Utjecaj nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze na metilaciju proteina

Ćuk, Mario

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:088644

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Ćuk, Mario (2013) ***Utjecaj nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze na metilaciju proteina [Impact of S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency on protein methylation].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1900

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Mario Ćuk

Utjecaj nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze na metilaciju proteina

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Autor disertacije

Autor disertacije je Mario Ćuk, dr.med., specijalist pedijatar Specijalističkog zavoda za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i asistent Katedre za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor

Mentor disertacije je prof.dr.sc. Ivo Barić, dr.med., specijalist pedijatar i subspecijalist genetičar Specijalističkog zavoda za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i redoviti profesor Katedre za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Naslov i voditelj projekta u okviru kojeg je izrađena disertacija

Disertacija je izrađena u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Nasljedne metaboličke i ostale monogenske bolesti djece“ (broj projekta 108-1081870-1885; glavni istraživač i voditelj projekta prof.dr.sc. Ivo Barić, dr.med.; suradnik na projektu Mario Ćuk, dr.med.) i projekta IPA Europske Unije “Uspostava istraživačke infrastrukture za translacijsku medicinu i primjenjenu genomiku” (broj projekta IPA2007/HR/16IPO/001-040305, glavni istraživač i voditelj projekta doc.dr.sc. Oliver Vugrek; suradnik na projektu Mario Ćuk, dr.med.).

Mjesto provođenja istraživanja

Disertacija je izrađena u Specijalističkom zavodu za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju, Kliničkoj jedinici za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Laboratoriju za translacijsku medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu.

POSVETA

Posvećujem i darivam svojoj djeci, sinu i kćeri, ljubičici Roku i ljepotici Marti.

Ćukiću i Ćukici

Zato što Ste dio mene, neotuđiv, nenadoknadiv,

Zato što Vas volim, beskrajno, najiskrenije,

Zato što ne mogu bez Vas, ni dana, ni trenutka, ni živjeti, ni disati,

Zato što Ste moj početak i kraj,

Zato što kroz Vaše djetinjstvo proživljavam svoje,

Vraćate me u mladost, činite me mladim i vječnim,

Činite me djetetom, dječaćićem,

Dolazim k Vama po utjehu, po snagu, po sebe, život, radost, po sve,

Šaputate mi, Milujete me,

Mazite me,

Ljubite me,

Liječite me, hranite me,

Darivate me osmjesima,

Oživljavate dodirima,

Sate provodimo zajedno, mjesece, godine, odlazimo u beskraj,

Ni noć, ni zlo nas rastaviti neće, ni sudnji dan, niti išta,

Vaša snaga čini me jakim, još jačim, najjačim,

Vaša tišina sretnim, još sretnijim, najsretnijim,

Vaša divota zdravim, najzdravijim, Vaša pjesma mirnim, spokojnim,

Gledam Vas dušom, grlim srcem i tijelom,

Osjećam dodirom i mirisom,

Djeco moja, trebam Vas neizmjerno svakodnevno,

U mene utkani ste, neprekidno, beskrajno,

Živ sam zbog Vas i za Vas,

Ćukiću moj i Ćukice moja,

Blagoslovio Vas Bog.

Zauvijek Vaš tatica Ćuk

ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Ivi Bariću, dr.med.

Hvala Saši.
Hvala Ljiljani.
Hvala Željki.
Hvala Mariji.
Hvala Predragu.
Hvala Mili.
Hvala Ani.
Hvala Karmen.
Hvala Josipi.
Hvala Oliveru.
Hvala sestri Višnji i medicinskim sestrama Specijalističkog zavoda za bolesti metabolizma.
Hvala primarijusu doktoru mr.sc. Vladimiru Sarnavki, dr.med.

Grateful to Prof Harvey Mudd, MD, PhD, Scientist Emeritus at the Laboratory of Molecular Biology, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, United States.

Hvala obitelji Vidović - David, Luka, Mihael i Mia Marija su smisao ovog znanstvenog istraživanja - želim i nadam se da će biti na Vašu dobrobit i prilog Vašem zdravlju.

Neopisivo, neizmjerno, najneizmjernije HVALA Kseniji i Robertu u stručnom, a majci, ocu i mojoj obitelji, u svakom smislu - posebno, najposebnije mojoj dječici, ljubičici Roku i ljepotici Marti, koja me nikada, i ni u čemu, nisu iznevjerila.

Bez Vas ne bih uspio.

Hvala Vam Svima i za sve do Neba,

Mario

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1. Što znamo o enzimu zbog kojeg nastaje bolest koju istražujemo 1

1.1.1. Naša dosadašnja istraživanja 3

1.2. Molekule povezane sa S-adenozilhomocistein hidrolazom 5

1.2.1. Metionin 5

1.2.2. S-adenozilmetionin 5

1.2.3. S-adenozilhomocistein 6

1.2.4. Metiltransferaze ovisne o AdoMet 6

1.2.5. Metilacijski indeks 7

1.3. Biološki procesi povezani s bolesću zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze 8

1.3.1. Uloga i važnost metilacije u biološkim procesima 8

1.3.2. Posttranslacijske modifikacije proteina 9

1.3.2.1. Poremećaj metilacije proteina kao moguća posljedica nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze 9

1.3.3. Asimetrični dimetilarginin (aDMA) 11

1.3.4. Proteini odabrani za ovo istraživanje: hnRNP-A1, PABP-1, Sam68 13

1.3.4.1. Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini (hnRNP) 13

1.3.4.2. Protein koji veže poli-A 1 (PABP-1) 17

1.3.4.3. Protein Sam68 18

1.3.5. Konstitutivno i alternativno izrezivanje nezrele mRNA (engl. *splicing code*) 20

1.3.5.1. Regulacija i važnost izrezivanja nezrele mRNA 21

1.3.5.2. "*Spliceosome*" 22

2. HIPOTEZA **25**

3. CILJEVI **26**

4. MATERIJALI I METODE **27**

4.1. Ispitanici i kontrolne skupine 27

4.2. ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) 28

4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornisti 29

4.4. Spektrofotometrija 31

4.5. Imunoprecipitacija 32

4.6. Elektroforeza u gelu poliakrilamida s natrijevim dodecilsulfatom 34

4.7. Imunološka detekcija imobiliziranog proteina 35

4.8. Kvantifikacija detektiranog signala imunološki imobiliziranog proteina 37

4.9. Kulture fibroblasta 38

4.10. Statistička obrada podataka 41

5. REZULTATI **42**

5.1. Utjecaj povišene koncentracije S-adenozilhomocisteina, S-adenozilmetionina i patološki niskog metilacijskog indeksa na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ 42

5.2. Utjecaj liječenja dijetom siromašnom metioninom na metilacijski indeks i koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ 44

5.3. Analize u eksperimentalnom modelu fibroblasta *in vitro* 46

5.3.1. Metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastim te usporedna analiza s vrijednostima u plazmi 46

5.3.2. Metilacijski indeks i koncentracija asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy 48

5.3.3. Utjecaj dodavanja AdoMet i AdoHcy na metilacijski indeks u fibroblastima *in vitro* *49*

5.3.4. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju 50

5.3.5. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u kontrolnim fibroblastima i mediju 53

