116 ak (Miller et al. 2003). Miller i saradnici su pretpostavili da izoforme proteina ANKRD2 nastaju translacijom sa alternativnih start kodona (Slika 7) (Miller et al. 2003).

Biološki smisao postojanja različitih izoformi proteina ANKRD2 nije odgonetnut, niti su one uporedo proučavane u poprečno prugastim mišićima.

### 1.4.3. Ekspresija proteina Ankrd2

Protein Ankrd2 je najviše eksprimiran u skeletnim mišićima (Kemp et al. 2000; Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). U manjoj meri je eksprimiran u srcu i bubregu, dok su transkripti *Ankrd2* najmanje zastupljeni u prostati (Pallavicini et al. 2001) i mrkom masnom tkivu (Rakicevic et al. 2011).

U toku embriogeneze miša, *Ankrd2* iRNK je detektovana *in situ* hibridizacijom u miotomu počev od stadijuma E9.5 (Kemp et al. 2000). U skeletnim mišićima čoveka ANKRD2 je eksprimiran već od desete nedelje razvića, dok u fetalnom srcu nije detektovan u tom stadijumu (Ishiguro et al. 2002). U srcu odrasle osobe protein ANKRD2 je prisutan u pojedinim odeljcima kao što su komore, međukomorna pregrada i apeks (Moriyama et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). U skeletnim mišićima odrasle osobe preferencijalno je prisutan u sporim vlaknima (Ishiguro et al. 2002; Tsukamoto et al. 2002). Jedarna akumulacija ovog proteina je detektovana u miocitima koji okružuju oštećena vlakna posle povrede adultnog mišića, što sugeriše da Ankrd2 ima ulogu i u procesu regeneracije (Tsukamoto et al. 2008).

Ekspresija Ankrd2 je indukovana u odgovoru na različite vrste stresa i osetljiva je na mehaničko istezanje mišića kako *in vivo* tako i u *in vitro* uslovima (Kemp et al. 2000; Miller et al. 2003). Na modelu miša je ustanovljeno da je ekspresija proteina Ankrd2 povećana nakon povrede mišića (Tsukamoto et al. 2008), kao i po hroničnoj imobilizaciji mišića u istegnutom stanju (Kemp et al. 2000; Mckoy et al. 2005). Isto tako, i pojedinačne ekscentrične kontrakcije mišića miša (Barash et al. 2004) i pacova (Hentzen et al. 2006) dovode do povećanja ekspresije ovog proteina. Duže izlaganje pasivnom istezanju dovodi do indukcije ekspresije Ankrd2 u brzim mišićnim vlaknima (Mckoy et al. 2005). Interesantno je da nivo transkripata *Ankrd2* zavisi od tipa kontrakcija kojem je mišić izložen (Barash et al. 2004; Hentzen et al. 2006), kao i od vektora istezanja mišića (Mohamed et al. 2010). Utvrđeno je da se mehanizam indukcije ekspresije Ankrd2 razlikuje u zavisnosti da li je istezanje delovalo u transverzalnom ili longitudinalnom pravcu u odnosu na pravac pružanja mišićnih vlakana (Mohamed et al. 2010). I kod čoveka je primećeno da nakon iscrpljujućih vežbi skakanja dolazi do povećanja ekspresije ANKRD2 u mišićima (Lehti et al. 2009).



Na nivo ekspresije *Ankrd2* veliki uticaj ima i denervacija mišića a krajni rezultat zavisi od tipa mišića. Denervacija sporog mišića *m. soleus* dovodi do smanjenja (Mckoy et al. 2005), dok denervacija brzog mišića *m. gastrocnemius* rezultira povećanjem nivoa ekspresije *Ankrd2* (Tsukamoto et al. 2002).

Kod dijabetesa tipa I primećena je povišena ekspresija *Ankrd2*. Pretpostavlja se da je ovo povećanje posledica promene tipa mišićnih vlakana, odnosno pojačane tranzicije u vlakna tipa I. Zanimljivo je da fizička aktivnost može da ublaži povećanje nivoa ekspresije *Ankrd2* indukovano bolešću (Lehti et al. 2007).

Ekspresija *Ankrd2* je izučavana i *in vitro*, u mišićnim ćelijama miša C2C12 gajenim u kulturi. U mioblastima je ovaj protein pretežno lokalizovan u jedru (Pallavicini et al. 2001; Bean et al. 2008), dok u miotubama nivo njegove ekspresije u citoplazmi raste, a jedarna lokalizacija se gubi (Kemp et al. 2000; Pallavicini et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). Porast ekspresije *ANKRD2* u toku diferencijacije je primećen i kod primarnih mišićnih ćelija čoveka CHQ5B (Pallavicini et al. 2001).

#### 1.4.4. Regulacija ekspresije gena *Ankrd2*

Kao i većina gena eksprimiranih u skeletnim mišićima, transkripcija *Ankrd2* je aktivirana mišićno specifičnim transkripcionim faktorom MyoD u ranim stadijumima miogene diferencijacije (Bean et al. 2005). MyoD pripada familiji transkripcionih faktora bHLH (eng. *basic Helix-Loop-Helix*) i smatra se ključnim faktorom u procesu diferencijacije skeletnih mišića (Choi et al. 1990) jer upravlja ekspresijom gena koji su odgovorni za uspostavljanje mišićnog fenotipa (Olson 1993). Pošto je *Ankrd2* identifikovan kao nizvodni target nekoliko miogenih regulatornih faktora (eng. *myogenic regulatory factors* - MRF) kao što su MyoD, miogenin i MEF2 (eng. *myocyte enhancer factor-2*) (Blais et al. 2005), može se pretpostaviti da je ovaj protein uključen u propagaciju i amplifikaciju signala iniciranih od MRF u toku miogene diferencijacije.

Aktivnost promotora *Ankrd2* je pozitivno regulisana od strane tumor supresora p53 u mioblastima miša (Kojic et al. 2004; Belgrano et al. 2011), međutim mehanizam

je nepoznat. Ćelijski senzor stresa p53 utiĉe na miogenu diferencijaciju (Yang et al. 2015), a ima i regulatornu ulogu u procesima adaptacije mišića na fiziĉku aktivnost (Tachtsis et al. 2016).

Kao što je već pomenuto, ekspresija proteina *Ankrd2* moŹe biti indukovana mehaniĉkim istežanjem mišića po anizotropnom principu. Naime, u zavisnosti od pravca istežanja aktiviraju se dva razliĉita mehanosenzitivna signalna puta koja regulišu ekspresiju *Ankrd2*. Longitudinalnim istežanjem mišićnih vlakana povećava se ekspresija *Ankrd2* aktivacijom transkripcionog faktora NF-κB (eng. *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) koja je posredovana fosforilacijom kinazom Akt. Sa druge strane, transferzalnim istežanjem mišića se indukuje ekspresija *Ankrd2* preko proteina AP1 (eng. *activator protein*) u Raf-1 zavisnom signalnom putu (Mohamed et al. 2010). Zanimljivo je da p50/p65, heterodimer NF-κB, aktivira promotor *Ankrd2* (Mohamed et al. 2010), dok homodimer p50/p50 ima ulogu represora ekspresije *Ankrd2* (Bean et al. 2014). NF-κB i AP1 su transkripcioni regulatori aktivirani razliĉitim stresogenim aĉenasima (Hess et al. 2004; Kuryłowicz and Nauman 2008) što je još jedan dokaz na osnovu koga se *Ankrd2* svrstava u grupu gena koji se aktiviraju u ćelijskom odgovoru na stres.

Ekspresija *Ankrd2* u srcu je regulisana transkripcionim faktorom Nkx2.5 koji aktivira gene kao što su ANP (eng. *atrial natriuretic peptid*), srĉani alfa aktin i MEF2C (eng. *myocyte enhancer factor 2C*) (Akazawa and Komuro 2003), a funkcioniše i kao koaktivator GATA-4, drugog vaŹnog transkripcionog faktora koji reguliše ekspresiju gena ukljuĉenih u razviće srca (Harvey et al. 2002). Na modelu mišjih mioblata je pokazano da je aktivnost promotora *Ankrd2* gena znaĉajno povećana pod dejstvom regulatora Nkx2.5 (Belgrano et al. 2011). Na istom modelu je nedavno utvrđeno da Nkx2.5 i p53 sinergistiĉki aktiviraju promotor *Ankrd2* i da je aktivacija jaĉa od one posredovane pojedinaĉnim faktorima u dvostrukoj dozi (Kojic et al. 2015).

### 1.4.5. Funkcija proteina Ankrd2

Funkcija Ankrd2 u očuvanju integriteta sarkomere i mehanotransdukciji se ogleda kroz njegovu interakciju sa teletoninom, titinom, miopaladinom i proteazom kalpain 3 (Miller et al. 2003; Kojic et al. 2004). Ankrd2 ima ulogu signalnog molekula koji je uključen u odgovor miocita na stres jer se premešta u jedro miocita koji se nalaze u blizini ćelija koje su oštećene suvim ledom ili kardiotoksinom (Tsukamoto et al. 2008). Takođe je uključen u regulaciju ekspresije gena kao kofaktor transkripcionih faktora p53, PML i YB1 (eng. *Y-box-binding protein 1*) (Kojic et al. 2004).

Ovaj protein ima važnu ulogu u formiranju skeletnih mišića kao regulator miogeneze. „Overekspresija“ Ankrd2 inhibira ekspresiju MyoD i miogenina koji su glavni regulatori transkripcije u miocitima. Takođe, povećanje ekspresije Ankrd2 negativno utiče na proliferaciju ćelija jer indukuje apoptozu zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, verovatno preko p53 signalnog puta, dok njegovo utišavanje promoviše ćelijsku proliferaciju (Bean et al. 2008). Utišavanje Ankrd2 utiče na miogenezu i promenom ekspresije brojnih gena uključenih u mehanizme međućelijske komunikacije (Belgrano et al. 2011) koji su važni za morfologiju ćelije, koordinaciju genske ekspresije (Krauss et al. 2005), i fuziju mioblasta (Horsley and Pavlath 2004).

Uloga Ankrd2 u diferencijaciji mišića je regulisana i fosforilacijom u prisustvu kinaze Akt2, a posledica je negativna regulacija miogeneze u uslovima stresa (Cenni et al. 2011). Ankrd2 inhibira diferencijaciju mišićne ćelije i u direktnoj interakciji sa ID3 (eng. *Inhibitor of DNA Binding 3*) (Mohamed et al. 2013). Zapaljenski procesi su česti sporedni efekti mišićne diferencijacije. Vezivanje Ankrd2 za represivnu subjedinicu faktora NF- $\kappa$ B, p50 dovodi do inhibicije njegove aktivnosti i ekspresije gena koji su uključeni u inflamatorne puteve (Bean et al. 2014). S obzirom da je ekspresija Ankrd2 povećana prilikom fizičke aktivnosti (Barash et al. 2004; Mckoy et al. 2005; Lehti et al. 2007; Roberts et al. 2012) koja indukuje anti-inflamatorno okruženje, predloženo je da Ankrd2 može predstavljati važnog učesnika anti-zapaljenskog puta (Bean et al. 2014).

Promena ekspresije gena povezanih sa hipertrofičnom (HCM) i dilatiranom kardiomiopatijom (DCM) u mioblastima u kojima je utišana ekspresija Ankrd2 (Belgrano et al. 2011) ukazuju na potencijalnu ulogu Ankrd2 u srčanom tkivu, koja još

uvek nije u potpunosti proučena. U ovom radu su postavljeni temelji za dalju analizu uloge Ankrd2 u procesima karakterističnim za srce.

#### 1.4.6. Protein ANKRD2 u patološkim stanjima

Ekspresija proteina MARP familije je izmenjena kod nekih neuromišićnih i kardiovaskularnih bolesti, kao i u tumorima.

##### *Protein ANKRD2 u neuromišićnim bolestima*

U skeletnim mišićima, u kojima se protein ANKRD2 preferencijalno eksprimira, primećene su promene u nivou ekspresije kod pacijenata sa naslednim i kongenitalnim miopatijama, kao i sa bolestima motornih neurona. Status ANKRD2 je uglavnom određivan imunohistohemijskim analizama uzoraka biopsija skeletnih mišića.

Nasledne mišićne distrofije predstavljaju grupu bolesti koje odlikuje progresivno slabljenje i propadanje prevashodno skeletnih mišića (Amato and Griggs 2011). Iako je generalno nivo ovog proteina smanjen u većini mišićnih vlakana pacijenata, u nekim hipertrofičnim vlaknima je gotovo na istom nivou kao i kod zdravih mišića (Nakada et al. 2004). Pretpostavlja se da ANKRD2 može biti uključen u molekulske mehanizme koji leže u osnovi mišićnih distrofija kroz interakciju sa SNB1 (beta-1-sintrofīn), membranskim proteinom koji je asociran sa distrofinom, i njemu sličnim proteinima (Belgrano et al. 2011).

Kongenitalne miopatije su heterogena grupa poremećaja koji su najčešće blagi i nisu progresivni (Nakada et al. 2004). Kod obolelih je povećana ekspresija ANKRD2 naročito u oštećenim vlaknima. Kod miotubularne miopatije je broj ANKRD2- pozitivnih vlakana kao i nivo ekspresije u njima bio povišen, ali su zapažene i varijacije među bolesnicima. Vrlo sličan profil je uočen kod pacijenata sa nemalinskom miopatijom, samo što su kod njih u ANKRD2 pozitivnim ćelijama prisutna nemalinska vlakna (Nakada et al. 2004). Mehanizmi koji indukuju ekspresiju ANKRD2 kod pacijenata sa kongenitalnim miopatijama još nisu rasvetljeni, ali se spekulise da

povećani broj vlakana u kojima je detektovan ANKRD2 prati i povećanje broja mišićnih vlakana tipa I koji su karakteristika ovih bolesti, tako da ANKRD2 može biti razmatran kao potencijalni dijagnostički marker (Nakada et al. 2004).

Ekspresija ANKRD2 je kao posledica denervacije poremećena kod bolesti motornih neurona, spinalne mišićne atrofije (SMA) i amiotrofične lateralne skleroze (ALS). Ove progresivne, neurodegenerativne bolesti karakteriše odumiranje spinalnih (SMA) ili i donjih i gornjih motornih neurona (ALS) (Lunn and Wang 2008; Kiernan et al. 2011). Kod SMA, ekspresija ANKRD2 zavisi od težine bolesti i povišena je kod težih oblika. Vlakna u kojima je detektovan ANKRD2 imaju tendenciju grupisanja umesto karakterističnog rasporeda šahovske table (Nakada et al. 2004), što se može iskoristiti za praćenje statusa i progresije bolesti. Kod pacijenata sa ALS dolazi do gubljenja karakterističnog profila ekspresije zdravog mišića. ANKRD2-pozitivna vlakna su uniformno raspoređena u tkivu, a uočljivo je i povećanje jedarnog signala za ANKRD2 (Nakamura et al. 2002). Ova promena u lokalizaciji podseća na akumulaciju Ankrd2 u jedrima miocita izloženih stresu (Tsukamoto et al. 2008; Cenni et al. 2011).

#### *Protein ANKRD2 u tumorima*

Na ulogu ANKRD2 u molekularnim mehanizmim tumorogeneze ukazuje kompleksna funkcionalna interakcija sa p53, koji je vrlo često mutiran u tumorima čoveka, kao i izmenjena ekspresija gena koji učestvuju u TGF- $\beta$  i Wnt signalnim putevima, kao i gena koji su uključeni u tumorogenezu po utišavanju *Ankrd2* (Belgrano et al. 2011).

Ekspresija ANKRD2 je izučavana u tumoru mekog tkiva rabdomiosarkomu i onkocitomima bubrega. ANKRD2 je detektovan različitim metodama u skoro 90% pacijenata sa rabdomiosarkomima (Ishiguro et al. 2002; Ishiguro et al. 2005), i to u ćelijama tumora koje nisu bile pozitivne na poznate markere tumora. ANKRD2 je senzitivniji u odnosu na markere miogene diferencijacije koji se rutinski koriste u dijagnostici rabdomiosarkoma (Itoh-Satoh et al. 2002).

Osim što je detektovan u zdravom bubregu (Pallavicini et al. 2001), ANKRD2 se eksprimira u benignim onkocitomima, dok je nedetektabilan u malignom hromofobnom karcinomu bubrega (Shomori et al. 2007). Tumori bubrega su heterogena grupa i teško se međusobno razlikuju (Yusenko 2010), pa se ANKRD2 nameće kao potencijalni marker u diferencijalnoj dijagnostici.

*2. Cilj rada*

Za proteine familije MARP, ANKRD2 i ANKRD1, je karakteristična diferencijalna ekspresija u poprečno prugastim mišićima. Za razliku od ANKRD1, koji je eksprimiran samo u srcu zdravih osoba, ANKRD2 je detektovan i u skeletnim mišićima, i u srcu. U skeletnim mišićima je okarakterisan kao strukturni element sarkomere i regulator transkripcije, dok je njegova funkcija u srcu još uvek neistražena. Da bismo postavili temelje za izučavanje i otkrivanje novih funkcija ANKRD2 specifičnih za srce cilj je bio

1. Odrediti profil ekspresije i unutarćelijsku lokalizaciju ANKRD2 u srcu čoveka i uporediti ih sa parametrima ekspresije i lokalizacije ANKRD1

Zbog teške dostupnosti uzoraka srca čoveka, odabrani su kardiomiociti neonatalnih pacova (KMNP), kao često i uspešno korišćen model sistem za proučavanje funkcije srčano-specifičnih gena. S obzirom da ANKRD2 nikad nije proučavan u ovim ćelijama jedan od ciljeva ovog rada je bio

2. Ispitivanje adekvatnosti model sistema KMNP za izučavanje srčano-specifične funkcije ANKRD2

ANKRD2 je protein koji se može eksprimirati u tri izoforme od 446, 360 i 333 ak. Duže izoforme se razlikuju od najkraće za 113, odnosno 27 ak na amino-kraju. Međutim izoforme ANKRD2 nisu diskriminisane u eksperimentalnim uslovima, pa nije poznat ni biološki smisao ekspresije sličnih proteina, ni mehanizam(mi) regulacije njihove ekspresije. Stoga su postavljeni sledeći ciljevi:

3. Utvrditi ekspresioni profil i unutarćelijsku lokalizaciju izoformi ANKRD2 u poprečno-prugastim mišićima čoveka
4. Utvrditi mehanizam regulacije ekspresije izoformi ANKRD2.



### *3. Materijal i metode*

### **3.1. MATERIJAL**

#### **3.1.1. Humani uzorci**

U okviru ove studije ispitivana je ekspresija i lokalizacija proteina ANKRD2 u tkivima srca i skeletnih mišića čoveka metodama imunohistohemije i western blot.

Uzorci tkiva 10 subjekata (1-10, Tabela 2) su prikupljeni tokom rutinskih obdukcija izvršenih na Institutu za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Svi relevantni podaci o subjektima kao što su pol, starost, morfološki parametri srca, vreme proteklo od smrti do obdukcije i uzrok smrti su prikazani u Tabeli 2.

Kriterijumi za uzimanje uzoraka su bili odsustvo makroskopski vidljivih znakova raspadanja tkiva, povrede organa i patoloških promena. Uzorci tkiva su prenošeni na ledu do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde su trenutno zamrzavani u izopentanu ohlađenom u tečnom azotu i skladišteni na temperaturi od -80°C do upotrebe.

Korišćenje uzoraka tkiva čoveka u ovom istraživanju je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (pod brojem 29/II-7), i u skladu je sa etičkim načelima Helsinške deklaracije, kao i sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Srbije (član 222).

Tabela 2. Podaci o subjektima čija su tkiva korišćena u ovom radu

Subjekat	pol	starost	težina srca (g)	dim. srca (cm)	debljina zida leve komore (mm)	debljina zida desne komore (mm)	PMI (sati)	uzrok smrti
1	M	51	440	11x9	< 15	< 5	10	samoubistvo
2	Ž	27	300	10x8	< 10	< 2	24	samoubistvo
3	M	19	280	10x11	< 15	< 5	5	politrauma (saobraćajna nesreća)
4	M	20	350	12x10	< 15	< 3	7	politrauma (saobraćajna nesreća)
5	Ž	49	265	10x8	< 14	< 3	13	politrauma (saobraćajna nesreća)
6	M	18	250	10x8	< 15	< 3	13	politrauma (saobraćajna nesreća)
7	M	51	/	/	/	/	9	prirodna smrt
8	Ž	29	/	/	/	/	9	povreda mozga (saobraćajna nesreća)
9	Ž	45	/	/	/	/	16	samoubistvo
10	M	26	240	11x9	< 15	< 3	96-108	prostrelna rana grudi

PMI-postmortem interval, vreme proteklo od smrti do obdukcije  
dim.-dimenzije  
M-muško  
Ž-žensko

U ovom istraživanju su analizirani srčani mišići subjekata 1-6 i 10, kao i dva tipa skeletnih mišića subjekata 7-9: trbušasti mišić lista (lat. *musculus gastrocnemius*) kao predstavnik brzih mišića i široki listoliki mišić (lat. *musculus soleus*) kao predstavnik sporih mišića (Tabela 2).

### 3.1.2. Eksperimentalne životinje

Za izolaciju kardiomiocita korišćena su srca neonatalnih pacova soja Wistar u cilju izolacije kardiomiocita.

Neonatalni pacovi starosti jedan dan su dekapitovani u anestetiziranom stanju na Odeljenju za eksperimentalnu hirurgiju i uzgoj laboratorijskih životinja Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu. Iz žrtvovanih životinja su izolovana srca koja su prebačena u pufer CBFHH (eng. *calcium and bicarbonate-free Hanks with Hepes*) sastava: 137 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,81 MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 5,55 mM dekstroza, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 340 μM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 20 mM HEPES, pH 7,4. U Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo su izolovani primarni kardiomiociti i gajeni u kulturi ćelija, kao što je detaljno opisano u odeljku 3.2.5.

Eksperimenti izolacije i kultivacije primarnih kardiomiocita su odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije, rešenje broj 323-07-03937/2016-05, a na zahtev Etičke komisije Vojnomedicinske akademije.

### 3.1.3. Bakterijski sojevi

U ovom radu su korišćena dva soja bakterije *E. coli*. Plazmidni konstrukti kojima su transfekovane eukariotske ćelije gajene u kulturi su propagirani u ćelijama soja DH5α (supE44, ΔlacU169, (Φ80, lacZ, M15Δ), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1), dok je za ekspresiju rekombinantnih proteina sa histidinskim tagom (aminokiselinski niz od 6 histidina), korišćen soj M15 (pREP4), genotipa (Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>).

### 3.1.4. Plazmidni konstrukti

Plazmidni konstrukti su korišćeni za ekspresiju rekombinantnih proteina ANKRD1 i ANKRD2 fuzionisanih sa različitim tagovima u prokariotskim i eukariotskim ćelijama. Karakteristike plazmidnih konstrukata upotrebljenih u ovoj tezi su prikazane u Tabeli 3.

**Tabela 3. Osnovne karakteristike korišćenih plazmidnih konstrukata**

pun i skraćen naziv konstrukta	insert	vektor	restrikciona mesta	rezistencija na antibiotik	referenca ili izvor
<b>ANKRD1-His (A1-His)</b>	Kodirajuća sekvenca <i>ANKRD1</i> gena (1-957 bp)	pQE30 (Qiagen)	<i>PstI/BamHI</i>	Ampicilin	(Nestorovic et al. 2014)
<b>ANKRD2-His (A2-His/S-A2-His)</b>	deo kodirajućeg regiona <i>ANKRD2</i> (13-999 bp)	pQE30 (Qiagen)	<i>KpnI/SalI</i>	Ampicilin	(Kojic et al. 2009)
<b>ANKRD1-GFP (A1-GFP)</b>	Kodirajuća sekvenca <i>ANKRD1</i> gena (1-957 bp)	pEGFP-C1 (Clontech)	<i>PstI/BamHI</i>	Kanamycin	(Jasnic-Savovic et al. 2015)
<b>ANKRD2-GFP (A2-GFP)</b>	Kodirajuća sekvenca <i>ANKRD2</i> gena (1-999 bp)	pEGFP-C1 (Clontech)	<i>BglII/EcoRI</i>	Kanamycin	(Jasnic-Savovic et al. 2015)
<b>S-ANKRD2-flag (S-A2-flag)</b>	Kodirajuća sekvenca S- <i>ANKRD2</i> dužine 999 bp	pCMV-Tag2 (Agilent Technologies)	<i>EcoRI/SalI</i>	Kanamycin	(Jasnic-Savovic et al. 2015)
<b>M-ANKRD2-flag (M-A2-flag)</b>	Kodirajuća sekvenca M- <i>ANKRD2</i> od 1080 bp	pCMV-Tag2 (Agilent Technologies)	<i>EcoRI/SalI</i>	Kanamycin	G. Faulkner

### 3.1.5. Graničnici

Za umnožavanje fragmenata DNK metodama PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) i qRT-PCR (eng. *quantitative Real-Time PCR*), korišćeni su graničnici prikazani u Tabeli 4.

Tabela 4. Spisak korišćenih graničnika

Naziv	Sekvenca	Dužina amplikona (bp)
S-ANKRD2 F	5'-CGGTTATGGACGGCACCAT-3'	155
S-ANKRD2 R	5'-CTTCTCATCCTCCAGCACCA-3'	
M-ANKRD2 F	5'-CAGTGAGCTCATGGCAAAGG-3'	241
M-ANKRD2 R	5'-CTTCTCATCCTCCAGCACCA-3'	
L-ANKRD2 F	5'-AGCATGCAGCCAGCAGT-3'	154
L-ANKRD2 R	5'-CCCCAACTCCTGGCCTATTA-3'	
ANKRD1 F	5'-AGTAGAGGAACTGGTCACTGG-3'	138
ANKRD1 R	5'-TGGGCTAGAAGTGTCTTCAGAT-3'	
GAPDH F	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	112
GAPDH R	5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'	

### 3.1.6. Antitela

U saradnji sa VMA, u Laboratoriji za molekularnu biologiju (LMB) su napravljena mišja poliklonska antitela na proteine ANKRD1 i ANKRD2. Kao antigeni su korišćeni prečišćeni rekombinantni protein ANKRD1, fragment proteina ANKRD2 (32-166 ak) fuzionisani sa His-tagom i eksprimirani u bakterijama. Pored navedenih antitela korišćena su i antitela dobijena na poklon ili komercijalno dostupna antitela čiji je pregled dat u Tabeli 5.

Tabela 5. Pregled korišćenih primarnih i sekundarnih antitela

Antitelo	Poreklo / tip antitela	Proizvođač ili izvor
<b>Anti-ANKRD1</b>	Mišje poliklonsko	LMB
<b>Anti-S-ANKRD2*</b>	Mišje poliklonsko	LMB i G. Faulkner
<b>Anti-M-ANKRD2</b>	Mišje poliklonsko	G. Faulkner
<b>Anti-C-ANKRD2</b>	Mišje monoklonsko	G. Faulkner
<b>Anti GAPDH</b>	Mišje monoklonsko	Abcam
<b>Anti Dezmin</b>	Zečje poliklonsko	Cell Signaling
<b>Anti <math>\alpha</math>-aktinin 2</b>	Mišje monoklonsko	Sigma
<b>Anti <math>\alpha</math>-aktinin 2</b>	Zečje poliklonsko	Abcam
<b>Anti <math>\alpha</math>-aktinin 3</b>	Zečje monoklonsko	Epitomics
<b>Anti koneksin-43</b>	Mišje monoklonsko	BD Biosciences
<b>Anti <math>\beta</math> katenin</b>	Mišje monoklonsko	BD Biosciences

<b>Anti ZO-1</b>	Zečje poliklonsko	Invitrogen
<b>Anti miozin</b>	Mišje poliklonsko	G. Faulkner
<b>Anti flag-HRP<sup>†</sup></b>	Mišje poliklonsko	Sigma
<b>Anti mouse-HRP<sup>†</sup></b>	Kozje poliklonsko	Abcam
<b>Anti mouse IgG Alexa Fluor 488<sup>‡</sup></b>	Kozje poliklonsko	Applied Biosystems
<b>Anti rabbit IgG Alexa Fluor 594<sup>‡</sup></b>	Kozje poliklonsko	Applied Biosystems

\*Anti-S-ANKRD2 = anti-ANKRD2 na Slikama 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18 i 21.

<sup>†</sup>Antitelo konjugovano sa peroksidazom rena, HRP (eng. *Horse\_radish peroxidase*).

<sup>‡</sup>Antitelo konjugovano sa fluoroforom Alexa Fluor koja se ekscituje na naznačenoj talasnoj dužini.

S obzirom da je za detekciju proteina ANKRD2 korišćeno više antitela, na Slici 8 je šematski prikazan položaj antigena korišćenih za imunizaciju.



**Slika 8. Šematski prikaz pozicije delova proteina ANKRD2 koji su korišćeni za imunizaciju i proizvodnju antitela.** Pozicije aminokiselina su date za izoformu ANKRD2 od 360 ak.

### 3.1.7. Čelijske linije

U ovom radu su korišćene sledeće sisarske ćelije gajene u kulturi:

-komercijalno dostupna COS-7 permanentna ćelijska linija (ATCC br. CRL-1651). Nastala je transformacijom CV-1 ćelijske linije, poreklom od ćelija bubrega afričkog zelenog majmuna, virusom SV-40.

-humani primarni mioblasti iz biobanke tkiva Muscle Tissue Culture Collection-MTCC, sa sedištem u Institutu Fridrih Baur Univerziteta u Minhenu, Nemačka.

### 3.1.8. Komercijalni agensi

Za ispitivanje efekta doksorubicina na nivo ekspresije proteina ANKRD2 korišćen je rastvor doksorubicina (Adriablastin, Phizer) namenjenog u medicinske svrhe. Ovaj agens, poznat i pod nazivom adriamicin, je citotoksičan i koristi se za hemoterapiju tumora.

MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) (Merck) je korišćen u testu vijabilnosti ćelija.

Za sprečavanje degradacije proteina u ekstraktima ćelija ili tkiva korišćen je koktel proteaznih inhibitora Complete, EDTA free (Roche). Jedna tableta je rastvarana u 2 ml destilovane, sterilne vode pri čemu je dobijan 25 puta koncentrovan rastvor koji je pred upotrebu dodavan u pufer za liziranje ćelija.

Boja DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol) (Sigma-Aldrich) je korišćena za bojenje jedara. Ova fluorescentna boja prolazi kroz ćelijsku membranu i vezuje se za mali žljeb molekula DNK formirajući stabilan kompleks koji 20 puta intenzivnije fluorescira u odnosu na boju u nevezanom stanju.

### 3.1.9. Kompjuterski progami

Pretraživanje baze podataka i poređenje aminokiselinskih sekvenci je urađeno pomoću NCBI platforme (eng. *National Center for Biotechnology Information*) i kompjuterskih programa FASTA (<http://fasta.bioch.virginia.edu>) i BLAST (EMBL-EBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Imunoreaktivni signali detektovani western blot metodom su kvantifikovani kompjuterskim programom ImageJ 1.50i.



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Kultivacija bakterija

Rad sa bakterijama se izvodi u sterilnim uslovima. Bakterije *E. coli* su gajene na 37°C u tečnom LB (Luria Broth) hranljivom medijumu (1% baktotripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 1% NaCl) uz aeraciju ili na čvrstoj LB podlozi (1% baktotripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 1% NaCl i 1,5% agar). Soj DH5 $\alpha$  je gajen u medijumu sa ampicilinom u finalnoj koncentraciji od 100  $\mu\text{g/ml}$ , dok su za soj M15 u medijum dodavani ampicilin i kanamicin u finalnoj koncentraciji od 100  $\mu\text{g/ml}$  odnosno 30  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.2.2. Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

Plazmidna DNK je korišćena za transfekciju ćelija u kulturi. Izolovana je kitom PureLink<sup>®</sup> HiPurePlasmid DNA Purification Kit- Miniprep (Invitrogen) po uputstvu proizvođača.

Na čvrstu LB podlogu sa ampicilinom su direktno iz glicerolskog stoka sejane bakterije. Sa čvrste selektivne podloge su zasejavane pojedinačne bakterijske kolonije u 5 ml LB medijuma i inkubirane preko noći na 37°C pri 180 obr/min. Bakterijska kultura je centrifugirana na 13000 obr/min u trajanju od 3-5 min i talog je resuspendovan u 400  $\mu\text{l}$  pufera R3. Bakterije su lizirane dodavanjem 400  $\mu\text{l}$  pufera za lizu (L7) i inkubacijom 5 min na sobnoj temperaturi. Posle dodavanja 400  $\mu\text{l}$  pufera za precipitaciju (N3) i invertovanja, smeša je centrifugirana 10 min na 13000 obr/min na sobnoj temperaturi. Supernatant je nanet na kolonu (HiPure Mini Column) prethodno tretiranu sa 2 ml pufera za ekvibraciju (EQ1) i opranu dva puta sa 2,5 ml pufera za pranje (W8). DNK je eluirana sa kolone dodavanjem 900  $\mu\text{l}$  pufera za eluciju (E4). U eluat je dodato 630  $\mu\text{l}$  izopropanola i smeša je centrifugirana pola sata na 13000 obr/min, na +4°C. Talog je

pran sa 1 ml 70% etanola, centrifugiran 5 min na 13000 obr/min na +4°C i sušen na vazduhu 10 min nakon čega je prečišćena DNK resuspendovana u 30-50 µl pufera TE.

Koncentracija DNK je merena spektrofotometrijski na instrumentu NanoVue (GE Healthcare, Life Sciences), po uputstvu za rad aparata.

Izolovana plazmidna DNK je skladištena na -20°C do upotrebe.

### 3.2.3. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantnih proteina

Rekombinantni proteini fuzionisani sa His tagom su izolovani po optimizovanoj proceduri u denaturišućim uslovima (Kojic et al. 2009).

**Indukcija ekspresije.** Iz odgovarajućeg glicerolskog stoka su zasejane bakterije M15 na svežu čvrstu podlogu, sa koje je jedan bakterijski klon zasejavan u 10 ml selektivnog medijuma. Kultura je inkubirana preko noći na 37°C i sutradan je razblaživana do 1 l LB medijumom sa antibioticima. Inkubacija na 37°C je nastavljena uz povremeno merenje optičke gustine. Kada je vrednost optičke gustine dostigla OD=0,4-0,6, što ukazuje da su bakterije u logaritamskoj fazi rasta, dodat je IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) u finalnoj koncentraciji 0,1 mM. IPTG pokreće transkripciju *lac* operona i time indukuje ekspresiju proteina čiji su geni pod kontrolom *lac* operatora. Bakterijska kultura sa dodatim IPTG je inkubirana na 37°C u trajanju od tri sata. Bakterije su staložene centrifugiranjem 10 min na 4000 obr/min na +4°C. Talozi bakterija su čuvani na -20°C do sledeće faze rada.

**Prečišćavanje rekombinantnih proteina fuzionisanih sa His tagom u denaturišućim uslovima.** U ovom radu su korišćeni rekombinantni proteini S-ANKRD2-His i ANKRD1-His. Oni su prečišćeni iz bakterija uz pomoć metal-afinitetne hromatografije. Kao hromatografski materijal korišćena je Ni-NTA (eng. *nickel-nitroloacetic acid*) agarozna (50% suspenzija u etanolu, QiaExpressionist™, Qiagen). Prečišćavanje rekombinantnih proteina je omogućeno specifičnim vezivanjem jona nikla iz agaroze za niz histidina.

Talog iz 250 ml bakterijske kulture nakon ekspresije rekombinantnog proteina je resuspendovan u 10-15 ml pufera za lizu (8 M urea, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8). Lizat je sonifikovan (sonikator- Soniprep 150, Sanyo) sa 2 pulsa amplitude 10 µm u trajanju od po 20 s na ledu. Nakon sonifikacije lizat je centrifugiran 10 min na 5000 obr/min, na +4°C. Afinitetni matriks je pripremljen kratkim centrifugiranjem i pranjem sa 10 ml pufera za lizu. Nakon pripreme, 500 µl matriksa je dodato u supernatant i smeša je inkubirana 60 min na +4°C uz lagano mešanje na rotacionom točku. Matriks sa vezanim proteinima je staložen centrifugiranjem na 2500 obr/min na sobnoj temperaturi u trajanju od dva minuta. Nespecifično vezani proteini su uklanjani pranjem matriksa 3 puta po 10 min sa po 5 ml pufera, na sobnoj temperaturi. Jednom je za pranje korišćen pufer za lizu, a dva puta pufer istog sastava ali nižeg pH (8 M urea, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 6,3). Protein od interesa, koji je ostao vezan za matriks, je eluiran puferom za eluciju (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 150 mM EDTA), dva puta u trajanju od 30 min sa po 1 ml pufera. Koncentracija prečišćenih proteina je određena metodom po Bradford-u, eluati su razdijeljeni i čuvani na -80°C.

### 3.2.4. Čelijska kultura

Čelije su gajene u odgovarajućim sterilnim posudama, u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO<sub>2</sub> i na temperaturi od 37°C.

Za propagaciju ćelija COS-7 korišćen je medijum DMEM sa stabilnom formom L-glutamina (GlutaMAX, Thermo Fisher Scientific) i glukozom u koncentraciji 4,5 g/l (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies), obogaćen sa 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal Bovine Serum*- FBS, Gibco) i antibiotikom gentamicinom u finalnoj koncentraciji 50 µg/ml.

Za gajenje primarnih mioblasta čoveka korišćen je komercijalni medijum za kultivaciju ćelija skeletnih mišića (Promocell), sa dodatkom smeše suplemenata (Promocell), gentamicina u finalnoj koncentraciji 50 µg/ml i 1,5x koncentrovanog rastvora L-glutamina (GlutaMAX, Thermo Fisher Scientific). U cilju diferencijacije u miotube mioblasti su, nakon dostizanja konfluentnosti od 70-90%, gajeni u medijumu

sastava: DMEM, 2% serum konja i gentamicin u finalnoj koncentraciji 50 µg/ml. Diferencijacija je trajala od 3 do 7 dana.

Pasažiranje ćelija je vršeno pri konfluentnosti od približno 80 %, tako što im je nakon ispiranja puferom PBS (137 mM NaCl, 3,4 mM KCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2) dodavan rastvor tripsina i EDTA (0,05% tripsin i 0,02% EDTA). Nakon delovanja enzima u trajanju od 3-5 min, reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma sa serumom. Ćelije su resuspendovane i brojane pomoću hemocitometra, a broj ćelija određivan je po sledećoj formuli:

Broj ćelija/ml=(broj izbrojanih ćelija/broj polja u kojima su ćelije prebrojane) x 10<sup>4</sup>

Nakon brojanja, ćelije su zasejavane u odgovarajućem razblaženju ili zamrzavane.

U cilju zamrzavanja, ćelije su taložene centrifugiranjem 5 min na 1500 obr/min u kliničkoj centrifugi (Biosan LMC 3000), a talog je resuspendovan u medijumu za zamrzavanje (10% dimetilsufoksid (DMSO) u FBS-u). DMSO ima krioprotektivnu ulogu, jer vezuje vodu i otežava stvaranje kristala leda koji mogu da oštete ćelije. Suspenzija ćelija je razdeljivana u kriotube i postupno zamrzavana: -20°C (4-8 sati), -80°C (16-24 sati), nakon čega su ćelije čuvane u tečnom azotu (-198°C).

Zasejavanje ćelija je vršeno brzim odmrzavanjem alikvota ćelija i resuspendovanjem u medijumu za gajenje ćelija zagrejanom na 37°C.

### **3.2.5. Izolacija primarnih kardiomiocita neonatalnih pacova**

Kardiomiociti su izolovani iz 6-10 srca neonatalnih pacova starosti jedan dan. Srcima žrtvovanih životinja su uklonjene pretkomore. Komore su mehanički usitnjene u puferu CBFHH, do veličine oko 1 mm<sup>3</sup>. Delići tkiva su prebacivani u pufer za digestiju sastava CBFHH, kolegenaza tipa 2 (Sigma) finalne koncentracije 0,5 mg/ml i pankreatinin (Sigma) finalne koncentracije 1 mg/ml. Ćelije tkiva se razdvajaju kroz serije enzimskih digestija koje se odvijaju na temperaturi od 37°C uz mešanje, u trajanju

od 10 min. U dobijenoj suspenziji ćelija su, pored kardiomiocita, prisutni i drugi tipovi ćelija, pre svega fibroblasti. Eliminacija ovih ćelija je omogućena zahvaljujući različitim karakteristikama mišićnih i ne-mišićnih ćelija kao što su brzina prijanjanja za podlogu, gustina i brzina proliferacije. Fibroblasti se mnogo brže dele i vezuju za dno posude u odnosu na primarne kardiomiocite. Zbog toga se nakon jedan sat od zasejavanja suspenzije ćelija prikuplja medijum koji sadrži većinom kardiomiocite i prebacuje u drugu posudu. Ovaj korak se ponavlja još jednom da bi se uklonilo što više fibroblasta. Nakon toga se preostali kardiomiociti prebrojavaju i zasejavaju u odgovarajuće sudove za primarne ćelijske kulture (Falcon) ili na kolagenom obložena pokrovna stakla. Jedan do dva dana posle izolacije kardiomiociti počinju spontano da se kontrahuju.

Izolovani primarni kardiomiociti neonatalnih pacova su gajeni u medijumu sastava: DMEM, 10% FBS, 5% serum konja (Life Technologies), 1% vitamin B12 (Sigma) i smeša antibiotika penicilin/streptomycin (PAA Laboratories).

### **3.2.6. Tranzijentna transfekcija ćelija**

Tranzijentna transfekcija ćelija u kulturi je rađena 24 sata nakon pasažiranja i dostizanja konfluentnosti od 40-60%.

COS-7 ćelije su transfekovane reagensima PolyFect (Qiagen) ili PEI MAX (Polyethylenimine MAX, Polysciences). Kompleks između DNK i reagensa se formira u medijumu u kome se gaje ćelije. Odnosi između DNK i reagensa su bili 1:5 kada je korišćen PolyFect, odnosno 1:3 za PEI MAX. Smeša je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi, razblažena medijumom za gajenje ćelija i nakapana na ćelije.

Kardiomiociti su transfekovani dva dana nakon izolacije i gajenja u kulturi korišćenjem reagensa Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). DNK i reagens su odvojeno rastvarani u minimalnom medijumu OPTI-MEM (Invitrogen), a zatim kombinovani i inkubirani 30 minuta, pri čemu je formiran kompleks. Odnos reagens a i DNK je iznosio 3:1. Pre dodavanja kompleksa, ćelijama je uklonjen medijum u kome su

gajene i zamenjen medijumom sastava DMEM, 2% serum konja i mešavina antibiotika penicilin/streptomycin.

### **3.2.7. Tretman ćelija doksorubicinom**

Po dostizanju konfluentnosti kardiomiociti su tretirani doksorubicinom finalne koncentracije 0,5 i 1  $\mu$ M. Nakon 24 sata pripremljeni su proteinski ekstrakti ili je određivan vijabilitet ćelija MTT testom.

### **3.2.8. Pripremanje proteinskih ekstrakata iz ćelija i tkiva**

Za pripremu proteinskih ekstrakata ćelije su oprane dva puta puferom PBS, a zatim su lizirane u puferu EBC srednje jonske jačine (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 120 mM NaCl, 0,5% NP40, koktel proteaznih inhibitora). Lizati su inkubirani na ledu 20 min, sonifikovani (Soniprep 150, Sanyo) sa 2 pulsa, amplitude 10  $\mu$ m, u trajanju od po 10 s i centrifugirani 10 min na 13000 obrt/min na +4°C. Supernatant tj. proteinski ekstrakt je alikvotiran i čuvan na -80°C do upotrebe.

Lizati tkiva srca i skeletnih mišića čoveka su pripremljeni po proceduri opisanoj u publikaciji Fanin i saradnika (Fanin et al. 2001). Od zamrznutih mišića pripremljena su dva kompleta preseka tkiva. U dve odvojene tube su naizmenično stavljeni pojedinačni uzastopni preseci tkiva pripremljeni na aparatu CM-1860UV (Leica) na temperaturi od -20°C. Jedan set preseka je liziran u 100-200  $\mu$ l 0,1 N NaOH 16-20 sati na sobnoj temperaturi. Ovaj lizat je korišćen za određivanje koncentracije proteina kako je opisano u odeljku 3.2.9. Drugi komplet preseka tkiva je uskladišten na -80°C, a pred upotrebu je pripreman ekstrakt definisane koncentracije, na osnovu koncentracije proteina u lizatu iste količine tkiva u NaOH. Tkivo je rastvarano u puferu sa visokom koncentracijom SDS i bromfenolplavim koji sprečavaju određivanje koncentracije proteina standardnom metodom po Bradfordu ali omogućava efikasnu lizu mišićnog tkiva. Pufera za lizu i nanošenje uzoraka na SDS PAGE se sastoji od sledećih komponenti: 0,05 M ditiotritol (DTT), 0,1 M etilendiamintetrasirćetna kiselina

(EDTA), 0,125 M Tris, 4% SDS, 0,05% bromfenol plavo, pH=8. Pre nanošenja na gel, uzorci su denaturisani kuvanjem 5 min na 95°C.

### 3.2.9. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana metodom po Bradford-u (Bradford 1976) koja se zasniva na vezivanju boje komasi plavo (eng. *Coomassie Brilliant Blue*) za proteine i poređenju intenziteta boje sa vrednostima dobijenim za uzorke albumina iz seruma govečeta (eng. *bovine serum albumin*, BSA) poznate koncentracije.

Koncentracija ukupnih proteina u ekstraktima određivana je korišćenjem komercijalnog reagensa (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate). U proteinski uzorak finalne zapremine 10 µl dodavano je 200 µl reagensa. Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, očitavana je apsorbance uzorka na talasnoj dužini od 595 nm (Infinite 200 PRO multiplate reader, TECAN). Na osnovu očitane apsorbance, koncentracija proteina u merenim uzorcima automatski je određivana intrapolacijom sa standardne krive koja je dobijena za uzorke proteina BSA poznatih koncentracija u opsegu od 0,1 do 1 mg/ml, pri čemu je uziman u obzir faktor razblaženja uzoraka.

### 3.2.10. Izolacija RNK

Radi lakše homogenizacije zamrznuti uzorci tkiva su u avanu izmrvljeni u prah, uz neprestano dodavanje tečnog azota, a zatim homogenizovani u 1ml TRI Reagens-a (Ambion). Nakon inkubacije 10 min na sobnoj temperaturi, u homogenizat je dodato 200 µl hloroforma, smeša je dobro izmešana, inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana na 13000 obr/min, 15 min, na +4°C. Izdvojena je bistra gornja faza u kojoj se nalazi RNK i dodato je 500 µl izopropanola. Rastvor je dobro promešan invertovanjem tube i inkubiran na sobnoj temperaturi 10 min, nakon čega je tuba centrifugirana na 13000 obr/min, 10 min, na +4°C. Na talog je dodat 1 ml 75% etanola, posle čega je uzorak centrifugiran 10 min na 13000 obr/min, na +4°C. Talog je sušen 10

min na sobnoj temperaturi kako bi ispario etanol. Precipitirana RNK je rastvorena u 20  $\mu$ l vode bez RNaze (eng. *nuclease-free water*, Ambion).

Da bi se uklonili eventualni ostaci genomske DNK, RNK je nakon izolovanja tretirana DNazom koja ima endonukleaznu aktivnost i hidrolizuje fosfodiestarske veze dvolančane i jednolančane DNK. Korišćen je kit DNA-free Kit (Ambion) po uputstvu proizvođača. Nakon dodavanja enzima DNaze i odgovarajućeg pufera, smeša je inkubirana 30 min na 37°C. DNaza je inaktivirana dodavanjem inhibitora, a nakon inkubacije od 2 min na sobnoj temeperaturi, reakciona smeša je centrifugirana 1,5 min na 13000 obrt/min. Supernatant koji je sadržao RNK oslobođenu od genomske DNK je čuvan na -80°C do upotrebe.

Koncentracija izolovane RNK je merena spektrofotometrijski, pomoću instrumenta NanoVue. Osim koncentracije, očitavan je i odnos apsorbanci izmerenih na 260 i 280 nm koji ukazuje na čistoću uzorka. Vrednost u opsegu 1,9-2 ukazuje na čistoću RNK koja je prihvatljiva za dalji rad.

### 3.2.11. Reakcija reverzne transkripcije- sinteza cDNK

Na RNK matrici je sintetisana komplementarna DNK (eng. *complementary DNA*, cDNA) reakcijom reverzne transkripcije koristeći High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Ovaj kit sadrži reverznu traskriptazu MultiScribe™ MuLV i nasumične (eng. *random*) graničnike dizajnirane tako da omoguće prevođene ukupne iRNK u cDNK. 1-2  $\mu$ g RNK se prevodi u cDNK serijom inkubacija na različitim temperaturama: 25 min na 25°C, 120 min na 37°C i 5 min na 85°C. Sastav reakcione smeše za reverznu transkripciju je prikazan u Tabeli 6. Sintetisana cDNK je čuvana na temperaturi od -20°C.



**Tabela 6. Sastav reakcione smeše za reverznu transkripciju korišćenjem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)**

Komponenta	Zapremina
10x pufer	2 µl
25x smeša nukleotida (dNTP)	0,8 µl
10x nasumični graničnici	2 µl
reverzna transkriptaza	1 µl
inhibitor RNAze	1 µl
RNK	1-2 µg
H <sub>2</sub> O	x µl
Ukupna zapremina	20 µl

### 3.2.12. Reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom

Reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom je *in vitro* amplifikacija određene DNK sekvence ograničene sa dva graničnika. Ovom metodom su sintetisane cDNK umnožavani fragmenti od interesa uz pomoć graničnika koji su navedeni u Tabeli 4. U reakciji umnožavanja je korišćena HotStartTaq DNK Polimeraza (Qiagen). Ova polimeraza nije aktivna na sobnoj temperaturi čime se sprečava nespecifično umnožavanje. Enzim postaje funkcionalno aktivan kraćom inkubacijom na visokoj temperaturi. U Tabeli 7 je prikazan sastav reakcione smeše za lančano umnožavanje DNK polimerazom. Produkti reakcije PCR su čuvani na -20°C

**Tabela 7. Sastav reakcione smeše i temperaturni profil reakcije za lančano umnožavanje DNK polimerazom**

Komponenta	Zapremina
10x pufer	2.5 µl
2mM smeša nukleotida (dNTP)	2.5 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
10 pmol "forward" graničnik	0.5 µl
10 pmol "reverse" graničnik	0.5 µl
5 U/µl HotStartTaq polimeraza (Qiagen)	0.2 µl
cDNK	3 µl
H <sub>2</sub> O	x µl
Ukupna zapremina	25 µl

Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
97 °C	2 min	3
55 °C	3 min	
95 °C	30 s	40
60 °C	60 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	/

### 3.2.13. Analiza DNK elektroforezom na agaraznom gelu

Prinos i kvalitet PCR produkata je proveravan horizontalnom elektroforezom DNK u 1% agaroznom gelu. U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijumbromid (0,5 µg/ml) radi vizuelizacije DNK. Elektroforeza uzoraka pomešanih sa puferom sastava 40 mM Tris-acetat, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5-10% glicerol i 0,025% boje Orange G se odvijala pri konstantnom naponu od 100 V u puferu TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Za utvrđivanje veličine molekula DNK na gel je zajedno sa uzorcima nanošen i standard dužine (100 bp DNA Ladder, Gene Ruler, Fermentas). Umnoženi produkti su vizuelizovani osvetljavanjem gela UV svetlošću talasne dužine 266 nm, a rezultat je dokumentovan sistemom BioDocAnalyze sa CCD kamerom (Biometra).