5.3.6. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem 54

5.4. Utjecaj patološki niskog metilacijskog indeksa na posttranslacijsku metilaciju arginina odabranih proteina 56

5.4.1. Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa A1 (hnRNP-A1) 56

5.4.2. Protein koji veže poli-A tipa 1 (PABP-1) 62

5.5 Pregledni sažetak rezultata 63

6. RASPRAVA **64**

6.1. Utjecaj povišene koncentracije S-adenozilhomocisteina, S-adenozilmetionina i patološki niskog metilacijskog indeksa na koncentraciju asimetričnog dimetilarginin u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ 64

6.2. Utjecaj liječenja dijetom siromašnom metioninom na metilacijski indeks i koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ 64

6.3. Analize u eksperimentalnom modelu fibroblasta *in vitro* *65*

6.3.1. Metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastim te usporedna analiza s vrijednostima u plazmi 65

6.3.2. Metilacijski indeks i koncentracija asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy 67

6.3.3. Utjecaj dodavanja AdoMet i AdoHcy na metilacijski indeks u fibroblastima *in vitro* *67*

6.3.4. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju 68
6.3.5. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u kontrolnim fibroblastima i mediju 69
6.3.6. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem 69
6.4. Utjecaj patološki niskog metilacijskog indeksa na razinu posttranslacijske metilacije arginina odabranih proteina 70
6.4.1. Hipometilacija arginina hnRNP-A1 70
6.4.2. Dovodi li hipometilacija proteina hnRNP-A1 do njegove disfunkcije? 71
6.4.3. Moguće pogreške u procesu izrezivanja mRNA u okviru manjka SAHH 74
6.5. Primjeri bolesnih stanja u čiju su patogenezu uključeni proteini hnRNP - moguće poveznice s bolešću zbog manjka SAHH 75
6.6. Uzročno-posljedična veza između dismetilacije proteina, poremećenog izrezivanja i mišićne distrofije u pacijenata s manjkom SAHH 77
6.6.1. Bolest zbog manjak SAHH - "proteinska izoformopatija" 78
6.6.2. Ciljni proteini i procesi mišićne stanice koji bi, u okviru manjka SAHH, a na temelju rezultata ovog istraživanja mogli biti poremećeni zbog 78
6.7. Zaključak rasprave 83

7. ZAKLJUČAK 84
7.1. O hipotezi i glavnom cilju disertacije 84
7.2. O specifičnim ciljevima disertacije 84
7.3. Ostali zaključci disertacije 85

8. SAŽETAK 86

9. SUMMARY 87

10. POPIS ODABRANE LITERATURE 89

11. ŽIVOTOPIS 101

POPIS OZNAKA I KRATICA

2.AB	- sekundarno protutijelo u postupku ELISA
3'SS	- oznaka za mjesto izrezivanja 3' (engl. 3' *splice site*)
5'SS	- oznaka za mjesto izrezivanja 5' (engl. 5' *splice site*)
AB	- protutijelo na aDMA u postupku ELISA
ab10685	- protutijelo na protein hnRNP-A1
ab414	- protutijelo na metilacijom modificiran arginin MMA
ab54733	- protutijelo na S-adenozilhomocistein hidrolazu
ab56836	- protutijelo na Sam68
ABAM	- antimikrobna otopina (engl. *Antibiotic/Antymicotic solution*)
ACTB	- beta aktin
ACTN4	- alfa aktinin 4
AD	- Alzheimerova bolest
aDMA	- asimetrično dimetiliran arginin
aDMA-194	- asimetrično dimetiliran Arg-194
aDMA-206	- asimetrično dimetiliran Arg-206
aDMA-225	- asimetrično dimetiliran Arg-225
Ado	- adenozin
AdoHcy	- S-adenozilhomocistein
AdoMet sintaza	- S-adenozilmetionin sintaza
AdoMet	- S-adenozilmetionin
AdoMet-MT	- metiltransferaze ovisne o AdoMet
AdoX	- kemijski inhibitor SAHH
AG	- slijed nukleotida koji predstavlja mjesto izrezivanja 3' (engl. 3' *splice site*)
AHCY	- gen za enzim SAHH
AiA	- oznaka za alternativnu izoformu A proteina hnRNP-A1
APP	- (engl. *amyloid precusor protein*)
Arg-225	- arginin na 225. mjestu sljeda aminokiselina proteina hnRNP-A1
Aß	- peptid koji se nakuplja u mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti (engl. *beta-amyloid peptide*)
ASYM24	- protutijelo na metilacijom modificiran arginin aDMA
ATP	- adenozin trifosfat
AU	- arbitrarne jedinice (engl. *Arbitrary Units*)

B_{12}	- vitamin B_{12}
B_6	- vitamin B_6
BHMT	- betain homocistein metiltransferaza
BPS	- mjesto izrezivanja (engl. *branch site*)
$C_6H_8O_7xH_2O$	- limunska kiselina
CARM1	- sinonim za PRMT4 (engl. *coactivator-associated arginine methyltransferase 1)*
CAT	- transmembranski prijenosnik kationskih aminokiselina
CBS	- cistationin beta-sintaze
CCPS	- progerija (engl. *cardiocutaneous progeria syndrome*)
CE1	- konzervirani element 1 (engl. *conserved element* 1)
CH_3	- metilna skupina
Cis-acting čimbenik	- epigenetski čimbenik mRNA koji utječu na njeno izrezivanje
CK	- kreatin kinaza
clone 10E10	- protutijelo na PABP-1
CMD1A	- dilatacijska kardiomiopatija (engl. *dilated cardiomyopathy, conduction-system disease*)
CMT2B1	- autosomno recesivni oblik bolesti Charcot-Marie-Tooth
CoQ	- koenzim Q
CpG	- dio DNA bogat citozinom i guaninom
C-terminalni dio	- kranji dio sljeda aminokiselina u strukturi proteina
CTRL	- kontrolni uzorci u postupku ELISA
Cys_{143}	- aminokiselina cistein na kodonu 143 polipeptidnog lanca
D1-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa D1
D2-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa D2
D3-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa D3
Da	- Dalton
DDAH	- dimetilarginin-dimetilamino hidrolaza
DDAH2	- dimetilarginin-dimetilamino hidrolaza tipa 2
deM	- demetilaza
DER	- reagens za aciliranje u postupku ELISA
DHX9	- RNA helikaza A ovisna o ATP
DMEM	- medija za rast fibroblasta (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium)*
DMSO	- dimetilsulfoksid
DNA	- deoksiribonukleinska kiselina
DNMT1	- DNA metiltransferaza tipa 1