### 3.2.14. Kvantitativni PCR u realnom vremenu

Nivo genske ekspresije je određivan kvantitativnim PCR u realnom vremenu, zasnovanim na detekciji fluorescentnog signala reagensa SYBER Green koji se vezuje za produkte PCR reakcije.

Fragmenti cDNK za *ANKRD1* i *ANKRD2* su umnoženi uz pomoć istih graničnika koji su upotrebljeni za reakciju PCR i navedeni u Tabeli 4. Pored ciljnog molekula, iz iste cDNK umnožena je i endogena kontrola GAPDH (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) korišćena za normalizaciju rezultata. Svaka reakcija je rađena u triplicatu a rezultat je izražen kao srednja vrednost za svaki uzorak. Relativni nivo ekspresije analiziranih gena je određen pomoću komparativnog algoritma za

kvantifikaciju, gde je  $\Delta C_t$  vrednost inkorporirana u formulu  $2^{-\Delta C_t}$  čime se dobija stepen razlike u ekspresiji između dva uzorka. Reakcija PCR-a u realnom vremenu urađena je na aparatu 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Za obradu rezultata korišćen je 7900HT System Software (Applied Biosystems). U Tabeli 8 naveden je sastav reakcione smeše.

**Tabela 8. Sastav reakcione smeše i temperaturni profil reakcije za qRT-PCR**

Komponenta		Zapremina
2x Brilliant II SYBER Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies)		5 $\mu$ l
3 pmol "forward" graničnik		1 $\mu$ l
3 pmol "reverse" graničnik		1 $\mu$ l
cDNK (ekvivalentno 300 ng iRNK)		3 $\mu$ l
Ukupna zapremina		10 $\mu$ l

Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
95 °C	3 min	
95 °C	15 s	40
60 °C	60 s	

### 3.2.15. Određivanje vijabilnosti ćelija MTT testom

MTT test je kvantitativna kolorimetrijska metoda za merenje vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta ćelija. Ova metoda se zasniva na sposobnosti enzima dehidrogenaze mitohondrija da redukuje žuti MTT reagens u ljubičasti formazan. Reakcija se odvija samo u živim ćelijama, u kojima su dehidrogenaze aktivne pa je količina dobijenog formazana proporcionalna broju vijabilnih ćelija. U ploču sa 96 bunarića sađeno je  $5 \times 10^3$  KMNP u svaki bunarić i ćelije su gajene u odsustvu ili prisustvu različitih koncentracija doksorubicina. Nakon tretmana medijum je zamenjen rastvorom MTT boje u svežem medijumu u finalnoj koncentraciji od 0,5 mg/ml. Ćelije su inkubirane sat vremena na 37°C, a zatim su lizirane u DMSO, 10 min na sobnoj temperaturi pri čemu su se rastvorili kristali formazana. Apsorbanca je merena je na talasnoj dužini od 490 nm (Infinite 200 PRO multiplate reader, TECAN). Na osnovu

dobijene apsorbance je određivan procenat vijabilnih ćelija u odnosu na broja netretiranih ćelija.

### 3.2.16. Western blot

Western blot je metoda koja omogućava imunodetekciju ciljnog proteina u uzorku. Metoda podrazumeva sledeće korake: razdvajanje smeše proteina elektroforezom, transfer razdvojenih proteina na membranu i imunodetekciju ciljnog proteina na membrani.

**Elektroforeza proteina na denaturišućem poliakrilamidnom gelu.** SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) je metoda koja omogućava razdvajanje proteina prema molekulskoj masi u denaturišućim uslovima. Za razdvajanje je korišćen diskontinuirani SDS poliakrilamidni gel sastavljen od gela za koncentrovanje (eng. *stacking gel*) koji omogućava homogenizaciju uzoraka i gela za razdvajanje (eng. *running gel*) u kome se proteini iz uzorka razdvajaju po svojoj masi.

Gel za koncentrovanje sadrži 6% poliakrilamid, 120 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 1,4% amonijumpersulfat i 0,14% TEMED. Gel za razdvajanje sadrži 12% poliakrilamid, 428 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,7% amonijumpersulfat i 0,04% TEMED. Pre nanošenja na gel proteini se denaturišu 5 min na 95°C u odgovarajućem puferu sa redukcionim agensom. Za proteinske ekstrakte ćelija korišćen je pufer sastava: 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,25 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,1% bromfenolplavo. Proteini poreklom iz tkiva su denaturisani u puferu koji sadrži 0,05 M DTT, 100 mM EDTA, 125 mM Tris, 4% SDS i 0,05% bromfenolplavo. Elektroforeza se odvijala u tris-glicinskom puferu (25 mM Tris pH 8,8, 250 mM glicin, 0,1% SDS), pod konstantnim naponom od 100 V u gelu za koncentrovanje i 180 V u gelu za razdvajanje. Zajedno sa uzorcima na gel je nanošen marker molekulskih težina Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) ukoliko su proteini vizuelizovani bojenjem, ili Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) u slučaju detekcije proteina Western Blot metodom.

**Prenos proteina na membranu.** Prenos proteina sa denaturišućih poliakrilamidnih gelova na membranu od poliviniliden fluorida (PVDF) (Immobilon-P, Millipore) je vršen polusuvim elektro-transferom pomoću aparata Fastblot 015-100 (Biometra). Gel je, nakon elektroforeze, inkubiran u katodnom puferu (25 mM Tris-HCl pH 9,4, 40 mM glicin, 20% metanol). Membrana je aktivirana potapanjem u metanol 1-2 s, a zatim je ispirana u vodi 5 min i inkubirana u anodnom puferu II (25 mM Tris-HCl pH 10,4, 20% metanol) 5 min. Na anodnu ploču, koja je najpre nakvašena anodnim puferom I (300 mM Tris-HCl pH 10,4, 20% metanol) je stavljano 2 sloja 3 MM papira nakvašenih anodnim puferom I, jedan 3 MM papir natopljen anodnim puferom II. Na ovaj sloj je zatim stavljana aktivirana membrana, a preko nje gel. Kao poslednji sloj stavljana su tri 3 MM papira natopljena u katodni pufer. Aparatura je zatvarana postavljanjem katode na složeni „sendvič“. Transfer je trajao 40 min pri konstantnoj struji od 5 mA po  $\text{cm}^2$  membrane. Uspešnost transfera je proverena bojenjem membrane rastvorom boje Ponso S (0,1% Ponso S, 1% glacijalna sirćetna kiselina). Ova boja se reverzno vezuje za proteine na PVDF membrani čime je omogućena njihova vizuelizacija. Nakon toga boja se potpuno uklanja blagim mućkanjem membrane u vodi.

**Imunodetekcija proteina.** Posle transfera, membrana je inkubirana u puferu PBST (80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl pH 7,5, 0,1% Tween 20) sa 10% bezmasnog mleka, preko noći na  $+4^\circ\text{C}$  da bi se blokirala mesta na membrani za koja nisu vezani proteini. Detekcija ispitivanog proteina se najčešće vrši u dve faze – inkubacijom sa primarnim i sekundarnim antitelom. Primarno antitelo je specifično za određeni epitop ciljnog proteina, dok sekundarno antitelo prepoznaje primarno i najčešće je specifično za epitop imunoglobulina životinje iz koje je izolovano primarno antitelo. Jednočasovna inkubacija sa primarnim antitelom se odvijala u puferu PBST sa 5% bezmasnog mleka na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje. Nespecifično vezana primarna antitela su uklanjana pranjem membrane 3 puta po 10 min u puferu PBST uz intenzivno mućkanje. Membrana je zatim inkubirana jedan sat sa sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa peroksidazom rena. Nespecifično vezano sekundarno antitelo je uklanjano pranjem membrane u puferu PBST (3 puta po 10 min), nakon čega je detektovan signal. Korišćena antitela su prikazana u Tabeli 5. Za generisanje hemiluminiscentnog signala korišćen je komercijalni reagens Imobilion<sup>TM</sup> Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore), prema uputstvu proizvođača. Peroksidaza

rena (eng. *horseradish peroxidase*- HRP) katalizuje reakciju u kojoj se supstrat (Lumigen PS-3 akridan) prevodi u jedinjenje koje daje hemiluminiscentni signal sa maksimalnom emisijom na talasnoj dužini od 430 nm. Membrana je inkubirana sa reagensom 5 min, a detekcija signala je vršena ekspozicijom radiografskih filmova.

### 3.2.17. Vizuelizacija proteina u SDS-poliakrilamidnim gelovima

U cilju vizuelizacije proteina, poliakrilamidni gelovi su bojeni bojom komasi plavo (0,1% komasi plavo G250, 6,25% glacijalna sirćetna kiselina i 4,25% HClO<sub>4</sub>), nakon čega su odbojavani vodom.

### 3.2.18. Esej imunoadsorpcije

Jedan od načina za utvrđivanje specifičnosti antitela je bio esej imunoadsorpcije. Ovom metodom je proverena imunoreaktivnost antitela inkubiranih sa antigenom ili kontrolnim proteinom fuzionisanim sa histidinskim tagom.

Rekombinantni proteini su prečišćeni po protokolu opisanom u odeljku 3.2.3., nakon čega su imobilisani za afinitetni matriks- Ni-NTA agarozu (QiaExpressionist<sup>TM</sup>, Qiagen). Smeša Ni-NTA agaroze (200 µl), dva puta isprane sa po 1 ml pufera, sastava 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, je inkubirana sa 120 µg prečišćenih proteina jedan sat na +4°C na rotacionom točku. Nakon kratkog centrifugiranja (2 min, 2500 obrt/min, +4°C) matriks je ispran PBS-om. Imobilisani proteini su inkubirani sa antitelima razblaženim u puferu PBS uz lagano mešanje na rotacionom točku, na +4°C u trajanju od jednog sata. Ukoliko su antitela specifično prepoznala epitope rekombinantnih proteina, ostala su vezana za matriks. Matriks je taložen dvominutnim centrifugiranjem na 2500 obrt/min, na +4°C. Supernatant je razblažen u 5% nemasnom mleku u odnosu 1:300, i korišćen kao primarno antitelo u western blot analizama.

### 3.2.19. Imunocitohemija

Ovom metodom je određivana lokalizacija proteina u ćelijama. Imunofluorescentni esej je zasnovan na vezivanju specifičnih primarnih antitela za antigen (protein), a vizuelizacija se postiže korišćenjem sekundarnih antitela konjugovanih sa fluoroforama.

Ćelije su zasejavane na pokrovna stakla, netretirana ili tretirana kolagenom. Pred fiksiranje, ćelije su najpre prane dva puta puferom PBS, nakon čega su inkubirane 15 min u 4% paraformaldehidu na sobnoj temperaturi. Zatim su oprane puferom PBS, a fiksacija je zaustavljena inkubacijom u 0,1 M glicinu u trajanju od 1 min. Nakon pranja u PBS-u, usledila je permeabilizacija ćelija sa 1% Triton X-100 (USB) rastvorenim u puferu PBS. Ćelije su inkubirane preko noći na +4°C u puferu za blokiranje (1% BSA, 0,05% Tween, PBS). Zatim su tri puta oprane u rastvoru za pranje (0,1% BSA, 0,05% Tween, PBS) u trajanju po 5 min, a zatim su inkubirane dva sata sa primarnim antitelom razblaženim u puferu za pranje. Nakon pranja (tri puta po 5 min), na ćelije je nanoseno fluorescentno obeleženo sekundarno antitelo. Radi vizualizacije jedara ćelije su, nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, inkubirane sa bojom DAPI koncentracije 100 µg/ml (razblažena u PBS-u). Ćelije su zatim tri puta oprane u PBS-u u trajanju po 5 min i fiksirane na mikroskopske pločice pomoću „mounting“ medijuma (eng. *Fluorescence mounting medium*, DAKO) radi usporavanja gubljenja fluorescencije i čuvanja preparata. Preparati su sušeni preko noći na sobnoj temperaturi i analizirani konfokalnom mikroskopijom.

### 3.2.20. Imunohistohemija

Imunohistohemijom je detektovana lokalizacija proteina na presecima tkiva. Zamrznuti uzorci srca i skeletnih mišića čoveka koji su bili smešteni na -80°C su temperirani do -20°C i sečeni kriotomom (CM-1860UV, Leica) na preseke debljine 10 µm, koristeći kriotom. Preseci tkiva su postavljeni na polarizovane mikroskopske

pločice (Thermo Scientific). Nakon kratkog sušenja na vazduhu, preseći su fiksirani acetonom ohlađenim na  $-20^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 5 min. Zatim su inkubirani preko noći na  $+4^{\circ}\text{C}$  u puferu za blokiranje (2% serum konja, 0,05% Tween, PBS). Na preseke su naneta primarna antitela razblažena u puferu za blokiranje, a nakon pranja puferom 0,05% Tween 20, PBS (tri puta po 5 min) preseći su inkubirani sat vremena sa sekundarnim antitelima konjugovanim sa fluoroforom. Radi vizualizacije jedara, na preseke naneta boja DAPI koncentracije  $100\ \mu\text{g/ml}$  (razblažena u PBS-u). Nakon tri pranja u trajanju od po 5 min u puferu za pranje, na preseke je nakapan „mounting“ medijum (DAKO) preko kog je stavljeno pokrovno staklo. Preparati su sušeni preko noći na sobnoj temperaturi i analizirani konfokalnom mikroskopijom.

### 3.2.21. Konfokalna mikroskopija

Fiksirane ćelije ili tkiva u kojima su ciljni proteini bili fluorescentno obeleženi su analizirani konfokalnom mikroskopijom na sistemu TCS SP8 (Leica). Slike su obrađene programom Leica Microsystems LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems). Fluorescentni molekuli su detektovani u sekvencijalnom modusu skeniranja. Signali nastali emisijom pobuđenih fluorofora detektovani su fotodetektorom 2 (PTM2). Fluorofore korišćene u ovom radu su Alexa Fluor-488, Alexa Fluor-594 i DAPI. Fluorescencija fluorofore vezane za sekundarno antitelo pobuđena je laserskom svetlošću talasnih dužina 488 (Alexa Fluor-488), 552 (Alexa Fluor-594) i 405 nm (DAPI). Maksimum emisije fluorofore Alexa Fluor-488 je detektovan na talasnoj dužini od 532 nm, dok je za fluoroforu Alexa Fluor-594 detektovan na dužini 617 nm. Maksimalna emisija boje DAPI je detektovana na talasnoj dužini od 470 nm. Zeleni fluorescentno obeleženi protein (eng. *green fluorescent protein*- GFP) je pobuđen svetlošću od 488 nm a emisija je detektovana na talasnoj dužini od 500 nm. Korišćeni su objektivni Fluotar 20x i Apo 63x (sa uljnom imerzijom), a slike su skenirane na ukupnom uveličanju od 200 i 630 puta.



### 3.2.22. DIC mikroskopija

DIC (eng. *Differential interference contrast*) mikroskopija predstavlja vid fazno-kontrastne mikroskopije kojom se naglašava kontrast u transparentnim uzorcima i na taj način se postiže reljefnost slike. Sistem za ovu mikroskopiju je integralni deo Leica sistema TCS SP8. Ovom metodom su analizirani uzorci fiksiranih tkiva u kojima su proteini detektovani imunohistohemijom.

### 3.2.23. Statistička analiza

Imunoreaktivni signali western blot analize su kvantifikovani programom Image J i statistički obrađeni programom SPSS 20.0. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD (standardno odstupanje, eng. *standard deviation*). Značajnost razlike između uzoraka je testirana Studentovim *t* testom.

Za upoređivanje nivoa ekspresije proteina ANKRD2 u uzorcima skeletnih mišića preminulih sa različitim postmortem intervalima korišćena je jednofaktorijalna analiza varijansi, ANOVA, uz korekciju rezultata testom *Scheffe post hoc*. Za analizu korelacije takođe je izračunavan i korelacioni koeficijent, *r*, koji ukazuje na povezanost dve promenljive vrednosti.

Za sva merenja, *p* vrednost manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom razlikom.

## *4. Rezultati*

---

S obzirom da podaci iz literature (Ishiguro et al. 2002; Miller et al. 2003; Belgrano et al. 2011) posredno ukazuju na značajnu ulogu ANKRD2 u srcu, a da još uvek ne postoje detaljni podaci o njegovoj ekspresiji i lokalizaciji u ovom organu, prvi deo rezultata se odnosi na određivanje profila ekspresije i unutarćelijske lokalizacije ANKRD2 u srcu čoveka. S obzirom da su uzorci srca čoveka teško dostupni u istraživačke svrhe, evaluirana je adekvatnost KMNP za dalje izučavanje srčano-specifične uloge ANKRD2. KMNP su odabrani kao često korišćen model sistem za proučavanje funkcije srčano-specifičnih gena.

Drugi deo rezultata se odnosi na proučavanje tri izoforme proteina ANKRD2 u poprečno prugastim mišićima čoveka. Izoforme dužine 446, 360 i 333 ak smo označili kao L-ANKRD2, M-ANKRD2 i S-ANKRD2, redom. Izoforma od 446 ak nije detektovana kod čoveka, dok izoforme od 360 i 333 ak do sada nisu diskriminisane u eksperimentalnim uslovima. Proučavali smo njihov ekspresioni profil na nivou RNK i na nivou proteina, kao i unutarćelijsku lokalizaciju. Takođe je ispitivan i mehanizam regulacije ekspresije izoformi u tkivu srca i skeletnih mišića.

S obzirom da su za detekciju proteina Ankrd2 i izoformi korišćena nekomercijalna antitela, u prvom delu poglavlja Rezultati prikazani su eksperimenti kojima je potvrđena njihova specifičnost.

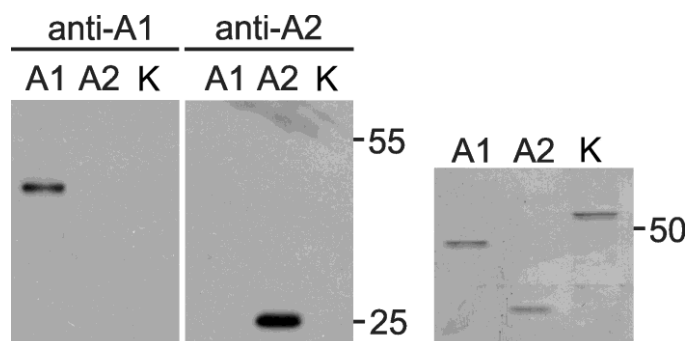
#### **4.1. Evaluacija specifičnosti antitela za detekciju proteina ANKRD2 i njegovih izoformi**

Jedan od ciljeva ove teze je bila karakterizacija ANKRD2 u srcu, gde je dominantan ANKRD1, drugi član familije MARP proteina. Stepen homologije između ova dva proteina je značajan, pa je bilo potrebno jasno utvrditi specifičnost antitela na proteine ANKRD1 i ANKRD2, tj. isključiti krosreaktivnost anti-ANKRD2 sa proteinom ANKRD1 i obrnuto.

Primenili smo dva različita pristupa koja su omogućila nedvosmisleno tumačenje rezultata. Antitela smo najpre testirali na proteinima eksprimiranim u prokariotskom sistemu, a zatim na rekombinantnim ANKRD1 i ANKRD2 egzogeno eksprimiranim u eukariotskom sistemu, po uzoru na rad Dwyer i kolega (2014).

#### a) Detekcija antigena korišćenih za imunizaciju miševa

Za imunizaciju miševa su, kao antigeni, korišćeni rekombinantni protein ANKRD1 (1-319 ak) i aminoterminalni region ANKRD2 (32-166 ak) fuzionisani sa histidinskim tagom. Oni su eksprimirani u bakterijskim ćelijama i prečišćeni afinitetnom hromatografijom na matriksu od Ni-NTA agaroze. Antigeni i kontrolni nesrodni protein aldA (eng. *lactaldehyde dehydrogenase*) fuzionisan sa histidinskim tagom, u ujednačenim količinama (Slika 9, panel desno), su razdvojeni elektroforezom u denaturišućem SDS-poliakrilamidnom gelu. Proteini su preneti na membranu i detektovani metodom western blot. Primarna antitela na ANKRD1 i ANKRD2 su korišćena u razblaženju 1:300, a sekundarno antitela 1:80 000.

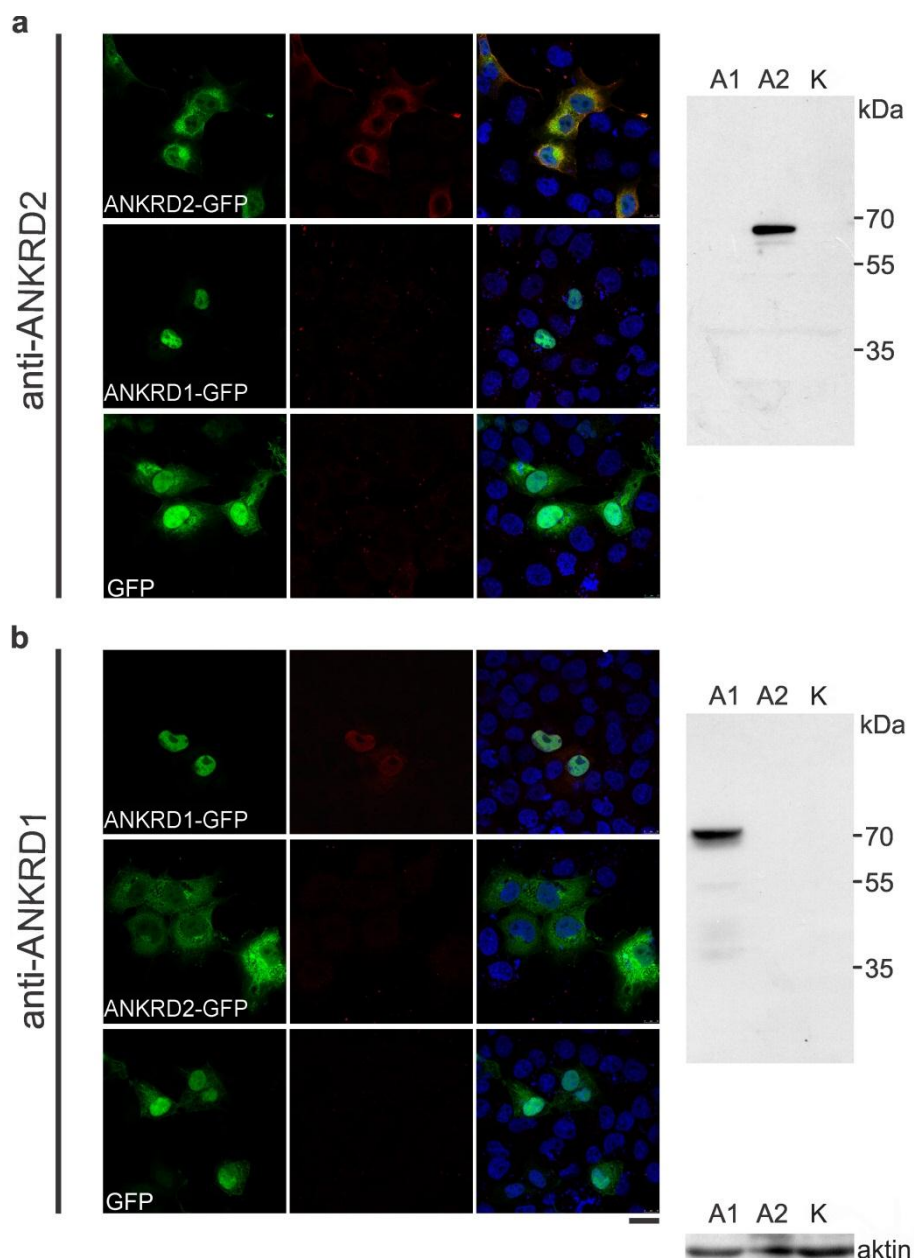


**Slika 9. Detekcija antigena korišćenih za proizvodnju anti-ANKRD2 i anti-ANKRD1 mišjih poliklonskih antitela.** Rekombinantni protein ANKRD1-His (A1), amino-kraj proteina ANKRD2 (A2) i kontrolni protein sa His tagom (K) su detektovani metodom western blot (panel levo). Jednake količine proteina su nanete na gel što je pokazano bojenjem proteina komasi plavim (panel desno). Brojevi odgovaraju molekulskim težinama proteina markera u kDa.

Rezultati prikazani na Slici 9 pokazuju da testirana antitela prepoznaju samo odgovarajući antigen i ne reaguju sa druga dva ponuđena proteina. Odsustvo interakcije sa kontrolnim proteinom koji je isto fuzionisan sa histidinskim tagom potvrđuje neimunogenost taga korišćenog za prečišćavanje proteina.

#### **b) Imunofluorescentna detekcija egzogeno eksprimiranih proteina ANKRD1 i ANKRD2 u eukariotskim ćelijama**

U COS-7 ćelijama su eksprimirani rekombinantni proteini ANKRD1 i ANKRD2 fuzionisani sa GFP, ANKRD1-GFP i ANKRD2-GFP. COS-7 ćelije, koje ne eksprimiraju endogene MARP proteine, su transfekovane odgovarajućim konstruktima i vektorom pEGFP-C1 (negativna kontrola). Ćelije su fiksirane 24 sata nakon transfekcije i inkubirane sa primarnim antitelima u razblaženju 1:100. Sekundarno antitelo konjugovano sa fluoroforom Alexa Fluor-594 je korišćeno u razblaženju 250 puta. GFP emituje svetlost u zelenom delu spektra (zeleni signal), dok fluorofora vezana za sekundarno antitelo emituje svetlost u crvenom delu spektra (crveni signal). Žuti signal se dobija u slučaju vezivanja primarnog i sekundarnog antitela za protein koji je fuzionisan sa GFP tagom. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da ne postoji nespecifična reaktivnost antitela sa ponuđenim proteinima (Slika 10). Do preklapanja crvenog i zelenog signala došlo je samo u slučajevima kada su anti-ANKRD1 i anti-ANKRD2 inkubirana sa ćelijama u kojima su eksprimirani ANKRD1-GFP, odnosno ANKRD2-GFP. Rezultati imunocitohemije su dodatno potvrđeni western blot analizom proteina izolovanih iz transfekovanih COS-7 ćelija (Slika 10, paneli desno). Anti-ANKRD1 i anti-ANKRD2 antitela su detektovala isključivo odgovarajuće antigene (ANKRD1-GFP i ANKRD2-GFP).



**Slika 10. Procena specifičnosti anti-ANKRD2 (a) i anti-ANKRD1 (b) mišjih poliklonskih antitela.** ANKRD1-GFP, ANKRD2-GFP i GFP su eksprimirani u COS-7 ćelijama i detektovani imunocitohemijski (levi paneli) i metodom western blot (desni paneli) anti-ANKRD2 i anti-ANKRD1 antitelima (razblaženje 1:300). Proteinski ekstrakti COS-7 ćelija u kojima su eksprimirani ANKRD1-GFP, ANKRD2-GFP i GFP su obeleženi sa A1, A2 i K. Aktin je korišćen kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima i detektovan je bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera. Brojevi odgovaraju molekulskim težinama proteina markera u kDa. Linija razmere odgovara dužini od 20  $\mu$ m.

Prikazanim eksperimentima je nedvosmisleno potvrđena specifičnost antitela na protein ANKRD2 čime je omogućena njegova detekcija u ćelijama srca i diskriminacija u odnosu na protein ANKRD1.

Za diskriminaciju izoformi proteina ANKRD2, na raspolaganju su nam bila dva antitela:

**Anti-S-ANKRD2.** Za generisanje ovog antitela korišćen je fragment proteina ANKRD2 koji se nalazi na amino kraju izoforme od 333 ak, ali je takođe prisutan i u dužim izoformama. Ovo antitelo je korišćeno i u eksperimentima generalne detekcije ANKRD2 bez obzira na izoforme kada je označeno sa anti-ANKRD2.

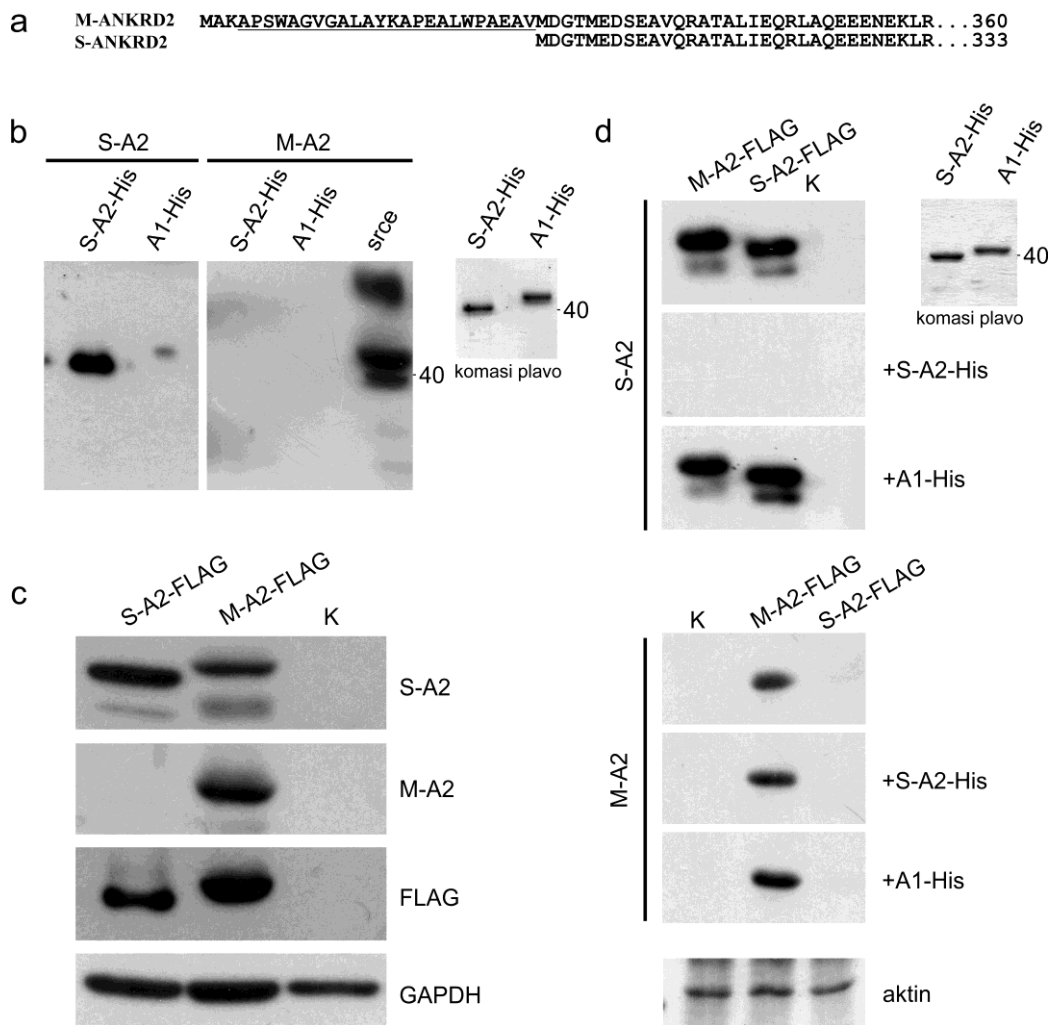
**Anti-M-ANKRD2.** Za diskriminaciju dužih izoformi od kratke, kao antigen za generisanje specifičnog antitela korišćen je peptid čija je sekvenca prisutna samo u izoformama M- i L-ANKRD2 (Slika 8 i Slika 11a).

Procena specifičnosti antitela na izoforme ANKRD2 je podrazumevala eksperimentalne pristupe kojima se dokazuje da anti-M-ANKRD2 ne prepoznaje kratku izoformu, S-ANKRD2.

Prvi korak je predstavljao detekciju najkraće izofome ANKRD2 fuzionisane sa His tagom, metodom western blot. Antitelo na M-ANKRD2 nije prepoznalo ni S-ANKRD2-His ni kontrolni ANKRD1-His, što znači da ne postoji nespecifična interakcija sa kratkom izoformom, srodnim proteinom ANKRD1 i histidinskim tagom (Slika 11b).

U drugom koraku antitela su testirana detekcijom S-ANKRD2-flag i M-ANKRD2-flag eksprimiranih u COS-7 ćelijama. Antitelo na S-ANKRD2 je prepoznalo oba proteina dok je anti-M-ANKRD2 antitelo specifično detektovalo samo dužu izoformu (Slika 11c).

Poslednji korak ove analize je bio esej imunoadsorpcije. Ispitivana antitela su najpre inkubirana sa istim količinama rekombinantnih S-ANKRD2 i ANKRD1 fuzionisanih sa histidinskim tagom, a zatim korišćena za western blot detekciju S- i M-izoforni obeleženih flag tagom i eksprimiranih u COS-7 ćelijama.



### Slika 11. Utvrđivanje specifičnosti antitela na izoforme proteina ANKRD2.

**a-** Poravnanje primarne sekvence amino-krajeva S- i M-ANKRD2. Sekvenca polipeptida koji je korišćen kao antigen za pravljenje mišjeg poliklonskog antitela na M-ANKRD2 je podvučena. **b-** Western blot analiza S-ANKRD2-His i ANKRD1-His antitelima na izoforme ANKRD2 (S-A2 i M-A2). Na gel su nanete iste količine rekombinatnih proteina (panel komasi plavo). Uzorak srca čoveka je korišćen kao pozitivna kontrola. **c-** Western blot analiza ekstrakata COS-7 ćelija u kojima su ekspimirani S-ANKRD2-flag i M-ANKRD2-flag. Panel FLAG - kontrola identiteta analiziranih proteina. Panel GAPDH - kontrola ujednačenih količina proteinskih ekstrakata nanetih na gel. **d-** U esaju imunoadsorpcije jednake količine imobilisanih S-ANKRD2 (S-A2-His) i ANKRD1 (A1-His, korišćen kao negativna kontrola), fuzionisanih sa His tagom (desni panel, komasi plavo) su inkubirane sa anti-S-A2 i anti-M-A2 antitelima. M-ANKRD2 (M-A2-flag) i S-ANKRD2 (S-A2-flag) obeleženi flag tagom i ekspimirani u COS-7 ćelijama su detektovani pre-adsorbovanim (paneli obeleženi sa +S-A2-His i +A1-His) ili netretiranim (neobeleženi paneli) antitelima. Aktin je detektovan bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera i korišćen je kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima. K- proteinski ekstrakti netransfekovanih COS-7 ćelija. Brojevi odgovaraju molekularnoj težini proteina markera u kDa.



Esej se zasniva na pretpostavci da će inkubacija antitela sa odgovarajućim antigenom dovesti do „zasićenja“ antitela i inhibicije njegove aktivnosti. Na Slici 11d su prikazani rezultati ovog eksperimenta. Za razliku od anti-M-ANKRD2, inkubacija anti-S-ANKRD2 antitela sa imobilisanim S-ANKRD2-His je dovela do uklanjanja antitela iz rastvora, tako da je signal izostao prilikom detekcije S-ANKRD2-flag. Inkubacija sa proteinom ANKRD1-His, nije uticala na aktivnost nijednog od testiranih antitela.

Ovim eksperimentima smo utvrdili da anti-M-ANKRD2 antitelo specifično prepoznaje samo izoformu M-ANKRD2 i da ne reaguje unakrsno sa izoformom S-ANKRD2, kao ni sa proteinom ANKRD1.

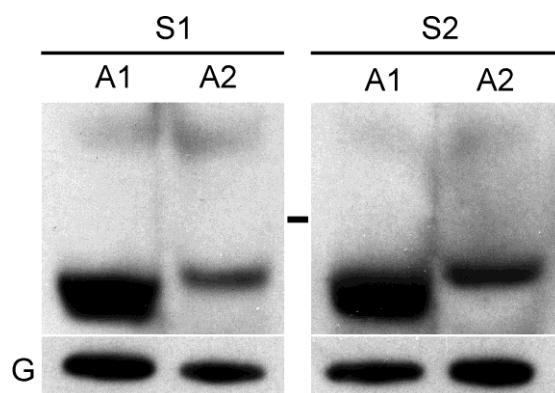
#### **4.2. Nivo ekspresije i unutarćelijska lokalizacija proteina ANKRD2 u srcu čoveka**

Prvi podaci o niskoj ekspresiji ANKRD2 u komorama srca datiraju iz 2001. i 2002. godine (Moriyama et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). U ovoj tezi je detaljno analizirana njegova ekspresija u odnosu na homologni protein ANKRD1, preferencijalno eksprimiran u srčanom tkivu.

Western blot analizom je određen profil ekspresije ANKRD2 u srcu dva subjekta (S1 i S2, Slika 12). Proteinski ekstrakti su pripremljeni iz tkiva uzorkovanih prilikom rutinske autopsije. Srce subjekta S1 je bilo standardnog anatomskeg izgleda. Kod srca donora S2 je konstatovano zadebljanje miokarda leve komore što je simptom blage hipertrofije nastale najverovatnije kao posledica povišenog krvnog pritiska. Podaci o subjektima, morfološkim parametrima srca, vremenu proteklom od smrti do obdukcije (postmortem interval- PMI) i uzroku smrti su prikazani u Tabeli 2 u odeljku Materijal i metode.

Rezultati western blot analize su prikazani na Slici 12. ANKRD2 je detektovan u srcu oba subjekta na očekivanom nivou od ~40 kDa. Primetna je razlika u nivou ekspresije između ANKRD2 i ANKRD1. Signal dobijen za ANKRD2 je manjeg intenziteta u poređenju sa signalom ANKRD1. Takođe, vidljiva je razlika u putovanju

ova dva proteina usled razlike u njihovim molekulskim težinama. Sa antitelima na ANKRD1 i ANKRD2 detektovan je i protein veličine ~50 kDa.

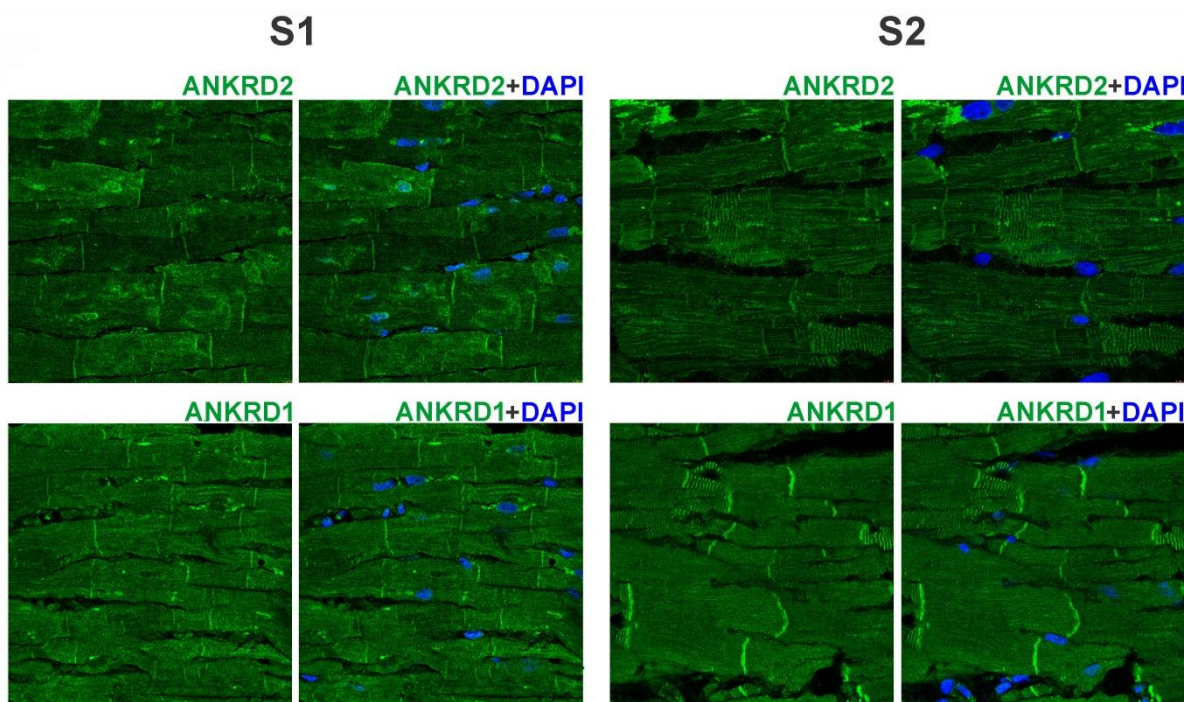


**Slika 12. Ekspresija proteina ANKRD2 u humanom srcu.** Western blot analiza proteina srca dva subjekta (S1 i S2). Korišćena su antitela na ANKRD1 (A1) i ANKRD2 (A2), razblažena 300 puta. GAPDH (G) je korišćen kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima. Crtica između panela označava položaj proteina markera od 48 kDa.

Unutarćelijska lokalizacija proteina ANKRD2 u kardiomiocitima komore srca čoveka utvrđena je metodom imunohistohemije. ANKRD2 i ANKRD1 su detektovani na presecima smrznutih tkiva srca subjekata S1 i S2 primarnim antitelima u razblaženju 1:100 i sekundarnim antitelom konjugovanim sa fluoroforom Alexa Fluor-488 u razblaženju 1:500.

Kao što se može videti na Slici 13, i ANKRD2 i ANKRD1 su detektovani na uzdužnim presecima srčanog mišića. Za razliku od ANKRD1, ANKRD2 je neravnomerno distribuiran u kardiomiocitima što se ogleda u jačem i slabijem intenzitetu signala u pojedinim ćelijama. ANKRD2 i ANKRD1 su lokalizovani u istim ćelijskim strukturama. Jak signal koji prati strijaciju karakterističnu za mišićnu ćeliju ukazuje na njihovo prisustvo u sarkomeri. Intenzitet sarkomernog signala koji odgovara proteinu ANKRD1 je bio neznatno jači u poređenju sa signalom za protein ANKRD2. Generalno, nivo proteina u jedrima je bio izuzetno nizak ili nedetektabilan. Izuzetak su jedra subjekta S1 u kojima je jedarni signal za protein ANKRD2 bio uočljiv. Osim u sarkomeri i jedrima signal je detektovan i u strukturama koje su najverovatnije IKD, na osnovu morfologije. Specifičnost signala detektovanih u sarkomeri, jedru i IKD je

verifikovana negativnim imunobojenjem tkiva kontrolnim serumom neimunizovanih miševa.

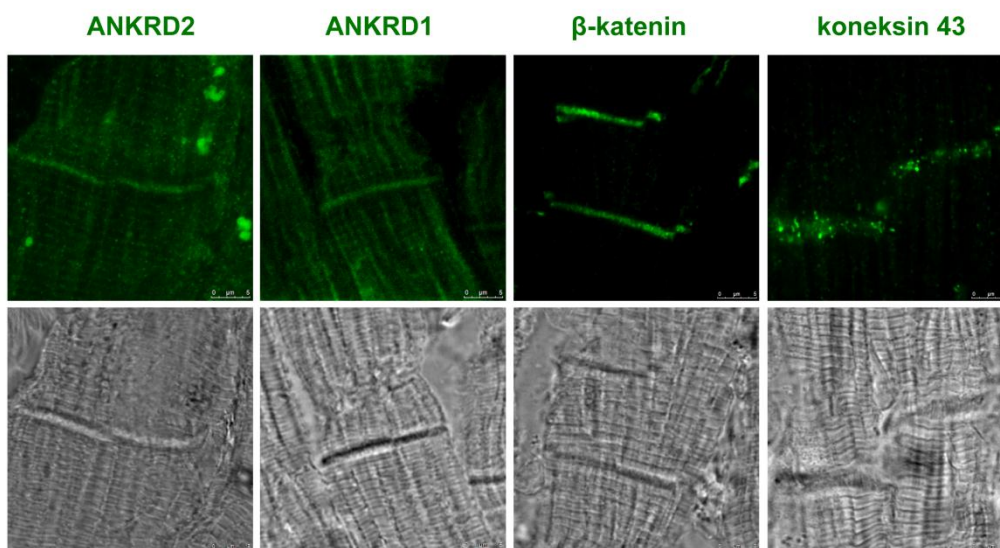


**Slika 13. Lokalizacija proteina ANKRD2 i ANKRD1 u kardiomiocitima srca čoveka.** Imunohistohemija detekcija ANKRD1 i ANKRD2 na kriosekcijama srca subjekata S1 i S2 i analiza konfokalnom mikroskopijom. Zeleni signal odgovara imunodetektovanim proteinima ANKRD1 i ANKRD2. Jezra kardiomiocita su obojena DAPI bojom- plavi signal. Linija razmere odgovara dužini od 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.1. Detekcija ANKRD2 i ANKRD1 u interkalirajućim diskovima kardiomiocita

Na Slici 13 su prikazani rezultati imunohistohemije detekcije ANKRD2 i ANKRD1 u tkivu srca čoveka. Osim signala u sarkomeri i jedru primećen je intenzivan signal u strukturama koje morfološki podsećaju na IKD. IKD povezuju kardiomiocite, obezbeđuju strukturni integritet tkiva srca i omogućavaju sinhronizovane kontrakcije (Sheikh et al. 2009). Da bismo potvrdili pretpostavku da su ANKRD1 i ANKRD2 lokalizovani u IKD, prisustvo ovih proteina analizirano je na presecima zamrznutog srca subjekta 1 (S1) metodom imunohistohemije. Kao markeri IKD korišćeni su  $\beta$ -katenin,

komponenta međućelijskih veza tipa fascia adherens i koneksin 43 koji ulazi u sastav pukotinastih veza (Sheikh et al. 2009). ANKRD1, ANKRD2,  $\beta$ -katenin i koneksin 43 su detektovani primarnim antitelima u razblaženju 1:100 za anti-ANKRD1 i anti-ANKRD2, odnosno 1:500 za anti- $\beta$ -katenin i anti-koneksin 43. Sekundarno antitelo je bilo obeleženo fluoroforom Alexa Fluor-488 u razblaženju 1:500. Na Slici 14 prikazan je rezultat imunofluorescentne detekcije navedenih proteina. Osim u sarkomeri, signal za ANKRD1 i ANKRD2 je detektovan i u strukturama u kojima su bili lokalizovani i  $\beta$ -katenin i koneksin 43. Pošto su IKD jasno vidljivi kada se kardiomiociti posmatraju pod svetlosnim mikroskopom, napravljeni su i snimci istih polja koristeći DIC mikroskopiju. Jasno se uočava da su IKD strukture u kojima su detektovani fluorescentni signali koji odgovaraju analiziranim proteinima. Ovim eksperimentom je indirektno dokazana lokalizacija proteina ANKRD1 i ANKRD2 u IKD kardiomiocita čoveka.



**Slika 14. ANKRD2 i ANKRD1 su lokalizovani u interkalirajućim diskovima.** Kriopreseći srca subjekta S1 su inkubirani sa antitelima na ANKRD2 i ANKRD1, kao i na  $\beta$ -katenin i koneksin 43, koji predstavljaju markere za IKD. Odgovarajuće slike dobijene DIC mikroskopijom su prikazane na donjim panelima. Linija razmere odgovara dužini od 5  $\mu$ m.

### 4.3. Evaluacija kardiomiocita neonatalnih pacova kao model sistema za izučavanje proteina ANKRD2

Izolovani kardiomiociti malih glodara predstavljaju izuzetan *in vivo* sistem za proučavanje ekspresije, lokalizacije i finkcije srčano-specifičnih gena i proteina. Za karakterizaciju proteina ANKRD2 u srcu odabrali smo kardiomiocite neonatalnih pacova (KMNP) s obzirom da su oni korišćeni u eksperimentima u kojima je proučavana funkcija srodnog ANKRD1 (Jeyaseelan et al. 1997; Zou et al. 1997; Kuo et al. 1999; Aihara et al. 2000b; Arimura et al. 2009).

Koristeći program FASTA (Pearson and Lipman 1988) ustanovljeno je da aminokiselinski sastav proteina ANKRD2 čoveka (360 ak, NCBI Reference Sequence: NP\_065082.2, izoforma a) pokazuje 88.1% identičnosti i 95.7% sličnosti sa proteinom Ankrd2 pacova (328 ak, NCBI Reference Sequence: NP\_001101059.1) (Slika 15).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
homo sapiens  MAKAPSWAGVGLAYKAPEALWPAEAVMDGTMEDSEAVQRATALIEQRLAQEEENEKLRGDARQKLPMDLLVLEDEKHHG
rattus norvegicus  MEGPEAVQRATELIEQRLAEEEEETEKLRRAATPGKTSMDMLVLEDEKRLG
      10      20      30      40

      90      100     110     120     130     140     150     160
homo sapiens  AQSAAALQKVKGQERVRKTSLDLRREIIDVGGIQNLIELRKKRKQKKRDALAASHEPPPEPEEITGPVDEETFLKAAVEGK
rattus norvegicus  VQSPALQKVKGQERVRKTSLDLRREIIDVGGIQNLIELRKKRKQKKRDALAAAQEPPEPEEITGPVDEETFLKAAVEGK
      50      60      70      80      90      100     110     120

      170     180     190     200     210     220     230     240
homo sapiens  MKVIEKFLADGGSADTCDFRRTALHRASLEGHMEILEKLLDNGATVDFQDRLDCTAMHWACRGGHLEVVKLLQSHGADT
rattus norvegicus  IKVIDKYLADGGSADTCDEFRRRTALHRASLEGHMEILEKLLDNGATVDFQDRLDCTAMHWACRGGHLEVVKLLQSRGANT
      130     140     150     160     170     180     190     200

      250     260     270     280     290     300     310     320
homo sapiens  NVRDKLLSTPLHVAVRTGQVEIVEHFSLGLGLEINARDREGDTALHDAVRLNRYKIKLLLLHGADMMTKNLAGKTPPTDLV
rattus norvegicus  DVRDKLLSTPLHVAVRTGHVEIVEHFSLGLDINAKDREGDSALHDAVRLNRYKIKLLLLHGADMMAKNMAGKTPPTDLV
      210     220     230     240     250     260     270     280