DNMT3a/3b	- DNA metiltransferaza tipa 3a i 3b
Domena M9	- sinonim za domenu NS
Domena NS	- redosljed aminokiselina hnRNP-A1 za nukleo-citoplazmatsko prebacivanje i substaničnu lokalizaciju
DPBS-CMF	- Dulbekov fosfatni pufer bez iona Ca^{+2} i Mg^{+2} (engl. *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline Calcium and Magnesium Free*)
e10	- egzon 10 gena LMNA
e10a	- alternativni egzon 10 gena LMNA
E1-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa E1
ECL	- substrat za kemiluminiscenciju u postupku WB
EDMD2/3	- mišićna distrofija Emery-Dreifuss tipa 2 i 3 (engl. Emery-Dreifuss *muscular dystrophy)*
EDTA	- etilendiaminotetraoctena kiselina
Egzon E7b izoformom UP-1	- alternativni egzon proteina hnRNP-A1 koji rezultira kraćom
eIF4B	- (engl. eukaryotic translation initiation factor 4B), protein koji sudjeluje u vezanju mRNA za ribosome
ELISA	- enzimskoimunokemijski esej (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
ERG	- transkripcijski činitelj koji interagira s SETDB1-histon metiltransferazom
ESE	- pozitivan *cis-acting* čimbenik u egzonu (engl. *exonic splicing enhancer*)
ESS	- redosljed baza mRNA koji predstavlja utišavač izrezivanja (engl. *exonic splicing silencer*)
ESS	- negativni *cis-acting* čimbenik u egzonu (engl. *exonic splicing silencer*)
Exon exclusion (engl.)	- isključivanje egzona prilikom alternativnog izrezivanja pre-mRNA
F1-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa F1
FBS	- goveđi serum (engl. *Fetal Bovin Serum*)
FPLD	- autosomno dominantni oblik familijarne parcijalne lipodistrofije (engl. *Familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety*)
G1-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa G1
GAMT	- guanidinoacetat metiltransferaza
GAPDH	- gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, enzim glikolize
GNMT	- glicin N-metiltransferaza
GSH	- glutation u reduciranom obliku

GU	- slijed nukleotida koji predstavlja mjesto izrezivanja 5' (engl. 5' *splice site*)
H3	- podjedinica histona H3
H4	- podjedinica histona H4
HCl	- klorovodična kiselina
HCOOH	- mravlja kiselina
Hcy	- homocistein
HGPS	- progerija (engl. *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*)
HHcy	- hiperhomocisteinemija
hnRNA-hnRNP-snRNP	- višeproteinski kompleks nezrele mRNA
hnRNP	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA
hnRNP-A1	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa A1
hnRNP-A1+hnRNP-A1	- proteinski funkcionalni homokompleksi
hnRNP-A1+hnRNP-A3	- proteinski funkcionalni heterokompleksi
hnRNPA1-A	- alternativna izorofma proteina hnRNP-A1 (sinonim je UP-1)
hnRNPA1-B	- konstitucionalna forma proteina hnRNP-A1
hnRNP-A2	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa A2
hnRNP-A2B1	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa A2B1
hnRNP-A3	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa A3
hnRNP-AB	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa AB
hnRNP-D	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa D
hnRNP-H	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa H
hnRNP-H3	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa H3
hnRNP-K	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa K
hnRNP-L	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa L
hnRNP-Q1	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa Q1
hnRNP-Q2	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa Q2
hnRNP-Q3	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa Q3
hnRNP-R	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa R
hnRNP-U	- heterogeni nuklearni ribonukleo-protein koji veže RNA tipa U
HPLC	- tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
hPrp	- oznaka za RNA ATPaze/helikaze
HRP	- enzim za vizualizaciju signala u postupku WB (engl. *Horseradishe Peroxidase*)
HSPA1B	- engl. *heat shock protein A1*
HSPA8	- engl. *heat shock protein A8*
IP	- imunoprecipitacija

ISE	- pozitivan *cis-acting* čimbenik u intronu (engl. *intronic splicing enhancer*)
ISS	- negativni *cis-acting* čimbenik u intronu (engl. *intronic splicing silencer*)
K	- kontrola
K_2CO_3	- kalijev karbonat
KH_2PO_4	- kalijev dihidrogenfosfat
KHDRBS1	- engl. *KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1*, službeni naziv proteina Sam68
KoB	- oznaka za konstitutivni oblik B proteina hnRNP-A1
LDHPC	- lipoatrofija s dijabetesom, steatozom jetre i kardiomiopatijom (engl. *Lipoatrophy with diabetes, hepatic steatosis, hypertrophic cardiomyopathy and leukomelanodermic papules*)
LDS	- litijev dodecilsulfat
LGMD1B	- mišićna distrofija Limb-Girdle 1B (engl. *Limb-Girdle muscular dystrophy*)
LSm1-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm1
LSm2-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm2
LSm3-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm3
LSm4-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm4
LSm5-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm5
LSm6-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm6
LSm7-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm7
LSm8-snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa LSm8
MAD	- mandibuloakralna displazija (engl. *Mandibuloacral dysplasia)*
MAG	- engl. *Myelin-associated* glycoprotein
MAT I/III	- izoenzim metionin adenoziltransferaze
MAT II	- izoenzim metionin adenoziltransferaze
MAT	- metionin adenoziltransferaza, sinonim za AdoMet sintetazu
MBP	- osnovni protein mijelina
MCBP2	- protein koji veže metil-CpG tipa 2
Met	- metionin
MFMT	- metiltetradihrofolat metiltransferaza (sinonim za MS)
miRNA	- mikro RNA (engl. *micro*RNA)
MMA	- monometilarginin
MOPS	- 3-N-morpholinopropan-sulfonska kiselina
mRNA	- glasnička ribonukleinska kiselina

mRNA-hnRNP-A1	- mRNA koja određuje sintezu proteina hnRNP-A1
MS	- metionin sintaza
MT	- metiltransferaze ovisne o AdoMet, S-adenozilmetioninu
MTHF	- 5-metiltetrahidrofolat
MTR	- 5-MTHF-homocistein metiltransferaza
MyoD1	- protein determinacije mioblasta
NA931-1ML	- sekundarno mišje protutijelo IgG HRP (engl. *Horseradishe Peroxidase)* protutijelo
NaCl	- natrijev klorid
NAD	- nikotinamid adenin dinukleotid
NAD^+	- oksidirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NADH	- reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NCBP1	- engl. *nuclear cap-binding protein 1*
NCL	- eukariotski nuklearni fosfoprotein važan za sazrijevanje ribosoma (engl. *nucleolin*)
NMD	- degradacija mRNA zbog pogrešaka u transkripciji ili izrezivanju (engl. *nonsense mediated dekay*)
NMDA	- receptor N-metil-D-aspartat
NO	- dušični oksid
NOS	- NO sintaze, sintaza dušičnog oksida
NS (sinonim M9)	- domena mRNA za nukleo-citoplazmatsko prebacivanje i substaničnu lokalizaciju
N-terminalni dio	- početni dio redoslijeda aminokiselina u strukturi proteina
NuPAGE Antioksidant	- antioksidans za elektroforezu
NuPAGE Gel	- poliakrilamidni gel za elektroforezu
NuPAGE Reducing Agent	- reducirajuća tvar za elektroforezu
P	- pacijent
p68	- sinonim za Sam68, protein koji veže RNA
PABC	- engl. *poly-A binding C-terminal domain*, domena PABP-1 koja veže poli-A mRNA
PABP-1	- protein koji veže poli A tipa 1
PABP-2	- protein koji veže poli A tipa 2
PABP-C1	- engl. *poly-A binding protein C1*
PABP-C4	- engl. *poly-A binding protein C4*
PABP-N1	- engl. *poly-A binding protein N1*
PABP-N1	- protein koji veže poli-A tipa N1
PADeM ili R-deM	- protein arginin demetilaza