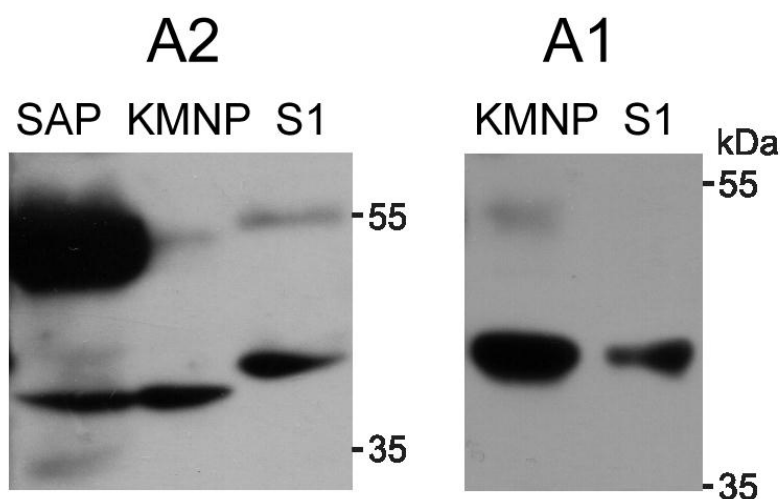
      330     340     350     360
homo sapiens  QLWQADTRHALEHPEPGAENGLGPNDSGRETPQPVPVPAQ
rattus norvegicus  QLWQADTRHALEHPESEQNGLERPG-SGRETPQPVPVPAQ
      290     300     310     320

```

Slika 15. Poravnanje aminokiselinskih sekvenci proteina ANKRD2 čoveka (*Homo sapiens*) i Ankrd2 pacova (*Rattus norvegicus*) koristeći algoritam FASTA (verzija 3.8) (<http://fasta.bioch.virginia.edu>).

#### 4.3.1. Ekspresija endogenog Ankrd2 u KMNP na proteinskom nivou

Imajući u vidu značajnu sličnost između Ankrd2 čoveka i pacova, u preliminarnim eksperimentima smo utvrdili da je anti-ANKRD2 antitelo na protein čoveka imunoreaktivno na protein pacova. Zahvaljujući tome mogli smo da odredimo ekspresioni profil endogenog Ankrd2 pacova u KMNP, kao i da ga uporedimo sa ekspresionim profilom ANKRD2 u srcu čoveka. Ankrd2 je detektovan metodom western blot u proteinskim ekstraktima KMNP tkiva srca subjekta S1 i tkiva srca adultnog pacova, koji je korišćen kao pozitivna kontrola zbog već definisanog profila ekspresije proteina Ankrd2 (Miller et al. 2003). Ankrd2 je detektovan primarnim anti-ANKRD2 antitelom razblaženim 300 puta i sekundarnim antitelom razblaženim 80 000 puta (Slika 16, levi panel).



**Slika 16. Uporedni profili ekspresije endogenog proteina Ankrd2 (A2) u KMNP, srcu adultnog pacova (SAP) i srcu subjekta 1 (S1). Ankrd1 (A1) je korišćen kao pozitivna kontrola u KMNP i srcu subjekta S1. Brojevi odgovaraju molekularnoj težini proteina markera u kDa.**

Anti-ANKRD2 antitelom su detektovane dve trake koje odgovaraju molekularnoj težinama od oko 40 i 50 kDa u svim uzorcima. Proteini detektovani u uzorku tkiva odraslog pacova i KMNP su u gelu migrirali neznatno brže u poređenju sa proteinima tkiva srca čoveka što se može pripisati razlici u dužini proteina Ankrd2/ANKRD2

između ove dve vrste. U srcu odraslog pacova protein od 50 kDa predstavlja dominantnu formu dok je protein od oko 40 kDa detektovan nakon duže ekspozicije (Slika 16, levi panel). Ankrd2 je po prvi put detektovan u KMNP i profil njegove ekspresije je bio identičan profilu u tkivu čoveka. Dodatna kontrola ovog eksperimenta je detekcija Ankrd1 u KMNP i srcu čoveka anti-ANKRD1 antitelom (u razblaženju 1:300) (Slika 16, panel desno). Ankrd1 je detektovan u oba ekstrakta i nije primećena razlika u migraciji, što je u skladu sa identičnom veličinom Ankrd1 čoveka i pacova od 319 ak.

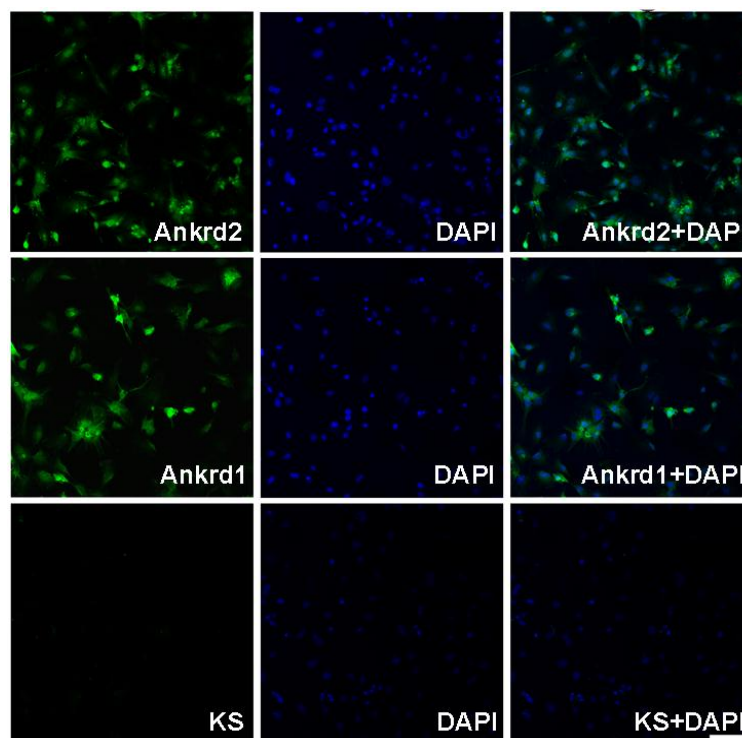
Ovim eksperimentom smo definisali status endogenog Ankrd2 u KMNP, uporedili ga sa profilom u srcu čoveka i adultnog pacova i uspostavili sistem za njegovu detekciju.

#### **4.3.2. Lokalizacija endogenog i egzogenog Ankrd2 u kardiomiocitima neonatalnih pacova**

##### ***Lokalizacija endogenog Ankrd2 u KMNP***

U cilju određivanja lokalizacije endogenog Ankrd2 u KMNP, ćelije su gajene na pokrovnim staklima obloženim kolagenom. Posle 24 sata ćelije su fiksirane i urađena je imunocitohemijska analiza koristeći primarna anti-ANKRD2 i anti-ANKRD1 antitela (u razblaženju 1:100) i sekundarno antitelo konjugovano sa fluoroforom Alexa Fluor-488. Približno isti broj kardiomiocita prikazanih na Slici 17, eksprimira proteine Ankrd2 i Ankrd1.



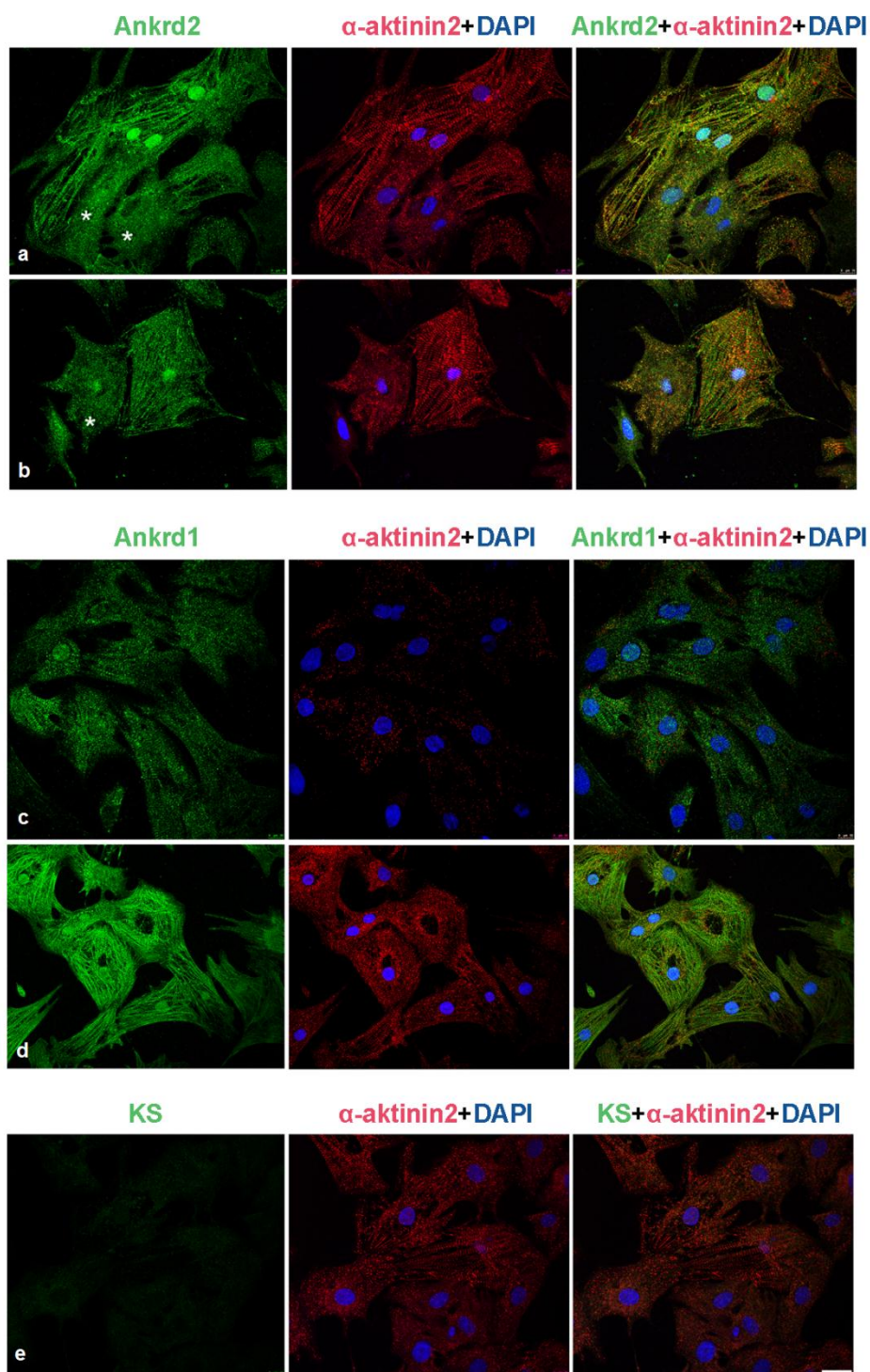


**Slika 17. Detekcija Ankrd2 i Ankrd1 u KMNP.** Preimuni serum miša je korišćen kao negativna kontrola (KS- kontrolni serum), dok su jedra detektovana bojom DAPI. Kardiomiociti su slikani pod malim uveličanjem koristeći objektiv Fluotar 20x/0.50. Linija razmere odgovara dužini od 100  $\mu\text{m}$ .

U narednom eksperimentu identifikovane su strukture kardiomiocita u kojima je lokalizovan Ankrd2. Takođe je ispitivana i njegova distribucija u zavisnosti od stepena maturacije kardiomiocita. Stoga je uporedo detektovan i  $\alpha$ -aktinin 2 koji je lokalizovan u Z-disku sarkomere i pokazatelj je zrelosti mišićne ćelije. U nezrelim kardiomiocitima sarkomera nije u potpunosti formirana pa signal  $\alpha$ -aktinina 2 ne prati karakterističnu strijaciju zrele ćelije.  $\alpha$ -aktinin 2 je detektovan primarnim antitelom razblaženim 250 puta i sekundarnim antitelom konjugovanim sa Alexa Fluor-594 fluoroforom (razblaženje 1:250).

U poređenju sa Ankrd1, koji je lokalizovan u citoplazmi i jedru (Slika 18, c i d), Ankrd2 pokazuje sličnu lokalizaciju, nezavisno od statusa maturacije kardiomiocita (Slika 18, a i b). Jedarni signal Ankrd2 je bio dosta izraženiji u zrelim kardiomiocitima. U citoplazmi nezrelih KMNP signal za Ankrd2 je difuzan i neuređen (Slika 18, paneli a i b, ćelije obeležene zvezdicom), dok je u zrelim KMNP pratio strijaciju sarkomere.





**Slika 18. Unutarćelijska lokalizacija proteina Ankrd2 (a i b) i Ankrd1 (c i d) u KMNP.** Nezreli KMNP, u kojima  $\alpha$ -aktinin 2 ne pokazuje jasnu strijaciju su obeleženi belom zvezdicom. Kao negativna kontrola je korišćen preimuni serum miša (KS, panel e). Jedra su detektovana bojom DAPI. Slikano na konfokalnom mikroskopu objektivom Apo 63x/1.40 sa uljnom imerzijom. Linija razmere odgovara dužini od 20  $\mu$ m.

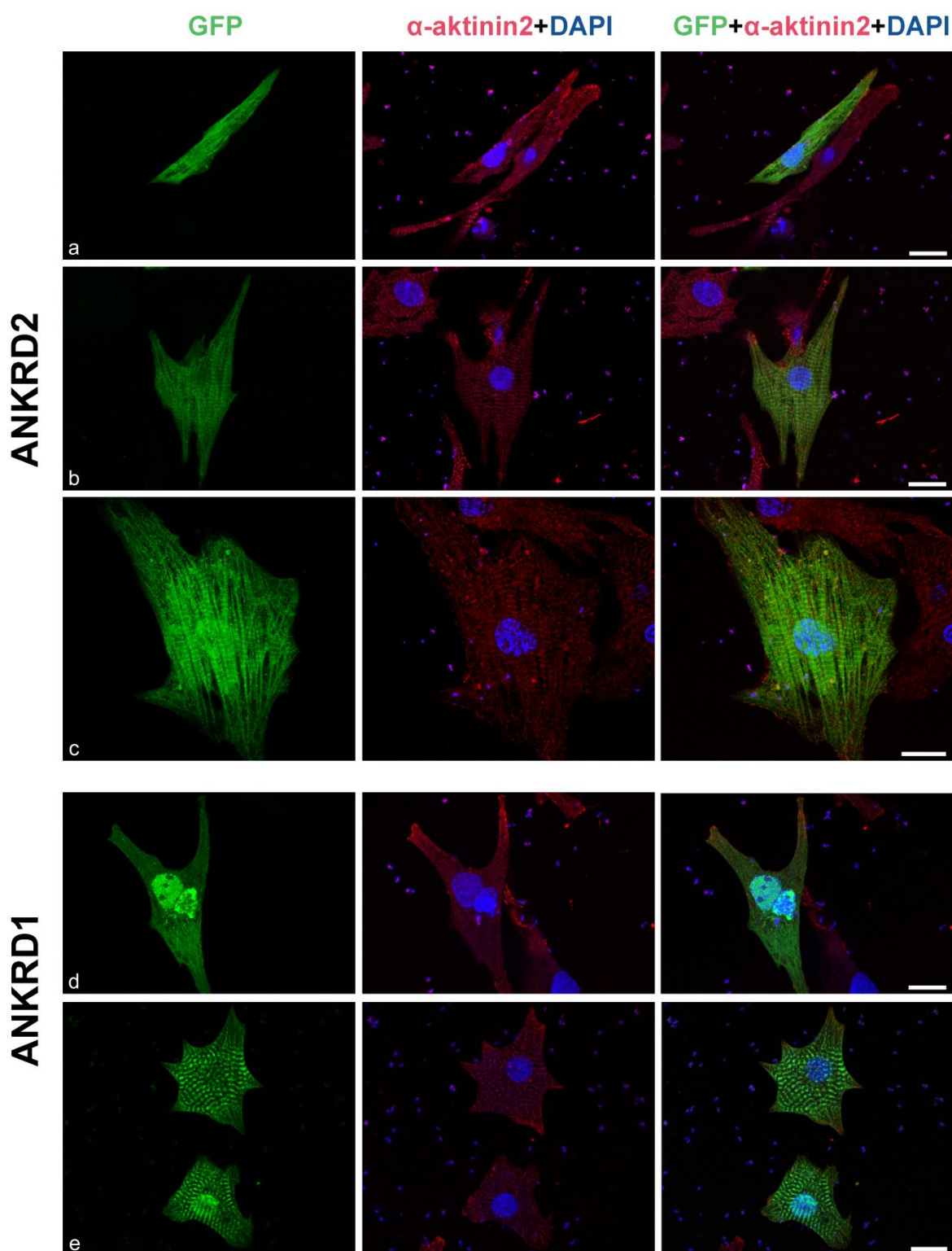
Dualna lokalizacija Ankrd2 u KMNP se poklapa sa već utvrđenim profilom u humanim kardiomiocitima.

### ***Lokalizacija egzogenog ANKRD2 u KMNP***

S obzirom da KMNP eksprimiraju endogeni Ankrd2, postavlja se pitanje da li će i gde biti lokalizovan homologni i overeksprimirani protein čoveka.

Stoga su KMNP transfekovani konstruktima sa kojih se eksprimiraju humani ANKRD2 i ANKRD1 (korišćen kao pozitivna kontrola) fuzionisani sa GFP. Efikasnost transfekcije KMNP reagensom Lipofectamine 2000 je iznosila oko 15%. Dan posle transfekcije, ćelije su fiksirane i inkubirane sa primarnim antitelom na  $\alpha$ -aktinin 2 (razblaženje 1:250) a zatim sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa fluoroforom Alexa Fluor-594 (razblaženje 1:250).  $\alpha$ -aktinin 2 (crveni signal na Slici 19) je korišćen kao indikator zrelosti kardiomiocita. U većini transfekovanih nezrelih KMNP protein ANKRD2 je bio lokalizovan u jedru i citoplazmi, u kojoj je signal bio ravnomerno i difuzno raspoređen (Slika 19a). U zrelih kardiomiocitima signal je dominirao u citoplazmi i poklapao se sa strijacijom sarkomere (Slika 19b), dok je jedarni ANKRD2 detektovan u malom broju ćelija (Slika 19c).

Sa druge strane, protein ANKRD1 je preferencijalno bio lokalizovan u jedru nezrelih (Slika 19d) i zrelih (Slika 19e), kao i u sarkomeri zrelih kardiomiocita (Slika 19e).

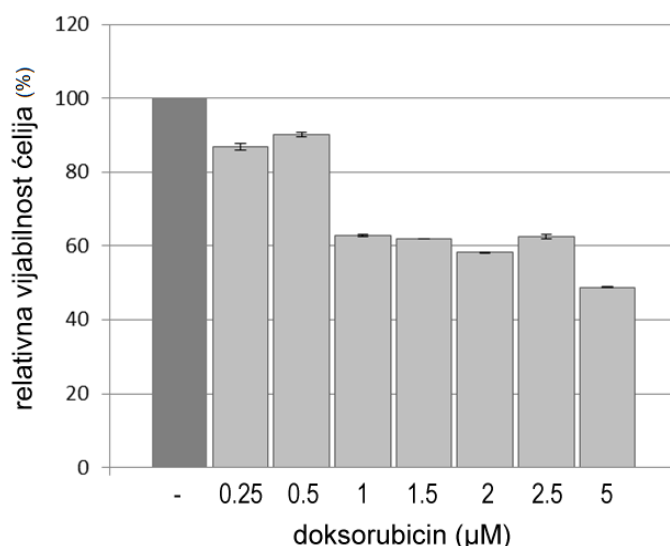


Slika 19. Unutarćelijska lokalizacija egzogeno eksprimiranih proteina ANKRD2-GFP (a, b i c) i ANKRD1-GFP (d i e) u KMNP. GFP- zeleni signal,  $\alpha$ -aktinin 2- crveni signal. Jedra su detektovana bojom DAPI - plavi signal. Linija razmere odgovara dužini od 15  $\mu$ m.

### 4.3.3. Uticaj doksorubicina na ekspresiju Ankrd2 u kardiomiocitima neonatalnih pacova

Protein Ankrd1 je transkripcioni regulator u srcu i njegova ekspresija je izuzetno osetljiva na hemoterapeutik doksorubicin. Nivo iRNK (Jeyaseelan et al. 1997) i proteina (Chen et al. 2012) drastično opadaju pod dejstvom ovog kardiotoksičnog agensa. Ovo je bio razlog da se testira efekat doksorubicina na ekspresiju proteina Ankrd2 u kardiomiocitima.

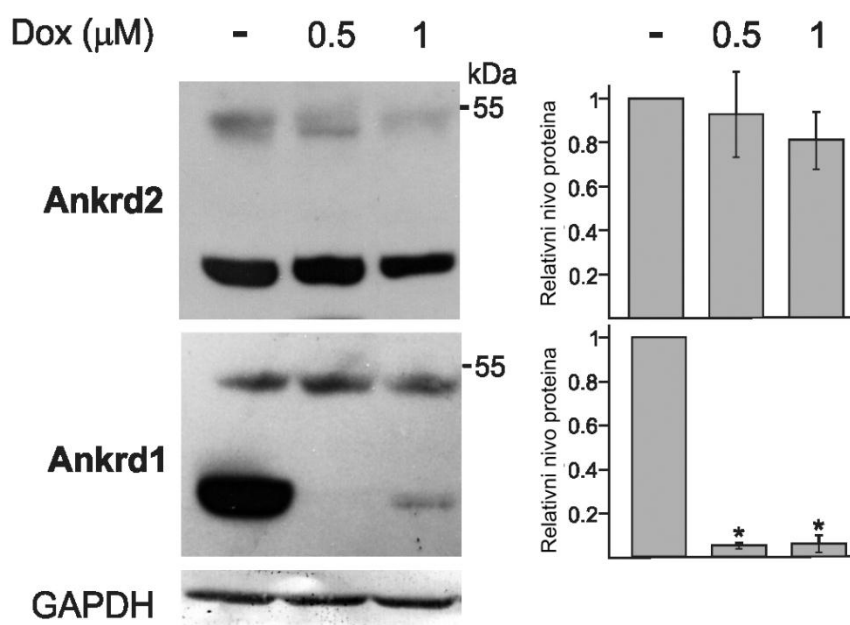
Inicijalno, MTT testom su determinisane koncentracije doksorubicina kojima će biti tretirani kardiomiociti. KMNP su gajeni 24 sata u prisustvu doksorubicina u koncentracijama od 0,25-5  $\mu\text{M}$ . Procenat preživelih ćelija je prikazan na histogramu (Slika 20). Vijabilnost KMNP je bila snižena za 15% pri koncentracijama doksorubicina od 0,25 i 0,5  $\mu\text{M}$ . Dalje povećanje koncentracije doksorubicina na 1  $\mu\text{M}$  dovelo je do smanjenja broja tretiranih ćelija na 60% od početnog broja ćelija. Tretmani većim koncentracijama doksorubicina (1,5, 2 i 2,5  $\mu\text{M}$ ) nisu rezultirali daljim smanjenjem preživljavanja ćelija, dok je vijabilnost pala na oko 50% pri tretmanu sa 5  $\mu\text{M}$  doksorubicinom (Slika 20).



**Slika 20. Uticaj doksorubicina na vijabilnost KMNP.** Vijabilnost ćelija tretiranih 24 h različitim koncentracijama doksorubicina je određena MTT testom. Rezultati su predstavljeni kao procenat preživelih ćelija u odnosu na ukupan broj netretiranih ćelija kome je arbitrarno pridružena vrednost od 100%. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD tehničkih triplikata dva nezavisna eksperimenta.

Za analizu efekta doksorubicina na ekspresiju proteina Ankrd2 u KMNP izabrali smo koncentracije od 0,5 i 1  $\mu\text{M}$  koje su dovele do smanjenja broja preživelih ćelija za oko 15%, odnosno oko 40%. Ove doze doksorubicina nisu imale izrazit citotoksični efekat i nisu dovele do umiranja više od 50% ćelija u odnosu na kontrolu. Osim toga, iz literature je poznato da tretman KMNP 0,5  $\mu\text{M}$  doksorubicinom dovodi do potpune inhibicije ekspresije Ankrd1 (Chen et al. 2012).

Ankrd2 je detektovan u KMNP tretiranim 0,5 i 1  $\mu\text{M}$  doksorubicinom u trajanju od 24 sata, metodom western blot (Slika 21). Primarno antitelo za detekciju ovog proteina je bilo razblaženo 300 puta. GAPDH je korišćen kao kontrola količine analiziranih proteina, pošto doksorubicin nema uticaj na njegovu transkripciju, kao ni na transkripciju drugih gena kućepazitelja (Kurabayashi et al. 1993).



**Slika 21. Uticaj doksorubicina (Dox) na ekspresiju proteina Ankrd2 u KMNP.** Levi paneli prikazuju western blot detekciju proteina Ankrd2 i Ankrd1 u KMNP tretiranim 24 sata doksorubicinom u koncentracijama od 0.5 i 1  $\mu\text{M}$ . GAPDH je korišćen kao kontrola količine nanetih proteina. Panel desno: Kvantifikacija ekspresije proteina izražena u odnosu na netretirane ćelije. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  SD iz četiri nezavisna eksperimenta. Relativne vrednosti su upoređene u Studentovom t-testu i vrednosti za koje je  $p \leq 0.01$  su predstavljene zvezdicom (\*).

Imunoreaktivni signali western blot analize su digitalizovani i kvantifikovani pomoću kompjuterskog programa Image J, i normalizovani su na vrednosti signala za GAPDH. Količina proteina u ćelijama koje su tretirane doksorubicinom je izražena u odnosu na količinu proteina u netretiranim ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 1. Doksorubicin ne utiče na nivo proteina Ankrd2 u tretiranim ćelijama u poređenju sa netretiranim. Efikasnost tretmana je potvrđena značajnim smanjenjem nivoa ekspresije proteina Ankrd1 (Slika 21).

#### **4.4. Karakterizacija izoformi proteina ANKRD2**

U cilju karakterizacije izoformi ANKRD2 ispitivana je njihova ekspresija i unutarćelijska lokalizacija u skeletnim mišićima i srcu čoveka, kao i mehanizam njihove regulacije. Radi preliminarne karakterizacije izoformi u procesu miogeneze, analizirana je i njihova ekspresija i lokalizacija u primarnim mioblastima i miotubama čoveka.

##### **4.4.1. Ekspresija izoformi ANKRD2 u srcu i skeletnim mišićima čoveka**

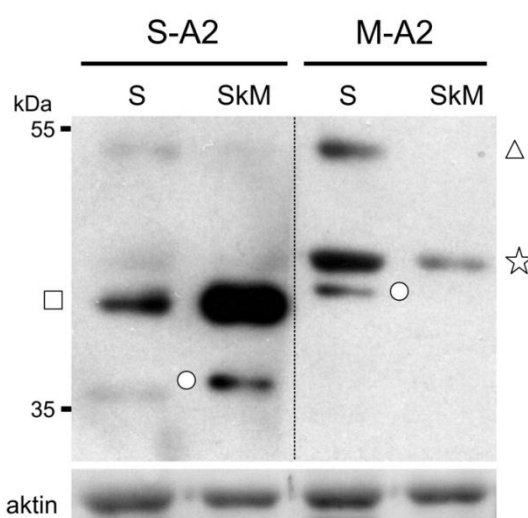
###### **Ekspresija izoformi ANKRD2 na proteinskom nivou**

Izoforme su specifično detektovane antitelima anti-M-ANKRD2, kojim mogu da se detektuju duže izoforme, i anti-S-ANKRD2, koje prepoznaje sve tri izoforme proteina ANKRD2 (Slika 8).

Izoforme ANKRD2 su detektovane u skeletnim mišićima i srcu čoveka western blot analizom. Korišćeni su komercijalno dostupan proteinski ekstrakt mišića i ekstrakt kadaveričnog srca subjekta 3 (Tabela 2). Imunodetekcija je rađena primarnim anti-S-ANKRD2 i anti-M-ANKRD2 antitelima u razblaženju 1:300 i sekundarnim antitelom u razblaženju 1: 80 000.

S-ANKRD2 je detektovan i u skeletnim mišićima i u srcu (Slika 22, traka obeležena kvadratom), s tim da je signal bio jači u skeletnim mišićima. M-ANKRD2 je

takođe detektovan u oba tkiva, ali je signal ovog puta bio jači u srcu (traka obeležena zvezdom). Osim specifičnim antitelima, diskriminacija S i M izoformi je postignuta i adekvatnim uslovima elektroforeze proteina koji se razlikuju za 27 ak. Veoma slab signal koji odgovara M izoformi je detektovan u oba tkiva i antitelom S-ANKRD2. Slab signal se može objasniti nejednakim afinitetom ovog antitela za različite izoforme, čime je olakšana njihova diskriminacija. Trake obeležene krugovima najverovatnije odgovaraju produktima degradacije. Identitet trake detektovane na nivou od ~50 kDa (obeležene trouglom) nije mogao biti sa sigurnošću utvrđen u ovom eksperimentu.

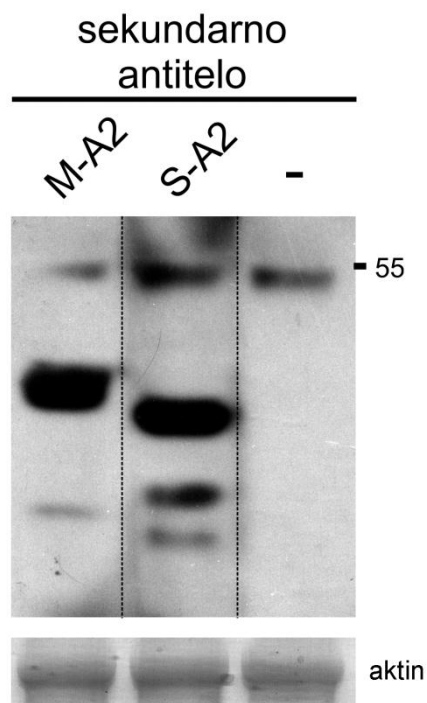


**Slika 22. Detekcija izoformi M- i S-ANKRD2 u srcu i skeletnom mišiću čoveka.** Metodom western blot su analizirani proteinski ekstrakti tkiva srca subjekta 3 (S) i komercijalnog ekstrakta skeletnih mišića čoveka (SkM). Aktin je korišćen kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima i detektovan je bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera. Brojevi odgovaraju molekulskim težinama proteina markera u kDa.

Postojala je mogućnost da je protein molekulske težine od oko 50 kDa detektovan u prethodnom eksperimentu (Slika 22, traka obeležena trouglom) ustvari L-ANKRD2. Međutim specifičnost ovog proteina je dovedena u pitanje jer je slična traka detektovana i antitelom na ANKRD1 (Slika 12). Zato smo western blot analizu proteina izolovanih iz srca subjekta 3 uradili koristeći samo sekundarno antitelo (Slika 23, uzorak -), dok su kontrolni uzorci tretirani i primarnim i sekundarnim antitelima. Traka koja odgovara proteinu molekulske težine od oko 50 kDa je detektovana u slučaju kada



je membrana inkubirana samo sa sekundarnim antitelom, na osnovu čega je zaključeno da je nespecifična i da nepoznati protein ne predstavlja L-ANKRD2.

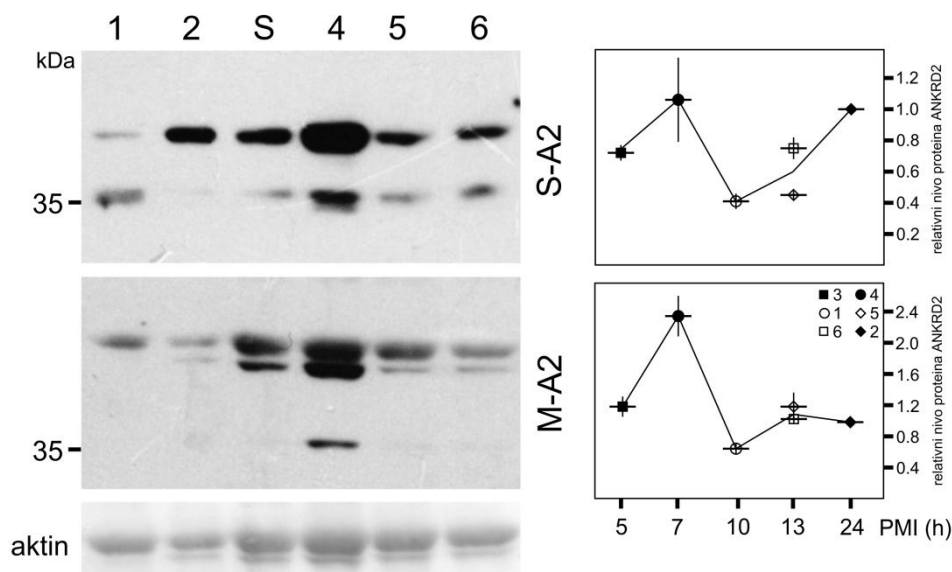


**Slika 23. Protein molekulske težine od 50 kDa ne predstavlja specifičnu L izoformu ANKRD2.** Proteinski ekstrakt srca subjekta 3 je analiziran western blot metodom sa (M-A2 i S-A2) i bez (-) primarnog antitela Aktin je korišćen kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima i detektovan je bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera. Broj odgovara molekulske težini proteina markera u kDa.

Ovi rezultati pokazuju ekspresiju i nejednaku distribuciju S- i M- izoformi proteina ANKRD2 u tkivu srca i skeletnih mišića čoveka. S-ANKRD2 je zastupljenija u skeletnom mišiću, dok je M-ANKRD2 dominantnija u srcu.

Da bismo isključili mogućnost da je ekspresioni profil izoformi proteina ANKRD2, prikazan na Slici 22, specifičan za analizirani subjekat, proteinski ekstrakti kadaveričnih srca pet subjekata (Slika 24) i skeletnih mišića dva subjekta (Slika 26) su analizirani metodom western blot.

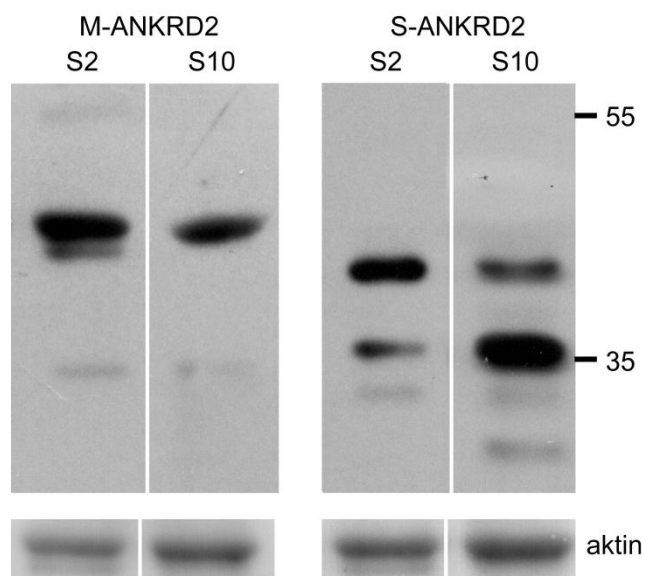




**Slika 24. Ekspresija izoformi ANKRD2 u tkivu srca nekoliko subjekata.** Izoforme su detektovane primarnim antitelima na S-ANKRD2 (S-A2) i M-ANKRD2 (M-A2) koja su razblažena 300 puta. Proteini su detektovani u uzorcima srca subjekata 1, 2, 4-6 (Tabela 2) pri čemu je srce subjekta 3 (S) korišćeno kao pozitivna kontrola za poređenje. Intenzitet signala iz tri nezavisna eksperimenta kvantifikovan je denzitometrijski. Rezultati analize korelacije nivoa ekspresije proteina sa postmortem intervalom su predstavljeni grafički na panelima desno. Aktin je korišćen je kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima i detektovan je bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera. Brojevi odgovaraju molekulskim težinama proteina markera u kDa.

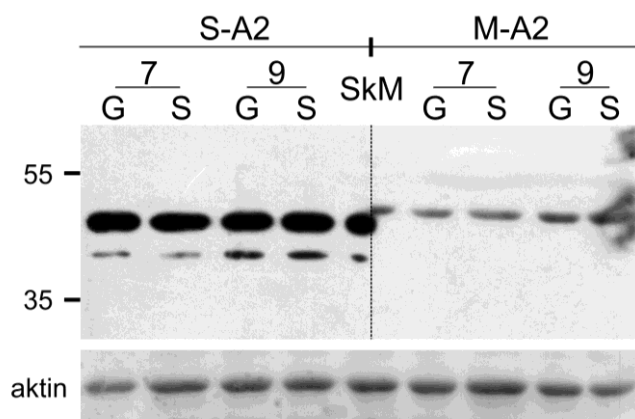
Kod svih analiziranih subjekata se uočavaju identični profili traka za obe izoforme u srcu koji se poklapaju sa profilima kontrolnih uzoraka (Slika 24). Međutim, uočene su razlike u nivou ekspresije kod različitih uzoraka koje se mogu pripisati različitom stepenu degradacije proteina u kadaveričnim tkivima u zavisnosti od vremena koje je proteklo od smrti do autopsije i uzorkovanja (PMI). Zbog toga su intenziteti signala detektovanih metodom western blot, direktno proporcionalni količini proteina ANKRD2 u uzorku, kvantifikovani denzitometrijski, normalizovani na vrednost signala u tkivu sa najdužim PMI (uzorak 2, PMI=24 sata) i prikazani grafički u funkciji PMI (Slika 24, paneli desno). Zatim je statističkim metodama ispitano postojanje korelacije između intenziteta signala i PMI. Stepen korelacije je utvrđen na dva načina: jednofaktorskom analizom varijansi ANOVA uz korekciju rezultata testom Scheffe post hoc, kao i izračunavanjem koeficijenta korelacije. Rezultati obe analize su pokazali da nema značajne korelacije između količine izoformi u srcu i PMI.

Za razliku od M-ANKRD2, detektovana je značajna degradacija izoforme S-ANKRD2 u uzorku S10 za koji je PMI procenjen na 96-108 sata. Profil ovog uzorka je poređen sa profilom ekspresije izoformi subjekta S2 (PMI=24 sata) (Slika 25).



**Slika 25. Degradacija ANKRD2 u kadaveričnom srcu subjekta S10 sa 96h<PMI<108h.** Poređeni su profili ekspresije izoformi ANKRD2 S10 i S2 (PMI=24h). Aktin je korišćen je kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima i detektovan je bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera. Brojevi odgovaraju molekulskim težinama proteina markera u kDa.

Na Slici 26 su prikazani rezultati western blot detekcije izoformi S- i M-ANKRD2 u dva skeletna mišića – *m. gastrocnemius* i *m. soleus*, subjekata 7 i 9. Profili detektovanih traka su bili identični, a nivoi ekspresije vrlo ujednačeni. Ovim eksperimentom je potvrđeno da je ekspresija izoforme S-ANKRD2 dominantna u skeletnim mišićima u odnosu na M-ANKRD2.



**Slika 26. Ekspresija izoformi proteina ANKRD2 u skeletnim mišićima čoveka.** Proteinski ekstrakti mišića *m. gastrocnemius* (G) i *m. soleus* (S) subjekata 7 i 9 su inkubirani sa primarnim antitelom na S-ANKRD2 (S-A2) i M-ANKRD2 (M-A2) (razblaženja 1:300). Komercijalni proteinski ekstrakt mišića čoveka (SkM) je korišćen kao pozitivna kontrola. Aktin je korišćen je kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima i detektovan je bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera. Brojevi odgovaraju molekulskim težinama proteina markera u kDa.

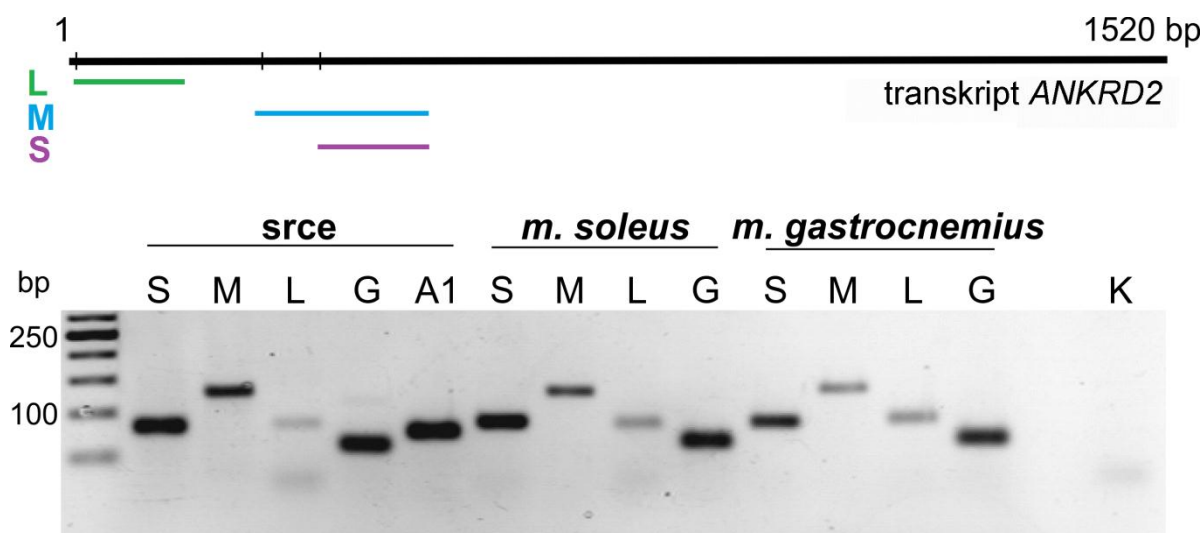
### Ekspresija izoformi ANKRD2 na nivou RNK

Na osnovu pretpostavke Miller i saradnika da izoforme proteina ANKRD2 predstavljaju produkte translacije jedne iRNK sa tri alternativna start kodona (Miller et al. 2003), dizajnirali smo tri para graničnika koja umnožavaju različite regione transkripta. Jedan par graničnika je umnožavao region od 155 baznih parova (bp) koji je prisutan u kodirajućem regionu sve tri izoforme. Drugim parom graničnika je umnožavan amplikon od 241 bp koji sadrži sekvencu prisutnu u dužim izoformama i uzvodni ATG kodon M-izoforme, dok je amplikon od 154 bp dobijen trećim parom graničnika umnožavan sa dela transkripta koji kodira amino-kraj L-ANKRD2. Položaj amplikona unutar transkripta *ANKRD2* (NM\_020349.3, 1520 bp) je šematski prikazan na gornjem panelu Slike 27.

Iz srca subjekta 3, kao i mišića *m. gastrocnemius* i *m. soleus* subjekta 8 izolovana je ukupna RNK koja je korišćena kao matrica za sintezu cDNK metodom reverzne transkripcije. Nakon toga su reakcijom PCR umnožavana tri specifična fragmenta locirana u različitim regionima prvog egzona *ANKRD2* koja su obuhvatala po

jedan od tri alternativna start kodona. Produkti reakcije PCR su razdvajani elektroforezom na agaroznom gelu i rezultati su prikazani na Slici 27. Kao kontrola kvaliteta RNK i sintetisane cDNK u srcu umnožen je deo transkripata gena *ANKRD1*, dok je *GAPDH* upotrebljen kao pozitivna kontrola u svim analiziranim tkivima.

Sva tri fragmenta su umnožena sa cDNK poreklom iz srca i skeletnih mišića. Najjači signali su dobijeni za amplikon *S-ANKRD2* u uzorcima sva tri mišića. Nešto slabiji signali su detektovani za *M-ANKRD2*, dok je signal za *L-ANKRD2* bio najslabiji.



**Slika 27. Detekcija amplikona S-, M- i L-*ANKRD2* (S, M, L) u skeletnim mišićima i srcu čoveka.** Šematski prikaz transkripta *ANKRD2* dugačkog 1520 bp (NM\_020349.3) i pozicije amplikona. Vertikalnim linijama su označena tri alternativna start kodona. Fragmenti su umnoženi sa cDNK srca i skeletnih mišića (*m. gastrocnemius* i *m. soleus*). *ANKRD1* (A1) i *GAPDH* (G) su umnožavani kao pozitivne kontrole. Negativna kontrola je reakciona smeša koja ne sadrži DNK matricu- K.

Dobijeni rezultati potvrđuju rezultate western blot analize da su izoforme S- i M-*ANKRD2* eksprimirane u poprečno prugastim mišićima čoveka a intenzitet signala amplikona ukazuje da S-*ANKRD2* predstavlja dominantnu izoformu.

Semikvantitativna analiza ekspresije transkripta *ANKRD2* metodom RT-PCR nije potvrdila hipotezu Miler i saradnika (2003). U slučaju da su izoforme translatirane

sa jedne iRNK očekivala bi se približno ista količina različitih amplikona u jednom uzorku. S obzirom da su različiti fragmenti amplifikovani u različitim količinama, ovi rezultati ukazuju na prisustvo više od jedne iRNK. Zbog toga je urađena precizna kvantifikacija amplikona *S*-, *M*- i *L-ANKRD2* metodom qRT-PCR.

Iz tkiva srca tri subjekta (3, 4 i 6), kao i iz tkiva mišića *m. gastrocnemius* i *m. soleus* dva subjekta (7 i 8) je izolovana ukupna RNK. cDNK, sintetisana iz 1 µg RNK je upotrebljena kao matrica za amplifikaciju fragmenata transkripta *ANKRD2*. Rezultati su normalizovani na vrednost dobijenu za *GAPDH* i prikazani u Tabeli 9. Vrednosti za *S-ANKRD2* u svim ispitivanim tkivima su bile veće od onih dobijenih za *M-ANKRD2*. Pošto je amplikon *L-ANKRD2* bio na granici detektabilnosti ( $Ct > 30$ ) i nije detektovan na proteinskom nivou, isključen je iz narednih analiza.

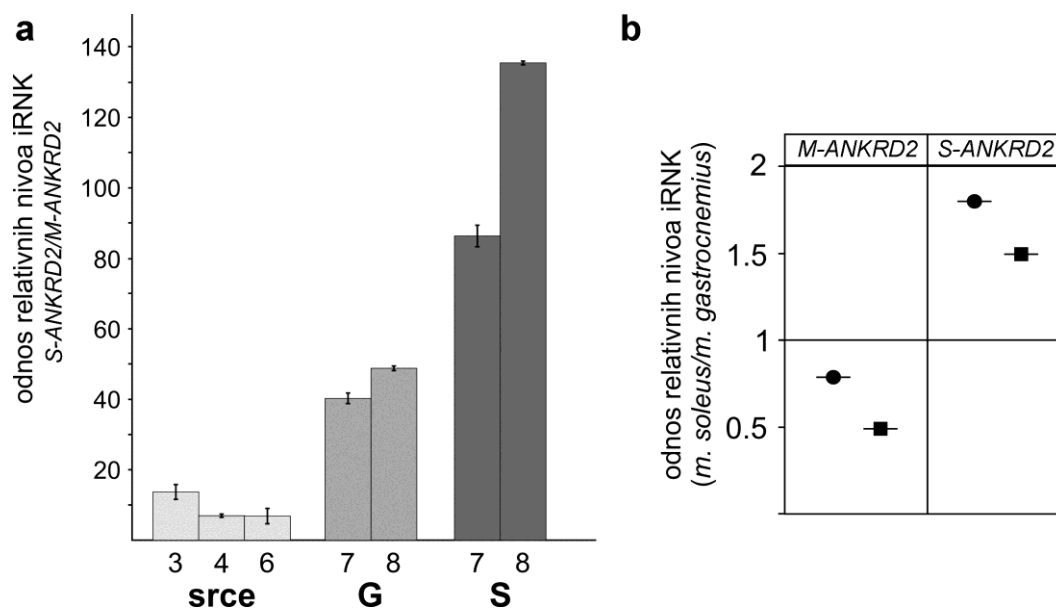
**Tabela 9. Relativni nivoi amplikona različitih regiona transkripta *ANKRD2* normalizovani na *GAPDH* i izraženi kao  $2^{-\Delta Ct} \times 1000$ . Zatamnjeni brojevi predstavljaju subjekte opisane u Tabeli 2.**

	SRCE			SKELETNI MIŠIĆ			
				<i>m. gastrocnemius</i>		<i>m. soleus</i>	
	3	4	6	7	8	7	8
<i>S-ANKRD2</i>	41,58	97,06	49,62	167,47	32,71	245,16	59,46
<i>M-ANKRD2</i>	3,07	14,03	7,26	3,47	0,82	1,82	0,69

Na osnovu različitog broja S i M amplikona zaključili smo da se izoforme S- i M-*ANKRD2* ne prepisuju sa jedne iRNK jer bi u tom slučaju njihov broj bio sličan. Broj dobijen za amplikon S predstavlja zbir iRNK za obe izoforme, dok broj amplikona M oslikava broj iRNK za dužu izoformu. Pošto je broj amplikona M mnogo manji u odnosu na broj amplikona S u svakom pojedinačnom uzorku, amplikoni S i M su poistovećeni sa pojedinačnim transkriptima za svaku izoformu.

Zbog izraženih varijacija u vrednostima za iste amplikone kod različitih subjekata, rezultati kvantifikacije su prikazani za svaki subjekt pojedinačno. Na Slici 28a rezultati su izraženi kao odnos između nivoa ekspresije transkripata S- i M-*ANKRD2* u svakom tkivu. U srcu je *S-ANKRD2* bio 6,5-13,5 puta više eksprimiran u odnosu na *M-ANKRD2*. Sa druge strane, odnos njihove ekspresije u skeletnim mišićima

je bio mnogo veći i zavisao od tipa mišića. U brzom mišiću (*m. gastrocnemius*) je odnos između transkripata bio 29,8 za subjekat 7 i 48,2 za subjekat 8. U sporom mišiću *m. soleus* ovaj odnos je iznosio 86,0 i 134,8 za subjekte 7 i 8. Ovako predstavljeni rezultati potvrđuju dominantno prisustvo *S-ANKRD2* i u srcu i u skeletnim mišićima.



**Slika 28. Analiza ekspresije transkripata *ANKRD2* u srcu i skeletnim mišićima.** Nivo ekspresije *S-* i *M-ANKRD2* je kvantifikovan u srcu subjekata 3, 4 i 6, kao i u mišićima *m. gastrocnemius* (G) i *m. soleus* (S) subjekata 7 i 8. **a-** Relativni nivoi ekspresije *S-ANKRD2* u odnosu na *M-ANKRD2*. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD tehničkih triplikata. **b-** Odnos relativnih nivoa ekspresije transkripata *ANKRD2* u različitim tipovima skeletnih mišića. Crni kružić predstavlja subjekat 7 a crni kvadratić subjekat 8.

Ovim eksperimentom je utvrđen i različit odnos relativnih nivoa ekspresije pojedinačnih transkripata između sporih i brzih mišića u istom subjektu (Slika 28b). Vrednost je iznosila  $<1$  za *M-ANKRD2* što ukazuje da je ovaj transkript više ekspimiran u mišiću u kojem dominiraju brza vlakna. Transkripata *S-ANKRD2* je bilo više u sporom mišiću.

Prikazani rezultati ukazuju na postojanje različitih iRNK sa kojih se vrši translacija izoformi ANKRD2 i da je transkript *M-ANKRD2* manje eksprimiran u odnosu na *S-ANKRD2*.

#### 4.4.2. Unutarćelijska lokalizacija izoformi ANKRD2 u srcu i skeletnim mišićima

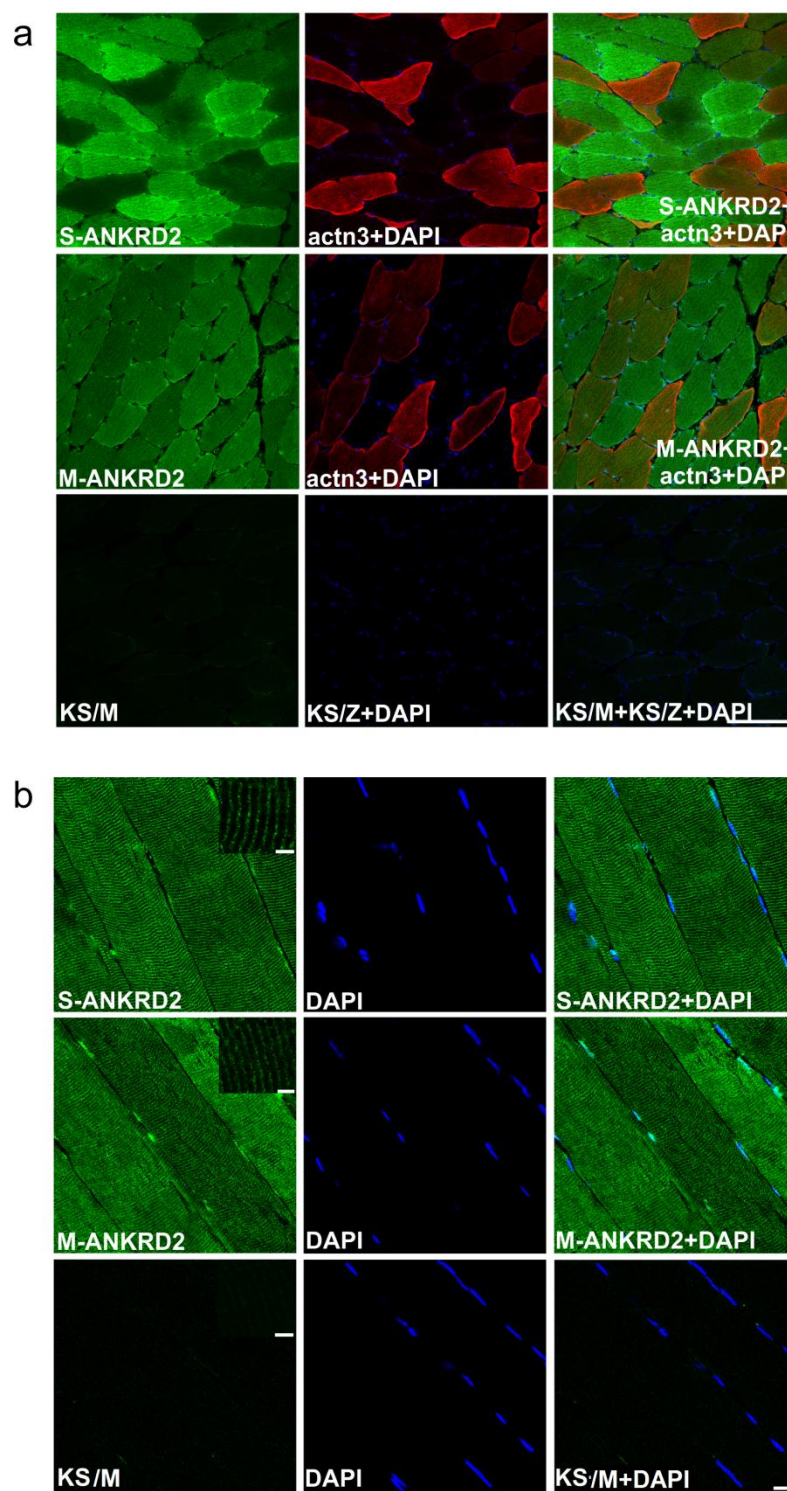
##### *Lokalizacija izoformi u skeletnim mišićima*

U miocitima skeletnih mišića protein ANKRD2 je lokalizovan u citoplazmi/sarkomeri i jedru (Ishiguro et al. 2002). Pored toga, preferencijalno je eksprimiran u sporim mišićnim vlaknima (Pallavicini et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). Da bismo utvrdili da li se ova specifična lokalizacija može pripisati različitoj distribuciji izoformi proučavanog proteina, praćena je unutarćelijska lokalizacija S- i M-ANKRD2 u skeletnim mišićima čoveka.

Na Slici 29 su prikazani rezultati imunohistohemijske analize poprečnih (a) i uzdužnih (b) preseka mišića *m. soleus*. Tip mišićnih vlakana je identifikovan detekcijom  $\alpha$ -aktinina 3 koji je specifično eksprimiran u brzim miofibrilima (Slika 29a, crveni signal). U ovom eksperimentu S-ANKRD2 je detektovan anti-C-ANKRD2 antitelom, a sekundarna antitela su bila konjugovana sa fluoroforima Alexa Fluor-488 (zeleni signal) i Alexa Fluor-594 (crveni signal).

Na poprečnim presecima, uočena je specifična lokalizacija S-ANKRD2 u sporim mišićnim vlaknima, dok je M-ANKRD2 skoro uniformno bio raspoređen u brzim i sporim vlaknima (Slika 29a). Na uzdužnim presecima, S- i M-ANKRD2 su detektovani i u sarkomeri i u jedrima (Slika 29b). Jedarni signal M-ANKRD2 je na oba tipa preseka bio istaknutiji u odnosu na S-ANKRD2.

Rezultati ove analize pokazuju da S-ANKRD2 najviše doprinosi profilu lokalizacije ANKRD2 u sporim mišićnim vlaknima. Obe izoforme su detektovane u sarkomeri, dok je lokalizacija M-ANKRD2 izraženija u jedru mišićne ćelije.

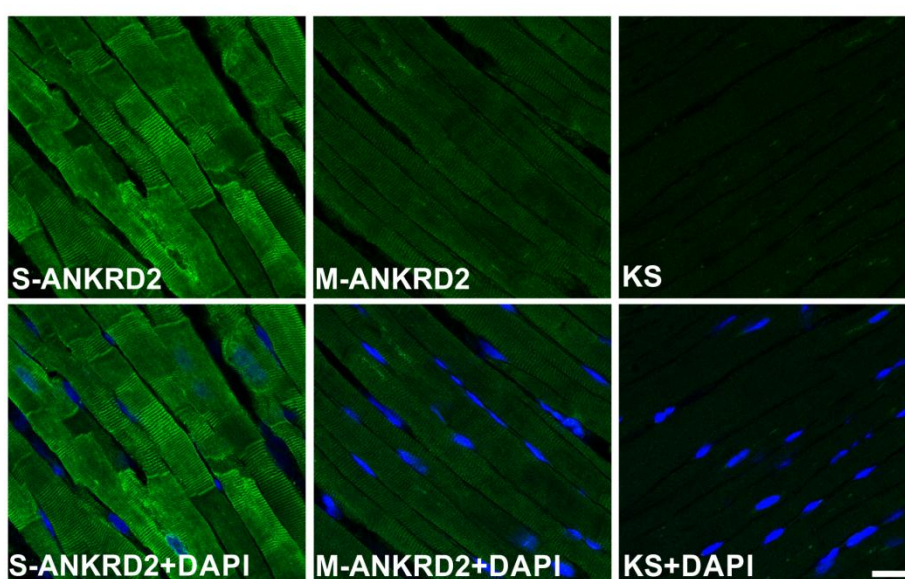


**Slika 29. Lokalizacija izoformi proteina ANKRD2 u *m. soleus* čoveka.** Poprečni (a) i uzdužni (b) preseki mišića su inkubirani sa antitelima na S- i M-ANKRD2 (zeleni signal, razblaženje 1:100) i  $\alpha$ -aktinin 3 (actn3- crveni signal, razblaženje 1:250). Kontrolni (preimuni) serum miša -KS/M i zeca -KS/Z. Jedra su detektovana bojom DAPI (plavi signal). Umetci na panelu b pokazuju uvećan detalj mišićne ćelije. Linija razmere odgovara dužini od 150  $\mu$ M (za panel a), 15  $\mu$ M (za panel b) i 5  $\mu$ M (za umetke).



### Lokalizacija izoformi u srcu

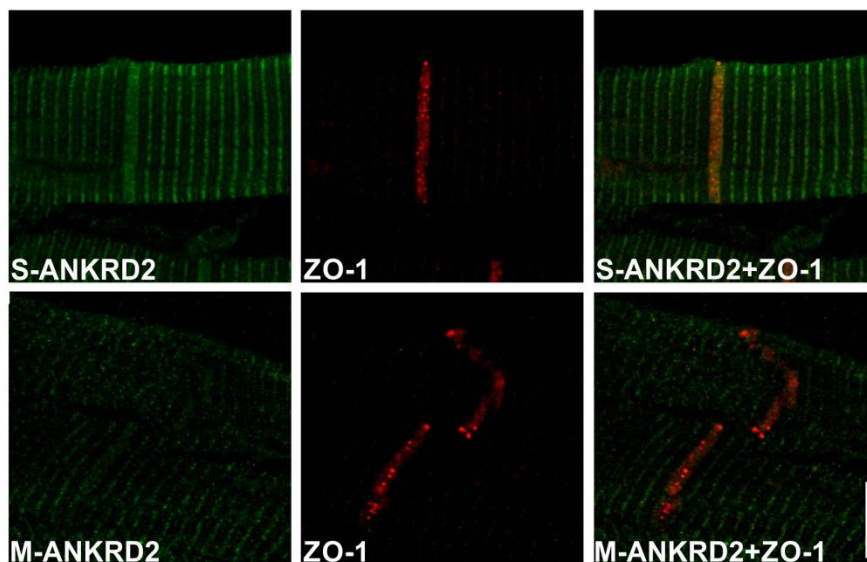
Lokalizacija izoformi ANKRD2 u tkivu srca subjekta 4 je analizirana imunohistohemijski, a rezultati su prikazani na Slici 30. Za S-ANKRD2 je karakterističan neravnomerni intenzitet signala u kardiomiocitima. Signal za M-ANKRD2 je bio uniforman, ali dosta slabiji. Obe izoforme su preferencijalno lokalizovane u sarkomeri, dok je jedarni signal bio slab i u nekim jedrima potpuno odsutan. U strukturama koje liče na IKD dominirala je S-ANKRD2 izoforma.



**Slika 30. Lokalizacija izoformi proteina ANKRD2 u srcu čoveka.** Uzdužni preseki mišića su inkubirani sa antitelima na S- i M-ANKRD2 u razblaženju 1:100 (zeleni signal). Jedra su detektovana bojom DAPI (plavi signal). Linija razmere odgovara dužini od 25  $\mu$ M.

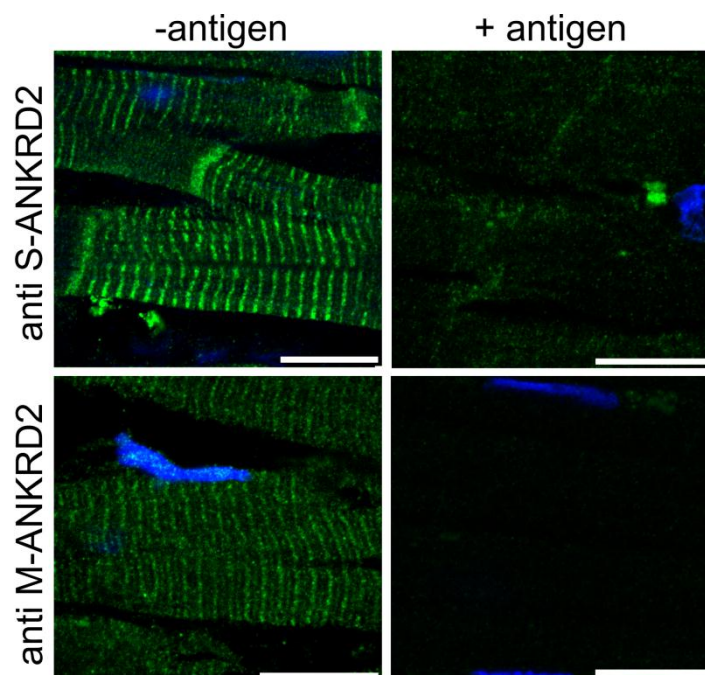
Lokalizacija izoformi ANKRD2 u IKD je detaljno analizirana kolokalizacijom sa markerom IKD, proteinom ZO-1 (eng. *tight junction protein 1/ zona occludens 1*). Primarno antitelo na ZO-1 je bilo razblaženo 50 puta. Sekundarna antitela su bila konjugovana sa fluoroforama Alexa Fluor-488 (za detekciju izoformi ANKRD2) i Alexa Fluor-594 (za detekciju ZO-1).

Signali za S-ANKRD2 i ZO-1 su se preklapali što ukazuje na njihovu kolokalizaciju. Signal za M-ANKRD2 u IKD je bio skoro nedektabilan (Slika 31).



**Slika 31. Lokalizacija izoformi ANKRD2 u IKD.** Uzdužni preseki srca su inkubirani sa antitelima na S- i M-ANKRD2 razblaženim 100 puta (zeleni signal) i ZO-1 (crveni signal). Jedra su detektovana bojom DAPI (plavi signal). Linija razmere odgovara dužini od 10  $\mu$ M.

Osim u I traci i IKD, izoforme ANKRD2 su detektovane i u strukturi koja odgovara M-traci sarkomere. Preliminarni dokaz specifičnosti ovog nalaza je potvrđen proverom antitela korišćenih za detekciju izoformi. Antitela su specifično inaktivirana inkubacijom sa odgovarajućim antigenima korišćenim za imunizaciju miševa. Na Slici 32 je prikazan rezultat histohemijske analize preseka srca na kojima su izoforme detektovane tretiranim antitelima. Odsustvo specifičnih signala kako u sarkomeri i IKD, tako i u M traci, ukazuje da je detektovana lokalizacija izoformi specifična.



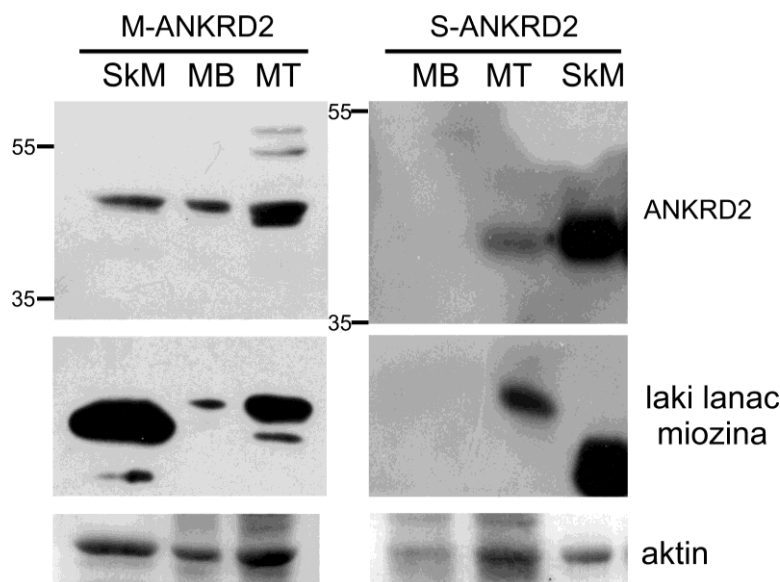
**Slika 32. Specifična lokalizacija izoformi ANKRD2 u M-traci sarkomere.** Izoforme su detektovane primarnim antitelima na S- i M- ANKRD2 (razblaženje 1:100) koja su inkubirana sa (+) ili bez (-) odgovarajućih antigena. Jedra su detektovana bojom DAPI (plavi signal). Linija razmere odgovara dužini od 15  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.3. Ekspresija izoformi ANKRD2 u mioblastima i miotubama čoveka

Pokazano je da je ekspresija proteina ANKRD2 slaba u mioblastima a zatim se postepeno povećava tokom diferencijacije mioblasta u miotube (Pallavicini et al. 2001; Kojic et al. 2004). Postavlja se pitanje koja je od izoformi odgovorna za ovakav profil ekspresije. Osim promene u nivou ekspresije, menja se i njegova unutarćelijska lokalizacija. U mioblastima je ANKRD2 lokalizovan u jedru, dok je u miotubama uniformno raspoređen u citoplazmi (Kojic et al. 2004). Stoga smo želeli da uporedimo lokalizaciju izoformi u mioblastima i miotubama sa njihovom lokalizacijom u miocitama mišićnog tkiva čoveka.

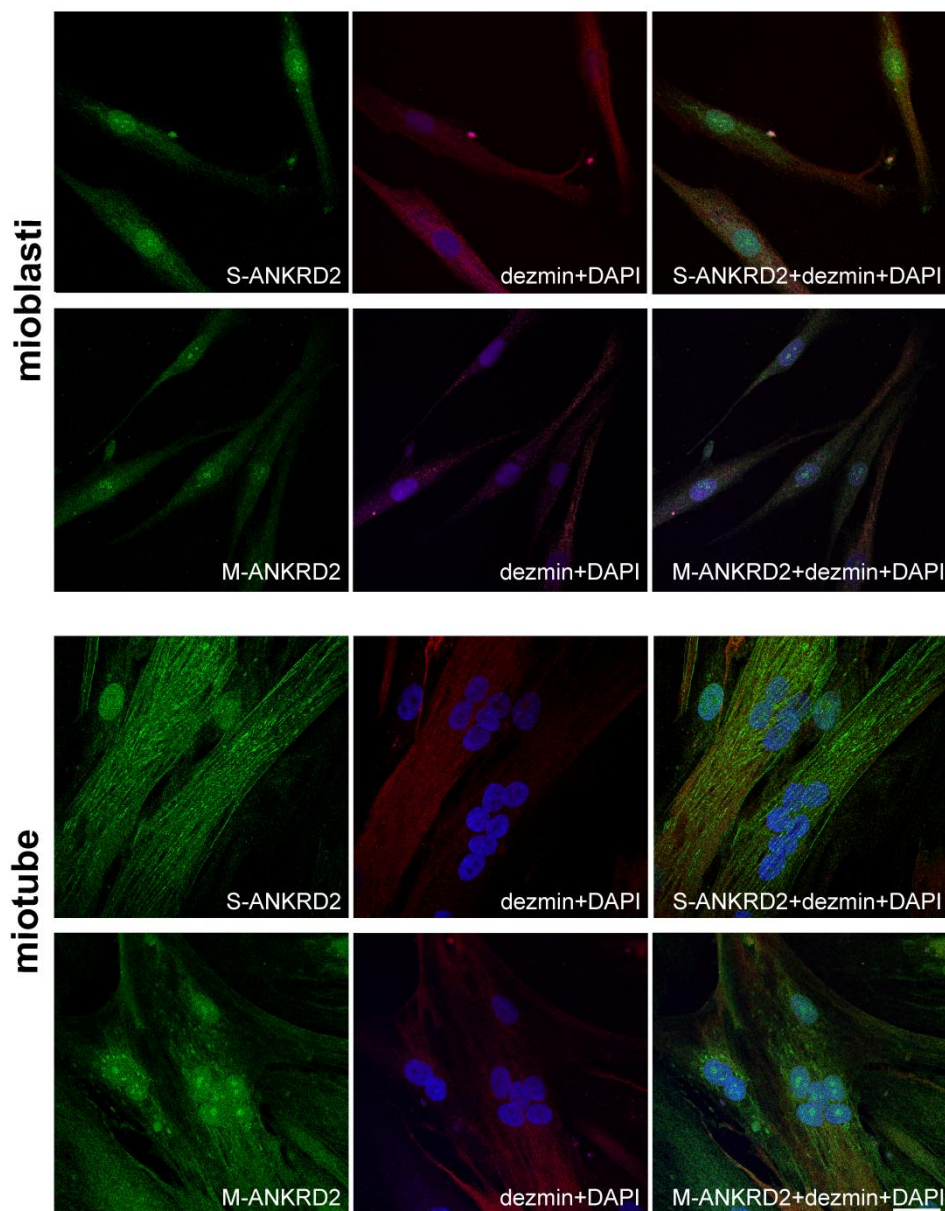
Proteinski ekstrakti primarnih mioblasta i miotuba (diferenciranih 7 dana) čoveka su analizirani metodom western blot i rezultat je prikazan na Slici 33. S-ANKRD2 je detektovan samo u miotubama, što odgovara poznatom profilu ekspresije. M-ANKRD2 je detektovan u mioblastima ali u manjoj meri nego u miotubama.

Diferencijacija je potvrđena detekcijom lakog lanca miozina (Slika 33) koji se eksprimira samo u diferenciranim mišićnim ćelijama.



**Slika 33. Western blot analiza izoformi ANKRD2 u proteinskim ekstraktima mioblasta (MB) i miotuba (MT).** Izoforme su detektovane anti-S-ANKRD2 i anti-M-ANKRD2 antitelima razblaženim 300 puta. Laki lanac miozina je upotrebljen kao marker diferencijacije. Komercijalni ekstrakt skeletnog mišića čoveka (SkM) je korišćen kao pozitivna kontrola identiteta izoformi. Aktin je korišćen je kao kontrola ujednačene količine proteina u uzorcima i detektovan je bojenjem membrane Ponso crvenim nakon transfera. Brojevi odgovaraju molekulskim težinama proteina markera u kDa.

Imunocitohemijskom analizom je utvrđena lokalizacija izoformi ANKRD2 u mioblastima i miotubama diferenciranim 3 dana (Slika 34). Za detekciju S- i M-ANKRD2 su korišćena specifična primarna antitela razblažena 100 puta i sekundarno antitelo konjugovano sa fluoroforom Alexa Fluor-488 (zeleni signal) razblaženo 500 puta. Kao marker mišićnih ćelija korišćen je dezmin (crveni signal potiče od fluorofore Alexa Fluor-594 kojom je obeleženo sekundarno antitelo). U mioblastima su i S- i M-ANKRD2 izoforme pretežno detektovane u jedru. U miotubama, za razliku od S-ANKRD2 koji je isključivo detektovan u citoplazmi, M-ANKRD2 je lokalizovan i u jedru i u citoplazmi.



**Slika 34. Lokalizacija izoformi ANKRD2 u mioblastima i miotubama čoveka.** Čelije su inkubirane sa antitelima na S- i M-ANKRD2 (zeleni signal) i desmin (crveni signal). Jedra su detektovana bojom DAPI (plavi signal). Linija razmere odgovara dužini od 25  $\mu$ M.

Ovim eksperimentima su pokazane značajne razlike u nivou ekspresije i lokalizaciji izoformi S- i M-ANKRD2 u nediferenciranim i diferenciranim mišićnim ćelijama čoveka, što se može odraziti i na njihovu funkciju tokom diferencijacije mišićne ćelije.

## *5. Diskusija*



Protein ANKRD2 je identifikovan 2001. godine (Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001) i od tada su njegova ekspresija i funkcija intenzivno proučavane u skeletnim mišićima. U ovoj tezi ANKRD2 je okarakterisan sa dva nedovoljno izučena aspekta. Određeni su profil ekspresije i lokalizacija ANKRD2 u srcu čoveka, i upoređeni su sa profilom proteina ANKRD1. ANKRD1 i ANKRD2 pripadaju istoj porodici proteina, imaju dosta strukturnih i funkcionalnih sličnosti, i ANKRD1 je isključivo eksprimiran u srcu zdravih osoba. Takođe su okarakterisane i diskriminisane izoforme proteina ANKRD2 u eksperimentalnim uslovima, čime je utvrđen njihov doprinos opštem profilu ekspresije ANKRD2 u poprečno-prugastim mišićima.

### **5.1. Analiza ANKRD2 u posmrtnim tkivima čoveka**

U ovom istraživanju su korišćeni uzorci kadaveričnog mišićnog tkiva čoveka imajući u vidu ograničenu dostupnost svežeg tkiva mišića čoveka, pogotovo srca. Iako se posmrtni uzorci humanog tkiva često koriste u biomedicinskim istraživanjima, uvek se postavlja pitanje stepena očuvanosti biomolekula. I pored toga, u brojnim studijama su prikazane uspešne analize ekspresije gena i proteina iz uzoraka izolovanih iz tkiva nakon smrti subjekata (Phang et al. 1994; Heinrich et al. 2007; Tavichakontrakool et al. 2008; Hansen et al. 2014). Na očuvanost kadaveričnih tkiva mogu uticati različiti parametri: uzrok i način smrti, vreme proteklo od smrti do analize tkiva, uslovi skladištenja i tip tkiva (Heinrich et al. 2007; Tavichakontrakool et al. 2008; Koppelkamm et al. 2010). Posebno je zahtevno izolovati kvalitetnu RNK pošto je ona vrlo osetljiv biomolekul sa kratkim polu-životom. U nekim slučajevima su uspešne analize urađene i tri dana posle smrti (Hansen et al. 2014). Značajan faktor predstavlja i skladištenje na niskoj temperaturi ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) čime se mogu odložiti promene tkiva koje nastaju posle smrti (Tavichakontrakool et al. 2008). Ako se tkivo čuva u navedenim uslovima, profil proteina skeletnih mišića može ostati nepromenjen i do 24 sata (Tavichakontrakool et al. 2008). Takođe je utvrđeno da i tip posmrtnog tkiva utiče na kvalitet nukleinskih kiselina. RNK i DNK su veoma stabilne u skeletnim mišićima, srcu

i mozgu preminulih (Phang et al. 1994; Heinrich et al. 2007; Partemi et al. 2010; González-Herrera et al. 2013).

U našim eksperimentima, RNK i proteini izolovani iz posmrtnih mišićnih tkiva su bili zadovoljavajućeg kvaliteta. Korelativnom analizom smo utvrdili da individualne razlike u količini detektovanog ANKRD2 u srcima analiziranih subjekata nisu mogle biti pripisane različitom stepenu degradacije proteina koji zavisi od vremena proteklog od smrti do uzorkovanja, tj. dužine PMI. To se odnosilo na slučajeve kada je PMI bio manji od 24 sata, što je u skladu sa podacima iz literature (Tavichakortrakool et al. 2008). S obzirom da je očigledna degradacija ANKRD2 bila prisutna samo kod subjekta sa znatno dužim PMI (>96 sati), opredelili smo se da u budućim eksperimentima koristimo samo tkiva subjekata sa PMI manjim od 24 sata. Takođe, postavlja se pitanje da li nivo ekspresije proteina ANKRD2 i njegovih izoformi u srcu korelira sa nekim drugim fiziološkim parametrima.

## 5.2. Ekspresija proteina ANKRD2 u srcu čoveka

Iako skeletni mišići čoveka predstavljaju primarno mesto njegove ekspresije, protein ANKRD2 je detektovan i u srcu adulta, i to u kardiomiocitima komora, međukomornoj pregradi i apeksu (Moriyama et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). U srcu fetusa nije detektovan (Ishiguro et al. 2002; Jasnic-Savovic et al. 2015). Rezultati nekoliko istraživanja su ukazali na potencijalno značajnu ulogu ANKRD2 u srčanom mišiću. Gen *ANKRD2* se nalazi u istom regionu hromozoma 10 kao i geni asocirani sa dilatiranom kardiomiopatijom (Moriyama et al. 2001). Upravo u ovoj bolesti je nivo ekspresije proteina ANKRD2 značajno povećan, što ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u patološkim stanjima u srcu (Nagueh et al. 2004). Utišavanje ekspresije ANKRD2 u miotubama čoveka menja ekspresiju gena uključenih u mehanizme dilatirane i hipertrofične kardiomiopatije (Belgrano et al. 2011). Belgrano i saradnici (2011) su utvrdili da regulatori transkripcije specifični za srce, kao što su NKX2.5, HAND2 i ANKRD1, mogu da aktiviraju promotor gena za ANKRD2.



Ova teza je obuhvatila uporednu analizu ekspresije i lokalizacije proteina ANKRD2 i ANKRD1, s obzirom da je ANKRD1 vrlo dobro okarakterisan u srcu (Ishiguro et al. 2002; Zolk et al. 2002; Miller et al. 2003). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je nivo ekspresije proteina ANKRD2 značajno snižen u poređenju sa ANKRD1 što je u skladu sa literaturnim podacima (Ishiguro et al. 2002; Nagueh et al. 2004). ANKRD2 je lokalizovan u sarkomeri, dok signal u jedru nije detektovan u svim kardiomiocitima. Osim toga, utvrdili smo da je ANKRD2 bio neravnomerno raspoređen u kardiomiocitima, tako da se dobijao obrazac šahovske table karakterističan za skeletne mišiće (Pallavicini et al. 2001; Ishiguro et al. 2002). ANKRD1 je bio lokalizovan u sarkomeri, kao i ANKRD2, i nije detektovan u jedrima humanih kardiomiocita. Zaključili smo da, uprkos značajnoj razlici u nivou ekspresije, ANKRD2 i ANKRD1 imaju sličnu lokalizaciju u kardiomiocitima čoveka. Zanimljivo je da je intenzitet signala za ANKRD1 u sarkomeri bio neznatno jači u poređenju sa signalom koji odgovara proteinu ANKRD2, što je bilo iznenađujuće s obzirom da je razlika u nivou ekspresije ova dva proteina bila više nego izražena u western blot analizi. Jedno od mogućih objašnjenja je razlika u afinitetima antitela u različitim eksperimentalnim postupcima (u ovom slučaju metodama western blot i imunofluorescencije).

Osim što smo potvrdili rezultate prethodne analize (Ishiguro et al. 2002) po pitanju ekspresije i lokalizacije ANKRD2 u srcu čoveka, u ovoj tezi je po prvi put pokazano da su ANKRD2 i ANKRD1 lokalizovani u IKD.

### **5.2.1. MARP proteini u interkalirajućim diskovima kardiomiocita**

Do sada je samo DARP, treći član familije MARP, identifikovan u IKD kardiomiocita pacova (Miller et al. 2003). Lokalizacija ANKRD2 i ANKRD1 u IKD ide u prilog hipotezi da su ovi proteini uključeni u mehanosenzaciju i međucelijsku komunikaciju.

Osim što uspostavljaju elektrohemijsku i mehaničku vezu između susjednih kardiomiocita (Ehler 2016), IKD funkcionišu kao senzori mehaničkog stresa i učestvuju u mehanotransdukciji (Hoshijima 2006; Michaelson and Huang 2012). Ove funkcije obavljaju dezmozomi i adherentne veze koji ulaze u sastav IKD, zajedno sa

pukotinastim vezama (Sheikh et al. 2009). Uloga IKD u mehanotransdukciji je dokumentovana eksperimentima u kojima je opterećenje srca zeca dovelo do dinamičkih strukturnih promena u IKD koje su bile povezane sa odgovorom sarkomere na opterećenje (Yoshida et al. 2010). U tom smislu, IKD, osim I-trake sarkomere skeletnih mišića, mogu da predstavljaju još jedno mesto u ćeliji gde proteini MARP familije mogu da ostvare mehanosenzornu ulogu.

Za međućelijsku komunikaciju i prenos akcionog potencijala najzaslužnije su pukotinaste veze IKD koje predstavljaju dinamičke kanale između ćelija i omogućavaju prolaz malih molekula, čime obezbeđuju metaboličko i električno povezivanje susednih kardiomiocita (Sheikh et al. 2009). Nepravilno mehaničko povezivanje dovodi do električne disfunkcije kardiomiocita što za posledicu ima brojne srčane poremećaje (Noorman et al. 2009). Ideja o potencijalnoj funkciji ANKRD2 u međućelijskoj komunikaciji potiče iz eksperimenata utišavanja *ANKRD2* u miotubama čoveka koje je dovelo do promene ekspresije gena koji ulaze u sastav adherentnih i pukotinastih veza (Belgrano et al. 2011). Lokalizacija ANKRD2 u IKD u potpunosti podržava ovu hipotezu i prvi je indirektni dokaz da ANKRD2 može da učestvuje u komunikaciji između kardiomiocita.

U IKD su detektovani proteini koji mogu da menjaju svoju lokalizaciju. Jedan od njih je i ZO-1 koji učestvuje u formiranju pukotinastih veza (Sheikh et al. 2009). Osim što interaguje sa proteinima pukotinastih veza, ZO-1 je detektovan i u jedru gde ostvaruje regulatornu ulogu vezujući se za transkripcione faktore i utičući na regulaciju genske ekspresije (Balda and Matter 2000; Balda et al. 2003), slično članovima familije MARP. Poznato je da ANKRD1 i ANKRD2 interaguju sa proteinom ZO-1 (Belgrano et al. 2011; Nestorovic et al. 2014), a u ovoj tezi je pokazano da ANKRD2 i ZO-1 kolokalizuju i verovatno interaguju u IKD. Nameću se pitanja na koji način i pod kojim uslovima ANKRD1, ANKRD2 i ZO-1 dospevaju u jedro, da li i tamo interaguju i kojim genima regulišu ekspresiju.

Značaj lokalizacije ANKRD1 i ANKRD2 u IKD (Jasnic-Savovic et al. 2015) je dokumentovan otkrićem patološkog mehanizma koji leži u osnovi DCM (Lange et al. 2016). Lange i saradnici su identifikovali signalni put u kom učestvuju ova dva proteina

i gde je ključna njihova lokalizacija u IKD. U eksperimentima su koristili uzorke srca bolesnika sa DCM, kao i mišji model za DCM koji ne eksprimira MLP. Autori su predložili da multiproteinski kompleks, lokalizovan u IKD i sastavljen od Ankrd1, Ankrd2, fosfolipaze PLC $\beta$ 1 i protein kinaze C (PKC $\alpha$ ), održava patološku signalnu aktivnost PKC $\alpha$ . Povišena ekspresija proteina Ankrd1 i Ankrd2 u DCM i njihova translokacija u IKD dovodi do regrutacije PKC $\alpha$  i njegove hronične aktivacije. Delecija gena *Ankrd1* i *Ankrd2* kod mišjeg modela za DCM nije dovela do pojave patološkog fenotipa, što sugerise da su oni neophodni za održavanje kompleksa i zadržavanje kinaze PKC $\alpha$  u IKD. Modulacija ovog kompleksa bi mogla imati potencijalni terapijski značaj za prevenciju i lečenje bolesti srca.

Koekspresija ANKRD2 i ANKRD1 u srcu i dalje predstavlja veliku enigmu jer nije jasan fiziološki smisao koekspresije dva vrlo homologna proteina u istom organu. Srca miševa koji ne ekspimiraju nijedan protein familije MARP se ne razlikuju od srca „wild type“ životinja u fiziološkim uslovima i uslovima povišenog pritiska (Bang et al. 2014). Moguće je da će proteini MARP familije ispoljiti svoju funkciju tek u slučaju nekog drugog tipa stresa, pa će sledeći korak u našim istraživanjima biti uporedna analiza ekspresije ova dva proteina u bolestima srca čoveka.

### **5.3. Kardiomiociti neonatalnih pacova: adekvatan model sistem za proučavanje ANKRD2 u srcu**

Zbog teške dostupnosti biološkog materijala humanog porekla za dalje funkcionalne analize ANKRD2 u srcu bilo je potrebno uspostaviti pogodan model sistem. S obzirom da dosta podataka o strukturi i funkciji Ankrd1 potiče iz istraživanja u kojima su korišćeni KMNP (Jeyaseelan et al. 1997; Zou et al. 1997; Kuo et al. 1999; Aihara et al. 2000a; Aihara et al. 2000b; Arimura et al. 2009), odabrali smo ove ćelije i ispitali njihovu adekvatnost za dalje izučavanje uloge ANKRD2 u srcu. Dodatni razlog je bio visok stepen sličnosti (skoro 90%) primarnih struktura proteina ANKRD2 čoveka i Ankrd2 pacova.

Animalni modeli su od izuzetnog značaja za istraživanja kardiovaskularnog sistema. Najčešće korišćeni modeli su izolovana srca malih sisara i kulture ćelija srca. Među njima se pogotovo ističe model pacova imajući u vidu široku dostupnost i jednostavnu manipulaciju (Chlopcíková et al. 2001). Najranije uspešne izolacije i studije na ovom modelu datiraju još iz šezdesetih godina prošlog veka kada su Harary i Farley (1963) ustanovili da kulture kardiomiocita mogu obezbediti jedinstven sistem za proučavanje kontraktilnosti mišićne ćelije i metaboličkih puteva. KMNP omogućavaju istraživanja morfoloških, biohemijskih i elektrofizioloških osobina srca, kao i procese miofibrilogeneze (Sreejit et al. 2008; Ehler et al. 2013). Pored toga, KMNP predstavljaju dobar model sistem i za farmakološke i toksikološke studije, kao i za proučavanje ekspresije proteina i njenu regulaciju (Hoshida et al. 1996; Eble et al. 1998). Kultura KMNP je možda i najsvestraniji model za proučavanje funkcije ćelija srca *in vitro* (Ehler et al. 2013), a u kombinaciji sa istraživanjima *in vivo* i na intaktnim tkivima, može obezbediti uvid u funkcije srca na svim nivoima (Louch et al. 2011). Iako su za rad mnogo jednostavnije komercijalne imortalizovane linije primarnih kardiomiocita kao što su HL-1 (Claycomb et al. 1998), model KMNP ima prednost zbog veće fiziološke sličnosti sa živim organizmom (Louch et al. 2011).

Interesantno je da se profili ekspresije Ankrd2 u KMNP i srcu adultnog pacova veoma razlikuju, dok Ankrd2 nije detektovan u kardiomiocitima fetalnog srca (Miller et al. 2003). U KMNP je dominantan protein od oko 40 kDa, dok je u srcu adulta veoma ekspimiran protein od oko 50 kDa. Za sada nije poznato zbog čega Ankrd2 u adultnom srcu ima povećanu molekulsku težinu. Miller i saradnici (2003) smatraju da se radi o dugoj izoformi Ankrd2, specifično ekspimiranoj u srcu, iako u bazama podataka ne postoje indikacije o postojanju ove izoforme kod pacova, već samo kod čoveka. Naša istraživanja su pokazala da protein od 50 kDa detektovan u humanom srcu ne predstavlja specifičnu izoformu L-ANKRD2. Međutim, u srcu odraslog pacova protein od ~50 kDa je bio specifičan i predstavljao je dominantnu formu Ankrd2 što je u skladu sa nalazom Miller i saradnika (2003). Oni su Ankrd2 detektovali antitelom na deo proteina Ankrd2 pacova (Miller et al. 2003). Pošto je profil ekspresije Ankrd2 identičan u KMNP i srcu čoveka, zaključili smo da su kardiomiociti neonatalnog pacova pogodni za proučavanje ANKRD2 u srcu.

U ovoj tezi je pokazano da je protein Ankrd2 lokalizovan i u citoplazmi i u jedru kardiomiocita neonatalnih pacova, nezavisno od stepena njihove zrelosti. Međutim, jedarni signali su bili jači u zrelim kardiomiocitima. Promena u intenzitetu jedarnog signala zavisna od zrelosti kardiomiocita može ukazivati na postojanje fine modulacije regulacije ekspresije Ankrd2 u procesu sazrevanja kardiomiocita. Za razliku od tek rođenih, u kardiomiocitima odraslog pacova Ankrd2 je lokalizovan samo u sarkomeri (Miller et al. 2003). Ovakav profil unutarćelijske lokalizacije podseća na profil ANKRD2 u toku diferencijacije ćelija skeletnih mišića čoveka kada se u mioblastima prevashodno nalazi u jedru, a u miotubama u citoplazmi (Kojic et al. 2004). Sličnu dualnu lokalizaciju je pokazivao i egzogeno eksprimirani ANKRD2, na osnovu čega smo zaključili da ga ćelije pacova tretiraju na isti način kao i Ankrd2 pacova i da ne dolazi do njegove aberantne agregacije ili lokalizacije.

Naši rezultati koji su se odnosili na lokalizaciju egzogenog ANKRD1 se nisu u potpunosti slagali sa nalazima kolega (Arimura et al. 2009), koji su detektovali overekspimirani ANKRD1 samo u jedrima nezrelih kardiomiocita. Naš rezultat, koji je pokazao da oko 18% zrelih kardiomiocita eksprimira ANKRD1 u jedru, je bio u saglasnosti sa nalazima drugih studija u kojima je takođe detektovana jedarna lokalizacija endogenog Ankrd1 u zrelim kardiomiocitima (Jeyaseelan et al. 1997; Zou et al. 1997; Miller et al. 2003). Potencijalni uzrok neslaganja rezultata različitih studija može biti zbog razlika u tagovima sa kojima su ekspimirani rekombinantni proteini, GFP u našim istraživanjima i myc tag u radu Arimure i saradnika (2009). S obzirom da su molekulske težine ova dva taga veoma različite (29 kDa za GFP i 1,2 kDa za myc) moguće je da oni utiču na unutarćelijsku lokalizaciju rekombinantnih proteina.

Važno je napomenuti da je efikasnost transfekcije KMNP u našim eksperimentima iznosila oko 15%, što predstavlja maksimum za lipozomalnu transfekciju primarnih mišićnih ćelija standardnim reagensima (Djurovic et al. 2004). U daljim eksperimentima je poželjno povećati efikasnost transfekcije viralnom transdukcijom.

U ovoj tezi su kardiomiociti neonatalnih pacova najpre okarakterisani po pitanju ekspresije i lokalizacije Ankrd2, a zatim i evaluirani kao adekvatan model sistem za

proučavanje ANKRD2 čoveka, čime su otvorene mogućnosti za dalje funkcionalne studije ovog proteina i njegovih izoformi u srcu.

### **5.3.1. Doksorubicin različito utiče na ekspresiju Ankrd2 i Ankrd1 u kardiomiocitima neonatalnih pacova**

Imajući u vidu senzitivnost ekspresije Ankrd1 na doksorubicin, ispitali smo da li ovaj citotoksični lek utiče na ekspresiju Ankrd2. Korišćen je model kardiomiocita neonatalnih pacova jer je u njima testiran efekat doksorubicina na ekspresiju Ankrd1 (Chen et al. 2012).

Hemoterapeutski agens doksorubicin se koristi za tretman različitih vrsta tumora i može biti izuzetno efikasan (Sant et al. 2009). Međutim, postoje brojni negativni sporedni efekti doksorubicina kao što su kardiomiopatija, aritmija i zastoj srca (Tan et al. 1967; Von Hoff et al. 1977), do kojih dolazi usled narušavanja programa genske ekspresije specifičnog za srce (Ito et al. 1990; Kurabayashi et al. 1995). Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi ovih procesa su stvaranje slobodnih radikala i inaktivacija DNK topoizomeraze (Damiani et al. 2016). Doksorubicin se vezuje i za DNK i za topoizomerazu II onemogućavajući dalju replikaciju DNK (Capranico and Zunino 1992). Sa druge strane, metabolizam doksorubicina u ćeliji dovodi do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i drugih slobodnih radikala, kao što su superoksid ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksilni radikal ( $OH^\cdot$ ) (Doroshov 1983; Ide et al. 2000). Posledica su poremećena struktura sarkomere i transport  $Ca^{2+}$  što dovodi do smanjene funkcije srca (Singal et al. 1987). Takođe se povećava ekspresija gena koji su uključeni u p53-zavisnu apoptozu (Zhu et al. 2009; Zhang et al. 2014), a indukcija ćelijske smrti dovodi do odumiranja srčanog tkiva (Singal et al. 2000). Tumor supresor p53 je funkcionalno povezan sa proteinima Ankrd1 i Ankrd2 tako što reguliše njihovu ekspresiju, dok Ankrd1 i Ankrd2 stimulišu funkciju p53 (Belgrano et al. 2011; Kojic et al. 2004; Kojic et al. 2010).

U kardiomiocitima tretiranim doksorubicinom dolazi do značajnog pada ekspresije ANKRD1 i na proteinskom (Chen et al. 2012) i na nivou RNK (Jeyaseelan et al. 1997) usled dejstva vodonik peroksida koji dovodi do aktivacije H7-senzitivnih

serin-treonin kinaza (Aihara et al. 2000b). Ove kinaze interaguju sa M-CAT elementom u promotoru *Ankrd1* i dovode do represije transkripcije (Aihara et al. 2000b).

Rezultati naših eksperimenata nisu pokazali značajnu promenu u nivou proteina *Ankrd2* u KMNP tretiranim doksorubicinom. Ovaj rezultat ukazuje da je ekspresija *Ankrd1* i *Ankrd2* regulisana različitim molekularnim mehanizmima, a jedan od njih je ćelijski odgovor na doksorubicin. Međutim, iako nema promene u nivou ekspresije, postoji mogućnost da protein *Ankrd2* promeni lokalizaciju pod dejstvom doksorubicina. Poznato je da izlaganje mioblasta miša vodonik peroksidu ne dovodi do promene u ekspresiji, već rezultira akumulacijom jedarnog *Ankrd2* (Cenni et al. 2011). S obzirom da vodonik peroksid predstavlja jedan od metabolita doksorubicina i da je odgovoran za sniženu ekspresiju proteina *Ankrd1*, sledeći korak u istraživanjima bi bio da se prouči unutarćelijska lokalizacija *Ankrd2* pod dejstvom doksorubicina. Takođe, moguće je da vodonik peroksid, u zavisnosti od porekla, aktivira različite signalne puteve i ima različite efekte na ekspresiju gena. Iako vodonik peroksid, kao produkt metabolizma doksorubicina, snižava ekspresiju *Ankrd1*, tretman ćelija vodonik peroksidom ima čak suprotan efekat i povećava nivo iRNK za *Ankrd1* (Aihara et al. 2000b).

#### **5.4. Izoforma S-ANKRD2 najviše doprinosi opštem profilu ekspresije proteina ANKRD2**

Strukturni proteini sarkomere su vrlo konzervisani kako među različitim vrstama, tako i poredeći srčane i skeletne mišiće iste vrste, što je i očekivano s obzirom da izgrađuju funkcionalnu jedinicu poprečno prugastih mišića (Clark et al. 2002). Međutim, postojanje specifičnih izoformi sarkomernih proteina doprinosi razlikama u brzini kontrakcije i relaksacije mišića, što za posledicu ima postojanje brzih i sporih skeletnih mišića (Luther 2009; Baylor and Hollingworth 2012).

Interesantno je da od objavljivanja rada u kome su prvi put pomenute izoforme *Ankrd2* (Miller et al. 2003), nisu utvrđeni ni individualni profili ekspresije izoformi, ni njihov biološki značaj. Na osnovu informacija iz baza podataka i rezultata sekvenciranja transkriptoma humanih skeletnih mišića i srca, bilo je poznato da izoforme ANKRD2

nisu proizvod alternativne obrade iRNK, već da najverovatnije imaju različite početke transkripcije. Ovi podaci su nam poslužili kao osnova strategije za diskriminaciju izoformi u eksperimentalnim uslovima.

Da bismo razlikovali izoforme na nivou proteina, koristili smo antitelo konstruisano na epitop koji je prisutan samo u dužim izoformama proteina ANKRD2. Iako je ovo antitelo (anti-M-ANKRD2) teorijski moglo da prepozna izoforme i od 360 i od 446 ak (M- i L-ANKRD2), to ne bi predstavljalo tehnički problem jer bi razdvajanje izoformi po molekulskim masama bilo moguće elektroforezom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Međutim, u uzorcima tkiva srca i skeletnih mišića, izoforma L-ANKRD2 nije bila eksprimirana na detektabilnom nivou, tako da je anti-M-ANKRD2 antitelo bilo specifično za M-ANKRD2. Za protein od 50 kDa koji je detektovan u skeletnim mišićima i srcu čoveka je pokazano da ne predstavlja L-ANKRD2, već nepoznati protein detektovan samo sekundarnim antitelom na imunoglobuline miša. Teški lanci imunoglobulina imaju sličnu molekulsku masu. Protein od 50 kDa, koji hipotetički predstavlja najdužu izoformu, je detektovan samo u ekstraktima srca adultnog pacova (Miller et al. 2003), što smo potvrdili i u našim eksperimentima. Međutim, postojanje izoformi Ankrd2 pacova je diskutabilno jer je u bazama podataka prijavljen samo protein od 328 ak (NCBI Reference Sequence: NP\_001101059.1).

Antitelo na amino-kraj najkraće izoforme (anti-S-ANKRD2) je teorijski trebalo da prepozna sve izoforme proteina ANKRD2. Iako je detektovalo izoformu M-ANKRD2 eksprimiranu u COS-7 ćelijama, pokazivalo je mnogo manji afinitet za M-ANKRD2 u tkivima, na osnovu čega smo zaključili da anti-S-ANKRD2 antitelo možemo koristiti za detekciju samo najkraće izoforme. Zahvaljujući specifičnosti anti-S- i anti-M-ANKRD2 antitela uspeali smo da u eksperimentalnim uslovima diskriminišemo izoforme ANKRD2 u poprečno prugastim mišićima čoveka: antitelo na S- izoformu je detektovalo izoformu od 333 ak, a anti-M-ANKRD2 antitelo je detektovalo izoformu of 360 ak. L- izoforma nije mogla biti detektovana na nivou proteina najverovatnije zbog odsustva ili veoma niske ekspresije.

Naša polazna hipoteza, formirana na osnovu literaturnih podataka o proteinu ANKRD2 (Miller et al. 2003; Lun et al. 2014) i informacija u bazama podataka je bila



da su M- i L-ANKRD2 izoforme specifične za srce, a da se S-ANKRD2 izoforma eksprimira u skeletnim mišićima. Međutim, dobijeni rezultati su dali sasvim drugačiju sliku. L-ANKRD2 nismo detektovali, dok je izoforma M-ANKRD2, iako dominantnija u tkivu srca, ekspimirana i u srcu i u skeletnim mišićima. Izoforma S-ANKRD2 je takođe ekspimirana u oba tkiva ali više u skeletnim mišićima. Rezultati ekspresije proteina su potvrđeni i na nivou RNK jer su delovi transkripta koji kodiraju specifične regione S- i M- izoformi amplifikovani u svim analiziranim mišićima.

S obzirom da se ekspresija ANKRD2 razlikuje u sporim i brzim mišićnim vlaknima, izoforme su analizirane u dva mišića različitih karakteristika: mišiću *musculus gastrocnemius* kao predstavniku grupe brzih mišića i mišiću *musculus soleus* koji pripada grupi sporih mišića. *M. soleus* sadrži 80% sporih mišićnih vlakana tipa I, dok *m. gastrocnemius* sadrži 57% sporih vlakana čime se svrstava u brze mišiće (Gollnick et al. 1974). Na poprečnim presecima skeletnih mišića signal za S-ANKRD2 je pokazivao već poznati obrazac šahovskog polja (Pallavicini et al. 2001; Ishiguro et al. 2002) i ova izoforma je bila dominantna u sporim mišićnim vlaknima. Različita distribucija izoforme M-ANKRD2 u sporim i brzim vlaknima nije bila tako ubedljiva, ali je signal bio malo jači u sporim vlaknima. I u eksperimentu reverzne transkripcije detektovana je veća količina M-ANKRD2 amplikona u sporom mišiću *m. soleus*. Međutim, rezultati lančanog umnožavanja DNK polimerazom u realnom vremenu su ukazali da je izoforma M-ANKRD2 više ekspimirana u brzim mišićnim vlaknima, dok je kraća izoforma bila izražena u sporim. Veliki broj proteina mišićnih ćelija se takođe eksprimira u više izoformi koje su diferencijalno raspodeljene u različita mišićna vlakna. Najpoznatiji primer je teški lanac miozina čije izoforme određuju fenotip mišićnih vlakana. Ekspresija ovih izoformi zavisi i od hormonskog statusa i inervacije ćelije, pa promena statusa njihove ekspresije doprinosi tranziciji iz jednog u drugi tip mišićnog vlakna i plastičnosti mišića (Soukup and Smerdu 2015).

Iako su obe izoforme pokazivale sarkomernu i jedarnu lokalizaciju u skladu sa literaturnim podacima (Moriyama et al. 2001; Ishiguro et al. 2002), jedarni signal M-ANKRD2 je bio znatno izraženiji u odnosu na S-ANKRD2. Dominantniju lokalizaciju M-ANKRD2 u jedru je potrebno dodatno analizirati u smislu identifikacije ćelija u čijim jedrima je detektovana ova izoforma, imajući u vidu da je mišićno tkivo, osim mišićnih,

izgrađeno od više vrsta ćelija, kao što su endotelijalne ćelije kapilara i satelitske ćelije. Takođe treba ispitati mogućnost da strukturne karakteristike izoformi utiču na i upravljaju njihovom unutarćelijskom lokalizacijom. Obe izoforme proteina ANKRD2, kao i svi proteini MARP familije, sadrže signal za lokalizaciju u jedro (NLS). U slučaju da je ovaj domen izloženiji u M-ANKRD2 to može biti razlog zašto je ova izoforma dominantnija u jedru. Drugo potencijalno objašnjenje je različit uticaj post-translacionih modifikacija. Na primer, Ankrd1 i Ankrd2 interaguju sa i supstrati su proteaze kalpain 3 (Hayashi et al. 2008; Laure et al. 2010). Lokalizacija proteina Ankrd1 u ćeliji je dirigovana aktivnošću ovog enzima jer digestija Ankrd1 na amino-kraju dovodi do povećane interakcije sa titinom a samim tim i do zadržavanja Ankrd1 u sarkomeri (Laure et al. 2010). Postoji mogućnost da su izoforme ANKRD2 različito podložne digestiji kalpainom 3, što može rezultirati razlikama u njihovoj jedarnoj distribuciji.

U komorama srca čoveka obe izoforme su pokazivale predominantnu lokalizaciju u sarkomeri, dok je jedarni signal bio odsutan ili vrlo slab. ANKRD2 je bio lokalizovan i u IKD pa smo imunohistohemijskom analizom ustanovili da je samo S-ANKRD2 lokalizovan u ovoj strukturi i da kolokalizuje sa proteinom ZO-1. S obzirom da je već poznato da protein Ankrd2 interaguje sa ZO-1 (Belgrano et al. 2011), postoji mogućnost da M-ANKRD2 ne može da interaguje sa ZO-1 pa samim tim ne dolazi ni do njegove regrutacije u IKD. U svakom slučaju, buduća istraživanja treba usmeriti na izučavanje uloge proteina ANKRD2 u IKD, kao i mehanizme koji utiču na distribuciju izoformi u kardiomiocitima.

Analiza ekspresije izoformi ANKRD2 u srcu dovela je do još jednog novog otkrića. Osim u I traci sarkomere, obe izoforme ANKRD2 su detektovane i u strukturi koja najverovatnije predstavlja M liniju. Proteinski sadržaj M linije varira kod različitih tipova mišića i određen je izoformom titina koja se eksprimira (Kolmerer et al. 1996). Imajući u vidu da ANKRD2 interaguje sa titinom (Miller et al. 2003), može se spekulirati da je prisustvo proteina ANKRD2 u M liniji takođe uslovljeno specifičnom izoformom titina. Potrebna su dodatna istraživanja kolokalizacije ANKRD2 sa proteinima M linije i detaljna analiza lokalizacije ANKRD2 u kardiomiocitima elektronskom mikroskopijom.

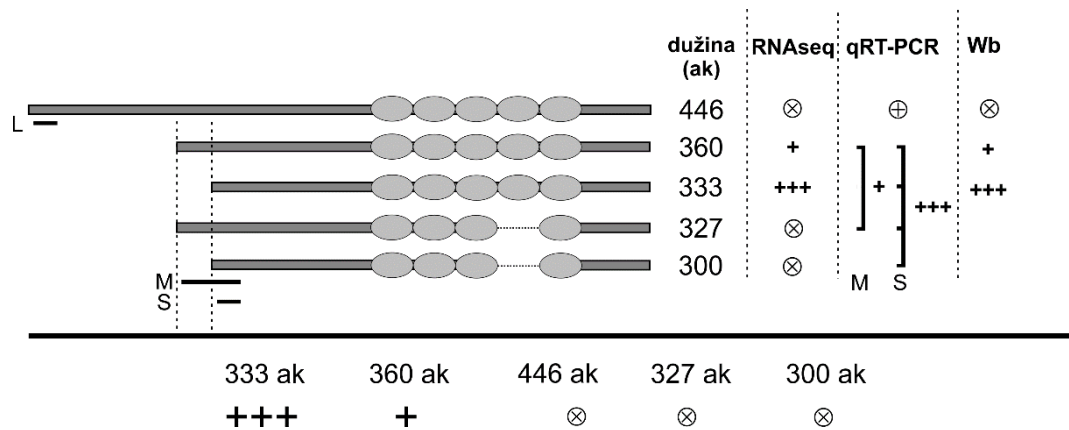
Zanimljivo je da još jedna proteinska familija sa ankirinskim ponovcima ima višestruke izoforme u srcu. Alternativno iskrajanje gena *Ank3* rezultira brojnim izoformama proteina Ankirin-G koje se detektuju u različitim tkivima kao što su pluća i mišići. Yamankurt i saradnici (2015) su pokazali da postoje grupe ankirina-G u srcu: jedna koja je predominantno eksprimirana u Z liniji sarkomere, i druga koja lokalizuje u interkalirajućim diskovima. Predloženo je da različite izoforme nastaju alternativnim iskrajanjem *Ank3* i da svaka izoforma interaguje sa specifičnim setom proteina što dovodi do lokalizacije u specifične domene kardiomiocita i ispoljavanja različitih funkcija na tim pozicijama (Yamankurt et al. 2015). Ankirin-B je još jedan primer proteina sa ankirinskim ponovcima koji se eksprimira u više izoformi koje u kardiomiocitima pokazuju različitu lokalizaciju (Wu et al. 2015). Ovi podaci ukazuju na postojanje zajedničkog mehanizma regulacije lokalizacije izoformi jednog proteina interakcijom sa drugim proteinima koji su specifično pozicionirani i regrutuju izoforme u te ćelijske strukture.

Na amino-kraju proteina ANKRD2 se nalazi domen uvijenih uvojaka koji je odgovoran za dimerizaciju proteina. Zanimljivo je da su jedini eksperimenti u kojima je korišćena izoforma M-ANKRD2 bili analiza dimerizacije proteina MARP familije (Witt et al. 2005; Lun et al. 2014). Rezultati tih istraživanja su pokazali da M- izoforma može da formira homo- i heterodimere sa drugim članovima MARP familije (Lun et al. 2014). Bilo bi interesantno ispitati da li i S-ANKRD2 ima sposobnost dimerizacije s obzirom na činjenicu da, po predikciji programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), ima samo 9 ak ispred domena uvijenog uvojka za razliku od M-ANKRD2 koji ima 36 ak (Lun et al. 2014). U slučaju da izoforma S-ANKRD2 ne može da formira dimere to bi bila još jedna razlika između izoformi i bila bi direktna posledica njihove različite primarne strukture.

U mioblastima čoveka, protein ANKRD2 je slabo eksprimiran i lokalizovan je u jedru, dok je u diferenciranim miotubama njegova ekspresija povišena, a protein pretežno prisutan u citoplazmi (Pallavicini et al. 2001; Kojic et al. 2004). U ovom istraživanju smo utvrdili koja od izoformi je odgovorna za ovakav profil ekspresije i ispitati da li se njihova lokalizacija u mioblastima i miotubama razlikuje u odnosu na miocite u tkivu čoveka. Pokazali smo da se poznati profil ekspresije i lokalizacije

proteina ANKRD2 može pripisati S- izoformi. Izoforma M-ANKRD2 je, sa druge strane, pokazivala jedarnu lokalizaciju i u diferenciranim višejedrnim miotubama, što ukazuje na mogućnost da ima dodatnu regulatornu ulogu značajnu za proces diferencijacije. Ovaj nalaz je zanimljiv jer nema puno podataka o različitoj lokalizaciji izoformi nekog proteina tokom procesa diferencijacije mišićnih ćelija. Interesantan je primer filamina koji u interakciji sa integrinima učestvuje u prenosu mehaničkih signala od ekstraćelijskog matriksa do citoskeleta. Ekspresija kraće izoforme filamina nastale alternativnom obradom transkripta u mišjim C2C12 mioblastima ubrzava njihovu diferencijaciju i utiče na fenotip novonastalih miotuba. Iako nije primećena značajna razlika u lokalizaciji, kraća izoforma je pokazivala sklonost ka polarizaciji i nakupljanju na krajevima aktinskih filamenata, što nije karakteristično za dužu izoformu (van der Flier et al. 2002). Primer proteina filamina i njegovih izoformi sugeriše da obrada iRNK, u ovom slučaju iskrajanje, i ekspresija izoformi utiču na citoskelet ćelije, a samim tim i njenu morfologiju, kao i na diferencijaciju.

Na Slici 35 predstavljeni su objedinjeni rezultati karakterizacije izoformi ANKRD2 kod čoveka dobijeni u ovom istraživanju i potkrepljeni nalazima kolega (lična komunikacija sa G. Faulkner i G. Valle, CRIBI, Univerzitet u Padovi). Za razliku od S- i M-ANKRD2 koje su uspešno diskriminisane kako na nivou proteina tako i na nivou RNK, nismo uspeali da detektujemo izoformu L-ANKRD2. Na nivou RNK *L-ANKRD2* je bila detektovana u zanemarljivoj količini. Važno je napomenuti da primenjene metode nisu dovoljno osetljive da pokažu razliku između M i S-ANKRD2 i njihovih varijanti dobijenih alternativnim iskrajanjem egzona 7, koje su prijavljene u ENSEMBL bazi. Međutim, u istraživanju Martinelli i saradnika (2014), sekvenciranjem transkriptoma skeletnih mišića i srca nekoliko subjekata nisu dobijeni dokazi o alternativnom iskrajanju egzona 7, te je najverovatnije da se ove hipotetičke varijante ne eksprimiraju u mišićima odraslog čoveka, bar ne u fiziološkim uslovima (Slika 35, kolona RNAseq). Na osnovu analize svih prikazanih rezultata može se zaključiti da je izoforma S-ANKRD2 dominantna u poprečno prugastim mišićima čoveka i da je treba proglašiti kanonskom (Jasnic-Savovic et al. 2016).



**Slika 35. Objedinjeni rezultati analize ekspresije izoformi ANKRD2 u skeletnim mišićima i srcu čoveka metodama sekvenciranja transkriptoma (RNAseq), kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (qRT-PCR) i western blot (Wb).** S-ANKRD2 (ENSEMBL transkript 001) dužine 333 ak je dominantna izoforma u poprečno prugastim mišićima čoveka. Nema dokaza za iskrajanje egzona 7 u srcu i skeletnim mišićima zdrave odrasle osobe. ⊗- nema ekspresije, ⊕- izuzetno slaba ekspresija, +-niska ekspresija, +++- visoka ekspresija. Sa L, M i S su označeni fragmenti transkripta *ANKRD2* umnožavani i kvantifikovani metodom qRT-PCR. Slika preuzeta i adaptirana iz Jasnic-Savovic et al. 2016.

### 5.5. Izoforme ANKRD2 su produkti translacije različitih iRNK

Miller i saradnici (2003) su jedini predložili, ali ne i eksperimentalno potvrdili mehanizam regulacije ekspresije izoformi proteina ANKRD2: translacija sa alternativnih start kodona jedne iRNK. Dizajn naše studije je omogućio proveru ove hipoteze. Umnožavana su tri regiona transkripta: deo koji kodira region prisutan samo u L- izoformi (amplikon L), deo koji kodira sekvencu prisutnu u izoformama L- i M- ANKRD2 (amplikon M) i deo koji kodira region prisutan u sve tri izoforme (amplikon S). Rezultati reverzne transkripcije su ukazali da hipoteza Miller i saradnika nije tačna pošto nije dobijena približno ista količina amplikona u jednom istom uzorku, što bi bilo očekivano da se izoforme transliraju sa iste iRNK.

Metodom qRT-PCR izvršena je precizna kvantifikacija L, M i S amplikona. Vrednosti  $\Delta Ct$  su trebale da budu slične u slučaju da postoji samo jedna iRNK koja kodira izoforme. Međutim, mi smo dobili značajne razlike između vrednosti za svaki amplikon u svim poprečno-prugastim mišićima čoveka na osnovu čega smo zaključili

da se sa gena *ANKRD2* prepisuje više od jedne iRNK. Važno je imati na umu da kvantifikacija dobijenih amplikona u ovom slučaju ne oslikava količine pojedinih transkripata već njihove zbirove. Broj S amplikona predstavlja zbir iRNK za sve izoforme, dok broj M amplikona predstavlja broj transkripata za dve duže izoforme. Međutim, pošto je broj detektovanih L amplikona bio zanemarljiv, a broj M amplikona mnogo manji od S, mogli smo poistovetiti vrednosti dobijene za S i M amplikone sa količinama pojedinačnih transkripata. Ovi rezultati ukazuju da postoje najmanje dve iRNK sa kojih se odvojeno sintetišu S i M izoforme proteina ANKRD2 tj. da je njihova ekspresija regulisana na nivou transkripcije.

Sa druge strane, ostalo je nerešeno pitanje L amplikona. Vrednosti  $\Delta C_t$  dobijene za ovaj transkript su bile veoma niske što ukazuje da se ova izoforma gotovo ni ne prepisuje. Moguće je da region koji odgovara najdužoj izoformi predstavlja uzvodni regulatorni region ispred ATG kodona sa koga se prevodi M-ANKRD2. Potrebno je uraditi dodatne ekperimente kojima bi se identifikovao start transkripcije iRNK za izoforme. Dalja istraživanja će biti usmerena na detekciju konstitutivnih i/ili regulatornih elemenata koji omogućavaju specifičnu ekspresiju izoformi ANKRD2.

U ovom istraživanju su detaljno analizirani protein ANKRD2 i njegove izoforme, u srcu i skeletnim mišićima čoveka. Ustanovili smo profile njihove ekspresije i lokalizacije, kao i mehanizam regulacije ekspresije izoformi. Kardiomiociti neonatalnih pacova su okarakterisani i uspostavljeni kao adekvatan model sistem za analizu proteina ANKRD2. Stoga, rezultati ove teze predstavljaju temelj za dalje funkcionalne studije proteina ANKRD2 i njegovih izoformi u poprečno prugastim mišićima.

*6. Zaključci*

U ovoj tezi su određeni profil ekspresije i lokalizacija proteina ANKRD2 u srcu čoveka i upoređeni sa profilima proteina ANKRD1 (a). Okarakterisan je model sistem kardiomiocitima neonatalnih pacova po pitanju ekspresije i lokalizacije endogenog Ankrd2 i egzogenog ANKRD2 (b). Utvrđeni su nivoi ekspresije, distribucija i mehanizam regulacije ekspresije izoformi ANKRD2 u poprečno-prugastim mišićima čoveka (c).

Na osnovu prikazanih rezultata doneti su sledeći zaključci:

a)

1. Protein ANKRD2 je eksprimiran u srcu čoveka, u manjoj meri u odnosu na protein ANKRD1
2. Protein ANKRD2 je slično proteinu ANKRD1, lokalizovan u sarkomeri kardiomiocita čoveka
3. Protein ANKRD2 je detektovan samo u jedrima kardiomiocita srca koje je pokazivalo karakteristike blage hipertrofije.
4. Interkalirajući diskovi kardiomiocita čoveka su identifikovani kao nova mesta lokalizacije proteina ANKRD2 i ANKRD1.

b)

1. Protein Ankrd2 je eksprimiran u kardiomiocitima neonatalnih pacova.
2. Endogeni Ankrd2 je lokalizovan i u citoplazmi i jedru kardiomiocita neonatalnih pacova.
3. Lokalizacija egzogeno eksprimiranog proteina ANKRD2 u kardiomiocitima neonatalnih pacova je zavisila od stepena zrelosti kardiomiocita: u nezrelim kardiomiocitima ANKRD2 je detektovan u jedru i citoplazmi, dok je u zrelih kardiomiocitima detektovan samo u sarkomeri.



4. Za razliku od Ankrd1, kardiotoksični agens doksorubicin ne dovodi do promene nivoa ekspresije Ankrd2.

c)

1. Postoji razlika u raspodeli izoformi ANKRD2 u poprečno prugastim mišićima čoveka: izoforma S-ANKRD2 se više eksprimira u skeletnom mišiću, dok je izoforma M-ANKRD2 dominantnija u srcu.
2. Postoji razlika u ekspresiji izoformi ANKRD2 u sporim i brzim vlaknima skeletnih mišića čoveka *m. soleus* i *m. gastrocnemius*: izoforma S-ANKRD2 se specifično eksprimira u sporim vlaknima, dok je izoforma M-ANKRD2 skoro uniformno raspoređena u brzim i sporim vlaknima.
3. Izoforme S-ANKRD2 i M-ANKRD2 imaju sličnu sarkomernu lokalizaciju u ćelijama skeletnih mišića čoveka, dok je lokalizacija M-ANKRD2 izraženija u jedru mišićne ćelije u odnosu na S-ANKRD2.
4. Izoforme S-ANKRD2 i M-ANKRD2 u kardiomiocitima čoveka su preferencijalno lokalizovane u sarkomeri.
5. S-ANKRD2 je dominantna izoforma u interkalirajućim diskovima kardiomiocita čoveka.
6. U poprečno-prugastim mišićima čoveka nije detektovana izoforma L-ANKRD2.
7. Izoforme S-ANKRD2 i M-ANKRD2 su produkti translacije dve iRNK.
8. Izoforma S-ANKRD2 je dominantna u poprečno prugastim mišićima čoveka i najviše doprinosi opštem profilu ekspresije proteina ANKRD2 te je treba proglasiti kanonskom.
9. U nediferenciranim mišićnim ćelijama čoveka (mioblastima) izoforme S-ANKRD2 i M-ANKRD2 su detektovane u jedru. U miotubama se S-ANKRD2 eksprimira samo u citoplazmi, dok je izoforma M-ANKRD2 lokalizovana i u jedru i u citoplazmi. Ovi rezultati ukazuju na različitu funkciju izoformi ANKRD2 u procesu diferencijacije mišićnih ćelija.

## *7. Literatura*

- Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ (2005) Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res* 7 (5):190-197. doi:10.1186/bcr1286
- Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R (2000a) Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension* 36 (1):48-53
- Aihara Y, Kurabayashi M, Tanaka T, Takeda SI, Tomaru K, Sekiguchi KI, Ohyama Y, Nagai R (2000b) Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. *J Mol Cell Cardiol* 32 (8):1401-1414. doi:10.1006/jmcc.2000.1173
- Akazawa H, Komuro I (2003) Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92 (10):1079-1088. doi:10.1161/01.RES.0000072977.86706.23
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> edition.
- Amato AA, Griggs RC (2011) Overview of the muscular dystrophies. *Handb Clin Neurol* 101:1-9. doi:10.1016/B978-0-08-045031-5.00001-3
- Arimura T, Bos JM, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Moulik M, Doi YL, Towbin JA, Ackerman MJ, Kimura A (2009) Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 54 (4):334-342. doi:10.1016/j.jacc.2008.12.082
- Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL, Niswander L, Conlon RA (2006) Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol* 296 (1):164-176. doi:10.1016/j.ydbio.2006.04.449
- Badi I, Cinquetti R, Frascoli M, Parolini C, Chiesa G, Taramelli R, Acquati F (2009) Intracellular ANKRD1 protein levels are regulated by 26S proteasome-mediated degradation. *FEBS Lett* 583 (15):2486-2492. doi:10.1016/j.febslet.2009.07.001
- Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LV, Lopez de Munain A, Fardeau M, Mangat P, Beckmann JS, Lefranc G (1999) Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 5 (5):503-511. doi:10.1038/8385
- Balda MS, Garrett MD, Matter K (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160 (3):423-432. doi:10.1083/jcb.200210020
- Balda MS, Matter K (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 19 (9):2024-2033. doi:10.1093/emboj/19.9.2024
- Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S (2001) The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its

- interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 89 (11):1065-1072
- Bang ML, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chien KR, Chen J (2014) The muscle ankyrin repeat proteins CARP, Ankrd2, and DARP are not essential for normal cardiac development and function at basal conditions and in response to pressure overload. *PLoS One* 9 (4):e93638. doi:10.1371/journal.pone.0093638
- Barash IA, Bang ML, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL (2007) Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 293 (1):C218-227. doi:10.1152/ajpcell.00055.2007
- Barash IA, Mathew L, Lahey M, Greaser ML, Lieber RL (2005) Muscle LIM protein plays both structural and functional roles in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 289 (5):C1312-1320. doi:10.1152/ajpcell.00117.2005
- Barash IA, Mathew L, Ryan AF, Chen J, Lieber RL (2004) Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 286 (2):C355-364. doi:10.1152/ajpcell.00211.2003
- Baumeister A, Arber S, Caroni P (1997) Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis. *J Cell Biol* 139 (5):1231-1242
- Baylor SM, Hollingworth S (2012) Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *J Gen Physiol* 139 (4):261-272. doi:10.1085/jgp.201210773
- Bean C, Facchinello N, Faulkner G, Lanfranchi G (2008) The effects of Ankrd2 alteration indicate its involvement in cell cycle regulation during muscle differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1783 (6):1023-1035. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.027
- Bean C, Salamon M, Raffaello A, Campanaro S, Pallavicini A, Lanfranchi G (2005) The Ankrd2, Cdkn1c and calcyclin genes are under the control of MyoD during myogenic differentiation. *J Mol Biol* 349 (2):349-366. doi:10.1016/j.jmb.2005.03.063
- Bean C, Verma NK, Yamamoto DL, Chemello F, Cenni V, Filomena MC, Chen J, Bang ML, Lanfranchi G (2014) Ankrd2 is a modulator of NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses during muscle differentiation. *Cell Death Dis* 5:e1002. doi:10.1038/cddis.2013.525
- Belgrano A, Rakicevic L, Mittempergher L, Campanaro S, Martinelli VC, Mouly V, Valle G, Kojic S, Faulkner G (2011) Multi-tasking role of the mechanosensing protein Ankrd2 in the signaling network of striated muscle. *PLoS One* 6 (10):e25519. doi:10.1371/journal.pone.0025519
- Blais A, Tsikitis M, Acosta-Alvear D, Sharan R, Kluger Y, Dynlacht BD (2005) An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes Dev* 19 (5):553-569. doi:10.1101/gad.1281105
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11 (2):82-88
- Capranico G, Zunino F (1992) DNA topoisomerase-trapping antitumour drugs. *Eur J Cancer* 28A (12):2055-2060

- Cenni V, Bavelloni A, Beretti F, Tagliavini F, Manzoli L, Lattanzi G, Maraldi NM, Cocco L, Marmiroli S (2011) Ankrd2/ARPP is a novel Akt2 specific substrate and regulates myogenic differentiation upon cellular exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mol Biol Cell* 22 (16):2946-2956. doi:10.1091/mbc.E10-11-0928
- Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang ML, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S (2001) Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* 306 (4):717-726. doi:10.1006/jmbi.2001.4448
- Chen B, Zhong L, Roush SF, Pentassuglia L, Peng X, Samaras S, Davidson JM, Sawyer DB, Lim CC (2012) Disruption of a GATA4/Ankrd1 signaling axis in cardiomyocytes leads to sarcomere disarray: implications for anthracycline cardiomyopathy. *PLoS One* 7 (4):e35743. doi:10.1371/journal.pone.0035743
- Chen YW, Nader GA, Baar KR, Fedele MJ, Hoffman EP, Esser KA (2002) Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *J Physiol* 545 (Pt 1):27-41
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12 (16):2499-2509
- Chlopčíková S, Psotová J, Míketová P (2001) Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 145 (2):49-55
- Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S, Holtzer H (1990) MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (20):7988-7992
- Chu W, Burns DK, Swerlick RA, Presky DH (1995) Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J Biol Chem* 270 (17):10236-10245
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:637-706. doi:10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840
- Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (6):2979-2984
- Cohen N, Kudryashova E, Kramerova I, Anderson LV, Beckmann JS, Bushby K, Spencer MJ (2006) Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics* 6 (22):6075-6084. doi:10.1002/pmic.200600199
- da Costa N, Edgar J, Ooi PT, Su Y, Meissner JD, Chang KC (2007) Calcineurin differentially regulates fast myosin heavy chain genes in oxidative muscle fibre type conversion. *Cell Tissue Res* 329 (3):515-527. doi:10.1007/s00441-007-0441-3
- Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JA, Saffi J (2016) Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Arch Toxicol* 90 (9):2063-2076. doi:10.1007/s00204-016-1759-y

- Dingwall C, Laskey RA (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* 16 (12):478-481
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F, Christensen G (2004) Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol* 28 (1):21-32. doi:10.1385/MB:28:1:21
- Doroshov JH (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 43 (2):460-472
- Dwyer J, Pluess M, Iskratsch T, Dos Remedios CG, Ehler E (2014) The formin FHOD1 in cardiomyocytes. *Anat Rec (Hoboken)* 297 (9):1560-1570. doi:10.1002/ar.22984
- Eble DM, Cadre BM, Qi M, Bers DM, Samarel AM (1998) Contractile activity modulates atrial natriuretic factor gene expression in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30 (1):55-60. doi:10.1006/jmcc.1997.0571
- Ehler E (2016) Cardiac cytoarchitecture - why the "hardware" is important for heart function! *Biochim Biophys Acta* 1863 (7 Pt B):1857-1863. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.11.006
- Ehler E, Moore-Morris T, Lange S (2013) Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp* (79). doi:10.3791/50154
- Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH, Angelini C (2001) Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy. *Neurology* 56 (5):660-665
- Faulkner G, Lanfranchi G, Valle G (2001) Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life* 51 (5):275-282. doi:10.1080/152165401317190761
- Faulkner G, Pallavicini A, Formentin E, Comelli A, Ievolella C, Trevisan S, Bortoletto G, Scannapieco P, Salamon M, Mouly V, Valle G, Lanfranchi G (1999) ZASP: a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J Cell Biol* 146 (2):465-475
- Garvey SM, Rajan C, Lerner AP, Frankel WN, Cox GA (2002) The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics* 79 (2):146-149. doi:10.1006/geno.2002.6685
- Gautel M, Djinović-Carugo K (2016) The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. *J Exp Biol* 219 (Pt 2):135-145. doi:10.1242/jeb.124941
- Gautel M, Mues A, Young P (1999) Control of sarcomeric assembly: the flow of information on titin. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 138:97-137
- Gollnick PD, Sjödin B, Karlsson J, Jansson E, Saltin B (1974) Human soleus muscle: a comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. *Pflugers Arch* 348 (3):247-255
- González-Herrera L, Valenzuela A, Marchal JA, Lorente JA, Villanueva E (2013) Studies on RNA integrity and gene expression in human myocardial tissue, pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. *Forensic Sci Int* 232 (1-3):218-228. doi:10.1016/j.forsciint.2013.08.001
- Granzier HL, Labeit S (2004) The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* 94 (3):284-295. doi:10.1161/01.RES.0000117769.88862.F8
- Granzier HL, Labeit S (2005) Titin and its associated proteins: the third myofibrillar system of the sarcomere. *Adv Protein Chem* 71:89-119. doi:10.1016/S0065-3233(04)71003-7

- Granzier HL, Labeit S (2006) The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring. *Exerc Sport Sci Rev* 34 (2):50-53
- Gregorio CC, Trombitás K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, Suzuki K, Obermayr F, Herrmann B, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S (1998) The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol* 143 (4):1013-1027
- Guyon JR, Kudryashova E, Potts A, Dalkilic I, Brosius MA, Thompson TG, Beckmann JS, Kunkel LM, Spencer MJ (2003) Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans. *Muscle Nerve* 28 (4):472-483. doi:10.1002/mus.10465
- Hansen J, Lesnikova I, Funder AM, Banner J (2014) DNA and RNA analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. *Forensic Sci Med Pathol* 10 (3):322-328. doi:10.1007/s12024-014-9567-2
- Harray I, Farley B (1963) In vitro studies on single beating rat heart cells. I. Growth and organization. *Exp Cell Res* 29:15
- Harvey RP, Lai D, Elliott D, Biben C, Solloway M, Prall O, Stennard F, Schindeler A, Groves N, Lavulo L, Hyun C, Yeoh T, Costa M, Furtado M, Kirk E (2002) Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67:107-114
- Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, Mineki R, Arai T, Taguchi H, Yanagida M, Hirner S, Labeit D, Labeit S, Sorimachi H (2008) Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283 (21):14801-14814. doi:10.1074/jbc.M708262200
- Heineke J, Ruetten H, Willenbockel C, Gross SC, Naguib M, Schaefer A, Kempf T, Hilfiker-Kleiner D, Caroni P, Kraft T, Kaiser RA, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC (2005) Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (5):1655-1660. doi:10.1073/pnas.0405488102
- Heinrich M, Matt K, Lutz-Bonengel S, Schmidt U (2007) Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med* 121 (2):136-142. doi:10.1007/s00414-006-0131-9
- Hentzen ER, Lahey M, Peters D, Mathew L, Barash IA, Fridén J, Lieber RL (2006) Stress-dependent and -independent expression of the myogenic regulatory factors and the MARP genes after eccentric contractions in rats. *J Physiol* 570 (Pt 1):157-167. doi:10.1113/jphysiol.2005.093005
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117 (Pt 25):5965-5973. doi:10.1242/jcs.01589
- Horsley V, Pavlath GK (2004) Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs* 176 (1-3):67-78. doi:10.1159/000075028
- Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, Igarashi J, Aoki K, Hori M, Kuzuya T, Tada M (1996) Heme oxygenase-1 expression and its relation to oxidative stress during primary culture of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 28 (9):1845-1855. doi:10.1006/jmcc.1996.0177
- Hoshijima M (2006) Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (4):H1313-1325. doi:10.1152/ajpheart.00816.2005

- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takeshita A (2000) Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 86 (2):152-157
- Ikeda K, Emoto N, Matsuo M, Yokoyama M (2003) Molecular identification and characterization of a novel nuclear protein whose expression is up-regulated in insulin-resistant animals. *J Biol Chem* 278 (6):3514-3520. doi:10.1074/jbc.M204563200
- Improta S, Politou AS, Pastore A (1996) Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure* 4 (3):323-337
- Ishiguro N, Baba T, Ishida T, Takeuchi K, Osaki M, Araki N, Okada E, Takahashi S, Saito M, Watanabe M, Nakada C, Tsukamoto Y, Sato K, Ito K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol* 160 (5):1767-1778. doi:10.1016/S0002-9440(10)61123-6
- Ishiguro N, Motoi T, Osaki M, Araki N, Minamizaki T, Moriyama M, Ito H, Yoshida H (2005) Immunohistochemical analysis of a muscle ankyrin-repeat protein, Arpp, in paraffin-embedded tumors: evaluation of Arpp as a tumor marker for rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol* 36 (6):620-625. doi:10.1016/j.humpath.2005.04.014
- Ito H, Miller SC, Billingham ME, Akimoto H, Torti SV, Wade R, Gahlmann R, Lyons G, Kedes L, Torti FM (1990) Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (11):4275-4279
- Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, Koga Y, Arimura T, Koyanagi T, Takahashi M, Hohda S, Ueda K, Nouchi T, Hiroe M, Marumo F, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A (2002) Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 291 (2):385-393. doi:10.1006/bbrc.2002.6448
- Jasnic-Savovic J, Krause S, Savic S, Kojic A, Kovcic V, Boskovic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Schreiber-Katz O, Vogel JG, Schoser BG, Walter MC, Valle G, Radojkovic D, Faulkner G, Kojic S (2016) Differential expression and localization of Ankrd2 isoforms in human skeletal and cardiac muscles. *Histochem Cell Biol*. doi:10.1007/s00418-016-1465-0
- Jasnic-Savovic J, Nestorovic A, Savic S, Karasek S, Vitulo N, Valle G, Faulkner G, Radojkovic D, Kojic S (2015) Profiling of skeletal muscle Ankrd2 protein in human cardiac tissue and neonatal rat cardiomyocytes. *Histochem Cell Biol* 143 (6):583-597. doi:10.1007/s00418-015-1307-5
- Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Kedes L (1997) A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem* 272 (36):22800-22808
- Kemp TJ, Sadusky TJ, Saltisi F, Carey N, Moss J, Yang SY, Sassoon DA, Goldspink G, Coulton GR (2000) Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics* 66 (3):229-241. doi:10.1006/geno.2000.6213



- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377 (9769):942-955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7
- Kinbara K, Ishiura S, Tomioka S, Sorimachi H, Jeong SY, Amano S, Kawasaki H, Kolmerer B, Kimura S, Labeit S, Suzuki K (1998) Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem J* 335 ( Pt 3):589-596
- Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K (1997) Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys* 342 (1):99-107. doi:10.1006/abbi.1997.0108
- Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR (2002) The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111 (7):943-955
- Knöll R, Linke WA, Zou P, Miodic S, Kostin S, Buyandelger B, Ku CH, Neef S, Bug M, Schäfer K, Knöll G, Felkin LE, Wessels J, Toischer K, Hagn F, Kessler H, Didié M, Quentin T, Maier LS, Teucher N, Unsöld B, Schmidt A, Birks EJ, Gunkel S, Lang P, Granzier H, Zimmermann WH, Field LJ, Faulkner G, Döbelstein M, Barton PJ, Sattler M, Wilmanns M, Chien KR (2011) Telethonin deficiency is associated with maladaptation to biomechanical stress in the mammalian heart. *Circ Res* 109 (7):758-769. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.245787
- Kojic S, Medeot E, Faulkner G (2009) Characterization of Antibodies Directed Against the Ankrd2 Human Muscle Protein. *Archive of Biological Science* 61 (4):9
- Kojic S, Medeot E, Guccione E, Krmac H, Zara I, Martinelli V, Valle G, Faulkner G (2004) The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol* 339 (2):313-325. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.071
- Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Belgrano A, Stankovic M, Divac A, Faulkner G (2010) A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Arch Biochem Biophys* 502 (1):60-67. doi:10.1016/j.abb.2010.06.029
- Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Protic O, Jasnica-Savovic J, Faulkner G, Radojkovic D (2015) Cardiac transcription factor Nkx2.5 interacts with p53 and modulates its activity. *Arch Biochem Biophys* 569:45-53. doi:10.1016/j.abb.2015.02.001
- Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G (2011) Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48 (5-6):269-294. doi:10.3109/10408363.2011.643857
- Kojić S (2002) "Karakterizacija humanog mišićnog proteina Ankrd2", doktorska disertacija.
- Kolmerer B, Olivieri N, Witt CC, Herrmann BG, Labeit S (1996) Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol* 256 (3):556-563. doi:10.1006/jmbi.1996.0108
- Koppelkamm A, Vennemann B, Fracasso T, Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Heinrich M (2010) Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation

- of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *Int J Legal Med* 124 (5):371-380. doi:10.1007/s00414-010-0433-9
- Kramerova I, Kudryashova E, Wu B, Ottenheijm C, Granzier H, Spencer MJ (2008) Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 17 (21):3271-3280. doi:10.1093/hmg/ddn223
- Krauss RS, Cole F, Gaio U, Takaesu G, Zhang W, Kang JS (2005) Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J Cell Sci* 118 (Pt 11):2355-2362. doi:10.1242/jcs.02397
- Krüger M, Linke WA (2011) The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem* 286 (12):9905-9912. doi:10.1074/jbc.R110.173260
- Kuo H, Chen J, Ruiz-Lozano P, Zou Y, Nemer M, Chien KR (1999) Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development* 126 (19):4223-4234
- Kurabayashi M, Dutta S, Jeyaseelan R, Kedes L (1995) Doxorubicin-induced Id2A gene transcription is targeted at an activating transcription factor/cyclic AMP response element motif through novel mechanisms involving protein kinases distinct from protein kinase C and protein kinase A. *Mol Cell Biol* 15 (11):6386-6397
- Kurabayashi M, Jeyaseelan R, Kedes L (1993) Antineoplastic agent doxorubicin inhibits myogenic differentiation of C2 myoblasts. *J Biol Chem* 268 (8):5524-5529
- Kuryłowicz A, Nauman J (2008) The role of nuclear factor-kappaB in the development of autoimmune diseases: a link between genes and environment. *Acta Biochim Pol* 55 (4):629-647
- Laing NG, Nowak KJ (2005) When contractile proteins go bad: the sarcomere and skeletal muscle disease. *Bioessays* 27 (8):809-822. doi:10.1002/bies.20269
- Lanfranchi G, Muraro T, Caldara F, Pacchioni B, Pallavicini A, Pandolfo D, Toppo S, Trevisan S, Scarso S, Valle G (1996) Identification of 4370 expressed sequence tags from a 3'-end-specific cDNA library of human skeletal muscle by DNA sequencing and filter hybridization. *Genome Res* 6 (1):35-42
- Lange S, Auerbach D, McLoughlin P, Perriard E, Schäfer BW, Perriard JC, Ehler E (2002) Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci* 115 (Pt 24):4925-4936
- Lange S, Gehmlich K, Lun AS, Blondelle J, Hooper C, Dalton ND, Alvarez EA, Zhang X, Bang ML, Abassi YA, Dos Remedios CG, Peterson KL, Chen J, Ehler E (2016) MLP and CARP are linked to chronic PKC $\alpha$  signalling in dilated cardiomyopathy. *Nat Commun* 7:12120. doi:10.1038/ncomms12120
- Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edström L, Ehler E, Udd B, Gautel M (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 308 (5728):1599-1603. doi:10.1126/science.1110463
- Laure L, Danièle N, Suel L, Marchand S, Aubert S, Bourg N, Roudaut C, Duguez S, Bartoli M, Richard I (2010) A new pathway encompassing calpain 3 and its newly identified substrate cardiac ankyrin repeat protein is involved in the

- regulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway in skeletal muscle. *FEBS J* 277 (20):4322-4337. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07820.x
- Lee EH, Gao M, Pinotsis N, Wilmanns M, Schulten K (2006) Mechanical strength of the titin Z1Z2-telethonin complex. *Structure* 14 (3):497-509. doi:10.1016/j.str.2005.12.005
- Lehti M, Kivelä R, Komi P, Komulainen J, Kainulainen H, Kyröläinen H (2009) Effects of fatiguing jumping exercise on mRNA expression of titin-complex proteins and calpains. *J Appl Physiol* (1985) 106 (4):1419-1424. doi:10.1152/jappphysiol.90660.2008
- Lehti TM, Silvennoinen M, Kivelä R, Kainulainen H, Komulainen J (2007) Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretch-sensing complexes in mouse striated muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2):E533-542. doi:10.1152/ajpendo.00229.2006
- Linke WA (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res* 77 (4):637-648. doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.029
- Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM (2011) Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 51 (3):288-298. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.012