PAIP1	- (engl. poly(A) binding protein interacting protein 1), protein koji aktivira translaciju proteina
PAIP2	- (engl. poly(A) binding protein interacting protein 2), protein koji inhibira translaciju proteina
P-deM	- protein demetilaza
PEMT	- fosfatidiletanolamin N-metiltransferaza
PK1	- piruvat kinaza tipa 1
PK2	- piruvat kinaza tipa 2
P-MT	- protein metiltransferaza
P-N-deM	- protein N-demetilaza
P-P interakcije	- interakcije između proteina (proteinsko-proteinske interakcije)
PRMT	- protein-arginin metiltransferaza
PRMT1	- protein arginin metiltransferaza tipa 1
PRMT2	- protein arginin metiltransferaza tipa 2
PRMT3	- protein arginin metiltransferaza tipa 3
PRMT4/CARM1	- protein arginin metiltransferaza tipa 4
PRMT5	- protein arginin metiltransferaza tipa 5
Proteini SR	- proteini koji vežu mRNA bogati serinom i argininom
PTM	- posttranslacijska modifikacija
PTMe	- posttranslacijska metilacija
Pufer BM *Wash buffer*	- pufer za ispiranje u postupku ELISA
Pufer C1	- pufer za aktivaciju magnetnih kuglica u postupku imunoprecipitacije
Pufer C2-	- pufer za kovalentno vezanje protutijela na magnetne kuglice u postupku IP
Pufer CODIL	- pufer za razrijeđivanje u postupku ELISA
Pufer DERBUF	- pufer za pokretanje reakcije u postupku ELISA
Pufer HB	- pufer s visokom koncentracijom soli u postupku imunoprecipitacije
Pufer LB	- pufer s malom koncentracijom soli u postupku imunoprecipitacije
Pufer MOPS SDS	- pufer natrijevog dodecil sulfata za elektroforezu
Pufer RIPA	- pufer RIPA (engl. *Radio Immuno Precipitation Assay*)
Pufer SB	- pufer za pohranu u postupku imunoprecipitacije
Py	- područje bogato pirimidinom
RD	- restriktivna dermopatija (engl. *Restrictive Dermopathy*)
RGG	- redoslijed aminokiselina Arg-Gly-Gly za uspostavu veze hnRNP-A1 s mRNA
RGG	- domena mRNA za vezanje proteina (Arg-Gly-Gly sekvenca)

RNA	- ribonukleinska kiselina
RNA-MT	- metiltransferaze ribonukleinske kiselina
RPLP0	- oznaka za podjedinicu ribosoma
RPS3, RPS3A	- oznake za odgovarajuće podjedinice ribosoma
RPS4X, RPS8, RPS9	- oznake za odgovarajuće podjedinice ribosoma
RRM	- domena proteina važna za prepoznavanje mRNA (engl. RNA *recognition motif*)
RRM1	- domena proteina važna za prepoznavanje mRNA tipa 1 (engl. RNA *recognition motif*)
RRM2	- domena proteina važna za prepoznavanje mRNA tipa 2 (engl. RNA *recognition motif*)
SAH	- sinonim za AdoHcy, S-adenozilhomocistein
SAHH	- S-adenozilhomocistein hidrolaza
$SAHH^{-/-}$ miš	- eksperimentalni model miša s delecijom gena za SAHH
SAM	- sinonim za S-adenozilmetionin
Sam68	- protein koji veže RNA
SAMe	- sinonim za S-adenozilmetionin
SAMPLE	- uzorci serum u postupku ELISA
sDMA	- simetrično dimetiliran arginin
SDS PAGE	- elektroforeza u gelu poliakrilamida s natrijevim dodecilsulfatom
SDS	- natrijev dodecilsulfat
SEPT6	- protein porodice septin GTPaza važan u citokinezi
SF	- čimbenik izrezivanja (engl. *splicing factor*)
SF2/ASF	- čimbenik izrezivanja mRNA koji pripada porodici proteina SR
SF3B1	- čimbenik izrezivanja SF3B1
SF3B2	- čimbenik izrezivanja SF3B2
SF3B3	- čimbenik izrezivanja SF3B3
siRNA-SAHH	- RNA koja blokira prijepis transkripta, molekularni inhibitor SAHH
Sm B/B'	- mali nuklearni ribonukleoprotein tipa Sm B/B'
Sm	- proteina važan u procesu sazrijevanja glasničke RNA
SMN	- proteina koji je poremećene funkcije kod spinalne mišićne atrofije
snRNA	- engl. *small nuclear RNA*
snRNP	- mali nuklearni ribonukleoprotein (engl. *small nuclear ribonucleoprotein*)
Snu114	- oznaka za RNA GTPaza
SRm300	- protein SR
SRp40	- protein SR

ssDNA	- jednolančana DNA (engl. *single stranded DNA*)
STAT1	- transkripcijski čimbenik
STD	- standardi u postupku ELISA
STOP	- otopina za zaustavljanje reakcije u postupku ELISA
SUB	- TMB (tetrametilbenzidin) substrat u postupku ELISA
SYM10	- antimodifikacijsko protutijelo sDMA
SYNCRIP	- sinonim za hnRNP-Q
TČ	- transkripcijski činitelj
TFEB	- transkripcijski činitelj
THF	- tetrahidrofolat
Trans-acting čimbenik	- epigenetski čimbenik regulacije izrezivanja mRNA (s one strane mRNA)
Tris-HCl	- trihidroksimetilaminometan-klorovodična kiselina
U1-snRNA	- mala nuklearna RNA tipa U1
U2AF1	- (engl. U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1) protein koji sudjeluje u izrezivanju mRNA
U2AF35	- čimbenik izrezivanja
U2AF65	- čimbenik izrezivanja
U2-snRNA	- mala nuklearna RNA tipa U2
U4-snRNA	- mala nuklearna RNA tipa U4
U5-snRNA	- mala nuklearna RNA tipa U5
U6-snRNA	- mala nuklearna RNA tipa U6
UTRs mRNA	- redosljed baza glasničke RNA koji se ne prepisuje (engl. *untranslated regions*)
vs.	- *versus*, lat. u suprotnosti s; u odnosu na; u usporedbi s
WB	- imunološka detekcija imobiliziranog proteina (engl. *Western blotting*)
WRN	- Wernerov sindrom (engl. *Werner's syndrome*)
$^{Y143C}SAHH_{W112X}$	- SAHH kojem je 143. aminokiselina očevog lokusa tirozin zamjenjena cisteinom, dok majčin alel rezultira stop kodonom na 112. aminokiselini