- Lun AS, Chen J, Lange S (2014) Probing muscle ankyrin-repeat protein (MARPs) structure and function. *Anat Rec (Hoboken)* 297 (9):1615-1629. doi:10.1002/ar.22968
- Lunn MR, Wang CH (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371 (9630):2120-2133. doi:10.1016/S0140-6736(08)60921-6
- Luther PK (2009) The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil* 30 (5-6):171-185. doi:10.1007/s10974-009-9189-6
- Lyon RC, Zanella F, Omens JH, Sheikh F (2015) Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 116 (8):1462-1476. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304937
- Martinelli VC, Kyle WB, Kojic S, Vitulo N, Li Z, Belgrano A, Maiuri P, Banks L, Vatta M, Valle G, Faulkner G (2014) ZASP interacts with the mechanosensing protein Ankrd2 and p53 in the signalling network of striated muscle. *PLoS One* 9 (3):e92259. doi:10.1371/journal.pone.0092259
- Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, Wilmanns M, Gautel M (1998) Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395 (6705):863-869. doi:10.1038/27603
- Mckoy G, Hou Y, Yang SY, Vega Avelaira D, Degens H, Goldspink G, Coulton GR (2005) Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. *J Appl Physiol* (1985) 98 (6):2337-2343; discussion 2320. doi:10.1152/jappphysiol.01046.2004
- McKoy G, Léger ME, Bacou F, Goldspink G (1998) Differential expression of myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in four functionally diverse rabbit skeletal muscles during pre- and postnatal development. *Dev Dyn* 211 (3):193-203. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199803)211:3<193::AID-AJA1>3.0.CO;2-C
- Michaelson JE, Huang H (2012) Cell-cell junctional proteins in cardiovascular mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 40 (3):568-577. doi:10.1007/s10439-011-0439-6

- Mikhailov AT, Torrado M (2008) The enigmatic role of the ankyrin repeat domain 1 gene in heart development and disease. *Int J Dev Biol* 52 (7):811-821. doi:10.1387/ijdb.082655am
- Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 333 (5):951-964
- Mohamed JS, Lopez MA, Cox GA, Boriek AM (2010) Anisotropic regulation of Ankrd2 gene expression in skeletal muscle by mechanical stretch. *FASEB J* 24 (9):3330-3340. doi:10.1096/fj.10-158386
- Mohamed JS, Lopez MA, Cox GA, Boriek AM (2013) Ankyrin repeat domain protein 2 and inhibitor of DNA binding 3 cooperatively inhibit myoblast differentiation by physical interaction. *J Biol Chem* 288 (34):24560-24568. doi:10.1074/jbc.M112.434423
- Moriyama M, Tsukamoto Y, Fujiwara M, Kondo G, Nakada C, Baba T, Ishiguro N, Miyazaki A, Nakamura K, Hori N, Sato K, Shomori K, Takeuchi K, Satoh H, Mori S, Ito H (2001) Identification of a novel human ankyrin-repeated protein homologous to CARP. *Biochem Biophys Res Commun* 285 (3):715-723. doi:10.1006/bbrc.2001.5216
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13 (6):1435-1448. doi:10.1110/ps.03554604
- Mues A, van der Ven PF, Young P, Fürst DO, Gautel M (1998) Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett* 428 (1-2):111-114
- Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110 (2):155-162. doi:10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF
- Nakada C, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M (2003a) Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathol Int* 53 (10):653-658
- Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M (2004) Altered expression of ARPP protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathobiology* 71 (1):43-51. doi:10.1159/000072961
- Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Takeda S, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M (2003b) Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy. *Lab Invest* 83 (5):711-719
- Nakamura K, Nakada C, Takeuchi K, Osaki M, Shomori K, Kato S, Ohama E, Sato K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Pathobiology* 70 (4):197-203. doi:69329
- Nestorovic A, Jasic-Savovic J, Faulkner G, Radojkovic D, Kojic S (2014) Ankrd1-mediated signaling is supported by its interaction with Zonula Occludens-1. *Arch Biol Sci* 66 (3):10

- Noorman M, van der Heyden MA, van Veen TA, Cox MG, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV (2009) Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling. *J Mol Cell Cardiol* 47 (1):23-31. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.016
- Ojima K, Ono Y, Hata S, Koyama S, Doi N, Sorimachi H (2005) Possible functions of p94 in connectin-mediated signaling pathways in skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* 26 (6-8):409-417. doi:10.1007/s10974-005-9023-8
- Olson EN (1993) Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. *Circ Res* 72 (1):1-6
- Ono Y, Hayashi C, Doi N, Kitamura F, Shindo M, Kudo K, Tsubata T, Yanagida M, Sorimachi H (2007) Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics--possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotechnol J* 2 (5):565-576. doi:10.1002/biot.200700018
- Ono Y, Torii F, Ojima K, Doi N, Yoshioka K, Kawabata Y, Labeit D, Labeit S, Suzuki K, Abe K, Maeda T, Sorimachi H (2006) Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J Biol Chem* 281 (27):18519-18531. doi:10.1074/jbc.M601029200
- Pallavicini A, Kojić S, Bean C, Vainzof M, Salamon M, Ievolella C, Bortoletto G, Pacchioni B, Zatz M, Lanfranchi G, Faulkner G, Valle G (2001) Characterization of human skeletal muscle Ankrd2. *Biochem Biophys Res Commun* 285 (2):378-386. doi:10.1006/bbrc.2001.5131
- Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW (1983) A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (4):1008-1012
- Partemi S, Berne PM, Batlle M, Berruezo A, Mont L, Riuró H, Ortiz JT, Roig E, Pascali VL, Brugada R, Brugada J, Oliva A (2010) Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology. *Forensic Sci Int* 203 (1-3):99-105. doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.005
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (8):2444-2448
- Phang TW, Shi CY, Chia JN, Ong CN (1994) Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues. *J Forensic Sci* 39 (5):1275-1279
- Pizon V, Iakovenko A, Van Der Ven PF, Kelly R, Fatu C, Fürst DO, Karsenti E, Gautel M (2002) Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci* 115 (Pt 23):4469-4482
- Puchner EM, Alexandrovich A, Kho AL, Hensen U, Schäfer LV, Brandmeier B, Gräter F, Grubmüller H, Gaub HE, Gautel M (2008) Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (36):13385-13390. doi:10.1073/pnas.0805034105
- Rakicevic L, Petrovic N, Radojkovic D, Kojic S (2011) The expression of muscle ankyrin repeat proteins in brown adipose tissue. *Arch Biol Sci* 63 (4):6
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21 (7):267-271
- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougereuse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C (1995) Mutations in the

- proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81 (1):27-40
- Roberts MD, Childs TE, Brown JD, Davis JW, Booth FW (2012) Early depression of Ankrd2 and Csrp3 mRNAs in the polyribosomal and whole tissue fractions in skeletal muscle with decreased voluntary running. *J Appl Physiol* (1985) 112 (8):1291-1299. doi:10.1152/jappphysiol.01419.2011
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234 (4774):364-368
- Samaras SE, Almodóvar-García K, Wu N, Yu F, Davidson JM (2015) Global deletion of Ankrd1 results in a wound-healing phenotype associated with dermal fibroblast dysfunction. *Am J Pathol* 185 (1):96-109. doi:10.1016/j.ajpath.2014.09.018
- Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R, Group EW (2009) EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 45 (6):931-991. doi:10.1016/j.ejca.2008.11.018
- Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* 81 (11):1810-1816
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454 (7207):961-967. doi:10.1038/nature07182
- Sheikh F, Raskin A, Chu PH, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M, Liang X, Zhang T, Yajima T, Gu Y, Dalton ND, Mahata SK, Dorn GW, Brown JH, Heller-Brown J, Peterson KL, Omens JH, McCulloch AD, Chen J (2008) An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest* 118 (12):3870-3880. doi:10.1172/JCI34472
- Sheikh F, Ross RS, Chen J (2009) Cell-cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc Med* 19 (6):182-190. doi:10.1016/j.tcm.2009.12.001
- Shomori K, Nagashima Y, Kuroda N, Honjo A, Tsukamoto Y, Tokuyasu N, Maeta N, Matsuura K, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Ito H, Moriyama M (2007) ARPP protein is selectively expressed in renal oncocytoma, but rarely in renal cell carcinomas. *Mod Pathol* 20 (2):199-207. doi:10.1038/modpathol.3800730
- Singal PK, Deally CM, Weinberg LE (1987) Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 19 (8):817-828
- Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N (2000) Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207 (1-2):77-86
- Smerdu V, Erzen I (2001) Dynamic nature of fibre-type specific expression of myosin heavy chain transcripts in 14 different human skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 22 (8):647-655
- Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K (1989) Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264 (33):20106-20111
- Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 328 ( Pt 3):721-732

- Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K (1995) Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem* 270 (52):31158-31162
- Soukup T, Smerdu V (2015) Effect of altered innervation and thyroid hormones on myosin heavy chain expression and fiber type transitions: a mini-review. *Histochem Cell Biol* 143 (2):123-130. doi:10.1007/s00418-014-1276-0
- Sreejit P, Kumar S, Verma RS (2008) An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44 (3-4):45-50. doi:10.1007/s11626-007-9079-4
- Tachtsis B, Smiles WJ, Lane SC, Hawley JA, Camera DM (2016) Acute Endurance Exercise Induces Nuclear p53 Abundance in Human Skeletal Muscle. *Front Physiol* 7:144. doi:10.3389/fphys.2016.00144
- Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA (1967) Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 20 (3):333-353
- Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I (2003) Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol* 23 (24):9127-9135
- Tavichakorntrakool R, Prasongwattana V, Sriboonlue P, Puapairoj A, Pongskul J, Khuntikeo N, Hanpanich W, Yenchitsomanus PT, Wongkham C, Thongboonkerd V (2008) Serial analyses of postmortem changes in human skeletal muscle: A case study of alterations in proteome profile, histology, electrolyte contents, water composition, and enzyme activity. *Proteomics Clin Appl* 2 (9):1255-1264. doi:10.1002/prca.200800051
- Tee JM, Peppelenbosch MP (2010) Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45 (4):318-330. doi:10.3109/10409238.2010.488217
- Torrado M, Iglesias R, Mikhailov AT (2008) Detection of protein interactions based on GFP fragment complementation by fluorescence microscopy and spectrofluorometry. *Biotechniques* 44 (1):70, 72, 74
- Torrado M, López E, Centeno A, Castro-Beiras A, Mikhailov AT (2004) Left-right asymmetric ventricular expression of CARP in the piglet heart: regional response to experimental heart failure. *Eur J Heart Fail* 6 (2):161-172. doi:10.1016/j.ejheart.2003.11.004
- Torrado M, Nespereira B, López E, Centeno A, Castro-Beiras A, Mikhailov AT (2005) ANKRD1 specifically binds CASQ2 in heart extracts and both proteins are co-enriched in piglet cardiac Purkinje cells. *J Mol Cell Cardiol* 38 (2):353-365. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.11.034
- Tskhovrebova L, Trinick J (2003) Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (9):679-689. doi:10.1038/nrm1198
- Tsukamoto Y, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Moriyama M (2008) Arpp/Ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury. *Histochemistry and Cell Biology* 129:55-64

- Tsukamoto Y, Senda T, Nakano T, Nakada C, Hida T, Ishiguro N, Kondo G, Baba T, Sato K, Osaki M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type 1 skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation. *Lab Invest* 82 (5):645-655
- van der Flier A, Kuikman I, Kramer D, Geerts D, Kreft M, Takafuta T, Shapiro SS, Sonnenberg A (2002) Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits. *J Cell Biol* 156 (2):361-376. doi:10.1083/jcb.200103037
- Von Hoff DD, Rozenzweig M, Layard M, Slavik M, Muggia FM (1977) Daunomycin-induced cardiotoxicity in children and adults. A review of 110 cases. *Am J Med* 62 (2):200-208
- Witt CC, Ono Y, Puschmann E, McNabb M, Wu Y, Gotthardt M, Witt SH, Haak M, Labeit D, Gregorio CC, Sorimachi H, Granzier H, Labeit S (2004) Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling. *J Mol Biol* 336 (1):145-154
- Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S (2005) MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* 350 (4):713-722. doi:10.1016/j.jmb.2005.05.021
- Wu HC, Yamankurt G, Luo J, Subramaniam J, Hashmi SS, Hu H, Cunha SR (2015) Identification and characterization of two ankyrin-B isoforms in mammalian heart. *Cardiovasc Res* 107 (4):466-477. doi:10.1093/cvr/cvv184
- Yamankurt G, Wu HC, McCarthy M, Cunha SR (2015) Exon organization and novel alternative splicing of Ank3 in mouse heart. *PLoS One* 10 (5):e0128177. doi:10.1371/journal.pone.0128177
- Yang ZJ, Broz DK, Noderer WL, Ferreira JP, Overton KW, Spencer SL, Meyer T, Tapscott SJ, Attardi LD, Wang CL (2015) p53 suppresses muscle differentiation at the myogenin step in response to genotoxic stress. *Cell Death Differ* 22 (4):560-573. doi:10.1038/cdd.2014.189
- Yoshida M, Sho E, Nanjo H, Takahashi M, Kobayashi M, Kawamura K, Honma M, Komatsu M, Sugita A, Yamauchi M, Hosoi T, Ito Y, Masuda H (2010) Weaving hypothesis of cardiomyocyte sarcomeres: discovery of periodic broadening and narrowing of intercalated disk during volume-load change. *Am J Pathol* 176 (2):660-678. doi:10.2353/ajpath.2010.090348
- Yusenko MV (2010) Molecular pathology of renal oncocytoma: a review. *Int J Urol* 17 (7):602-612. doi:10.1111/j.1442-2042.2010.02574.x
- Zhang J, He L, Geng XF, Firestone RA, Hong YP, Li Y (2014) Anti-cancer effects of novel doxorubicin prodrug PDOX in MCF-7 breast cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 34 (4):521-528. doi:10.1007/s11596-014-1309-x
- Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, Caldwell RL, Shou W, Field LJ (2009) Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation* 119 (1):99-106. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.799700
- Zolk O, Frohme M, Maurer A, Kluxen FW, Hentsch B, Zubakov D, Hoheisel JD, Zucker IH, Pepe S, Eschenhagen T (2002) Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 293 (5):1377-1382. doi:10.1016/S0006-291X(02)00387-X



- Zou P, Pinotsis N, Lange S, Song YH, Popov A, Mavridis I, Mayans OM, Gautel M, Wilmanns M (2006) Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* 439 (7073):229-233. doi:10.1038/nature04343
- Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR (1997) CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* 124 (4):793-804

## *8. Prilozi*

## BIOGRAFIJA

Jovana G. Jasnić je rođena 8. januara 1984. godine u Beogradu. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, završila je 2009. godine, sa prosečnom ocenom 9,31. Diplomski rad pod naslovom “Uticaj seruma i retinoične kiseline na neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija praćenjem ekspresije *SOX3* gena” uradila je u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), pod mentorstvom dr Gordane Nikčević. Za ovaj rad je dobila nagradu Goran Ljubijankić za najbolji diplomski rad iz oblasti molekularne biologije u Srbiji. Doktorske studije je upisala 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija. Od 2010. do kraja 2011. godine je bila zaposlena u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku IMGGI. Od 2012. godine je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu biologiju IMGGI gde je započela rad na izradi doktorske teze pod mentorstvom dr Snežane Kojić. Učesnik je nacionalnog projekta “Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa- strukturna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera” (MPNTR Republike Srbije ev. br. 173008). Takođe je učesnik dva međunarodna projekta: naučno-tehnološke saradnje Republike Srbije i Savezne Republike Nemačke “Zebra-ribica (*Danio rerio*) kao model sistem za izučavanje uloge mišićnih proteina sa ankirinskim ponovcima *Ankrd1* i *Ankrd2* u razviću i regeneraciji srca” (2015-1016) i bilateralne saradnje Republike Srbije i Narodne Republike Kine “Funkcionalna karakterizacija mišićnog signalnog proteina *Ankrd2* kod ptica” (2015-2017). Jovana Jasnić je do danas objavila 6 radova, od toga 5 u časopisima međunarodnog značaja i ima 10 kongresnih saopštenja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ **Јована Г. Јаснић** \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ **М3011/2009** \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

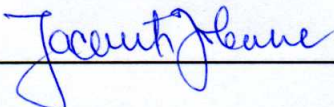
**Одређивање профила експресије и унутарћелијске локализације протеина**

\_\_\_\_\_ **ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека** \_\_\_\_\_

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ **21.10.2016.** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Г. Јаснић

Број индекса М3011/2009

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Одређивање профила експресије и унутарћелијске локализације протеина ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека

Ментор др Снежана Којић и др Драгица Радојковић

Потписани/а Јована Г. Јаснић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 21.10.2016.

Јаснић Јована

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Одређивање профила експресије и унутарћелијске локализације протеина**

**ANKRD2 у срцу и скелетним мишићима човека**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21.10.2016.





1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

# Profiling of skeletal muscle Ankrd2 protein in human cardiac tissue and neonatal rat cardiomyocytes

Jovana Jasnic-Savovic · Aleksandra Nestorovic · Slobodan Savic ·  
Sinisa Karasek · Nicola Vitulo · Giorgio Valle · Georgine Faulkner ·  
Dragica Radojkovic · Snezana Kojic

Accepted: 26 December 2014 / Published online: 14 January 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Muscle-specific mechanosensors Ankrd2/Arpp (ankyrin repeat protein 2) and Ankrd1/CARP (cardiac ankyrin repeat protein) have an important role in transcriptional regulation, myofibrillar assembly, cardiogenesis and myogenesis. In skeletal muscle myofibrils, Ankrd2 has a structural role as a component of a titin associated stretch-sensing complex, while in the nucleus it exerts regulatory function as transcriptional co-factor. It is also involved in myogenic differentiation and coordination of myoblast proliferation. Although expressed in the heart, the role of Ankrd2 in the cardiac muscle is completely unknown. Recently, we have shown that hypertrophic and dilated cardiomyopathy pathways are altered upon Ankrd2 silencing suggesting the importance of this protein in cardiac tissue. Here we provide the underlying basis for the functional investigation of Ankrd2 in the heart. We confirmed reduced Ankrd2 expression levels in human heart in comparison with Ankrd1 using RNAseq and Western blot. For the first time we demonstrated that, apart from the sarcomere and nucleus, both proteins are localized to the intercalated disks

of human cardiomyocytes. We further tested the expression and localization of endogenous Ankrd2 in rat neonatal cardiomyocytes, a well-established model for studying cardiac-specific proteins. Ankrd2 was found to be expressed in both the cytoplasm and nucleus, independently from maturation status of cardiomyocytes. In contrast to Ankrd1, it is not responsive to the cardiotoxic drug Doxorubicin, suggesting that different mechanisms govern their expression in cardiac cells.

**Keywords** Ankrd2 · Ankrd1 · Human heart · Rat neonatal cardiomyocytes · Intercalated disks · Doxorubicin

## Introduction

Ankrd2, the MARP (Muscle Ankyrin Repeat Proteins) family member, is a multi-tasking protein actively involved in muscle cell signaling. It can act as a powerful regulator in human skeletal muscle cells through participation in intercellular (cytokine–cytokine receptor interaction, focal adhesion, tight junction, gap junction and regulation of the actin cytoskeleton) and intracellular communication (calcium, MAPK, p53, TGF- $\beta$  and Wnt signaling) pathways (Belgrano et al. 2011). It physically interacts with transcription regulators (p53, YB-1 and PML) (Kojic et al. 2004), as well as with structural and signaling proteins (telethonin, ZASP, calpain-3, titin, Akt2, ZO-1) (Belgrano et al. 2011; Cenni et al. 2011; Hayashi et al. 2008; Kojic et al. 2004; Martinelli et al. 2014; Miller et al. 2003). The role of Ankrd2 in the regulation of gene expression is strongly supported by its accumulation in the nucleus after muscle injury (Tsukamoto et al. 2008) and in proliferating myoblasts (Kojic et al. 2004). Ankrd2 participates in signaling pathways via physical interaction with PDZ and SH3

---

J. Jasnic-Savovic · A. Nestorovic · D. Radojkovic · S. Kojic (✉)  
Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,  
University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, PO Box 23,  
11010 Belgrade, Serbia  
e-mail: snezanakojic@imgge.bg.ac.rs

S. Savic  
Institute of Forensic Medicine, School of Medicine, University  
of Belgrade, Deligradska 31a, 11000 Belgrade, Serbia

S. Karasek  
Institute for Medical Research, Military Medical Academy,  
Crnotravska 17, 11000 Belgrade, Serbia

N. Vitulo · G. Valle · G. Faulkner  
CRIBI, Via Ugo Bassi 58, 35121 Padua, Italy



proteins, which act as platforms for multiprotein complex assembly (Belgrano et al. 2011).

The Ankrd2 and other MARPs have several important functional domains: ankyrin repeats (Tee and Pepelenbosch 2010) and coil–coils (Burkhard et al. 2001) involved in protein–protein interaction and homodimerization, PEST motifs that are regions of protein instability (Rechsteiner and Rogers 1996; Rogers et al. 1986) and a putative nuclear localization signal (NLS) for sorting proteins to the nucleus. Ankrd2 is predominantly expressed in skeletal muscle, with preferential localization to slow-type fibers (Kojic et al. 2011). It has dual intracellular localization (nuclear and sarcomeric) (Tsukamoto et al. 2002), which mirrors its dual, structural and regulatory functions (Ishiguro et al. 2002; Kemp et al. 2000; Pallavicini et al. 2001). As stress signaling factor, it is strongly upregulated in myocytes upon stretch (Kemp et al. 2000) and denervation of skeletal muscle (Tsukamoto et al. 2002), as well as during eccentric exercise (Barash et al. 2004).

So far, changes in Ankrd2 expression level were observed in skeletal muscle disorders such as muscular dystrophy, congenital myopathy, spinal muscular atrophy (Nakada et al. 2004) and amyotrophic lateral sclerosis (Nakamura et al. 2002) pointing to its potential role as diagnostic marker. It is also implicated in cardiac pathologies since Ankrd2 was found to be upregulated in human dilated cardiomyopathy (Nagueh et al. 2004).

Although a low level of expression of Ankrd2 in the ventricles, the interventricular septum, and the apex of the heart is reported (Ishiguro et al. 2002; Moriyama et al. 2001), its function in cardiac muscle is completely unknown. In our previous experiments, we already showed that Ankrd2 expression is potentially regulated by the cardiac-specific transcriptional factors Nkx2.5, HAND2 and Ankrd1 (Belgrano et al. 2011). Moreover, we demonstrated that both the hypertrophic and dilated cardiomyopathic pathways were affected when Ankrd2 was silenced in mouse myotubes (Belgrano et al. 2011), further indicating its emerging role in cardiac muscle. Having this in mind, the goal of this study was to do preliminary work for exploring the cardiac-specific function of Ankrd2, by determining its expression profile and intracellular localization in a cardiac-specific cellular milieu such as primary neonatal rat cardiomyocytes (NRCM). Expression and localization of endogenous and overexpressed Ankrd2, as well as its responsiveness to the cardiotoxic anti-tumor drug Doxorubicin (Dox) was monitored in this model that is commonly used for research on cardiac-specific proteins. At the same time, we tackled the question of the simultaneous existence and functional relationship of the two closely related family members, Ankrd2 and Ankrd1, in human cardiac tissue by comparing their expression profiles. Moreover, we have

identified intercalated disks (ICDs) as a novel intracellular localization site of both Ankrd2 and Ankrd1 in human cardiomyocytes.

## Materials and methods

### Human material

This study included samples of left ventricles of two individuals which committed suicide and thus were subjected to forensic autopsy. Tissue samples of 5 mm<sup>3</sup> were obtained within 10 h after death. Subject S1 was 27-year-old female, without a history or post-mortal findings suggestive of cardiovascular disease or hypertension. The heart had normal anatomical appearance (weight was 300 g, dimensions were 10 × 8 cm and the wall thickness was up to 10 mm for the left and up to 2 mm for the right ventricle), and on gross, as well as on histological examination, no pathological changes were seen. The heart originated from 51-year-old male (S2) was mildly hypertrophic (weight was 440 g, dimensions were 11 × 9 cm, and the wall thickness was up to 15 mm for the left and up to 5 mm for the right ventricle). Low levels of fibrosis on cardiac muscle and arteriosclerosis on coronary arteries were observed. This subject had a medical history of arterial hypertension which most probably caused mild hypertrophy observed during autopsy. Tissue samples were shock-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at −80 °C. The study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine, University of Belgrade (29/II-7) and in agreement with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and the Law on Health Care of the Republic of Serbia (article 222).

### Cell culture and transfection

COS-7 cells were maintained in DMEM (Life Technologies) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) (Life Technologies) and gentamycin (PAA). They were transfected using PEI MAX (Polyethylenimine MAX, Polysciences), at 1:3 DNA to transfection reagent ratio. Complex containing PEI MAX, DMEM and DNA was incubated for 15 min and added to the cells. Cells were lysed 24 h after transfection in buffer containing 50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5 % Nonidet P-40 and protease inhibitor cocktail (Roche).

### Antibodies

Mouse polyclonal anti-Ankrd1 and anti-Ankrd2 antibodies were prepared against recombinant His-tagged human Ankrd1 protein and N terminus of Ankrd2 (aa 32–166). Immunization was performed as previously described

(Kojic et al. 2009). Commercial antibodies used in this study were as follows: mouse anti-connexin 43 (BD Biosciences), mouse anti- $\beta$  catenin (BD Biosciences), mouse anti-GAPDH (Abcam), rabbit anti-alpha actinin2 (Abcam) and mouse anti-alpha actinin2 (Sigma).

### Constructs

Ankrd1-GFP and Ankrd2-GFP constructs were made by inserting Ankrd1 and Ankrd2 coding sequences into *PstI/BamHI* and *BglII/EcoRI* sites, respectively, of pEGFP-C1 vector (Clontech). Primary sequence of inserts was verified by DNA sequencing.

### Whole Transcriptome Library Preparation and RNA-Seq

These experiments are described in the study of Martinelli and co-authors (Martinelli et al. 2014). Briefly, RNA from two adult hearts (Ambion and Amsbio), three skeletal muscles (Ambion, Amsbio and Stratagene), as well as one sample of both fetal heart and skeletal muscle RNA (Stratagene) were used for whole transcriptome library preparation and subsequent sequencing on either a SOLiD or Ion Proton NGS machine (Life Technology). SOLiD reads were mapped to the reference human genome (hg19) using PASS program, version 2.11 (Campagna et al. 2009), the minimal percentage identity was set to 90 %, and one gap was allowed. The Ion Proton reads were mapped using the program GSNAP (Wu and Nacu 2010) with default parameters except for the percentage identity that was set to 90 %. Cufflinks version 2.1.1 (Trapnell et al. 2010) was run to quantify the transcripts using the bias correction option to improve the estimate of accuracy of transcript abundance (Roberts et al. 2011). To normalize the counts related to the expression level of each gene in a sample, the counts were divided by the median value of the sample and multiplied by the mean of the medians of all the samples.

### Primary culture of rat neonatal cardiomyocytes, transfection and Dox treatment

NRCM were isolated and cultured as previously described (Martinelli et al. 2012). Animals were maintained under pathogen-free conditions, and tissue explants were performed in accordance with the relevant European Union legislation. Briefly, 1-day-old Wistar rat pups were killed by decapitation, hearts were removed, cut into small pieces and dissociated by enzymatic digestion in CBFHH (calcium and bicarbonate -free Hanks with Hepes) buffer containing 0.5 mg/ml of collagenase type 2 (Sigma), and 1 mg/ml of Pancreatine (Sigma). Non-myocyte cells were removed from cell suspension and separated from cardiomyocytes during two rounds of preplating, 1 h each, which

enabled their selective attachment. Cardiomyocytes were maintained in medium containing DMEM (Life Technologies), 10 % FCS (Life Technologies), 5 % horse serum (Life Technologies), 1 % vitamin B12 (Sigma) and penicillin/streptomycin mixture of antibiotics (PAA) and incubated in a humid 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. NRCMs were transfected with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Five days after isolation cells were treated with 0.5 and 1  $\mu$ M Dox (Pfizer) for 24 h.

### Western blot

Whole cell lysates were prepared from cardiomyocytes 2–4 days after isolation or after treatment with Dox. Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and lysed for 20 min in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5 % Nonidet P-40 and protease inhibitor cocktail (Roche). After brief sonication lysates were stored at -80 °C.

Human heart lysates were prepared by mincing the tissue in liquid nitrogen. Tissue powder was resuspended in buffer containing 4 % SDS, 125 mM Tris pH 8.8, 40 % glycerol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 100 mM dithiothreitol (DTT) and briefly sonicated (Cooper et al. 2003).

Proteins from cellular and tissue lysates were separated by SDS PAGE (12 %), transferred to PVDF membrane (Immobilon P, Millipore) and stained with Ponceau S solution to verify transfer efficiency. The membrane was incubated in blocking solution containing 10 % non-fat dried milk in PBS-T (0.1 % Tween 20 in PBS) at 4 °C overnight, followed by 1 h incubation at room temperature with each of the primary and secondary antibodies diluted in 5 % non-fat dried milk in PBS-T. Secondary antibody was HRP-conjugated anti-mouse antibody (Sigma). Immunoreactive bands were detected using an ECL kit (Millipore).

### Immunocytochemistry

Cardiomyocytes were grown on collagen-coated coverslips and fixed in 3 % paraformaldehyde/2 % sucrose solution for 20 min at room temperature. Fixation was stopped by adding 0.1 M glycine. Cells were permeabilized with 1 % Triton X-100 (USB) and blocked in 2 % bovine serum albumin (BSA). Samples were incubated with mouse polyclonal antibodies to Ankrd1 or Ankrd2 (diluted 1:100), and rabbit polyclonal antibody to alpha actinin2 (diluted 1:250), followed by incubation with fluorophore-conjugated secondary antibodies (Alexa Fluor-488, and Alexa Fluor-546 or Alexa Fluor-594, Life Technologies) and DAPI dye for nuclei staining. Mouse polyclonal antibody

was used to detect alpha actinin2 in transfected NRCM. The cells were mounted on a glass slide using fluorescent mounting medium (DAKO) and analyzed using an inverted fluorescence confocal microscope system (SP8, Leica).

### Immunohistochemistry

Cryopreserved human left ventricle tissue samples were tempered to  $-20^{\circ}\text{C}$  and cut into sections of  $10\ \mu\text{m}$ , using a cryotome (Leica). After air drying, they were fixed for 2 min in acetone, blocked overnight in PBS containing 2 % horse serum and 0.05 % Tween 20 and then stained for 1 h with mouse polyclonal antibodies against Ankrd2 (1:100), Ankrd1 (1:100), connexin 43 (1:500) and  $\beta$  catenin (1:500) diluted in blocking solution. In control experiments, the primary antibody was mouse preimmune serum. After three washes in PBS/0.05 % Tween 20, the samples were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) for 1 h followed by nuclear staining with DAPI dye. The samples were subsequently rinsed three times in PBS/0.05 % Tween 20 and finally mounted with fluorescence mounting medium (DAKO). Images were captured by confocal laser scanning microscopy performed on a Leica SP8 system (Leica). Images were acquired and processed with the Leica LAS AF software.

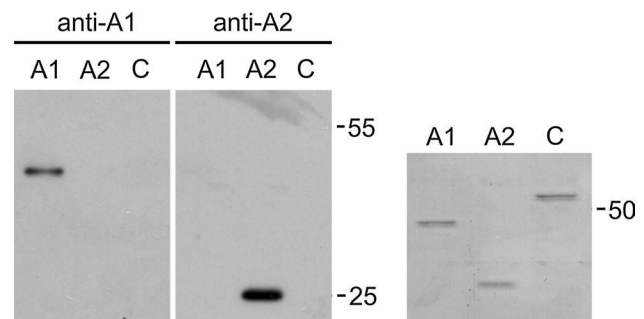
### Statistical analysis

The data were expressed as the mean  $\pm$  SD of four independent experiments and analyzed via Student's *t* test. Differences between groups were considered significant at  $p < 0.01$ .

## Results

### Evaluation of specificity of anti-Ankrd2 and anti-Ankrd1 mouse polyclonal antibodies

In order to exclude the crossreactivity of polyclonal antisera used to detect Ankrd2 and Ankrd1 proteins, which could be caused by high levels of homology between these two MARP proteins, we checked their specificity. First, we tested antisera against His-tagged Ankrd2 and Ankrd1 used for mice immunization by Western blot analysis. Unrelated His-tagged protein was used as control to exclude His-tagged immunoreactivity. As demonstrated on Fig. 1, there was no crossreactivity. In addition, we used an elegant approach for testing the specificity of antibodies according to Dwyer and coauthors (Dwyer et al. 2014). COS-7 cells were transiently transfected with Ankrd2 and Ankrd1 fused to GFP. Subsequently, they were detected by immunocytochemistry and immunoblotting. These experiments clearly



**Fig. 1** The specificity of anti-Ankrd2 and anti-Ankrd1 mouse polyclonal antibodies was demonstrated by Western blot on His-tagged Ankrd2 (A2) and Ankrd1 (A1). Equal amounts of antigens used for immunization of mice as well as an unrelated His-tagged protein (C) (right panel) were blotted and probed with antibodies (left panel). Each antibody recognized only corresponding antigen. Numbers correspond to MW of marker proteins in kDa

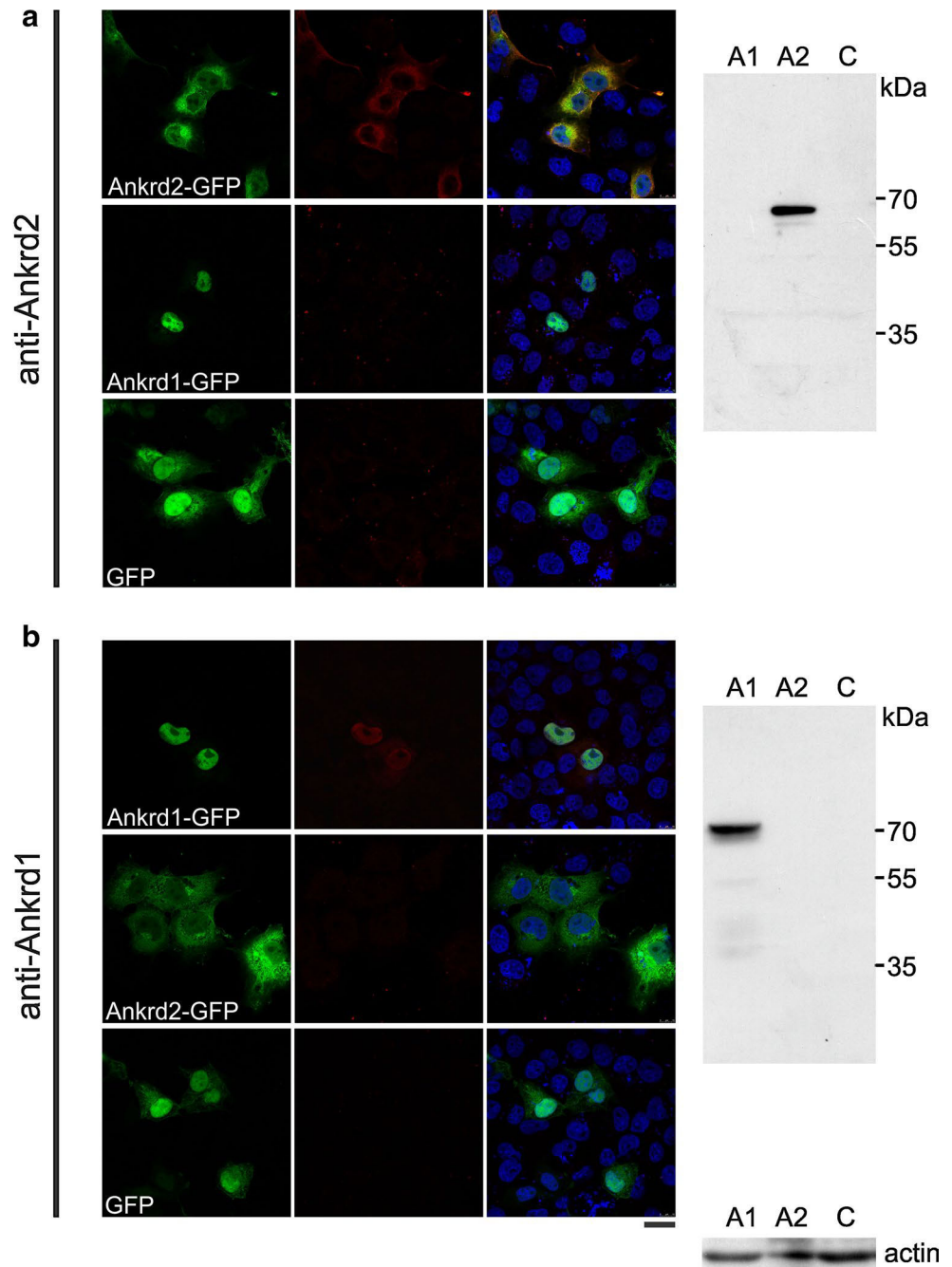
showed that the anti-Ankrd2 antibody only recognized Ankrd2 and did not crossreact with Ankrd1 (Fig. 2a) and vice versa (Fig. 2b).

### Expression and localization profile of Ankrd2 in human heart

Ankrd2 expression level in human cardiac tissue was determined by transcriptome profiling and compared to Ankrd1. Two samples of adult and one of fetal human heart RNA were used for RNAseq, as listed in Table 1. Ankrd2 expression, measured as number of reads, was much lower than the level of Ankrd1 in both adult samples, although the absolute numbers and their ratios were different. In the fetal human heart, only few Ankrd2 transcripts were detected, suggesting a very low expression level. In human skeletal muscle, there were more Ankrd2 transcripts compared to Ankrd1 in all three adult samples, while the number of Ankrd2 and Ankrd1 transcripts in human fetal skeletal muscle was similar. RNAseq data are validated by the obvious tissue specificity of genes known to have cardiac- or skeletal muscle-specific expression (Table 1). Myosin heavy chain 6 (MYH6), myosin heavy chain 7 (MYH7) and N-myc downstream regulated gene 4 (NDRG4) are cardiac specific. In fact, NDRG4 is only detected in brain or heart tissue. Myosin heavy chain 1 (MYH1) and troponin C type2 (TNNC2) are known to be specific for skeletal muscle tissue, whereas myosin heavy chain 3 (MYH3) is specifically expressed in embryonic skeletal muscle. The housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is listed for reference.

Expression levels of Ankrd2 and Ankrd1 in human heart were also determined by Western blot. Protein extracts were prepared from the hearts of two subjects (S1 and S2)

**Fig. 2** Demonstration of the specificity of anti-Ankrd2 (a) and anti-Ankrd1 (b) mouse polyclonal antibodies on MARP proteins expressed in eukaryotic system. *Left panels* are confocal images of COS-7 cells transiently transfected with either GFP-Ankrd2, GFP-Ankrd1 or GFP used as negative control (*green signal*). Cells were counterstained with the antibodies against Ankrd2 or Ankrd1 (*red signal*). *Yellow signal* was observed upon specific reaction of the antibody with related GFP-tagged protein. No crossreaction was observed. *Scale bar* 20  $\mu$ m. *Right panels* are immunoblots using the anti-Ankrd2 and anti-Ankrd1 antibodies on protein extracts from COS-7 cells transiently transfected with GFP-Ankrd1 (A1), GFP-Ankrd2 (A2) and GFP alone (C). Actin was used as loading control



taken during the autopsy. Heart from S1 donor had normal anatomical appearance, while the heart from the S2 was mildly hypertrophic probably due to the arterial hypertension. After lysis of the tissue, the same amount of proteins was run on SDS PAGE, blotted and probed with corresponding mouse polyclonal anti-MARP antibodies. They were directed against N terminus of Ankrd2 or full-length Ankrd1. As shown in Fig. 3, one main band at approximately 40 kDa was detected for each of the proteins, as well as one faint band at approximately 55 kDa. The Ankrd2 was detected in the cardiac tissue of both subjects,

but its expression level was significantly lower compared to Ankrd1.

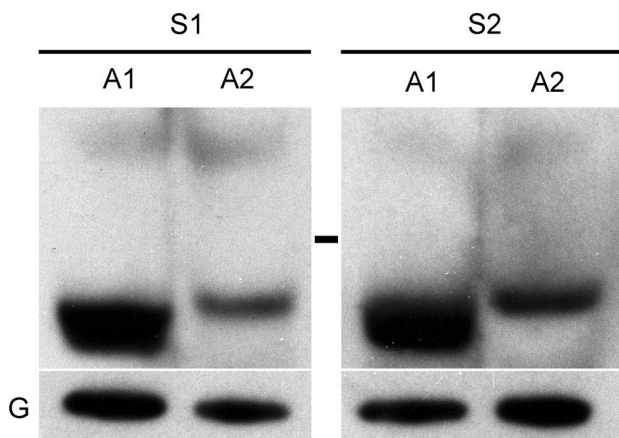
Subcellular localization of Ankrd2 in human adult ventricular cardiomyocytes was immunohistochemically evaluated and compared to Ankrd1, using indirect immunofluorescence microscopy on cryosections prepared from the same tissue samples used for Western blotting. Specific immunoreactivity was detected by incubating the samples with anti-MARP primary antibodies and Alexa Fluor 488-labeled secondary antibodies, while nuclei were stained with DAPI dye. As shown in Fig. 4a, Ankrd2 and



**Table 1** Expression levels of human Ankrd1 and Ankrd2 in striated muscle estimated from RNAseq data

Gene symbol	Adult heart		Fetal heart	Adult skeletal muscle			Fetal skeletal muscle
	AH1	AH2	FH	ASM1	ASM2	ASM3	FSM
Ankrd1	83,821	30,032	2,888	1,810	4,857	1,162	116
Ankrd2	2,997	5,729	18	3,149	11,415	10,013	127
MYH1	17	48	74	24,716	15,750	3,127	1,408
TNNC2	25	39	37	32,375	18,862	66,707	41,782
MYH3	20	233	313	265	365	311	277,700
MYH6	70,600	16,537	24,867	2,850	280	2,040	498
MYH7	484,476	347,089	257,725	268,263	11,517	134,314	16,531
NDRG4	19,561	6,666	2,179	86	87	86	128
GAPDH	67,332	54,214	17,672	129,765	170,958	132,155	25,869
Total aligned reads	36,291,964	49,772,970	33,846,018	35,911,697	50,768,869	35,947,111	47,008,221

The source of RNA was the following: AH1 and AH2, adult human heart, respectively, Ambion and Amsbio. ASM1, ASM2 and ASM3 adult human skeletal muscle Ambion, Amsbio and Stratagene. FH and FSM, fetal human heart and skeletal muscle from Stratagene. To normalize the counts related to the expression level of each gene in a sample, the counts were divided by the median value of the sample and multiplied by the mean of the medians of all the samples



**Fig. 3** Ankrd2 is expressed less than Ankrd1 in human heart. Western blot analysis of human heart proteins extracted from 27-year-old healthy female (S1) and 51-year-old male donor with mild cardiac hypertrophy (S2). Ankrd1 (A1) and Ankrd2 (A2) were detected with mouse polyclonal antibodies. GAPDH (G) was used to verify equal loading of the sample. The black bar between the two panels corresponds to a MW marker of 48 kDa

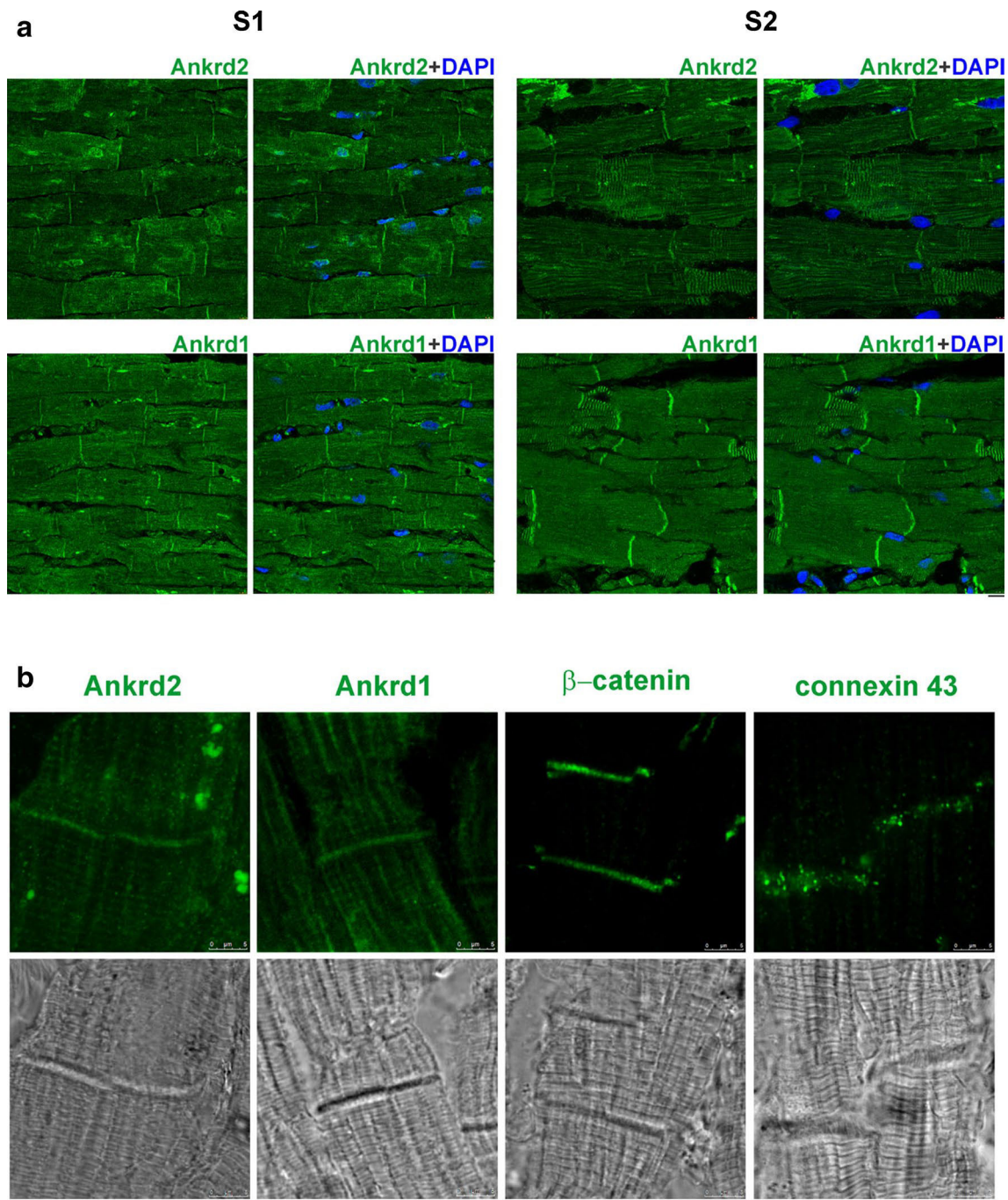
Ankrd1 positive cardiomyocytes were diffusely distributed throughout the ventricles. In the longitudinal section of cardiac muscle fibers, strong immunoreaction coincided with muscle striation in a similar way for both proteins. Protein levels in the nuclei were low or undetectable except for the heart of the subject S1, where strong nuclear signal for Ankrd2 was observed. Uneven staining of cardiomyocytes was observed for both proteins; strongly positive and weakly positive cardiomyocytes were admixed. Surprisingly, intensity of Ankrd1 signal was only slightly higher in comparison with Ankrd2 although Western blot showed

several fold difference between Ankrd1 and Ankrd2 protein levels in human heart. One of the possible explanations is difference in antibody affinities displayed in different methods (Western blot and immunofluorescence in this report).

In addition, very strong staining of structures resembling ICDs was detected for both proteins. In control samples, no fluorescent staining was observed, when mouse preimmune serum was used as primary antibody (not shown). In order to confirm localization of Ankrd1 and Ankrd2 in ICDs, cryosections were immunostained for Ankrd2 and Ankrd1, as well as for connexin 43 and  $\beta$ -catenin, already known as constituents of ICDs (Fig. 4b). ICDs were also visualized by differential interference contrast (DIC) microscopy (Fig. 4b, lower panels). The patterns observed with connexin 43 and  $\beta$ -catenin coincided with those of Ankrd1 and Ankrd2, strongly suggesting that MARP proteins reside in the ICDs.

#### Expression of endogenous Ankrd2 in neonatal rat cardiomyocytes

Isolated cardiomyocytes from small rodents are invaluable tool to study expression, localization and function of cardiac-specific proteins. We used primary NRCM to test them as appropriate model for functional studies on Ankrd2 protein, since they were successfully employed for investigation of Ankrd1 protein (Aihara et al. 2000a, b; Arimura et al. 2009; Jeyaseelan et al. 1997; Kuo et al. 1999; Zou et al. 1997). Human and rat Ankrd2 proteins share 88.1 % identity and 95.7 % similarity in 329 aa overlap (Fig. 5a) as determined by FASTA software (Pearson and Lipman 1988). First, we determined the expression profile of endogenous Ankrd2 in NRCM by Western blot, using antibodies to human Ankrd2 (Fig. 5b). Whole cell lysate



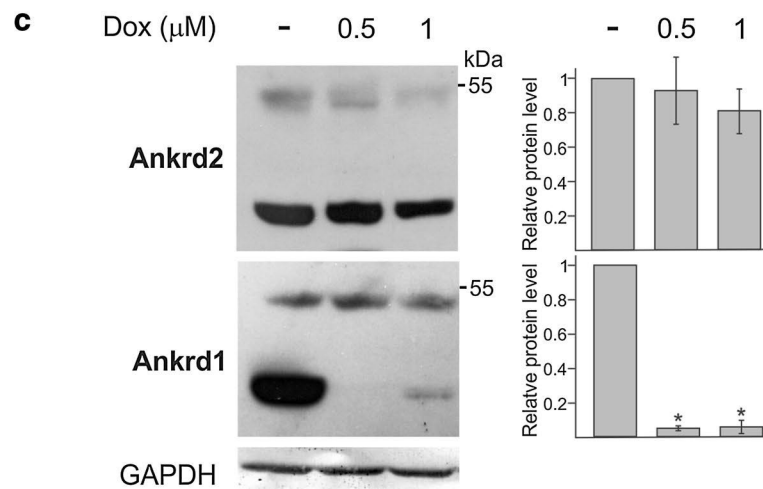
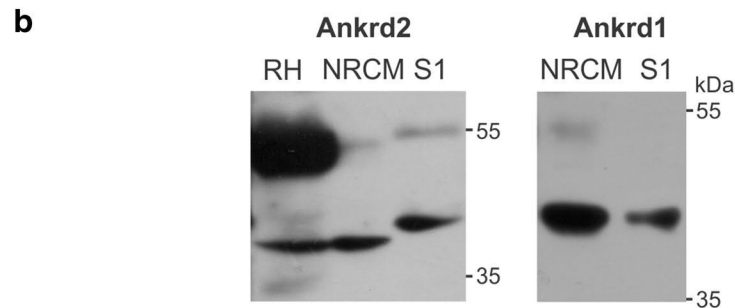
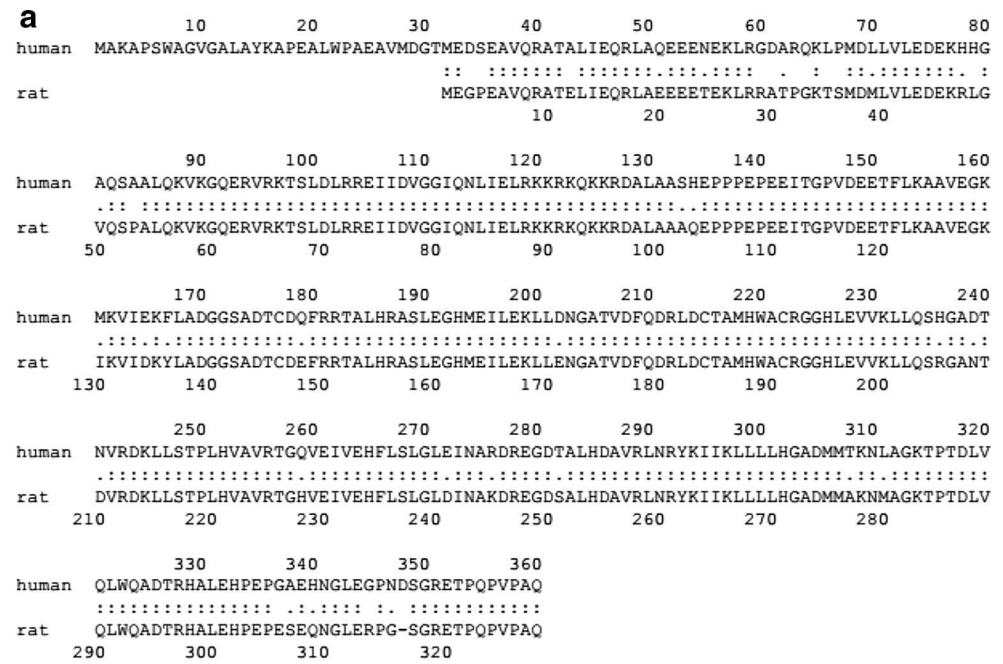
**Fig. 4** Ankrd2 is localized to ICDs of human cardiomyocytes. **a** Confocal images of cryosections from human hearts of *S1* and *S2* donors analyzed by immunostaining with anti-Ankrd2 and anti-Ankrd1 (green). Nuclei were labeled with DAPI (blue). Bar 10 μm. **b** Cryosections of *S1* cardiac tissue were stained with anti-Ankrd2

or anti-Ankrd1. Staining with anti-β-catenin or anti-connexin 43 was employed for marking of intercalated disks. Corresponding DIC images, showing the position of intercalated disks, are shown below. Bar 5 μm

from NRCM and protein extract of healthy human heart tissue from donor *S1* were subjected to SDS PAGE, blotted and probed with antibodies against human Ankrd1 and Ankrd2 proteins. In addition, adult rat heart, in which Ankrd2 was previously detected at approximately 55 kDa (Miller et al. 2003),

was used as a positive control. Anti-Ankrd2 antibodies visualized two bands at approximately 55 and 40 kDa in rat and human samples (Fig. 5b). Proteins detected in adult rat muscle and NRCM migrated slightly faster than proteins in human adult muscle. The 55 kDa protein is the dominant form in

**Fig. 5** Expression profile of endogenous Ankrd2 in NRCM. **a** Alignment of human and rat protein sequences of Ankrd2 performed using the FASTA (version 3.8) algorithm (<http://fasta.bioch.virginia.edu>). **b** Western blot analysis of Ankrd2 and Ankrd1 in neonatal rat cardiomyocytes (NRCM), human heart (SI) and adult rat heart (RH). **c** Left panels detection of Ankrd2 and Ankrd1 by Western blot in NRCM treated with 0.5 and 1  $\mu$ M cardiotoxic drug Doxorubicin for 24 h. GAPDH was used as loading control; right panels quantification of relative protein expression from four independent experiments. Densitometry was performed by ImageJ (<http://imagej.nih.gov>). Each value represents the mean  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.01 compared to the control



adult rat tissue, while the 40 kDa form is more prominent in NRCM, as well as in human adult heart. These results implicate NRCM as appropriate rat model for studying Ankrd2. On the other hand, bands detected with anti-Ankrd1 antibody in NRCM correspond to the apparent molecular mass of Ankrd1 protein detected in human heart.

Ankrd2 is not responsive to Dox

Ankrd1 was identified as a cardiac-specific Dox (Adriamycin)-responsive protein whose mRNA levels are markedly downregulated by Dox (Jeyaseelan et al. 1997). In order to check whether Ankrd2 levels are altered by this cardiotoxic



anti-tumor drug, NRCM were treated with different concentrations of Dox for 24 h. Ankrd2 protein expression levels were monitored by Western blot (Fig. 5c). Equal amount of proteins extracted from treated and control NRCM was subjected to SDS PAGE and transferred to PDVF membranes. Ankrd2 was detected with mouse polyclonal antibody against the N terminus of protein. Anti-GAPDH antibody was used to detect GAPDH as a loading control since Dox does not affect the transcription of housekeeping genes (Kurabayashi et al. 1993). The efficiency of Dox treatment was monitored via Ankrd1, whose levels were diminished upon Dox treatment as already demonstrated at both RNA (Jeyaseelan et al. 1997) and protein (Chen et al. 2012) levels. As shown in Fig. 5c, Dox did not significantly change the protein level of Ankrd2 in treated NRCM when compared to the control. Ankrd1 was significantly downregulated when NRCM were treated with Dox. These results suggest that different molecular mechanisms govern expression of MARP family members Ankrd1 and Ankrd2 in NRCM and this requires further investigation.