UVOD

1. UVOD - PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA I SPOZNAJA U OKVIRU TEME DISERTACIJE

Manjak enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) je rijetka nasljedna bolest, prvi put opisana 2004. godine od naše skupine istraživača (Barić 2004). Bolest se nasljeđuje autosomno recesivno. U bolesnika s ovom bolešću aktivnost enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze je značajno snižena. Klinički se bolest, u dosad poznatih devetero bolesnika, očitovala prirođenom slabošću mišića i zaostajanjem u psihomotornom razvoju te, u različitom stupnju- i ne u svih bolesnika, usporenim sazrijevanjem bijele moždane tvari, poremećajem zgrušavanja krvi, znakovima bolesti jetre i/ili slabošću mišića za disanje, fetalnim hidropsom i kongenitalnim anomalijama mozga. Dvoje djece je umrlo. U jedne bolesnice koja je, vjerojatno, bolovala od ove bolesti, znakovi bolesti bili su slični (Gaull 1981, Barić 2005, Buist 2006, Ćuk 2007, Grubbs 2010, Barić 2012, Honzík 2012). Iskustvo na ovako malom broju bolesnika ne dozvoljava da se sa sigurnošću zaključuje o kliničkoj slici i tijeku bolesti. Vrlo je vjerojatno da će biti bolesnika koji neće imati sve gore opisane znakove bolesti ili će imati neke druge. Svi bolesnici u kojih je dosad potvrđen manjak SAHH imali su kliničke znakove bolesti mišića i povišenu aktivnost enzima kreatin kinaze (CK) u krvi. Potonje činjenice ukazuju da se nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze očituje kao kongenitalna miopatija. Svi bolesnici u kojih je dosad potvrđen manjak SAHH imali su povišenu koncentraciju spojeva S-adenozilmetionina (AdoMet) i S-adenozilhomocisteina (AdoHcy), uz gotovo normalne koncentracije ukupnog homocisteina u krvi. Uz to, u nekih je bolesnika bila povišena i koncentracija metionina (Met). Bolest se dokazuje mjerenjem aktivnosti enzima SAHH i analizom gena *AHCY* koji ga kodira. Sigurnih dokaza o učinkovitosti liječenja nema, ali se korisnom pokazala dijeta s ograničenim unosom metionina, uz još neke lijekove (fosfatidilkolin, kreatin, N-acetilcistein), posebno ako se s liječenjem započne rano.

1.1. Što znamo o enzimu zbog kojeg nastaje bolest koju istražujemo

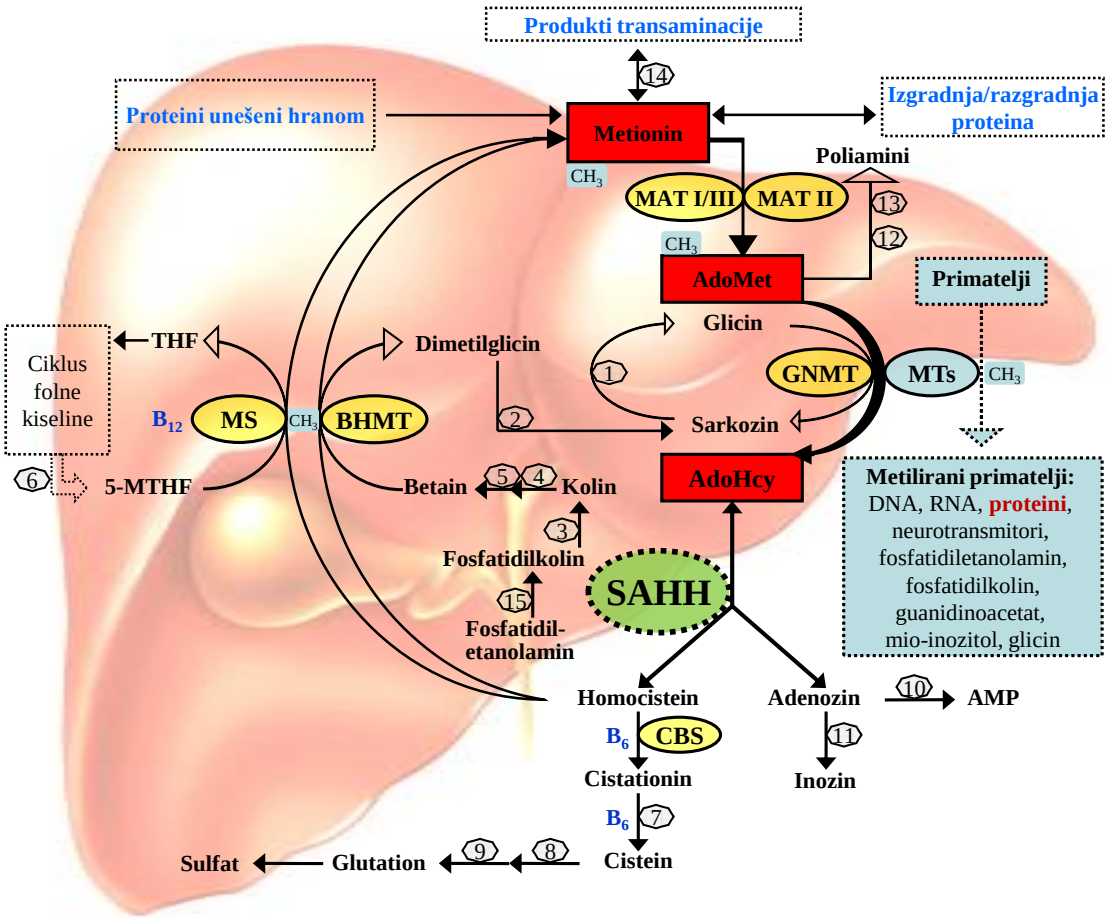
S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH, E.C. 3.3.1.1) je jedan od enzima ciklusa metionina, transmetilacije i transsulfuracije. Obavlja jedinstvenu ulogu hidrolize, odnosno razgradnje, spoja S-adenozilhomocisteina (AdoHcy) na adenozin (Ado) i homocistein (Hcy). Na taj način regulira omjer koncentracije dva spoja, S-adenozilmetionina (AdoMet) i AdoHcy. Ovaj omjer nazivamo metilacijski potencijal ili metilacijski indeks stanice. Metilacijski indeks određuje tijek brojnih transmetilacijskih

reakcija važnih u staničnim procesima. U obrnutom smjeru, SAHH sintetizira AdoHcy iz Ado i Hcy. U fiziološkim uvjetima, reakcija se odvija isključivo u smjeru hidrolize (slika 1).

SAHH je izražen u svim stanicama, mahom u citoplazmi (Prigge 2001). Kodiran je visoko konzerviranim genom *AHCY,* smještenim u području cen-q13.1., na kromosomu 20. Poznato je nekoliko polimorfizama ovog gena. Transkript odgovara jednoj podjedinici enzima, monomeru. Prema kvarternoj strukturi, funkcionalni enzim SAHH je homotetramer. Svaku od četiri podjedinice molekularne mase 47.7 kDa čine 432 aminokiseline. Svaka podjedinica veže po jednu molekulu NAD, spoja važnog za enzimsku aktivnost. Svaka podjedinica ima tri domene: 1) domena NAD (središnji dio, aminokiseline: 193-346) - važna za vezanje istoimenog kofaktora; 2) katalitička domena i vezno mjesto za AdoHcy (N-terminalni dio: 1-190 i C-terminalni dio: 355-402); 3) oligomerizacijska domena (C-terminalni dio: 403-431). U trodimenzionalnoj strukturi ovog homotetramernog enzima međusobno su povezane samo NAD- i oligomerizacijska domena. Na taj način je katalitička domena enzima slobodna za vezanje supstrata, AdoHcy, i neometanu katalizu.

Biološku nezamjenjivost enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze potvrđuju istraživanja na miševima s delecijom gena *AHCY,* koji ugibaju u devetom danu fetalnog razvoja (Miller 1994) i biljkama s mutacijom gena *AHCY* koje se aberantno razvijaju (gušarka, lat. *Arabidopsis*) (Rocha 2005). Nedostatak aktivnosti SAHH može uzrokovati poremetnju metilacije u eksperimentalnim uvjetima (Ohmori 1996, Mull 2006).

Zaključno, SAHH je jedini enzim koji metabolizira i regulira količinu AdoHcy, snažnog inhibitora svih, o AdoMet ovisnih transmetilacijskih reakcija. Zbog toga ima jedinstvenu ulogu regulatora transmetilacije u svim stanicama. Fiziološki, reakcija teče u smjeru razgradnje AdoHcy, iako bi zbog povoljnijih termodinamičkih uvjeta mogla teći i obrnuto, u smjeru njegove sinteze. Spojevi nastali razgradnjom AdoHcy se metaboliziraju - adenozin adenozin kinazom i deaminazom, a homocistein enzimima ciklusa transsulfuracije ili remetilacije. Budući da je SAHH enzim koji „radi“ u dva smjera i da je, termodinamski povoljniji sintetski put prema AdoHcy, sva stanja koja dovode do hiperhomocisteinemije mogu uzrokovati povećanje koncentracije AdoHcy i poremećaje metilacije.

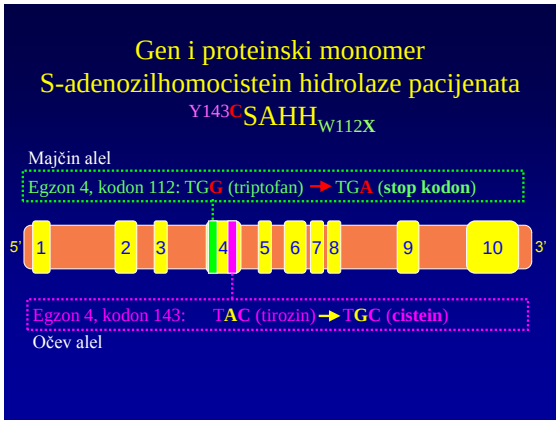


Slika 1. Metabolizam metionina, S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina. AdoMet, S-adenozilmetionin; AdoHcy, S-adenozilhomocistein; CH_3, metilna skupina; THF, tetrahidrofolat; 5-MTHF, 5-metiltetrahidrofolat; AMP, adenozin monofosfat; MAT, metionin adenoziltransferaza; GNMT, glicin N-metiltransferaza; MTs, metiltransferaze ovisne o AdoMet; SAHH, AdoHcy hidrolaza; CBS, cistationin β-sintetaza; MS, metionin sintaza (sinonim MTR ili 5-MTHF-homocistein metiltransferaza); BHMT, betain-homocistein metiltransferaza. Brojevi označavaju slijedeće: 1) sarkozin dehidrogenaza; 2) N,N-dimetilglicin dehidrogenaza; 3) fosfolipaza D; 4) kolin dehidrogenaza; 5) betain aldehid dehidrogenaza; 6) metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR); 7) γ-cistationaza; 8) glutamat-cistein ligaza; 9) glutation sintaza; 10) adenozin kinaza; 11) adenozin deaminaza; 12) AdoMet dekarboksilaza; 13) spermidin (spermin) sintaza; 14) put transaminacije metionina; 15) fosfatidiletanolamin metiltransferaza (PEMT).

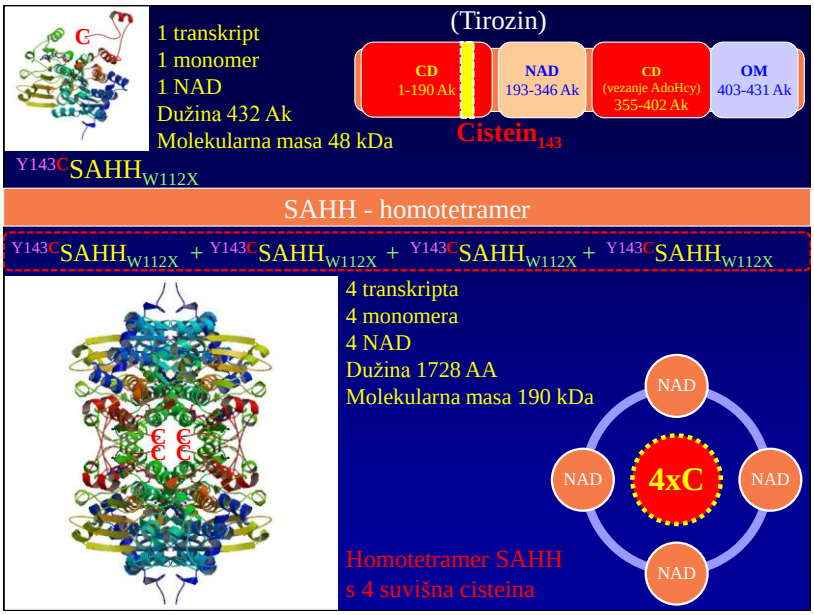
1.1.1. Naša dosadašnja istraživanja

Naši su pacijenti od majke naslijedili mutaciju koja rezultira preuranjenim stop kodonom na mjestu 112 peptidnog lanca ($SAHH_{W112X}$). Zbog toga nema funkcionalnog proteinskog produkta ovog alela (slika 2). Od oca su naslijedili točkastu mutaciju gena tipa zamjene zbog koje se na kodonu 143 peptidnog lanca umjesto tirozina ugrađuje cistein (^{Y143C}SAHH). Ovo dovodi do nedostatne aktivnosti enzima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (Barić 2004). Ovo ne iznenađuje, budući da je kodon 143 dio N-terminalnog dijela katalitičke domene i veznog mjesta za AdoHcy (slika 3). Naša su istraživanja pokazala da je $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ termosenzitivan i da slabije veže kofaktor NAD (Belužić 2006). Cistein je reaktivna aminokiselina, sklona stvaranju međumolekularnih veza koje mogu ometati vezanje supstrata i katalizu. Mogući mehanizam inaktivacije $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ objašnjavamo nekovalentnim vezanjem reduciranog NAD (NADH) za „suvišne“ cisteine (što rezultira nemogućnošću vezanja oksidiranog

kofaktora - NAD) ili stvaranjem patoloških disulfidnih veza (neobjavljena zapažanja, slika 3). Na sličan način djeluju neki inhibitori SAHH. Hidrolizu posredovanu S-adenozilhomocistein hidrolazom biološki inhibitori sprečavaju na dva načina: 1) reduciranjem NAD u NADH koji ostaje nekovalentno vezan za SAHH čime je spriječeno vezanje NAD i kataliza; 2) blokiranjem aktivnosti enzima aktivirajući se tijekom samog procesa hidrolize (Chiang 1998).