#### Ankrd2 is localized in both nucleus and sarcomeres of NRCM

Ankrd2 is known to have a dual, nuclear and cytoplasmic localization in skeletal muscle cells. In order to determine intracellular distribution of endogenous Ankrd2 in NRCM, cells were examined by staining with mouse anti-Ankrd2 antibody. Ankrd2 profile was compared with the one obtained for Ankrd1. As determined by confocal microscopy, most of the NRCM were positive for Ankrd2 as well as Ankrd1 (Fig. 6a). Antibody to Ankrd2 revealed that the endogenous Ankrd2 protein was localized in both cytoplasm and nuclei, independently from maturation status of NRCM which was monitored by alpha actinin2 (red in Fig. 6b). Nuclear signal was much stronger in mature cells with striated staining pattern of sarcomeric alpha actinin2 at the Z-disk (Fig. 6b). Cytoplasmic localization of Ankrd2 in immature NRCM was general, while in mature NRCM coincided with striation. The number of Ankrd2 positive cells showing a striation pattern was much lower than the number of cells where Ankrd1 had sarcomeric localization. Ankrd1 protein displayed myofibrillar and nuclear localization in NRCM (Fig. 6b), as previously described (Miller et al. 2003; Zou et al. 1997).

#### Expression and localization of exogenous Ankrd2-GFP in NRCM

In order to follow the expression and localization of human Ankrd2 protein overexpressed in NRCM, cardiac cells were transfected with construct expressing human Ankrd2 protein fused with GFP. For comparative analysis, NRCM were also transfected with Ankrd1-GFP. Variable transfection

efficiency with maximum of 15 % was achieved. In order to distinguish cardiomyocytes from stromal cells and to monitor the maturation status of NRCM, cells were stained for alpha actinin2 (red in Fig. 7). In the majority of transfected immature NRCM, Ankrd2 was localized in both cytoplasm and nucleus, and cytoplasmic signal was evenly distributed (Fig. 7a). In mature NRCM, we observed that most of the cells had cytoplasmic signal which coincided with striation (Fig. 7b). Only a few mature cells expressed Ankrd2 in nucleus (Fig. 7c). Ankrd1 was preferentially localized in the nucleus of immature NRCM (Fig. 7d), as well as in the cytoplasm of mature NRCM (Fig. 7e). Cytoplasmic pattern coincided with striation. In contrast to findings of Arimura and colleagues (Arimura et al. 2009), we were able to observe mature NRCM with clear nuclear signal, as demonstrated on Fig. 7e. Ankrd1-GFP was localized in the nuclei of 18.75 % (60/360) of transfected mature cardiomyocytes.

#### Discussion

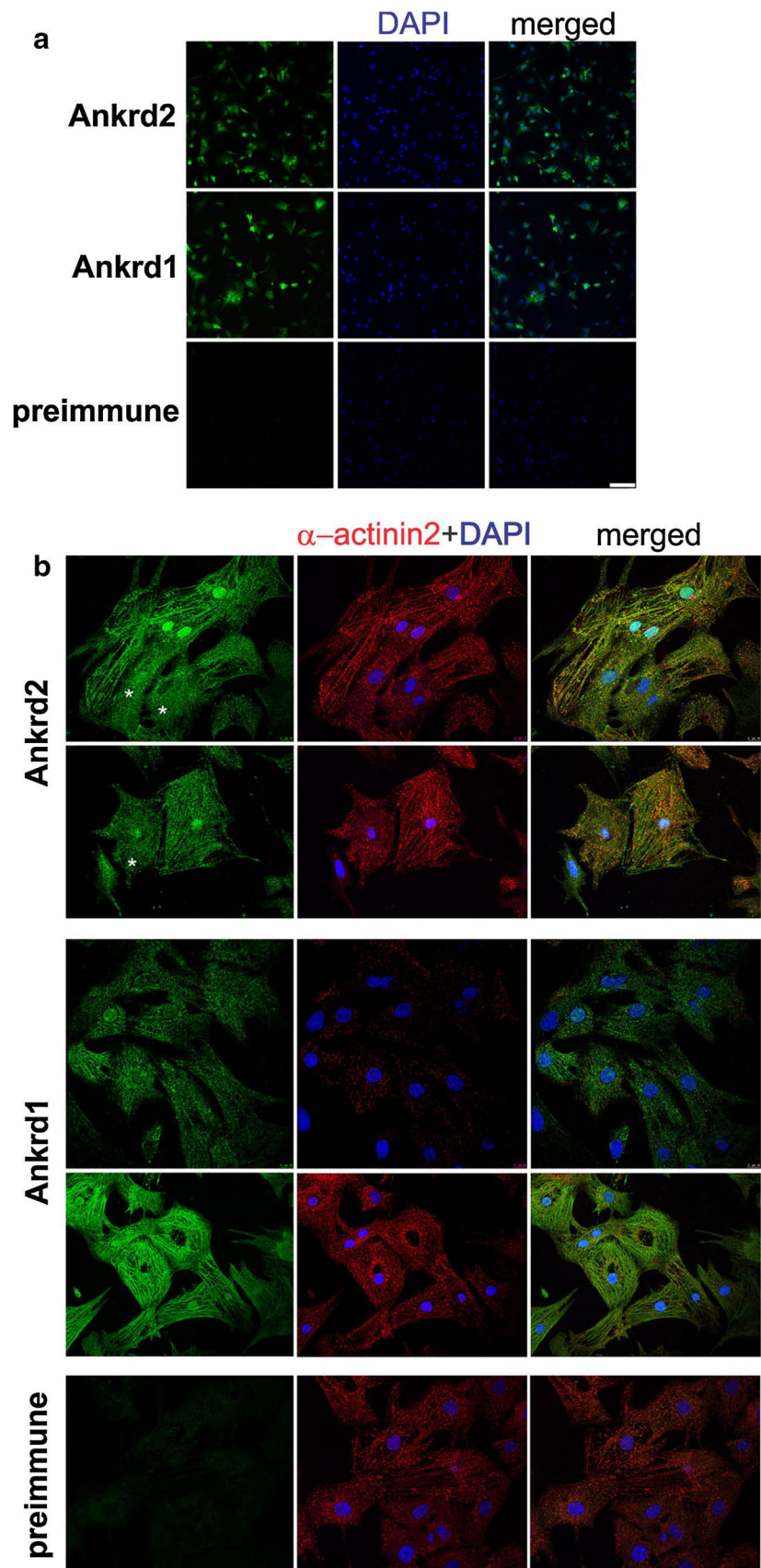
In the present study, we performed a comprehensive characterization of the skeletal muscle-specific protein Ankrd2 in human heart and cardiomyocytes isolated from neonatal rat hearts. Moreover, we compared its expression and intracellular localization with the cardiac protein Ankrd1 which belongs to the same family of muscle-specific proteins with ankyrin repeats.

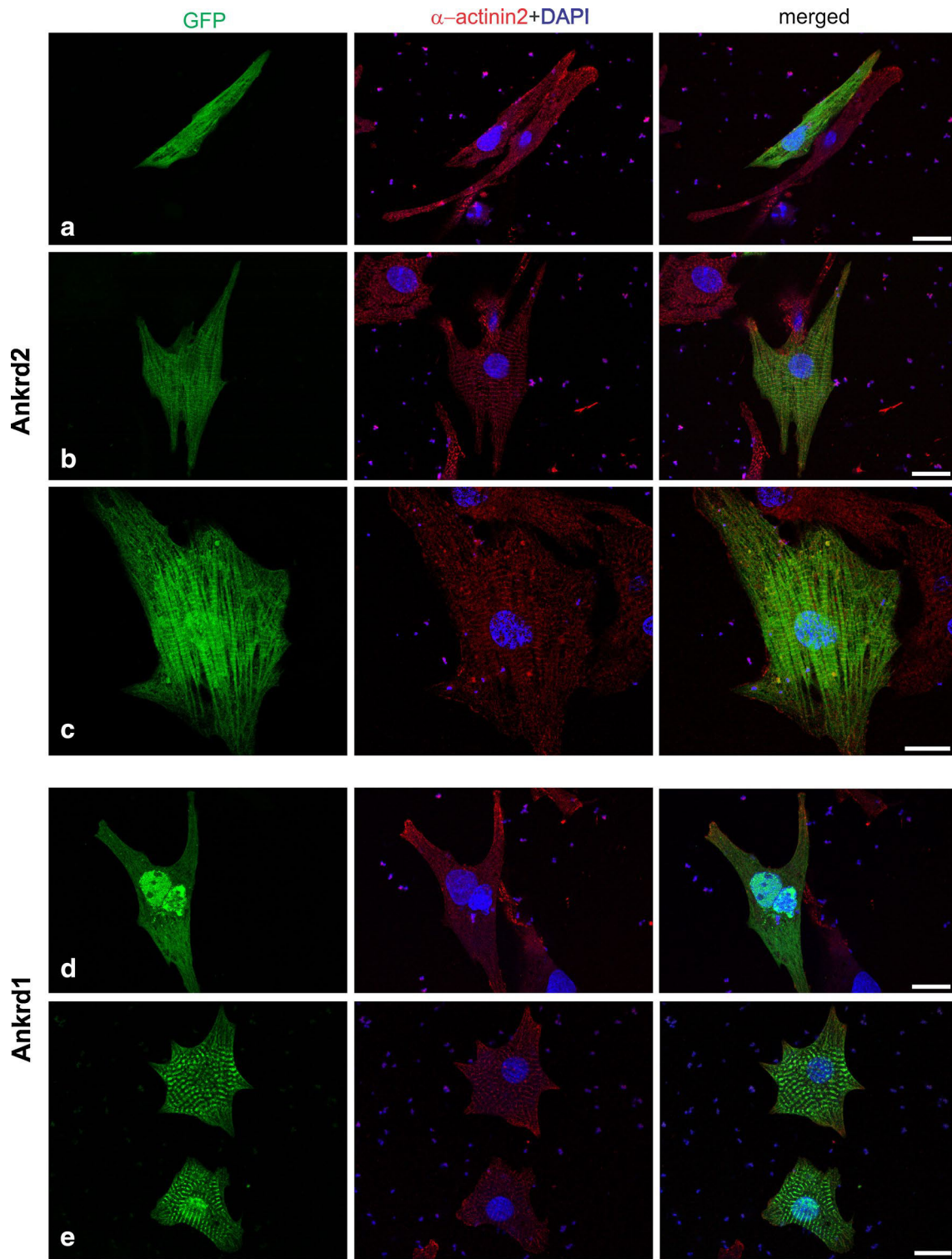
Apart from a well-established signaling role and preferential expression in skeletal muscle, the function of Ankrd2 in cardiac muscle is completely enigmatic. The potential significance of Ankrd2 in cardiac tissue started to emerge upon findings which implicate this regulator in cardiovascular diseases (Belgrano et al. 2011; Nagueh et al. 2004). It is significantly upregulated in the heart failure patients with dilated cardiomyopathy (DCM) (Nagueh et al. 2004) and alterations in genes involved in DCM and hypertrophic cardiomyopathy (HCM) pathways occur upon Ankrd2 silencing in human muscle cells (Belgrano et al. 2011). Moreover, the functional interaction between Ankrd2 and cardiac-specific transcription regulators Nkx2.5, HAND2 and Ankrd1 has been demonstrated (Belgrano et al. 2011).

The aim of this study was to further explore cardiac Ankrd2 by profiling its expression in human heart and NRCM, a model system commonly used to study cardiac-specific proteins. Additionally, for the first time, we provide comparative analysis of MARP family proteins Ankrd2 and Ankrd1 in human cardiac tissue and NRCM. The role of Ankrd1 in heart and cardiac disorders is already well established (Kimura 2010; Miller et al. 2003; Zolk et al. 2002) and mutations in Ankrd1 are associated with HCM and DCM (Arimura et al. 2009; Duboscq-Bidot et al. 2009;



**Fig. 6** Intracellular localization of endogenous Ankrd2 protein in nuclei and cytoplasm of NRCM. **a** Lower magnification (objective Fluotar 20 $\times$ /0.50) and **b** higher magnification (objective Apo 63 $\times$ /1.40 oil) images of NRCM immunostained for Ankrd2 or Ankrd1 (*green*). Mouse preimmune serum was used as a negative control (preimmune). Z-bodies in immature (labeled with *white asterix*) and Z-disks in mature NRCM were stained with anti- $\alpha$ -actinin2 antibody (*red*). Nuclei were labeled with DAPI dye (*blue*). Bar 100  $\mu$ m for **a** and 20  $\mu$ m for **b**





**Fig. 7** Immunofluorescent localization of exogenous Ankrd2 in NRCM by confocal microscopy. NRCM were transiently transfected with constructs overexpressing human Ankrd2 (a–c) or Ankrd1 (d,

e) fused with GFP (green). Maturation of NRCM was determined by alpha actinin2 staining (red). DAPI was used for nuclei labeling (blue). Scale bar 15 μm

Moulik et al. 2009). Recently, it was shown that MARP proteins (Ankrd1, Ankrd2 and DARP) are not essential for normal cardiac development and function at basal conditions and in response to mechanical stress, since triple KO mice were viable and had preserved cardiac function under tested conditions (Bang et al. 2014).

It is already well known that MARP proteins have distinct preferential sites of expression; Ankrd2 is more expressed in skeletal, while Ankrd1 is dominant in cardiac muscle. Their relative expression levels in human striated muscle tissues were determined in several studies by Northern blot, RT-PCR, Western blot or immunohistochemistry (Ishiguro et al. 2002; Miller et al. 2003; Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001). Here we provide additional evidence by RNAseq which was performed in order to obtain comparative in-depth view of the transcriptomes of adult and fetal skeletal and cardiac muscle cells. We have also confirmed expression of Ankrd2 in the human heart using postmortem tissue of two subjects, one healthy female and one male with mild cardiac hypertrophy. Ankrd2 expression level was lower compared to Ankrd1 in normal cardiac tissue, as already demonstrated (Ishiguro et al. 2002). The expression was detected as single bands of approximately 38 kDa for Ankrd1 and 40 kDa for Ankrd2, similarly to proteins detected in healthy human subjects with anti-Ankrd1 and anti-Ankrd2 in the study of Nageuh and co-authors (Nageuh et al. 2004).

Regarding intracellular localization, we found that Ankrd2 is localized in both cytoplasm (in striated pattern) and nuclei of human cardiomyocytes which is in accordance with the results of Ishiguro and co-authors (Ishiguro et al. 2002). We also observed strongly and weakly Ankrd2-positive cardiomyocytes admixed in heart tissue, and this pattern is similar to the checkerboard-like pattern which Ankrd2 has in skeletal muscle (Ishiguro et al. 2002; Kojic et al. 2011; Pallavicini et al. 2001). From our results, it is also clear that Ankrd1 has identical localization in human heart, with strong positive immunoreaction in the cytoplasm which coincided with striation of sarcomere. Nuclear absence of Ankrd1 is in compliance with previous findings of Ishiguro and coauthors (Ishiguro et al. 2002). On the other hand, Ankrd1 is detected in the nuclei of rodent cultured cardiac cells (Zou et al. 1997). The interesting novel finding in our study is localization of both Ankrd2 and Ankrd1 proteins in ICDs of human cardiomyocytes. So far, only the third MARP family member, DARP, was found in this structure, but in the rodent cardiomyocytes (Miller et al. 2003). Our result provides more information on the poorly understood role of MARPs in intercellular communication (Belgrano et al. 2011). Ankrd2 silencing in human myoblasts affected several genes involved in intercellular signaling pathways and structures such as focal adhesion, tight junction and gap junction. Recently, we

have demonstrated that both Ankrd2 and Ankrd1 physically interact with a gap junction protein ZO-1 which is enriched at ICDs (Belgrano et al. 2011; Nestorovic et al. 2014). In the cardiac muscle, apart from mechanical linkage, ICDs are involved in electrical and metabolic coupling between two adjoining cardiomyocytes (Sheikh et al. 2009), and they may also function as mechanical stress sensors (Hoshijima 2006). In addition, ICDs are found to sequester transcriptional regulators (Clark et al. 2002; Giepmans 2004). Since MARPs are transcriptional cofactors and stress responsive proteins, it is plausible to suggest ICDs as novel sites in the cell where they exert a sensor function. This hypothesis warrants further experimental evidence.

The commonly used experimental models in cardiac research are the isolated whole hearts and cultured cardiac cells. The rat model appears to be one of the most advantageous considering costs, availability and handling (Chlopčíková et al. 2001). The neonatal rat cardiomyocyte model enables studies aimed at understanding the morphological, biochemical and electrophysiological features of the heart and is valuable for pharmacological and toxicology studies, as well as for research on expression of proteins and their regulation (Eble et al. 1998; Hoshida et al. 1996; Sreejit et al. 2008). Data on Ankrd1 structure, function and localization were mostly obtained using primary cardiac myocytes isolated from neonatal rats (Aihara et al. 2000a, b; Arimura et al. 2009; Jeyaseelan et al. 1997; Kuo et al. 1999; Zou et al. 1997), as well as fetal rat cardiomyocytes (Miller et al. 2003). Since approximately 90 % of identity at amino acid level is shared between human and rat Ankrd2 (Fig. 3a), we choose NRCM to complement studies on deciphering the role of Ankrd2 in human heart. For the first time, we detected Ankrd2 in cardiac myocytes of neonatal rats. Previously, it was reported that no Ankrd2 protein was detected in fetal cardiomyocytes of 18-day-old rats, while in adult rat heart Ankrd2 was detected as a band of approximately 55 kDa by Western blot (Miller et al. 2003). We detected two protein bands interacting with anti-Ankrd2 in NRCM. They had slightly lower MWs compared to human Ankrd2 forms, which can be attributed to the lack of the N terminal extension of 32 amino acids in the rat protein (Fig. 5a). From our results, it is evident that Ankrd2 is present in NRCM shortly after birth, that 40 kDa form of Ankrd2 is more prominent and that protein expressed in neonatal cardiac cells corresponds to the one expressed in adult human heart. The 55 kDa form, which is dominant in adult rat heart (Miller et al. 2003), is also present in both human tissue and neonatal cardiomyocytes but to a lesser extent. These results suggest that expression of 40 and 55 kDa forms of Ankrd2 is, at least in rat, regulated in developmental fashion. Additional experiments are needed to show structural and functional differences between these Ankrd2 forms.



Considering that Ankrd2 has been reported to have a dual localization in skeletal muscle cells (nuclear and myofibrillar) (Kojic et al. 2004), we performed immunofluorescence analysis and localized Ankrd2 both in nuclei and cytoplasm of primary cardiomyocytes. In contrast to the almost exclusive striated pattern of Ankrd1, Ankrd2 had preferential diffuse cytoplasmic distribution, although its association with striation was also observed. It is interesting that in cardiomyocytes Ankrd2 is co-distributed in the nucleus and cytoplasm, independently from maturation and that nuclear signal is stronger in mature cardiomyocytes. In skeletal muscle cells, its localization is dependent on differentiation stage; in myoblasts Ankrd2 is found in the nucleus, while in multinucleated myotubes, it is diffusely distributed and upregulated in the cytoplasm (Kojic et al. 2004). Our work precisely profiled Ankrd2 in NRCM and set the scene for functional studies of this protein on its role in the cardiac tissue.

In contrast to results of Arimura and coauthors (Arimura et al. 2009) showing nuclear localization of overexpressed Ankrd1 only in non-mature cardiomyocytes, we have observed Ankrd1 also in nuclei of some mature cardiomyocytes which had striated pattern of alpha actinin2 staining. Our results comply with already published findings of nuclear staining of Ankrd1 in mature NRCM (Jeyaseelan et al. 1997; Miller et al. 2003; Zou et al. 1997). The discrepancy between results of different studies regarding nuclear localization of Ankrd1 could be attributed to the different antibodies used in these studies.

Dox is cardiotoxic antineoplastic drug which induces cardiomyopathy and congestive heart failure by disrupting the cardiac-specific program of gene expression (Kurabayashi et al. 1995). Molecular mechanisms of Dox cardiotoxicity include apoptosis which leads to cardiac tissue loss and disarray of sarcomeres (Singal et al. 1987, 2000). Free radical generation and p53-dependent apoptosis are thought to contribute to Dox-induced cardiotoxicity (Zhu et al. 2009). Ankrd1 was identified as nuclear protein whose mRNA is highly sensitive to Dox treatment and it was named accordingly as cardiac Adriamycin responsive protein—CARP (Jeyaseelan et al. 1997). The inhibiting effect of Dox on Ankrd1 protein expression in both adult and neonatal rat ventricular cardiomyocytes has also been demonstrated (Chen et al. 2012). Since Ankrd1 is sensitive to Dox and both Ankrd2 and Ankrd1 are functionally related to p53 (Belgrano et al. 2011; Kojic et al. 2004, 2010), we hypothesized that Ankrd2 could also be responsive to Dox treatment. Nevertheless, we did not observe any significant change in Ankrd2 protein level when NRCM were treated with Dox, while Ankrd1 protein expression was radically suppressed as already demonstrated (Chen et al. 2012). This result suggests that different molecular mechanisms involved in cellular response to Dox govern expression

of Ankrd1 and Ankrd2 in NRCM. It is possible that Dox causes other changes such as re-localization of Ankrd2. For example, it is known that Ankrd2 accumulates in the nuclei of muscle cells positioned in close proximity to myofibers injured by cardiotoxin or contact with dry ice (Tsukamoto et al. 2008). Further investigation is needed to explore whether and how Dox affects Ankrd2 behavior in cardiac cells.

In conclusion, our study identified ICDs as a novel site of Ankrd2 and Ankrd1 localization in human cardiomyocytes. We also defined NRCM as an appropriate model system for further functional analysis of Ankrd2. More extensive functional studies should aim at the identification of cardiac-specific pathways involved in intercellular communication in which both have a pivotal role. It would be also interesting to explore in which processes MARP proteins are functionally interrelated and if their interaction is cooperative or competitive.

**Acknowledgments** The excellent technical assistance of B Anic is gratefully acknowledged. We would like to thank M Schwirtlich for connexin 43 and  $\beta$ -catenin antibodies. This study was supported by grants from the Ministry of Education and Science of Serbia (Project No. 173008 to DR), Collaborative Research Programme, ICGEB, Italy (grant CRP/YUG-05-01 to SK), Fondazione Cariparo, Italy (Progetto Eccellenza 2010 CHROMUS to GV and GF) and the Italian Ministry of Research (PRIN 20108XYHJS to GV).

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical standard** All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Faculty of Medicine, University of Belgrade, 1964 Helsinki declaration and the Law on Health Care of the Republic of Serbia. For this type of study, formal consent is not required. All applicable international and national guidelines for the care and use of animals were followed.


## References

- Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohya Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R (2000a) Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of m-cat element within the promoter. *Hypertension* 36:48–53
- Aihara Y, Kurabayashi M, Tanaka T, Takeda SI, Tomaru K, Sekiguchi KI, Ohya Y, Nagai R (2000b) Doxorubicin represses carp gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. *J Mol Cell Cardiol* 32:1401–1414
- Arimura T, Bos JM, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Moulik M, Doi YL, Towbin JA, Ackerman MJ, Kimura A (2009) Cardiac ankyrin repeat protein gene (ankrd1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 54:334–342
- Bang ML, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chien KR, Chen J (2014) The muscle ankyrin repeat proteins carp, ankrd2, and darp are not essential for normal cardiac development and function at basal conditions and in response to pressure overload. *PLoS One* 9:e93638

- Barash IA, Mathew L, Ryan AF, Chen J, Lieber RL (2004) Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C355–C364
- Belgrano A, Rakicevic L, Mittempergher L, Campanaro S, Martinelli VC, Mouly V, Valle G, Kojic S, Faulkner G (2011) Multi-tasking role of the mechanosensing protein ankrd2 in the signaling network of striated muscle. *PLoS One* 6:e25519
- Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11:82–88
- Campagna D, Albiero A, Bilardi A, Caniato E, Forcato C, Manavski S, Vitulo N, Valle G (2009) Pass: a program to align short sequences. *Bioinformatics* 25:967–968
- Cenni V, Bavelloni A, Beretti F, Tagliavini F, Manzoli L, Lattanzi G, Maraldi NM, Cocco L, Marmiroli S (2011) Ankrd2/arpp is a novel akt2 specific substrate and regulates myogenic differentiation upon cellular exposure to h(2)o(2). *Mol Biol Cell* 22:2946–2956
- Chen B, Zhong L, Roush SF, Pentassuglia L, Peng X, Samaras S, Davidson JM, Sawyer DB, Lim CC (2012) Disruption of a gata4/ankrd1 signaling axis in cardiomyocytes leads to sarcomere disarray: implications for anthracycline cardiomyopathy. *PLoS One* 7:e35743
- Chlopčíková S, Psotová J, Miketová P (2001) Neonatal rat cardiomyocytes—a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 145:49–55
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:637–706
- Cooper ST, Lo HP, North KN (2003) Single section western blot: improving the molecular diagnosis of the muscular dystrophies. *Neurology* 61:93–97
- Duboscq-Bidot L, Charron P, Ruppert V, Fauchier L, Richter A, Tavazzi L, Arbustini E, Wichter T, Maisch B, Komajda M, Isnard R, Villard E, Network EHF (2009) Mutations in the ankrd1 gene encoding carp are responsible for human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 30:2128–2136
- Dwyer J, Pluess M, Iskratsch T, Dos Remedios CG, Ehler E (2014) The formin rhod1 in cardiomyocytes. *Anat Rec* 297:1560–1570
- Eble DM, Cadre BM, Qi M, Bers DM, Samarel AM (1998) Contractile activity modulates atrial natriuretic factor gene expression in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30:55–60
- Giepmans BN (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62:233–245
- Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, Mineki R, Arai T, Taguchi H, Yanagida M, Hirner S, Labeit D, Labeit S, Sorimachi H (2008) Multiple molecular interactions implicate the connexin/titin n2a region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283:14801–14814
- Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, Igarashi J, Aoki K, Hori M, Kuzuya T, Tada M (1996) Heme oxygenase-1 expression and its relation to oxidative stress during primary culture of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 28:1845–1855
- Hoshijima M (2006) Mechanical stress–strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1313–H1325
- Ishiguro N, Baba T, Ishida T, Takeuchi K, Osaki M, Araki N, Okada E, Takahashi S, Saito M, Watanabe M, Nakada C, Tsukamoto Y, Sato K, Ito K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol* 160:1767–1778
- Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Kedes L (1997) A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. Carp, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem* 272:22800–22808
- Kemp TJ, Sadusky TJ, Saltisi F, Carey N, Moss J, Yang SY, Sassoon DA, Goldspink G, Coulton GR (2000) Identification of ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics* 66:229–241
- Kimura A (2010) Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. *J Hum Genet* 55:81–90
- Kojic S, Medeot E, Guccione E, Krmac H, Zara I, Martinelli V, Valle G, Faulkner G (2004) The ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol* 339:313–325
- Kojic S, Medeot E, Faulkner G (2009) Characterization of antibodies directed against the ankrd2 human muscle protein. *Arch Biol Sci* 61:9
- Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Belgrano A, Stankovic M, Divac A, Faulkner G (2010) A novel role for cardiac ankyrin repeat protein ankrd1/carp as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Arch Biochem Biophys* 502:60–67
- Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G (2011) Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48:269–294
- Kuo H, Chen J, Ruiz-Lozano P, Zou Y, Nemer M, Chien KR (1999) Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development* 126:4223–4234
- Kurabayashi M, Jeyaseelan R, Kedes L (1993) Antineoplastic agent doxorubicin inhibits myogenic differentiation of c2 myoblasts. *J Biol Chem* 268:5524–5529
- Kurabayashi M, Dutta S, Jeyaseelan R, Kedes L (1995) Doxorubicin-induced id2a gene transcription is targeted at an activating transcription factor/cyclic amp response element motif through novel mechanisms involving protein kinases distinct from protein kinase c and protein kinase a. *Mol Cell Biol* 15:6386–6397
- Martinelli V, Cellot G, Toma FM, Long CS, Caldwell JH, Zentilin L, Giacca M, Turco A, Prato M, Ballerini L, Mestroni L (2012) Carbon nanotubes promote growth and spontaneous electrical activity in cultured cardiac myocytes. *Nano Lett* 12:1831–1838
- Martinelli VC, Kyle WB, Kojic S, Vitulo N, Li Z, Belgrano A, Maiuri P, Banks L, Vatta M, Valle G, Faulkner G (2014) Zasp interacts with the mechanosensing protein ankrd2 and p53 in the signalling network of striated muscle. *PLoS One* 9:e92259
- Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: carp, ankrd2/arpp and darp as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 333:951–964
- Moriyama M, Tsukamoto Y, Fujiwara M, Kondo G, Nakada C, Baba T, Ishiguro N, Miyazaki A, Nakamura K, Hori N, Sato K, Shomori K, Takeuchi K, Satoh H, Mori S, Ito H (2001) Identification of a novel human ankyrin-repeated protein homologous to carp. *Biochem Biophys Res Commun* 285:715–723
- Moulik M, Vatta M, Witt SH, Arola AM, Murphy RT, McKenna WJ, Boriak AM, Oka K, Labeit S, Bowles NE, Arimura T, Kimura A, Towbin JA (2009) Ankrd1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol* 54:325–333
- Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110:155–162
- Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M (2004) Altered expression of arpp protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathobiology* 71:43–51

- Nakamura K, Nakada C, Takeuchi K, Osaki M, Shomori K, Kato S, Ohama E, Sato K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with pest and proline-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Pathobiology* 70:197–203
- Nestorovic A, Jasnica-Savovic J, Faulkner G, Radojkovic D, Kojic S (2014) Ankrd1-mediated signaling is supported by its interaction with zonula occludens-1. *Arch Biol Sci* 66:10
- Pallavicini A, Kojić S, Bean C, Vainzof M, Salamon M, Ievolella C, Bortoletto G, Pacchioni B, Zatz M, Lanfranchi G, Faulkner G, Valle G (2001) Characterization of human skeletal muscle ankrd2. *Biochem Biophys Res Commun* 285:378–386
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444–2448
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) Pest sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21:267–271
- Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, Pachter L (2011) Identification of novel transcripts in annotated genomes using rna-seq. *Bioinformatics* 27:2325–2329
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the pest hypothesis. *Science* 234:364–368
- Sheikh F, Ross RS, Chen J (2009) Cell–cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc Med* 19:182–190
- Singal PK, Deally CM, Weinberg LE (1987) Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 19:817–828
- Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N (2000) Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207:77–86
- Sreejit P, Kumar S, Verma RS (2008) An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44:45–50
- Tee JM, Peppelenbosch MP (2010) Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45:318–330
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by rna-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28:511–515
- Tsukamoto Y, Senda T, Nakano T, Nakada C, Hida T, Ishiguro N, Kondo G, Baba T, Sato K, Osaki M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type 1 skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation. *Lab Invest* 82:645–655
- Tsukamoto Y, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Moriyama M (2008) Arpp/ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (marps), translocates from the i-band to the nucleus after muscle injury. *Histochem Cell Biol* 129:55–64
- Wu TD, Nacu S (2010) Fast and snp-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* 26:873–881
- Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, Caldwell RL, Shou W, Field LJ (2009) Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation* 119:99–106
- Zolk O, Frohme M, Maurer A, Kluxen FW, Hentsch B, Zubakov D, Hoheisel JD, Zucker IH, Pepe S, Eschenhagen T (2002) Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1377–1382
- Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR (1997) Carp, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* 124:793–804

## Differential expression and localization of Ankrd2 isoforms in human skeletal and cardiac muscles

Jovana Jasnic-Savovic<sup>1</sup> · Sabine Krause<sup>2</sup> · Slobodan Savic<sup>3</sup> · Ana Kojic<sup>1</sup> · Vlado Kovcic<sup>1</sup> · Srdjan Boskovic<sup>1</sup> · Aleksandra Nestorovic<sup>1</sup> · Ljiljana Rakicevic<sup>1</sup> · Olivia Schreiber-Katz<sup>2</sup> · Johannes G. Vogel<sup>2</sup> · Benedikt G. Schoser<sup>2</sup> · Maggie C. Walter<sup>2</sup> · Giorgio Valle<sup>4</sup> · Dragica Radojkovic<sup>1</sup> · Georgine Faulkner<sup>4</sup> · Snezana Kojic<sup>1</sup> 

Accepted: 25 June 2016  
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Four human Ankrd2 transcripts, reported in the Ensembl database, code for distinct protein isoforms (360, 333, 327 and 300 aa), and so far, their existence, specific expression and localization patterns have not been studied in detail. Ankrd2 is preferentially expressed in the slow fibers of skeletal muscle. It is found in both the nuclei and the cytoplasm of skeletal muscle cells, and its localization is prone to change during differentiation and upon stress. Ankrd2 has also been detected in the heart, in ventricular cardiomyocytes and in the intercalated disks (ICDs). The main objective of this study was to distinguish between the Ankrd2 isoforms and to determine the contribution of each one to the general profile of Ankrd2 expression in striated muscles. We demonstrated that the known expression and localization pattern of Ankrd2 in striated muscle can be attributed to the isoform of 333 aa which is dominant in both tissues, while the designated cardiac and canonical

isoform of 360 aa was less expressed in both tissues. The 360 aa isoform has a distinct nuclear localization in human skeletal muscle, as well as in primary myoblasts and myotubes. In contrast to the isoform of 333 aa, it was not preferentially expressed in slow fibers and not localized to the ICDs of human cardiomyocytes. Regulation of the expression of both isoforms is achieved at the transcriptional level. Our results set the stage for investigation of the specific functions and interactions of the Ankrd2 isoforms in healthy and diseased human striated muscles.

**Keywords** Ankrd2 · Isoforms · Human · Heart · Skeletal muscle

### Introduction

Ankyrin repeat protein 2 (Ankrd2), also known as Arpp (ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region), is a striated muscle-specific protein extensively studied in skeletal and cardiac muscles of mainly rodent animal models. Although not essential for the normal development and function of striated muscles (Bang et al. 2014; Barash et al. 2007), Ankrd2 is involved in muscle differentiation (Bean et al. 2008; Mohamed et al. 2013) and responsive to different forms of stress such as stretch (Kemp et al. 2000), denervation (Tsukamoto et al. 2002), eccentric contractions (Barash et al. 2004; Hentzen et al. 2006) and exercise (Lehti et al. 2009). Moreover, Akt2-phosphorylated Ankrd2 participates in the repression of inflammatory responses, induced by oxidative stress, through inhibition of NF-κB activity via the repressor complex Ankrd2/p50 (Bean et al. 2014).

In human skeletal muscles, Ankrd2 is preferentially expressed in slow, type I fibers (Moriyama et al. 2001;

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00418-016-1465-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Snezana Kojic  
 snezankojic@imgge.bg.ac.rs

- <sup>1</sup> Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, PO Box 23, Belgrade 11010, Serbia
- <sup>2</sup> Department of Neurology, Friedrich Baur Institute, Ludwig Maximilians University, Ziemssenstr. 1a, 80336 Munich, Germany
- <sup>3</sup> Institute of Forensic Medicine, School of Medicine, University of Belgrade, Deligradska 31a, Belgrade 11000, Serbia
- <sup>4</sup> CRIBI, University of Padova, Via Ugo Bassi 58b, 35121 Padua, Italy

Pallavicini et al. 2001). Apart from the sarcomeric localization in the I-band, it is also found in the nucleus (Ishiguro et al. 2002; Tsukamoto et al. 2002) where it has the role of a transcriptional cofactor. In the sarcomere, Ankrd2 interacts with telethonin/T-cap (Kojic et al. 2004) and the N2A region of titin (Miller et al. 2003). A complex built on the elastic I-band region of titin and composed of MARPs (muscle ankyrin repeat proteins) and calpain 3 is thought to participate in mechanosensing (Hayashi et al. 2008; Miller et al. 2003). Ankrd2 is involved in regulation of gene expression through interaction with the promyelocytic leukemia protein (PML), the Y-box-binding protein 1 (YB-1) and p53 (Kojic et al. 2004). This regulatory role is further supported by the finding that Ankrd2 accumulates in the nucleus of the cells positioned next to the injured muscle fibers (Tsukamoto et al. 2008). Altered expression of Ankrd2 has been observed in some skeletal muscle disorders such as congenital myopathies, muscular dystrophy, spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis (Nakada et al. 2004; Nakamura et al. 2002; Pallavicini et al. 2001), thus emerging as a potential diagnostic biomarker.

However, Ankrd2 has also been detected, at low levels, in adult human heart (Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001), specifically in the ventricular cardiac muscle fibers, the interventricular septum and the apex of the heart (Ishiguro et al. 2002; Moriyama et al. 2001). In adult cardiomyocytes, Ankrd2 has sarcomeric and nuclear localization, similar to the pattern observed in skeletal muscle (Ishiguro et al. 2002; Jasnica-Savovic et al. 2015). It is interesting that cardiomyocytes express different amounts of Ankrd2 (Ishiguro et al. 2002; Jasnica-Savovic et al. 2015); however, the mechanism of differential expression is still obscure. Recently, we identified the intercalated disks (ICDs) as a novel site of Ankrd2 expression (Jasnica-Savovic et al. 2015), corroborating previously suggested participation in intercellular communication (Belgrano et al. 2011). Cardiac-specific regulation of Ankrd2 expression is potentially achieved by interaction with the transcription regulators, Nkx2.5, HAND2 and Ankrd1 (Belgrano et al. 2011). Ankrd2 may be involved in human cardiac pathologies due to its upregulated expression in human dilated cardiomyopathy (Nagueh et al. 2004).

So far, several isoforms of Ankrd2 have been reported in the protein databases. The ones mainly investigated are the canonical, also called the cardiac isoform of 360 aa (UniProtKB/Swiss-Prot: Q9GZV1.3; Ensembl: Ankrd2-202; NCBI Reference Sequence: NP\_065082.2, isoform a), here designated as M-Ankrd2, and the S-Ankrd2 isoform of 333 aa (UniProtKB: A0A0A0MRN9; GenBank: CAC19412.1; Ensembl: Ankrd2-001). These two isoforms are identical, except that the M-Ankrd2 has an N-terminal extension of 27 aa when compared to the S-Ankrd2. In addition, two more isoforms are predicted as alternatively spliced

variants of S- and M-Ankrd2 lacking exon 7 (Ensembl: Ankrd2-002 and Ankrd2-201), but there is no experimental evidence. Three human Ankrd2 isoforms were mentioned for the first time in the work of Miller and colleagues (Miller et al. 2003). Two of them correspond to the S-Ankrd2 (37.5 kDa) and M-Ankrd2 (40 kDa). The third one (L-Ankrd2) of 446 aa and 50 kDa (NCBI Reference Sequence: NP\_001278147.1, isoform c) was nominated as cardiac, since it was exclusively detected in human heart by RT-PCR and in adult rat heart by Western blot (Miller et al. 2003). This isoform is extended for a further 116 aa at the N terminus when compared to M-Ankrd2. Miller and colleagues (Miller et al. 2003) suggested that these three isoforms are translated from alternative start codons. The majority of results and information published on human Ankrd2 were obtained on the 333 aa isoform, while Lange and his team used the isoform of 360 aa to show the dimerization properties of Ankrd2 and other MARPs (Lun et al. 2014).

The aim of this work was to profile expression of the S- and M-Ankrd2, the two main isoforms in human cardiac and skeletal muscles. We used M-Ankrd2-specific primers and antibody to specifically identify this isoform from the pool of Ankrd2 isoforms expressed in human tissues in order to determine its contribution to the overall expression patterns observed in striated muscles. It is important to note that the antibody against M-Ankrd2 is also able to detect L-Ankrd2 since the peptide used as an antigen is also present in the L-Ankrd2 isoform. Since M- and L-Ankrd2 have distinct molecular weights, they would be easy to distinguish on Western blots. We extensively determined expression patterns of these Ankrd2 isoforms at the RNA and protein level and demonstrated similarities and some striking differences in their intracellular localization in striated muscles. Our experimental evidence strongly indicates that S-Ankrd2 is the isoform dominant in both cardiac and skeletal muscles.

## Materials and methods

### Constructs

The coding sequences for M-Ankrd2 (1080 bp) and S-Ankrd2 (999 bp) were amplified by PCR with forward primers 5' TATGAATTCATGGCAAAGGCGCCCAGC 3' (for M-Ankrd2) and 5' CCGAATTCCATGGAGGACTCCGAGG 3' (for S-Ankrd2), and reverse primer 5' TATGTCGACTCACTGGGCTGGCACAGG 3'. After digestion with restriction enzymes, they were inserted into the EcoRI and SalI sites of the mammalian expression vector pCMV-Tag 2 (Agilent Technologies). Verification of inserted DNA identities was done by sequencing. The constructs for



**Table 1** Information on gender, age, morphological parameters of heart, postmortem interval and cause of death of subjects used in this study

Cardiac muscle								
Individual	Gender	Age	Weight of heart (g)	Dimensions of heart (cm)	Thickness of left ventricular wall (mm)	Thickness of right ventricular wall (mm)	Postmortem interval (h)	Cause of death
1	M	51	440	11 × 9	<15	<5	10	Suicide
2	F	27	300	10 × 8	<10	<2	24	Suicide
3	M	19	280	10 × 11	<15	<5	5	Polytrauma (car crash)
4	M	20	350	12 × 10	<15	<3	7	Polytrauma (car crash)
5	F	49	265	10 × 8	<14	<3	13	Polytrauma (car crash)
6	M	18	250	10 × 8	<15	<3	13	Polytrauma (car crash)
Skeletal muscles (soleus and gastrocnemius)								
Individual	Gender	Age	Postmortem interval (h)		Cause of death			
7	M	51	9		Natural death			
8	F	29	9		Brain injury (car crash)			
9	F	45	16		Suicide			

expression of the His-tagged S-Ankrd2 and Ankrd1 in *E. coli* were described previously (Kojic et al. 2009).

### Antibodies

The twenty-four-amino acid peptide (APSWAGVGALAZKAPEALWPAAEV) encoded by Ankrd2 exon 1 and specific for longer Ankrd2 isoforms of 360 and 446 aa was synthesized, activated and used for immunization of BALBc mice. Production of antibodies which recognize all Ankrd2 isoforms was described previously (Kojic et al. 2009).

### Cell culture and transfections

Human primary myoblasts were obtained from the Muscle Tissue Culture Collection (MTCC) located at the Friedrich-Baur-Institute, University of Munich, Germany. They were maintained in SGM proliferating medium composed of commercial medium (Promocell) for muscle cell culture, supplement mix (Promocell), 10 % FCS (Life Technologies), gentamicin (PAA, 40 µg/ml) and 1.5× concentrated GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific). When the myoblasts reached 70–90 % confluence, proliferation medium was replaced with differentiation medium composed of DMEM, 2 % horse serum and antibiotics. In this study, the myoblasts were differentiated for 3 and 7 days.

COS-7 cells were maintained in DMEM supplemented with 10 % FCS (Life Technologies) and gentamicin (PAA), and they were transfected with PolyFect (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

### Human tissue samples

Tissue samples of nine individuals (1–9) with postmortem intervals (PMI) varying from 5 to 24 h (Table 1) were collected from routine autopsies performed in the Institute of Forensic Medicine, School of Medicine, University of Belgrade. This work was approved by the local ethics committee (No. 29/II-7 of the Ethical Committee of the Faculty of Medicine, University of Belgrade) and in agreement with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and the Law on Health Care of the Republic of Serbia (article 222). The criteria for sampling were the following: no macroscopically visible signs of putrefaction, no history or postmortal findings suggestive of cardiovascular disease or hypertension for subjects 1–6 and no signs of muscle trauma or pathological changes for individuals 7–9. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until further use.

### RNA isolation, reverse transcription PCR (RT-PCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from pulverized human skeletal and cardiac muscle samples using TriReagent (Ambion), according to the protocol provided by the manufacturer. The first-strand cDNA was synthesized from 1 to 2 µg total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Products of reverse transcription were used as a template for amplification of the Ankrd2 isoforms by PCR, using specific primers listed in Table 2. Fragments were amplified with HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen) using a reaction temperature profile of 3 cycles of 2 min at 95 °C

**Table 2** List of primers used to amplify S-Ankrd2, M-Ankrd2, L-Ankrd2, Ankrd1 and GAPDH fragments from cDNAs

Target	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)
S-Ankrd2	CGGTTATGGACGGCACCAT	CTTCTCATCCTCCAGCACCA	155
M-Ankrd2	CAGTGAGCTCATGGCAAAGG	CTTCTCATCCTCCAGCACCA	241
L-Ankrd2	AGCATGCAGCCAGCAGT	CCCCAACTCCTGGCCTATTA	154
Ankrd1	AGTAGAGGAACTGGTCACTGG	TGGGCTAGAAGTGTCTTCAGAT	138
GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	TGAGGTCAATGAAGGGGTC	112

and 3 min at 55 °C, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 60 s at 60 °C, 30 s at 72 °C, and 10 min at 72 °C.

After reverse transcription, the mRNA expression level of the target genes was analyzed by 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with specific primers (Table 2). A housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a normalizing control. The real-time PCR was performed initially for 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. The expression level of each target gene was compared with the expression level of GAPDH. The  $\Delta Ct$  value for each sample was determined by subtracting the  $Ct$  value of GAPDH from the  $Ct$  value of the target gene. Relative expression level of the Ankrd2 isoforms was determined by calculating the  $2^{-\Delta Ct}$ .

### Purification of His tag proteins

His-tagged Ankrd1 and S-Ankrd2 were expressed in *E. coli* and purified as previously described (Kojic et al. 2009).

### Western blot

Human skeletal muscle and heart lysates were prepared as described by Fanin and coauthors (Fanin et al. 2001). In short, two parallel sets of cryostat sections of subjects' muscle samples were obtained. One set of sections was dissolved in 0.1 N NaOH and incubated at room temperature for 16–20 h before determination of protein concentration by the Bradford method. The second set of sections, whose protein concentration was determined by the previous measurement, was dissolved in loading buffer (0.05 M DTT (dithiothreitol), 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.125 M Tris-HCl, 4 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.05 % bromophenol blue, pH = 8), boiled for 5 min and centrifuged. Whole-cell lysates were prepared as described previously (Jasnic-Savovic et al. 2015).

Equal amounts of proteins from tissue or cell lysates were separated by 12 % SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Immobilon P, Millipore). Transfer was verified by membrane staining with Ponceau S solution.

The membrane was then incubated in blocking solution [10 % nonfat dried milk in 0.1 % Tween 20/PBS (PBS-T)] at 4 °C overnight, followed by 1-h incubation with primary and secondary (conjugated with HRP) antibodies diluted in 5 % nonfat dried milk in PBS-T at room temperature. Proteins were visualized using the ECL chemiluminescence detection system (Millipore).

### Immunohistochemistry

Tissues were cut on a cryostat (CM-1860UV, Leica) into 10- $\mu$ m sections, mounted on polarized microscope slides (Thermo Scientific) and fixed with pre-cooled acetone for 5 min at -20 °C. The tissue was blocked for 1 h in 2 % horse serum in PBS/0.05 % Tween 20. Primary and secondary antibodies were diluted in blocking buffer. The cells were incubated in the primary antibody solution for 1 h or ON at room temperature and then washed three times in PBS/0.05 % Tween 20 followed by incubation with the secondary antibody solution for 1 h. Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546-conjugated secondary antibodies (Life Technologies), as well as DAPI (Sigma-Aldrich), were used for double and triple immunofluorescence staining. The tissues were mounted with DAKO fluorescent mounting medium, and imaging was performed using the Leica SP8 confocal microscope.

### Immunocytochemistry

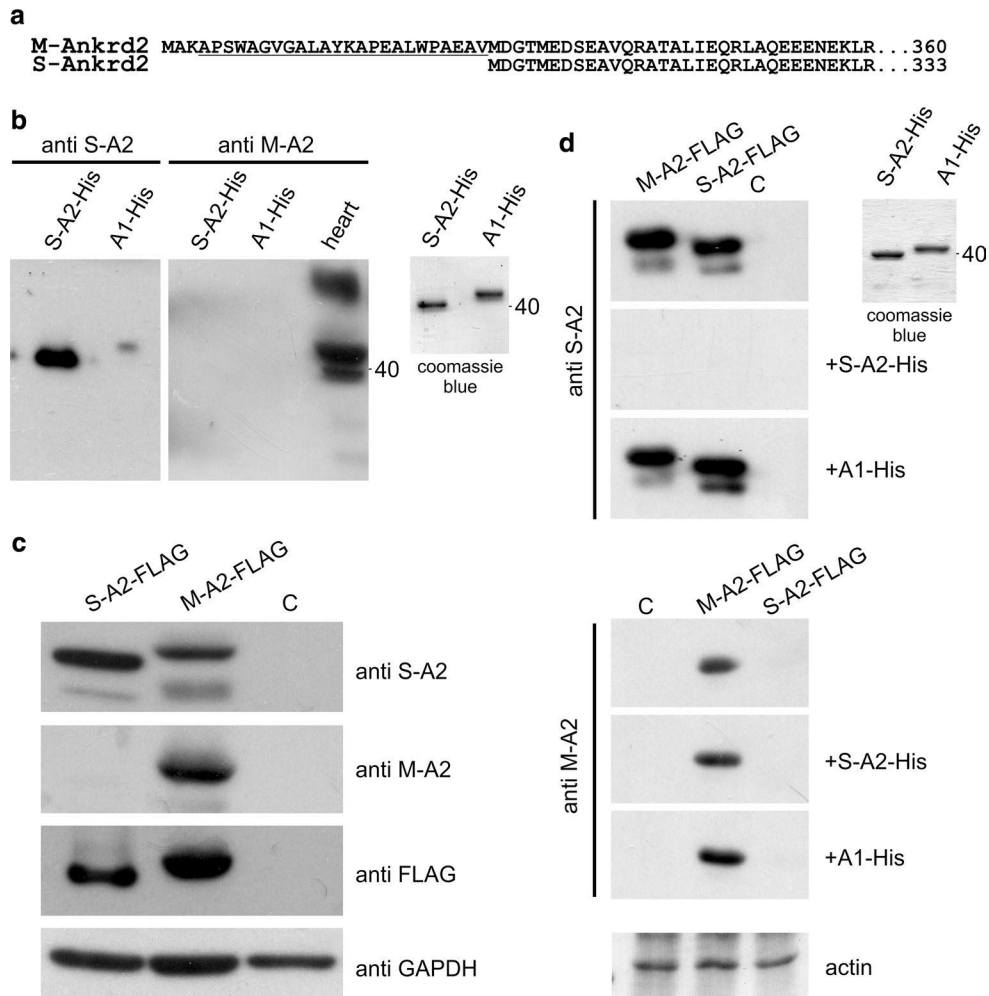
Primary myoblasts and myotubes were fixed in 3.7 % paraformaldehyde diluted in cytoskeleton buffer (CSK) containing 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 10 mM Pipes pH 6.8, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EGTA. The cells were permeabilized in 0.1 % Triton X-100 diluted in CSK buffer, blocked in PBS containing 5 % horse serum and incubated with primary and secondary antibodies, diluted in PBS containing 2 % horse serum, 1 h each. The secondary antibodies were conjugated with Alexa Fluor (Life Technologies) dyes, and the nuclei were stained with DAPI. Cells were mounted with DAKO fluorescent mounting medium and observed under a Leica SP8 confocal microscope.

**Statistical analysis**

Testing the difference in Ankrd2 protein quantities in samples with different postmortem intervals was performed using the one-way ANOVA with the Scheffe test for post hoc comparison. A *p* value <0.05 was considered to indicate a significant difference. Statistical tests were performed using the SPSS version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Additionally, the correlation coefficient, *r*, which measures the strength and the direction of a linear relationship between two variables, was calculated.

**Results**

Discrimination of Ankrd2 isoforms at the protein level was based on the design of the antibody. We made an antibody which specifically recognized the longer isoform of 360 aa (M-Ankrd2), but, theoretically, it was also able to detect the longest isoform of 446 aa (L-Ankrd2). Previously made antibodies against the isoform of 333 aa (S-Ankrd2) or its fragments (Kojic et al. 2009) should be able to recognize all isoforms. Accordingly, the first step in our work was to



**Fig. 1** Testing the specificity of the anti-Ankrd2 antibodies. **a** Amino acid sequence alignment of the N termini of S- and M-Ankrd2. Sequence of the peptide present in the longer isoforms and used for generation of mouse polyclonal antibody is underlined. **b** The His-tagged Ankrd2 isoform of 333 aa (S-A2-His) and the Ankrd1 (A1-His, used as a negative control) were expressed in *E. coli* and purified under denaturing conditions. Equal amounts of proteins (panel coomassie blue) were run on SDS-PAGE, blotted and probed with antibodies against the longer isoforms (anti-M-A2) or the antibody which should detect all isoforms (anti-S-A2). Human heart was used as a positive control for the anti-M-A2 antibody. **c** The S-Ankrd2 and M-Ankrd2 isoforms, fused with flag tag, were

expressed in COS-7 cells. Proteins from transfected and non-transfected cells (C) were analyzed by Western blot using antibodies against the isoforms and tag. GAPDH was detected as the loading control. **d** For immunoadsorption assay, the anti-S-A2 and anti-M-A2 antibodies were incubated with equal amounts (*right panel*, coomassie blue) of immobilized His-tagged S-Ankrd2 (S-A2-His) and Ankrd1 (A1-His, used as negative control) for 1 h. Flag-tagged M-Ankrd2 (M-A2-flag) and S-Ankrd2 (S-A2-flag) expressed in COS-7 cells were detected with pre-adsorbed antibodies. C designates samples of protein extracts from non-transfected COS-7 cells. Actin was detected as the loading control. The numbers correspond to the MW of marker proteins in kDa