Slika 2. Točkaste mutacije gena *AHCY* u naših pacijenata. Točkasta mutacija u egzonu 4 nasljeđena po majci dovela je do zamjene aminokiseline triptofana za preuranjeni stop kodon na 112. kodonu i sinteze krnjeg proteina (W112X). Točkasta mutacija u egzonu 4 nasljeđena po ocu dovela je do ugradnje aminokiseline cisteina u 143. kodonu, umjesto aminokiseline tirozina (Y143C).



Slika 3. Protein S-adenozilhomocistein hidrolaza (monomer i homotetramer). Gornji dio slike: C, cistein; CD, katalitička domena i vezno mjesto za S-adenozilhomocistein (AdoHcy); NAD, domena NAD i vezno mjesto za kofaktor NAD; OM, oligomerizacijska domena odgovorna za spajanje monomernih podjedinica u funkcionalni proteinski homotetramer; Ak, aminokiseline; kDa, kilodalton. Jedan transkript odgovara jednom monomeru, koji veže po jednu molekulu NAD. Naši pacijenti u katalitičkoj domeni umjesto tirozina posjeduju cistein. Donji dio slike: Četiri monomera su potrebna za funkcionalnu cjelinu homotetramera enzima SAHH. Mutirani enzim $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u katalitičkom središtu, umjesto četiri tirozina, posjeduje četiri cisteina. Četverostruki višak aminokiseline cisteina najvjerojatniji je uzrok disfunkcije enzima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (neobjavljena zapažanja).

1.2. Molekule povezane sa S-adenozilhomocistein hidrolazom

Aminokiselina metionin (Met) i njezini spojevi obogaćeni ATP-om, S-adenozilmetionin (AdoMet) i S-adenozilhomocistein (AdoHcy) te aminotiol homocistein (Hcy), dio su tri važna procesa u stanici: 1) metilacije, 2) remetilacije i 3) transsulfuracije. Procesima metilacije i remetilacije „daje“ se i obnavlja ugljik u metilnim skupinama (CH_3), a procesom transsulfuracije se odstranjuje višak sumpora i stvaraju se važni spojevi poput glutationa i taurina. U potonjim procesima sudjeluju mnogi enzimi i kofaktori (vitamin B_6 , vitamin B12, folna kiselina) (slika 1).

1.2.1. Metionin

Metionin je esencijalna aminokiselina koja sadrži sumpor, uključena u mnoge stanične procese (slika 1). Ima dvije važne uloge: 1) izgrađuje proteine; 2) izvor je metilnih skupina za transmetilacijske procese u obliku ATP-om aktiviranog metionina, odnosno u obliku AdoMet. Metionin je dio dva stanična ciklusa: 1) ciklusa metionina i 2) ciklusa transsulfuracije. Prvi je konzervirajući, a drugi katabolički put za metionin. Prvi korak oba ciklusa katalizira metionin adenoziltransferaza (MAT) pri čemu nastaje AdoMet (Mudd 1958, Cantoni 1975).

Ciklus metionina je ubikvitaran. Iako sve vrste stanica stvaraju AdoMet koji koriste za sintezu poliamina ili proces transmetilacije, jetra je najvažniji organ za metabolizam metionina. U njoj su aktivnost MAT i koncentracija AdoMet najveće (Finkelstein 1990).

1.2.2. S-adenozilmetionin

S-adenozilmetionin (AdoMet, SAM, SAMe) je spoj koji se u stanicama koristi više od bilo kojeg drugog spoja, osim ATP koji je nužan za njegovu sintezu (Cantoni 1975, Cantoni 1980).

AdoMet je univerzalni davatelj metilnih skupina za više od stotinjak trenutno poznatih transmetilacijskih reakcija u stanicama, uključujući metiliranje otoka CpG, stvaranje kape i poli-A repa RNA, posttranslacijske modifikacije proteina, sintezu adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, melatonina, fosfatidilkolina, kreatina, CoQ, vitamina K, karnitina i drugih (slika 1) (Chiang 1996).

Nastaje u svim stanicama, iz metionina koji se nije ugradio u proteine i ATP, u reakciji posredovanoj AdoMet sintazom koju još nazivamo metionin adenoziltransferaza (MAT). Smatra se da AdoMet ima važnu ulogu u regulaciji metilacijskog ciklusa.

Poremećaji metabolizma AdoMet imaju teške posljedice za život, diferencijaciju i funkciju stanica, prvenstveno jetre i središnjeg živčanog sustava (Surtees 1991, Surtees 1998, Mudd 2001, Barić 2004, Barić 2005, Buist 2006, Ćuk 2007, Vugrek 2009, Barić 2009, Grubbs 2010, Barić 2012,

Honzík 2012). AdoMet se koristi kao terapijski pripravak u određenim neuropsihijatrijskim bolestima i bolestima jetre, a dodatno se istražuje njegova primjena i u drugim bolesnim stanjima (Frezza 1990).

1.2.3. S-adenozilhomocistein

S-adenozilhomocistein (AdoHcy, SAH) je slobodni radikal nastao transmetilacijskim procesima posredovanim raznim metiltransferazama (MT), nakon prijenosa metilne skupine od AdoMet na brojne molekule - primatelje (slika 1). AdoHcy je demetilirani AdoMet: razlikuju se samo po jednoj metilnoj skupini (CH_3), što je dovoljno za potpuno suprotne biološke učinke ova dva spoja. AdoHcy je snažan inhibitor svih reakcija u kojima nastaje. Odmah po nastanku, AdoHcy se hidrolizira i razgrađuje djelovanjem enzima SAHH na homocistein (Hcy) i adenozin (Ado). Da bi, inače dvosmjerna, reakcija enzima SAHH tekla u željenom smjeru (hidroliza AdoHcy), produkti se moraju otplavljivati: Hcy remetilacijom ili transsulfuracijom, a Ado deaminacijom ili fosforilacijom. Ako se ne razgradi i nerazgrađen izađe iz stanice, AdoHcy nije vezan za proteine i slobodno cirkulira plazmom, za razliku od homocisteina. AdoHcy iz ekstracelularne tekućine uklanjaju jedino bubrezi što znači da ostali organi, u normalnim uvjetima, ne preuzimaju i ne metaboliziraju taj spoj, za razliku od homocisteina kojeg, iz plazme, preuzima i metabolizira jetra (Finkelstein 1998).

Toksičnost AdoHcy se povezuje s brojnim stanjima. Među njima je hiperhomocisteinemija (HHcy), neovisno o uzroku (Selhub 1994, Loehrer 1998). Sve je više dokaza da je AdoHcy najvažniji, iako ne i jedini kemopatogen u većini stanja povezanih s HHcy (Yi 2000). Povišena koncentracija AdoHcy smatra se važnim čimbenikom patogeneze bolesti koja nastaje zbog nedostatne aktivnosti SAHH (Barić 2004, Barić 2005, Buist 2006, Ćuk 2007, Vugrek 2009, Grubbs 2010, Barić 2009, Barić 2012, Honzík 2012).