extensively demonstrate the specificity of the antibody that recognizes the human M-Ankrd2 isoform.

### Determination of specificity of antibodies used to distinguish the Ankrd2 isoforms

To distinguish M-Ankrd2 from S-Ankrd2, we produced a mouse polyclonal antibody using the peptide (APSWAG-VGALAZKAPEALWPAEAV) from the unique N-terminal region of M- and L-Ankrd2 which is not present in S-Ankrd2 (Fig. 1a). Mouse polyclonal antibody to the N-terminal region of S-Ankrd2, which also exists in M- and L-Ankrd2, was used to detect all Ankrd2 isoforms. Their specificity and cross-reactivity were tested by Western blot and immunoadsorption assay using the S- and M-Ankrd2 isoforms overexpressed in *E. coli* or COS-7 cells (Fig. 1). First, we tested the peptide antibody on purified His-tagged S-Ankrd2 protein by Western blot analysis (Fig. 1b). His-tagged Ankrd1 protein was used as a negative control to exclude cross-immunoreactivity with the His tag. The anti-M-Ankrd2 did not recognize neither the S-Ankrd2-His nor the Ankrd1-His, demonstrating no cross-reactivity. Human heart proteins served as a positive control for the M-Ankrd2 peptide antibody. Next, we prepared extracts from the non-transfected COS-7 cells as well as COS-7 cells transfected with constructs expressing flag-tagged S- and M-Ankrd2. The extracted proteins were probed with the anti-Ankrd2 antibodies, while GAPDH antibody was used to detect GAPDH as a loading control (Fig. 1c). The presence of flag-tagged proteins on the membranes was confirmed by Western blot using anti-flag antibody. As demonstrated, the anti-M-Ankrd2 antibody recognized only the M-Ankrd2 flag, while the antibody for the S-Ankrd2 was able to detect both isoforms of the Ankrd2 protein.

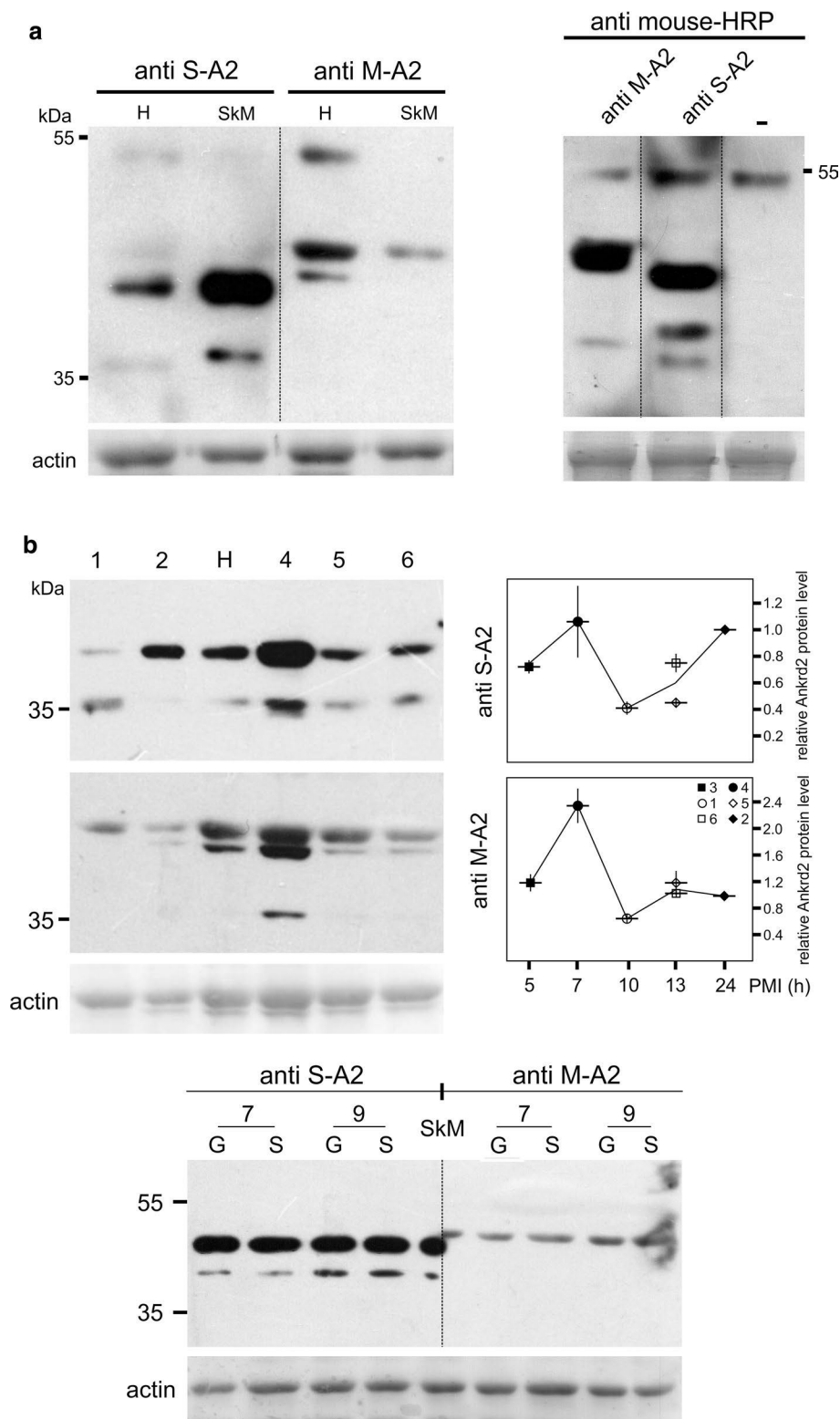
Finally, an immunoadsorption assay was performed by incubation of the anti-S-Ankrd2 and the anti-M-Ankrd2 antibodies with equal amounts of immobilized His-tagged S-Ankrd2 and Ankrd1; the latter was used as a negative control. Next we used pre-adsorbed antibodies to detect the flag-tagged M-Ankrd2 and S-Ankrd2 expressed in COS-7 cells. As shown in Fig. 1d, the anti-S-Ankrd2 antibody was adsorbed using His-tagged S-Ankrd2 which resulted in no signal on the Western blot (Fig. 1d, top panel), while incubation of the anti-M-Ankrd2 with S-Ankrd2-His did not affect its immunoreactivity with M-Ankrd2 (Fig. 1d, bottom panel). The anti-M-Ankrd2 antibody was not able to detect the S-Ankrd2 flag protein. The activity of tested antibodies was not blocked by incubation with the immobilized Ankrd1-His. The results of these control experiments represent strong evidence that the anti-M-Ankrd2 antibody is able to specifically detect M-Ankrd2 and not to cross-react with the S-Ankrd2 isoform.

**Fig. 2** Both the S-Ankrd2 and M-Ankrd2 isoforms were expressed in human skeletal (SkM) and cardiac (H) muscles demonstrated by Western blot analysis. **a** Proteins from tissue extracts were separated by SDS-PAGE, blotted and probed with designated primary antibodies. Actin was detected as a loading control. Numbers correspond to the MW of marker proteins in kDa. SkM is the extract of snap-frozen fresh gluteus muscle, while H corresponds to the cardiac muscle of subject 3 (Table 1). The *right panel* demonstrates that the 55-kDa band is non-specific since it was detected with secondary anti-mouse antibody, when the primary antibody was omitted. Equal amounts of proteins extracted from the cardiac muscle tissue of subject 3 were run in each lane. **b** Expression of the Ankrd2 isoforms in cardiac (*top*) and skeletal (*bottom*) muscles of several human subjects. Western blot analysis was performed on proteins extracted from cadaveric cardiac muscle, gastrocnemius (G) and soleus (S) tissues of healthy donors (1, 2, 4–7 and 9) of different age, sex and postmortem intervals (see Table 1). The Ankrd2 isoforms were detected by the designated antibodies. Actin was used as loading control, while protein extracts of snap-frozen fresh skeletal muscle (SkM) and heart of subject 3 (H) were used as positive controls. Each Western blot was performed three times, and bands corresponding to the Ankrd2 isoforms were quantified using ImageJ. Results are presented graphically on right panels. Diagrams show the PMI (X axis) and the relative Ankrd2 protein level (Y-axis) in each of the subjects and normalized to the protein level in sample H2 with PMI of 24 h. There was no significant correlation between PMI and relative Ankrd2 protein level

### Both of the Ankrd2 isoforms are expressed in human skeletal and cardiac muscles, but in different amounts

It was previously demonstrated that Ankrd2 is expressed in both skeletal and cardiac tissues, but to a different extent (Ishiguro et al. 2002; Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001). Recently, we have performed profiling of Ankrd2 in human cardiac muscle (Jasnic-Savovic et al. 2015) and, apart from the faint band of approximately 55 kDa which might correspond to L-Ankrd2, a single protein band at the molecular weight of approximately 40 kDa was detected by Western blot in the protein extracts. Since we used the anti-S-Ankrd2 antibody which is able to recognize all three Ankrd2 isoforms, it was not possible to specifically identify the 40-kDa band expressed in human heart. Our working hypothesis was that the M-Ankrd2 isoform is specifically expressed in cardiac muscle, while the S-Ankrd2 isoform is present either in both types of muscle or exclusively found in skeletal muscle.

To identify the isoforms expressed in human striated muscles, we performed Western blot analysis (Fig. 2). Proteins were extracted from snap-frozen human cardiac and skeletal muscles. The Ankrd2 isoforms were detected with the anti-M-Ankrd2 and the anti-S-Ankrd2 (Fig. 2a, left panel) antibodies. Actin was used as a loading control. The anti-S-Ankrd2 antibody recognized one band at about 40 kDa in both cardiac (H) and skeletal muscles (SkM). We also observed lower molecular weight bands probably as products of protein degradation, as well as faint band at ~55 kDa. Two bands in human heart (~55 and ~40 kDa)



and one (~40 kDa) in skeletal muscle were detected when the anti-M-Ankrd2 antibody was used. The bands at approximately 40 kDa showed slower migration when compared to the bands at a corresponding MW detected with anti-S-Ankrd2. It is interesting to note that, although

the anti-S-Ankrd2 antibody detected both isoforms overexpressed in COS-7 cells (Fig. 1), it has apparently a much lower affinity for the M-Ankrd2 protein expressed in striated muscle tissues, when compared to the anti-M-Ankrd2 antibody (Fig. 2a, left panel). It was possible that 55-kDa



band might be L-Ankrd2, but we also observed it when Ankrd1 was detected in our previous work (Jasnic-Savovic et al. 2015). To test the specificity of the 55-kDa band, we performed Western blot analysis of proteins from human cardiac muscle of subject 3 (Table 1) with and without primary antibody (Fig. 2a right panel). The 55-kDa band appeared on the membrane in all samples including the one when only the secondary antibody was applied, suggesting that signal corresponds to protein detected with the secondary, and not with the primary antibodies.

The specificity of both the anti-M-Ankrd2 and the anti-S-Ankrd2 antibodies was further demonstrated since no signals were detected when the same amounts of proteins extracted from human kidney and liver were used (data not shown). Our results suggest that both the S- and M-Ankrd2 isoforms are present in cardiac and skeletal muscle tissue, but their distribution is uneven; the S-Ankrd2 isoform is dominant in skeletal muscle, but also present in cardiac muscle. M-Ankrd2 is expressed in heart and skeletal muscle at comparable levels, although less than S-Ankrd2 and it does not represent the exclusive cardiac isoform. The L-Ankrd2 isoform was not detected at the protein level.

To exclude the possibility that the expression profiles of the Ankrd2 isoforms in human heart and skeletal muscles, determined in the previous experiment, were subject specific, we performed additional Western blot analysis of proteins extracted from the postmortem human hearts of five subjects (Fig. 2b, top panel) and the skeletal muscles of four subjects (Fig. 2b, bottom panel; results are presented for two subjects). Information on gender, age, morphological parameters of heart, postmortem interval and cause of death is given in Table 1. Similar profiles of detected bands in cardiac and skeletal muscles were identified among individuals, and they were similar to the one observed for the positive control samples (H and SkM, Fig. 2b). Therefore, we confirmed that both Ankrd2 isoforms were expressed in human heart and skeletal muscles.

Some variations in the expression levels of Ankrd2 in cardiac muscle were observed among different individuals. To test if these variations arise from proteolysis of Ankrd2 in postmortem muscle, we quantified Western blot bands corresponding to each Ankrd2 isoform (from 3 independent blots) and analyzed the correlation between postmortem interval and Ankrd2 content of the individual samples using the one-way ANOVA and Scheffe post hoc test. In addition, we also calculated the correlation coefficient. Results of these analyses have demonstrated no correlation between Ankrd2 content and postmortem interval which varied from 5 to 24 h. Significant protein degradation of the S- and M-Ankrd2 was observed in one sample with a postmortem interval between 96 and 108 h when compared to the other subjects with much shorter postmortem intervals (Online Resource 1).

Results of Western blot analysis were further supported at the mRNA level by reverse transcription combined with PCR amplification (RT-PCR) using total RNA isolated from the heart of subject 3 (Table 1), as well as both the soleus and the gastrocnemius tissues of subject 8. After synthesis of cDNA, three fragments were amplified by PCR with specific primers. One pair of primers was designed to amplify the region of 155 bp which is present in the coding region of all three isoforms, the second pair of primers gives rise to an amplicon of 241 bp which contains the sequence specific for longer isoforms, while the third pair of primers amplify the fragment of 154 bp unique for the N terminus of L-Ankrd2. As shown in Fig. 3a, all three fragments were amplified by reverse transcription from cDNA of both human skeletal (soleus and gastrocnemius) and cardiac muscles, although in different amounts. Stronger signals were obtained for the S-Ankrd2 amplicon in cardiac and skeletal muscle RNAs, while weaker signals were observed for M-Ankrd2. The L-Ankrd2 amplicons were the weakest. These results confirmed the differential expression of the S- and M-Ankrd2 isoforms demonstrated by Western blot analysis. Low amounts of transcripts containing the L-Ankrd2-specific sequence were also found in striated muscles. In conclusion, we have demonstrated that S-Ankrd2 is the dominant form in both skeletal and cardiac muscle, while M-Ankrd2 is not exclusive for cardiac, but is also expressed in skeletal muscle.

### Regulation of expression of the Ankrd2 isoforms is achieved at the transcriptional level

Since results obtained by RT-PCR and Western blot suggested that the Ankrd2 isoforms are expressed in different amounts, we quantified their expression by qRT-PCR. We used the same three pairs of primers from the previously described reverse transcription experiment. Total RNA was isolated from cardiac tissue of three human subjects (3, 4 and 6), as well as from the soleus and gastrocnemius tissue of two subjects (7 and 8). cDNAs, synthesized from 1  $\mu$ g of each RNAs, were used as templates for qRT-PCR amplification of the designated Ankrd2 fragments. The experiments were performed in technical triplicate for each tissue. Results were normalized to GAPDH and presented as  $\Delta C_t$  values. In all tested tissues, S-Ankrd2 was found to be more highly expressed than M-Ankrd2 (Table 3). Since the L-Ankrd2 transcript was barely detectable in the qRT-PCR experiment ( $C_t > 30$ ) and was not detected at the protein level, it was not included in further analyses.

As demonstrated previously, Ankrd2, regardless of isoform, is less expressed in cardiac than in skeletal muscles and shows more expression in slow muscles such as the soleus compared to the gastrocnemius. Due to the large interindividual variations, results are presented for each

subject individually and the mean values for each tissue are not an appropriate way to present these data. The relevant information is the ratio between expression levels of the S-Ankrd2 and M-Ankrd2 isoforms in each tissue (Fig. 3b). In heart, the S-Ankrd2 is 6.3–13.5 times more expressed than the M-Ankrd2. The difference between expression levels of the Ankrd2 isoforms in skeletal muscle is much larger, and it is muscle type dependent; in the gastrocnemius of two subjects, the ratio is 29.8 for subject 7 and 48.2 for subject 8, whereas for the soleus, the values are 86.0 and 134.8 for subjects 7 and 8, respectively. These data corroborate the results obtained by Western blot that S-Ankrd2 is the dominant isoform in both human heart and skeletal muscles.

The soleus muscle has been reported to contain predominantly slow twitch (type I) fibers with the mean being 80 %, whereas the gastrocnemius muscle only contained 57 % slow twitch fibers (Gollnick et al. 1974). It is interesting to note our novel finding of different ratios between the expression levels of each isoform in two different muscle types of one subject. The values of <1 for M-Ankrd2 and >1 for S-Ankrd2 (Fig. 3c) suggest a slightly higher expression of the M-Ankrd2 isoform in the gastrocnemius compared to the soleus. This is opposite to that found for the S-Ankrd2 isoform which is more expressed in the soleus compared to the gastrocnemius muscle. This interesting observation needs to be further experimentally tested on more subjects, since the results presented in this work were obtained only from two individuals.

Taken together, the differences in the expression levels of the Ankrd2 isoforms are significant in both cardiac and skeletal muscles, which implies that two distinct mRNAs code for each isoform and that their expression is regulated at the transcriptional level.

### **Distinct localization of the Ankrd2 isoforms in human skeletal and cardiac muscles**

It was previously shown that Ankrd2 has a dual intracellular localization in muscle cells; it can be found in nucleus and sarcomere (Ishiguro et al. 2002). Recently, we have demonstrated that Ankrd2 may be found in the ICDs of human adult cardiomyocytes (Jasnic-Savovic et al. 2015). Also, Ankrd2 was reported to be preferentially expressed in slow muscle fibers (Ishiguro et al. 2002; Pallavicini et al. 2001). To discover if multisite- and fiber-type-specific localization can be attributed to the differential localization of the Ankrd2 isoforms, we investigated their subcellular localization in human cardiac and skeletal muscle cryosections by immunohistochemistry.

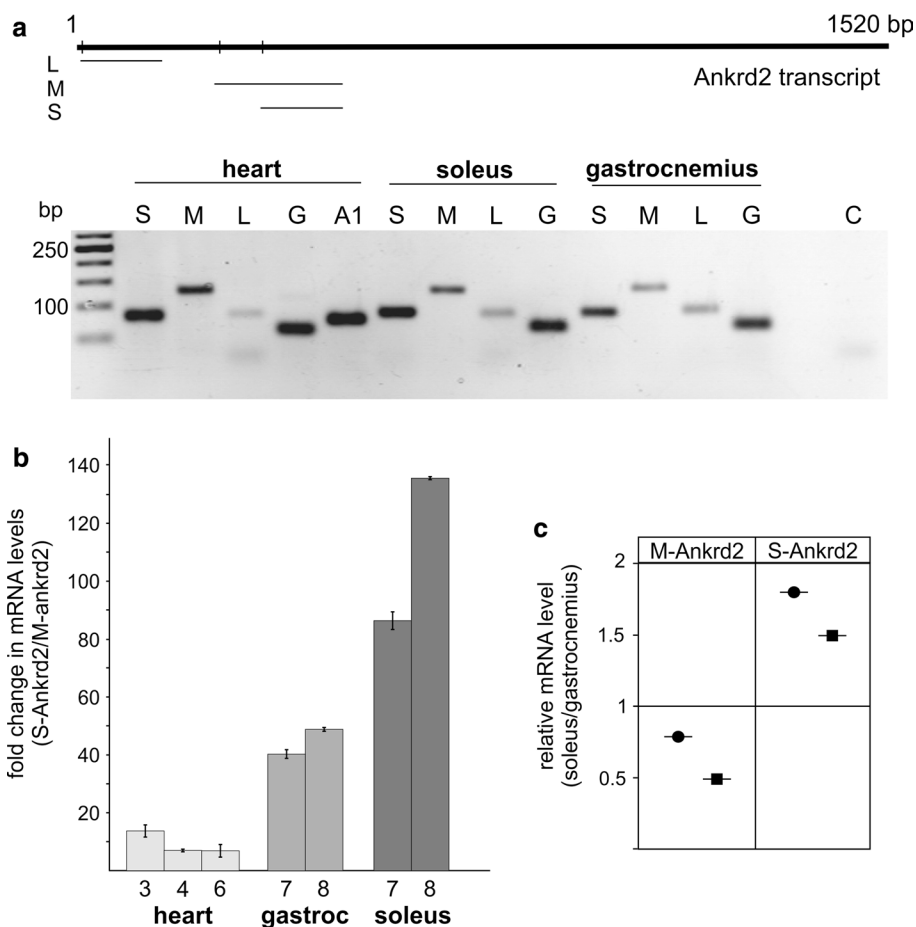
To examine the expression of the Ankrd2 isoforms in different types of fibers, we co-stained the soleus muscle (transversal section) with mouse monoclonal antibody to the C terminus of Ankrd2 and rabbit polyclonal antibody to

$\alpha$ -actinin 3 as a marker for fast fibers. We had already demonstrated that the S-Ankrd2 isoform shows a chessboard pattern of expression (Pallavicini et al. 2001). Although M-Ankrd2 is slightly more expressed in the slow fibers of the soleus, the distribution of M-Ankrd2 among fast and slow fibers is not significantly different in contrast to that observed for the S-Ankrd2 isoform (Fig. 4a). Another striking difference was the preferential localization of the M-Ankrd2 isoform in the nucleus. Longitudinal sections were stained with antibodies proven to distinguish the different Ankrd2 isoforms; specific immunoreactivity was detected upon incubation of the tissue samples with anti-S-Ankrd2 and anti-M-Ankrd2 primary antibodies and anti-mouse secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488. A striated pattern was observed for both isoforms (Fig. 4b, insets), and the nuclear signal for M-Ankrd2 was more prominent when compared to S-Ankrd2 (Fig. 4b).

In cardiac tissue, both isoforms show predominantly sarcomeric localization (Fig. 4c), and although a nuclear signal could be detected with both the anti-M- and anti-S-Ankrd2 antibodies, it was very low or absent. Apart from I-band localization, a weak signal was also observed in the M-band (Fig. 4d). To test the possibility that the M-band signal is not specific, we pre-adsorbed the antibodies with their corresponding antigens. All signals disappeared when the pre-adsorbed antibodies were applied, in contrast to the samples incubated with untreated antibodies (Online Resource 2), suggesting that the M-band localization of Ankrd2 isoforms in cardiac muscle is specific. Only S-Ankrd2 was detected in the ICDs, although in some cases a weak signal for M-Ankrd2 was also observed (Fig. 4d).

### **In contrast to S-Ankrd2, M-Ankrd2 is retained in nuclei of myotubes**

In previous studies done by the authors (Pallavicini et al. 2001; Kojic et al. 2004), the expression level and intracellular localization of Ankrd2 were detected using a monoclonal antibody that recognizes the C-terminal of S-Ankrd2. Ankrd2 expression in human myoblasts was low and mainly in the nucleus; however, on differentiation of these cells Ankrd2 expression was upregulated and almost exclusively localized in the cytoplasm (Kojic et al. 2004). Since this monoclonal anti-S-Ankrd2 antibody can recognize the M-Ankrd2 isoform, it was necessary to use the specific M-Ankrd2 antibody to discover if both isoforms are behaving in this manner. Immunocytochemistry experiments were done in primary human adult myoblasts and myotubes (after 3 days of differentiation), the cells were stained with anti-Ankrd2 and anti-desmin primary antibodies; desmin was used as a marker for muscle cells. We observed the known pattern for the S-Ankrd2 isoform, while there was M-Ankrd2 present in nuclei of both myoblasts and



**Fig. 3** Detection of transcripts of the Ankrd2 isoforms in human cardiac and skeletal muscles. **a** Schematic presentation of the 1520-bp Ankrd2 transcript (NM\_020349.3 NCBI) with the position of the amplicons. Vertical bars denote the three ATG codons. Below is shown representative result of RT-PCR amplification of Ankrd2 fragments from the cardiac tissue of subject 3 (heart) and the gastrocnemius and the soleus of subject 8 using the primer sets for isoforms L-Ankrd2 (L), M-Ankrd2 (M) and S-Ankrd2 (S). Ankrd1 (AI) was used as positive control in cardiac muscle, while the positive control for all tissues was GAPDH (G). C is negative control. **b** qRT-PCR

analysis was performed for the human cardiac muscle (heart) of subjects 3, 4 and 6, as well as for the gastrocnemius (gastroc) and the soleus muscles of subjects 7 and 8. For information about subjects, see Table 1. Bars represent fold change in relative mRNA levels of S-Ankrd2 compared to M-Ankrd2 in each subject. Results are presented as mean  $\pm$  SD for technical triplicates. **c** Ratio of the relative level of expression of each isoform in the soleus and the gastrocnemius for two subjects. The black circle is for subject 7, and the black rectangle is for subject 8

**Table 3** Relative expression levels of Ankrd2 isoforms normalized to GAPDH and expressed as  $2^{-\Delta Ct} \times 1000$

	Heart			Skeletal muscle			
	3	4	6	Gastrocnemius		Soleus	
	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
S-Ankrd2	41.58	97.06	49.62	167.47	32.71	245.16	59.46
M-Ankrd2	3.07	14.03	7.26	3.47	0.82	1.82	0.69

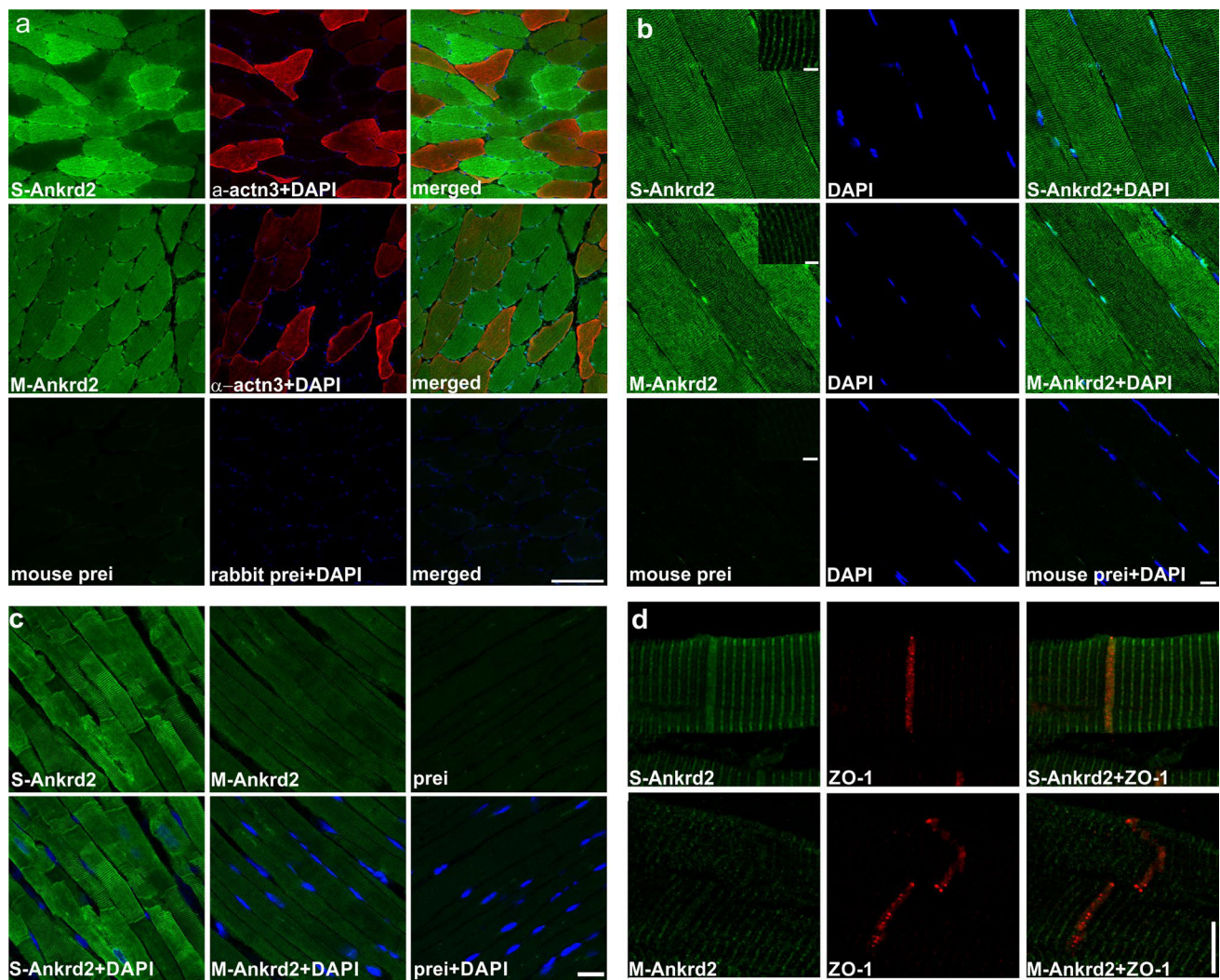
Numbers in bold correspond to human subjects (see Table 1)

multinucleated myotubes (Fig. 5a). The results of Western blot analysis (Fig. 5b) for these cells showed that both isoforms are upregulated during differentiation of myoblasts to myotubes, while only M-Ankrd2 isoform was detected in myoblasts.

**Discussion**

Although several human Ankrd2 isoforms are reported in databases, there are no published data which address their specificities in striated muscles. Generally, Ankrd2





**Fig. 4** Immunohistochemical localization of Ankrd2 isoforms in human skeletal (**a, b**) and cardiac muscles (**c, d**). Transversal (**a**) and longitudinal (**b, c**) cryosections were stained with mouse antibodies to the S- and M-Ankrd2 isoforms. Fast fibers (**a**) were detected with antibody to  $\alpha$ -actinin 3. Nuclei were stained with DAPI. *Insets* in **b**

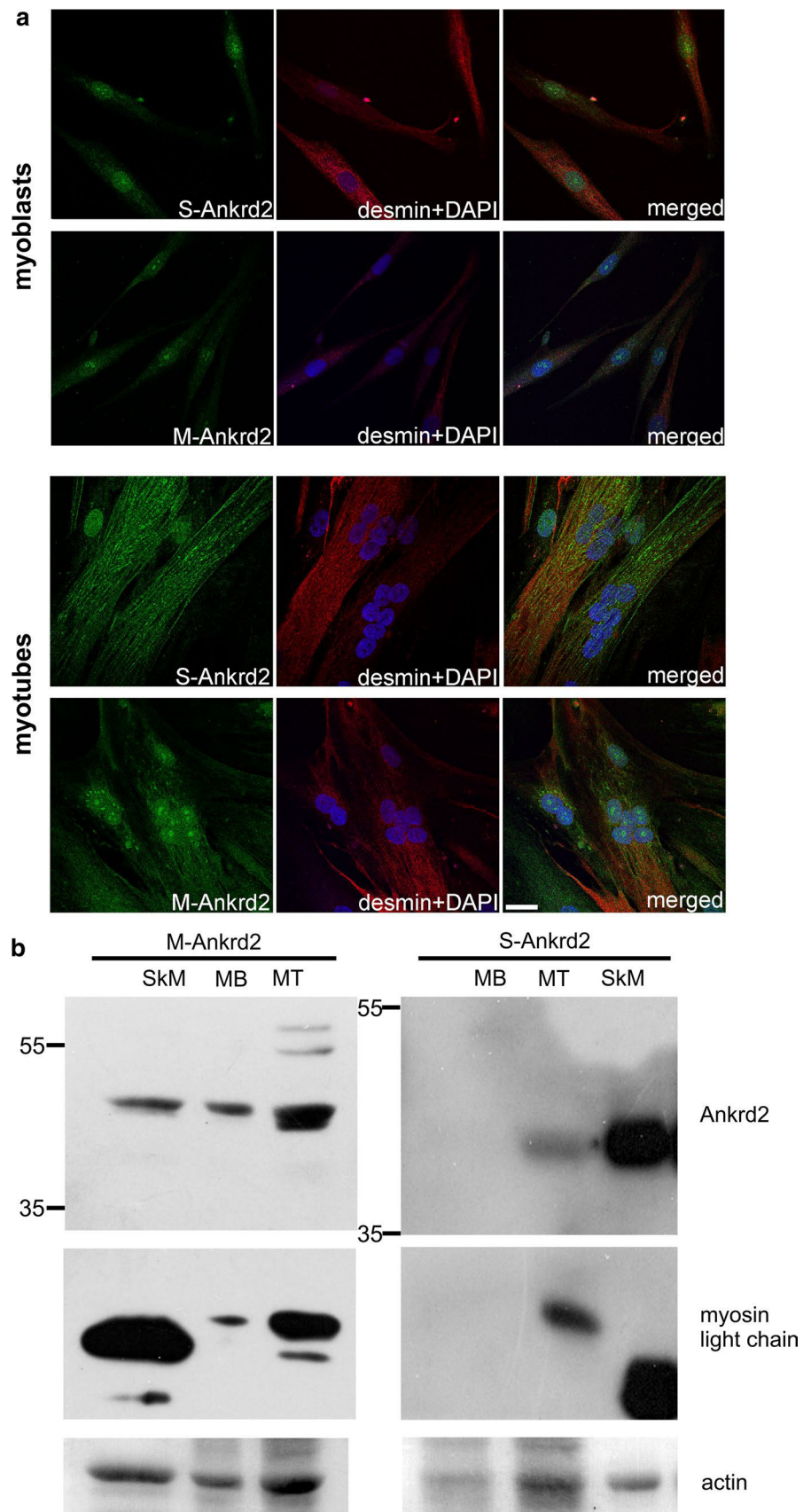
delineate striation pattern of Ankrd2 isoforms. *Bars* are 150  $\mu\text{m}$  for **a**, 15  $\mu\text{m}$  for **b**, 5  $\mu\text{m}$  for insets in **b** and 25  $\mu\text{m}$  for **c, d**. In contrast to S-Ankrd2, M-Ankrd2 isoform is not localized at the ICDs of cardiomyocytes. ZO-1 was used to mark ICDs. *Scale bar* 10  $\mu\text{m}$

is found in the sarcomeric I-band, as well as in the nuclei, it is expressed more in skeletal rather than in cardiac muscle, and it has both structural and regulatory roles in muscle cells (Kojic et al. 2011). But the intriguing question is which isoform contributes to which feature, do both isoforms behave in the same way, or do they have specific and distinct expression levels, localization and function? The majority of the work regarding profiling of human Ankrd2 expression and localization was done using the 333 aa isoform (here designated as S-Ankrd2) (Ishiguro et al. 2002; Moriyama et al. 2001; Pallavicini et al. 2001), while M-Ankrd2 was analyzed in dimerization studies (Lun et al. 2014; Witt et al. 2005). In 2003, Miller and coworkers (Miller et al. 2003) reported three human Ankrd2 isoforms

for the first time. The 5' exon of Ankrd2 contains three in-frame ATG codons and may encode isoforms of 37.5, 40 and 50 kDa. The 37.5-kDa isoform is skeletal muscle specific, while the isoform of 50 kDa is potentially expressed in heart muscle (Miller et al. 2003). It is interesting that, unlike in humans, there are no Ankrd2 isoforms in rodents. The rat and mouse Ankrd2 are highly similar (almost 90 %) to the human isoform of 333 aa. Thus, detection of the Ankrd2 protein at about 55 kDa, which was dominant in the adult rat heart (Miller et al. 2003; Jasnica-Savovic et al. 2015), is very intriguing since longer isoforms of rodent Ankrd2 are not reported in the databases.

In our work, we have characterized two out of the three isoforms: the one of 333 aa that corresponds to the isoform

**Fig. 5** Localization of the Ankrd2 isoforms in human myoblasts and myotubes. **a** Both of the Ankrd2 isoforms are found in the nuclei of myoblasts, but only the M-Ankrd2 isoform remains in the nuclei of the multinucleated myotubes. Localization of the Ankrd2 isoforms in human primary myoblasts and myotubes after 3 days of differentiation was determined by immunocytochemistry. The Ankrd2 isoforms were stained with the corresponding antibodies, while desmin was used as a muscle cell-specific marker. The nuclei were stained with DAPI. *Bar* 25  $\mu$ m. **b** Western blot analysis of the Ankrd2 isoforms in protein extracts of myoblasts (MB) and myotubes (MT) differentiated for 7 days. Actin was detected as a loading control, while myosin light chain was used as a marker of differentiation. SkM stands for extracts of the human skeletal muscle used as positive control





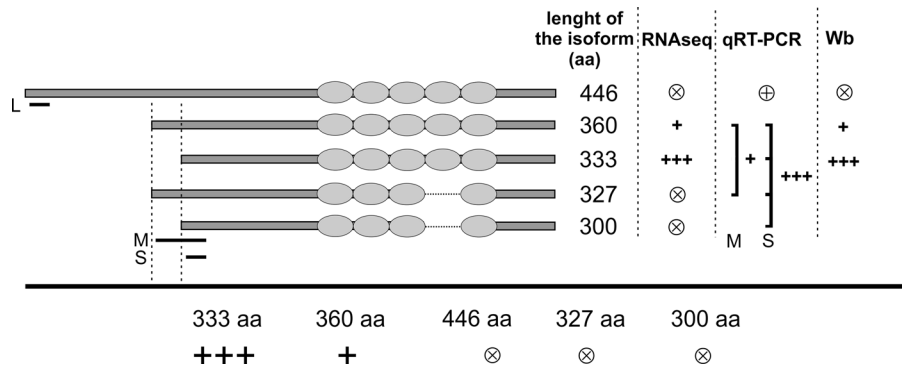
of 37.5 kDa and the other of 360 aa that corresponds to the isoform of 40 kDa. Our experimental evidence does not support the expression of the third isoform at protein level, at least under physiological condition. The L-Ankrd2-specific fragment amplified in RT-PCR experiments may originate from the 5' UTR of the M-Ankrd2 transcript.

In order to distinguish the S-Ankrd2 from the M-Ankrd2 isoform, we designed an antibody against an epitope which is present in the longer isoforms and extensively demonstrated its specificity (Fig. 1). Although this antibody was theoretically able to detect the isoforms of 360 and 446 aa (M-Ankrd2 and L-Ankrd2, respectively), it detected only the M-Ankrd2 isoform in protein extracts of human striated muscle (Fig. 2a). Antibody raised against the N terminus of S-Ankrd2 should recognize all three isoforms, but this was not the case, at least in Western blot analyses. At the level of 40 kDa, one strong and one faint band were detected with the anti-S-Ankrd2 antibody. The strong band was not the one detected by the anti-M-Ankrd2 antibody, while the faint band corresponded to the one detected by the anti-M-Ankrd2 antibody. This suggested that the anti-S-Ankrd2 antibody binds to the M-Ankrd2 isoform with low affinity. So, at the protein level specific discrimination of these two Ankrd2 isoforms was achieved. The L-Ankrd2 isoform was not detected in extracts of adult human skeletal and cardiac muscles with the anti-S- and anti-M-Ankrd2 antibodies. Using this approach, we showed that the S-Ankrd2 isoform is the one preferentially expressed in skeletal, but also present in cardiac muscle. Considered as a cardiac form (Lun et al. 2014), the M-Ankrd2 isoform was confirmed to be expressed in heart, but also detected in skeletal muscle (Fig. 2a). Similar expression profiles of the Ankrd2 isoforms were observed in the cardiac and skeletal muscles of several human subjects, thus confirming that these results were not subject specific (Fig. 2b). Results obtained at the protein level were confirmed at the RNA level. Transcripts of the Ankrd2 isoforms were detected in both skeletal and cardiac muscles, and the S-Ankrd2 was more dominant (Fig. 3). However, it seems that the M-Ankrd2 isoform is more expressed than the S-Ankrd2 isoform in certain types of skeletal muscles as we demonstrated for gastrocnemius. On the other hand, in some muscles the S-Ankrd2 isoform is dominant as demonstrated for soleus muscle. This observation warrants further experimental evidence. It is important to note that the absolute and in some cases the relative quantification of Ankrd2 isoforms at both the RNA and protein levels were not consistent with overall results, suggesting that their expression and ratio depend on specific but so far unknown physiological parameters such as age, muscle mass, physical condition. This is the reason why we did not present our results related to expression levels of isoforms as mean values with standard deviation.

In skeletal muscle, the already known slow fiber-type-specific localization and checkerboard pattern of expression of Ankrd2 (Ishiguro et al. 2002; Pallavicini et al. 2001) was observed for the S-Ankrd2 isoform (Fig. 4a). The M-Ankrd2 isoform was almost equally distributed between slow and fast fibers, suggesting that its expression is not strictly controlled by slow fiber-specific regulators of transcription. Regarding the intracellular localization of the Ankrd2 isoforms in skeletal muscle, both isoforms were detected by immunofluorescence in both the cytoplasm and the nuclei, which is in accordance with previously published results (Ishiguro et al. 2002; Moriyama et al. 2001). The cytoplasmic signal coincided with striation of the sarcomere; however, the nuclear signal for the M-Ankrd2 isoform was more prominent, implying the nucleus as the site of preferential localization of this isoform (Fig. 4b). Since muscle tissue contains other cell types, such as capillaries and satellite cells, it is not possible to exclude Ankrd2 expression in the nuclei of these non-muscle cells. We plan to investigate this possibility in future experiments. To indirectly confirm that the nuclear localization of Ankrd2 isoforms is inherent to muscle cells, we detected the isoforms in human primary myoblasts and myotubes and found that the M-Ankrd2 isoform remains in the nuclei of myotubes, in contrast to the pattern of the S-Ankrd2 isoform (Fig. 5).

In human ventricular cardiomyocytes, both isoforms show a predominant sarcomeric localization, while a nuclear signal, obtained with both antibodies, was very low or absent (Fig. 4c). Recently, we have reported that Ankrd2 is localized to the ICDs (Jasnic-Savovic et al. 2015). Here we demonstrate that the S-Ankrd2 isoform is the one localized in this structure, in contrast to the M-Ankrd2 (Fig. 4d). Since Ankrd1 and Ankrd23/DARP were also detected in ICDs (Jasnic-Savovic et al. 2015; Miller et al. 2003) and both Ankrd1 and Ankrd2 interact with the ZO1 protein (Belgrano et al. 2011; Nestorovic et al. 2014) which is involved in electromechanical coupling between cardiomyocytes (Delmar 2004; Palatinus and Gourdie 2007), it would be interesting to further study the role of Ankrd2 in ICDs and mechanisms which rule the specific functions of the isoforms in cardiomyocytes. Our results also show that the M-band may be a novel site of localization of Ankrd2 isoforms in human adult cardiomyocytes (Fig. 4c; Online Resource 2), but ultrastructural and other validation studies must be performed in order to confirm this finding.

M-Ankrd2 was found to be localized more in nuclei of skeletal muscle tissue, in comparison with S-Ankrd2. It is possible that structural features of the Ankrd2 isoforms direct their intracellular localization. For example, although both isoforms have a nuclear localization signal (NLS), this domain may be more exposed in the M-Ankrd2 isoform. Another possibility is that calpain 3 affects their localization in different ways. It was demonstrated that MARPs



**Fig. 6** The combined results of RNAseq, qRT-PCR and Western blot (Wb) experiments strongly suggest that major isoform expressed in human striated muscles is the one designated as S-Ankrd2 (Ensembl transcript 001). There is no evidence for alternative splicing of exon

7 in normal adult skeletal and cardiac muscles. ⊗-no expression, ⊕-extremely low expression, +-low expression, +++-high expression. L, M and S are qRT-PCR amplicons

Ankrd1 and Ankrd2 interact with and are substrates of calpain 3 protease (Hayashi et al. 2008; Laure et al. 2010). Moreover, the intracellular localization of Ankrd1 is controlled by the activity of calpain 3; when cleaved at the N terminus, its interaction with the sarcomere is increased. It is possible that the M-Ankrd2 is less prone to calpain 3 digestion resulting in preferential nuclear targeting and less retention in sarcomere, while S-Ankrd2 behaves in a similar way to Ankrd1. The distinct intracellular localization of the Ankrd2 isoforms may also contribute to functional differences between the isoforms. The M-Ankrd2 isoform, being predominantly nuclear, may have a more regulatory function, while the sarcomeric S-Ankrd2 may have a structural function in the sarcomere.

In addition to the NLS, the N terminus of Ankrd2 contains a coiled-coil (CC) domain essential for dimerization that is present in both Ankrd2 isoforms investigated in this study. Experiments on the dimerization properties of Ankrd2 were performed using the M-Ankrd2 isoform (Lun et al. 2014; Witt et al. 2005), and it was shown that this isoform is able to form homo- and heterodimers with the other two MARPs in an antiparallel manner (Lun et al. 2014). It would be interesting to discover if the S-Ankrd2 isoform is prone to homo- and heterodimerization since there are only 9 aa prior to the CC domain as determined by prediction using SMART software (<http://smart.embl-heidelberg.de>), in contrast to the CC domain in the M-Ankrd2 isoform positioned from aa 36–64 (Lun et al. 2014). If the S-Ankrd2 isoform is not able to form dimers, it could present one more functional difference between the isoforms.

One of the questions we tried to answer is how expression of the Ankrd2 isoforms is regulated. Are they transcribed from a single mRNA and translated from alternative ATG codons, or translated from distinct mRNAs? In order to pinpoint at which level regulation of their expression is achieved, we performed a qRT-PCR experiment

using specifically designed pairs of primers (Fig. 3a). One pair is designed to amplify the unique region of L-Ankrd2, another pair amplifies a fragment which contains the region found in the longer isoforms and not present in the S-Ankrd2 isoform, while the third pair of primers gives rise to the amplicon present in all three isoforms. We hypothesized that if one mRNA codes for all three isoforms, similar  $\Delta Ct$  values for the three amplicons will be obtained. This was not the case, since a significant difference between the M and S amplicon's values was measured, while L amplicon was barely detected, meaning that two distinct mRNAs code for the S- and M-Ankrd2 isoforms. Accordingly, the regulation of expression of these two Ankrd2 isoforms is achieved at the transcriptional level. This result imposes the question about which constitutive and/or inducible regulatory elements drive the specific expression of the Ankrd2 isoforms.

Due to the limited availability of human muscle tissue, we used cadaveric biological material obtained from routine autopsies. Although postmortem human tissues are often used in biomedical research, there is always the question of the integrity of the biomolecules due to decomposition of the tissue. Nevertheless, a number of studies have described successful gene expression and protein analysis from postmortem tissue and samples (Hansen et al. 2014; Heinrich et al. 2007; Phang et al. 1994; Tavichakortrakool et al. 2008). Several parameters can interfere with sample integrity, such as postmortem interval, cause of death and duration of agony, storage conditions and type of the tissue (Heinrich et al. 2007; Koppelkamm et al. 2011; Tavichakortrakool et al. 2008). Although it is recommended that analysis should be performed within the optimal postmortem interval, it is interesting that this is not the crucial factor for preservation of RNA, a very sensitive biomolecule with short half-life. In some cases, successful analyses were performed even up to 3 days

postmortem (Hansen et al. 2014). Low storage temperature of samples (4 °C and below) is very important because it can delay postmortem changes and preserve the tissue (Tavichakortrakool et al. 2008). For example, the proteome profile of skeletal muscle remains unchanged for 24 h when stored under these conditions (Tavichakortrakool et al. 2008). Also, it was found that the type of postmortem tissue has a significant influence on the quality of informative biomolecules. Human skeletal muscle, heart and brain were found to have a high postmortem stability of RNA and DNA (Gonzalez-Herrera et al. 2013; Heinrich et al. 2007; Partemi et al. 2010; Phang et al. 1994). Here we analyzed human skeletal and heart tissue from generally healthy subjects who died immediately. In order to conserve tissues for the analyses, all samples were collected up to 24 h after death, transported on ice, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

Here we demonstrated that at least two of the reported Ankrd2 isoforms, namely S- and M-Ankrd2, are expressed in both human skeletal and cardiac muscles and their expression and localization profiles is determined. The design of our study allowed for discrimination between these two isoforms, while other two isoforms (Ankrd2-002 and Ankrd2-201 from Ensembl database), both lacking exon 7, could not be specifically distinguished. RNAseq, performed using mRNA from human adult skeletal and cardiac muscle tissues (Martinelli et al. 2014), showed no evidence of alternative splicing of Ankrd2 exon 7, suggesting that these two isoforms are not actually expressed, at least under physiological conditions. In addition, we obtained experimental evidence that the S-Ankrd2 isoform is dominant in striated muscles (shown in Fig. 6).

Currently, the canonical Ankrd2 isoform in the UniProtKB/Swiss-Prot database is the one of 360 aa, probably since one of the criteria for the entry of a canonical sequence is that in the absence of any information, the longest sequence is chosen as the canonical form. In summary, we propose that the S-Ankrd2 isoform of 333 aa should be nominated as the canonical one, instead of the M-Ankrd2 isoform.

Although a number of intriguing questions regarding function of the MARPs remain to be resolved, such as the reason why different isoforms are expressed in each muscle type, do they compensate for each other, and if so, how do sarcomeric and nuclear Ankrd2 communicate, our results set the stage for future investigations on the specific functions of Ankrd2 isoforms and their functional relationship with Ankrd1, especially in cardiac and diseased muscles.

**Acknowledgments** This study was supported by a grant from the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 173008 to DR), a bilateral project

funded by the German Academic Exchange Service and the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project-ID 50753561 – ANDIMA to SK and MCW) and a grant from the Fondazione Cariparo, Italy (Progetto Eccellenza 2010 CHROMUS to GV and GF). We thank the Muscle Tissue Culture Collection (MTCC) for providing the myoblast samples. The Muscle Tissue Culture Collection is part of the German network on muscular dystrophies (MD-NET) and the German network for mitochondrial disorders (mito-NET, project D2, 01GM1113A) funded by the German Ministry of Education and Research (BMBF, Bonn, Germany). The Muscle Tissue Culture Collection is a partner of the EuroBioBank ([www.eurobiobank.org](http://www.eurobiobank.org)) and the TREAT-NMD ([www.treat-nmd.eu](http://www.treat-nmd.eu)). We are grateful to Natasa Tomic for the assistance in the qRT-PCR experiments.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical standard** All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Faculty of Medicine, University of Belgrade, 1964 Declaration of Helsinki and the Law on Health Care of the Republic of Serbia. For this type of study, formal consent is not required. All applicable international and national guidelines for the care and use of animals were followed.

#### References

- Bang ML, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chien KR, Chen J (2014) The muscle ankyrin repeat proteins carp, ankrd2, and darp are not essential for normal cardiac development and function at basal conditions and in response to pressure overload. *PLoS One* 9:e93638
- Barash IA, Mathew L, Ryan AF, Chen J, Lieber RL (2004) Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C355–C364
- Barash IA, Bang ML, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL (2007) Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C218–C227
- Bean C, Facchinello N, Faulkner G, Lanfranchi G (2008) The effects of ankrd2 alteration indicate its involvement in cell cycle regulation during muscle differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1783:1023–1035
- Bean C, Verma NK, Yamamoto DL, Chemello F, Cenni V, Filomena MC, Chen J, Bang ML, Lanfranchi G (2014) Ankrd2 is a modulator of nf-kb-mediated inflammatory responses during muscle differentiation. *Cell Death Dis* 5:e1002
- Belgrano A, Rakicevic L, Mitterpergher L, Campanaro S, Martinelli VC, Mouly V, Valle G, Kojic S, Faulkner G (2011) Multi-tasking role of the mechanosensing protein ankrd2 in the signaling network of striated muscle. *PLoS One* 6:e25519
- Delmar M (2004) The intercalated disk as a single functional unit. *Heart Rhythm* 1:12–13
- Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH Jr, Angelini C (2001) Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy. *Neurology* 56:660–665
- Gollnick PD, Sjodin B, Karlsson J, Jansson E, Saltin B (1974) Human soleus muscle: a comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. *Pflugers Arch* 348:247–255

- Gonzalez-Herrera L, Valenzuela A, Marchal JA, Lorente JA, Villanueva E (2013) Studies on rna integrity and gene expression in human myocardial tissue, pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. *Forensic Sci Int* 232:218–228
- Hansen J, Lesnikova I, Funder AM, Banner J (2014) DNA and rna analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. *Forensic Sci Med Pathol* 10:322–328
- Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, Mineki R, Arai T, Taguchi H, Yanagida M, Hirner S, Labeit D, Labeit S, Sorimachi H (2008) Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin n2a region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283:14801–14814
- Heinrich M, Matt K, Lutz-Bonengel S, Schmidt U (2007) Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med* 121:136–142
- Hentzen ER, Lahey M, Peters D, Mathew L, Barash IA, Fridén J, Lieber RL (2006) Stress-dependent and -independent expression of the myogenic regulatory factors and the MARP genes after eccentric contractions in rats. *J Physiol* 570:157–167
- Ishiguro N, Baba T, Ishida T, Takeuchi K, Osaki M, Araki N, Okada E, Takahashi S, Saito M, Watanabe M, Nakada C, Tsukamoto Y, Sato K, Ito K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol* 160:1767–1778
- Jasnic-Savovic J, Nestorovic A, Savic S, Karasek S, Vitulo N, Valle G, Faulkner G, Radojkovic D, Kojic S (2015) Profiling of skeletal muscle ankrd2 protein in human cardiac tissue and neonatal rat cardiomyocytes. *Histochem Cell Biol* 143:583–597
- Kemp TJ, Sadosky TJ, Saltisi F, Carey N, Moss J, Yang SY, Sassoon DA, Goldspink G, Coulton GR (2000) Identification of ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics* 66:229–241
- Kojic S, Medeot E, Guccione E, Krmac H, Zara I, Martinelli V, Valle G, Faulkner G (2004) The ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol* 339:313–325
- Kojic S, Medeot E, Faulkner G (2009) Characterization of antibodies directed against the ankrd2 human muscle protein. *Arch Biol Sci* 61:9
- Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G (2011) Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48:269–294
- Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M (2011) Rna integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med* 125:573–580
- Laure L, Daniele N, Suel L, Marchand S, Aubert S, Bourg N, Roudaut C, Duguez S, Bartoli M, Richard I (2010) A new pathway encompassing calpain 3 and its newly identified substrate cardiac ankyrin repeat protein is involved in the regulation of the nuclear factor-kappab pathway in skeletal muscle. *FEBS J* 277:4322–4337
- Lehti M, Kivela R, Komi P, Komulainen J, Kainulainen H, Kyrolainen H (2009) Effects of fatiguing jumping exercise on mrna expression of titin-complex proteins and calpains. *J Appl Physiol* 106:1419–1424
- Lun AS, Chen J, Lange S (2014) Probing muscle ankyrin-repeat protein (MARP) structure and function. *Anat Rec* 297:1615–1629
- Martinelli VC, Kyle WB, Kojic S, Vitulo N, Li Z, Belgrano A, Maiuri P, Banks L, Vatta M, Valle G, Faulkner G (2014) Zasp interacts with the mechanosensing protein ankrd2 and p53 in the signaling network of striated muscle. *PLoS One* 9:e92259
- Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: Carp, ankrd2/arpp and darp as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 333:951–964
- Mohamed JS, Lopez MA, Cox GA, Boriek AM (2013) Ankyrin repeat domain protein 2 and inhibitor of DNA binding 3 cooperatively inhibit myoblast differentiation by physical interaction. *J Biol Chem* 288:24560–24568
- Moriyama M, Tsukamoto Y, Fujiwara M, Kondo G, Nakada C, Baba T, Ishiguro N, Miyazaki A, Nakamura K, Hori N, Sato K, Shomori K, Takeuchi K, Satoh H, Mori S, Ito H (2001) Identification of a novel human ankyrin-repeated protein homologous to carp. *Biochem Biophys Res Commun* 285:715–723
- Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110:155–162
- Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M (2004) Altered expression of arpp protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathobiology* 71:43–51
- Nakamura K, Nakada C, Takeuchi K, Osaki M, Shomori K, Kato S, Ohama E, Sato K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with pest and proline-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Pathobiology* 70:197–203
- Nestorovic A, Jasnic-Savovic J, Faulkner G, Radojkovic D, Kojic S (2014) Ankrd1-mediated signaling is supported by its interaction with Zonula Occludens-1. *Arch Biol Sci* 66:1233–1242
- Palatinus JA, Gourdie RG (2007) Xin and the art of intercalated disk maintenance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H2626–H2628
- Pallavicini A, Kojić S, Bean C, Vainzof M, Salamon M, Ievolella C, Bortoletto G, Pacchioni B, Zatz M, Lanfranchi G, Faulkner G, Valle G (2001) Characterization of human skeletal muscle ankrd2. *Biochem Biophys Res Commun* 285:378–386
- Partemi S, Berne PM, Battle M, Berruezo A, Mont L, Riuro H, Ortiz JT, Roig E, Pascali VL, Brugada R, Brugada J, Oliva A (2010) Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology. *Forensic Sci Int* 203:99–105
- Phang TW, Shi CY, Chia JN, Ong CN (1994) Amplification of cdna via rt-pcr using rna extracted from postmortem tissues. *J Forensic Sci* 39:1275–1279
- Tavichakorntrakool R, Prasongwattana V, Sriboonlue P, Puapairoj A, Pongskul J, Khuntikeo N, Hanpanich W, Yenchtisomanus PT, Wongkham C, Thongboonkerd V (2008) Serial analyses of postmortem changes in human skeletal muscle: a case study of alterations in proteome profile, histology, electrolyte contents, water composition, and enzyme activity. *Proteomics Clin Appl* 2:1255–1264
- Tsukamoto Y, Senda T, Nakano T, Nakada C, Hida T, Ishiguro N, Kondo G, Baba T, Sato K, Osaki M, Mori S, Ito H, Moriyama M (2002) Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type 1 skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation. *Lab Invest* 82:645–655
- Tsukamoto Y, Hijiya N, Yano S, Yokoyama S, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Moriyama M (2008) Arpp/ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (marps), translocates from the i-band to the nucleus after muscle injury. *Histochem Cell Biol* 129:55–64
- Witt SH, Labeit D, Granzier H, Labeit S, Witt CC (2005) Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: implications for MARP titin-based signaling. *J Muscle Res Cell Motil* 26:401–408

*“And in the end, the love you take is  
equal to the love you make”*

*The Beatles*