1.2.4. Metiltransferaze ovisne o AdoMet

Metiltransferaze ovisne o AdoMet (MT) su velika skupina enzima koji prenose metilnu skupinu od AdoMet na primatelje različitih funkcija uključujući: 1) male molekule - neke aminokiseline, guanidinoacetat, neurotransmitore, fosfatidiletanolamin, međuprodukte sinteze CoQ, vitamina K i E; 2) velike molekule - DNA, RNA i različite proteine: histone jezgre, topive proteine citoplazme, strukturne proteine membrane stanice i druge (slika 1). Svaka metiltransferaza, za izvor metilne skupine koju će prenijeti na molekulu primatelja, koristi AdoMet, nakon čega, kao univerzalni produkt reakcije, nastaje AdoHcy. Ovisno o tipu metiltransferaze, nastaju i specifični metilirani produkti.

AdoHcy koji u ovim reakcijama nastaje, snažan je inhibitor tih istih reakcija, zbog čega se trenutno razgrađuje pomoću enzima SAHH (slika 4).

MT ovisne o AdoMet su, s jedne strane, dio transmetilacijskih procesa, dok su, s druge strane, dio ciklusa metionina i transsulfuracije. Stoga ih smatramo bifunkcionalnim enzimima. Poznato je više desetaka MT ovisnih o AdoMet. Razne MT su na različite načine osjetljive na inhibiciju s AdoHcy. Među najosjetljivijima je protein-arginin metiltransferaza tipa 1 (PRMT1). Najotpornija MT na AdoHcy je glicin N-metiltransferaza (GNMT). Što je viša koncentracija AdoHcy, niži je metilacijski indeks stanice što dovodi do jače inhibicije transmetilacijskih reakcija posredovanih metiltransferazama ovisnim o AdoMet (Clarke 2001).

AdoMet-(CH_3)		**AdoHcy → SAHH**
Otoci CpG unutar promotora DNA	DNMT1, DNMT3a/3b	(CH_3)-CpG (utišavanje promotora gena)
RNA	RNA-MT	Alternativno izrezivanje i obrada mRNA
Mnogi proteini (PTMe)	Protein$_{Arg/Lis/His}$N-MT$_{1,2,3,4,5}$	(CH_3)-Arg/Lis/His (miozin, aktin, alfa-tropomiozin, lamin i drugi proteini mišića)
Regulatorne podjedinice histona	Histon$_{Lis}$N-MT	(CH_3)$_{1,2,3}$-H3K4, -H3K9, -H3K27
Citokrom c	Cyt c$_{Lis/Arg}$N-MT	(CH_3)-Citokrom c
Kalmodulin	Kalmodulin$_{Lis}$N-MT	(CH_3)-Kalmodulin
Bazični protein mijelina	MBP$_{Arg}$N-MT	(CH_3)-MBP
Proteini koji vežu mRNA (hnRNP-A1)	**PRMT1**	**(CH_3)$_2$-Arg-hnRNP-A1 (regulacija konstitutivnog i alternativnog izrezivanja)**
Guanidinoacetat	GAMT	(CH_3)-Kreatin
Fosfatidiletanolamin	PEMT	(CH_3)$_3$-Kolin
Glicin	GNMT	(CH_3)-Sarkozin, (CH_3)$_2$-Glicin
Od tirozina nastali prekursori CoQ	CoQ3, CoQ5	(CH_3)$_2$-Koenzim Q10
Od triptofana nastali neurotransmitori - serotonin	HOMT	(CH_3)-Melatonin
Od tirozina nastali neurotransmitori - noradrenalin	FNMT	(CH_3)-Adrenalin
	COMT	Razgradnja dopamina, adrenalina i noradrenalina

Slika 4. Prikaz nekih transmetilacijskih reakcija koje dokazano jesu, ili bi mogle biti, poremećene u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH i niskog metilacijskog indeksa stanice. Lijevo su prikazani "primatelji" kojima AdoMet "daruje" metilnu skupinu (CH_3), u sredini enzimi koji metilne skupine prenose uz utrošak ATP, a desno produkti koji pojedinim transmetilacijskim reakcijama nastaju. Otoci CpG, dijelovi promotora gena; Arg, arginin; Lis, lizin; His, histidin; CoQ, koenzim Q; PTMe, posttranslacijska metilacija; H3K4, H3K9, H3K27, oznake za položaj aminokiseline lizin u histonu H3; N-MT, N-metiltransferaza; DNMT1, DNMT3a/3b, DNA metiltransferaza tipa 1, 3a i 3b; RNA-MT, RNA metiltransferaza; MBP-MT, metiltransferaza osnovnog proteina mijelina; GAMT, guanidinoacetat metiltransferaza; PEMT, fosfatidiletanolamin metiltransferaza; GNMT, glicin N-metiltransferaza, CoQ3, CoQ5, metiltransferaze trećeg i petog koraka sinteze koenzima Q10; HOMT, hidroksiindol metiltransferaza; FNMT, feniletanolamin N-metiltransferaza; COMT, katekolamin O-metiltransferaza; hnRNP-A1, heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa A1.

1.2.5. Metilacijski indeks

Metilacijski indeks (metilacijski potencijal) stanice je omjer koncentracija spojeva AdoMet i AdoHcy. O njemu ovisi tijek transmetilacijskih reakcija. Važan je pokazatelj metaboličke kontrole mnogih

procesa u stanici, od ekspresije gena do sinteze raznih proteina i za život važnih spojeva. Ovisno o tipu stanice, stupnju rasta i razvoja tkiva, vrijednosti metilacijskog indeksa se mijenjaju. Uzima se da je metilacijski indeks blizu ili iznad 10 fiziološki za većinu stanica (Clarke 2001).

1.3. Biološki procesi povezani s bolešću zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze

Patogeneza bolesti zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze vrlo je složena i očituje se u različitim tkivima i organima. Pretpostavljamo da mutacija gena i posljedična nedostatna aktivnost SAHH, dovodi do metaboličkog poremećaja koji uzrokuje tkivno specifičnu poremetnju epigenetskih procesa povezanih s metilacijom.

1.3.1. Uloga i važnost metilacije u biološkim procesima

Genom je sastavljen od slijeda nukleotida deoksiribonukleinske kiseline koji će u procesu translacije glasničke RNA odrediti redosljed aminokiselina u novonastajućem proteinu. Svaka stanica u tijelu čovjeka sadrži iste gene, a gradi različita tkiva i organe s različitom funkcijom. Od približno 20 tisuća gena čovjeka nastaje preko 250 tisuća različitih proteina. Ključ raznovrsnosti jest aktivacija određenog gena u određeno vrijeme na određenom mjestu, što rezultira sintezom određenog proteina koji se potom, na specifičan način, dodatno posttranslacijski modificira.

Fenotip jedinke, osim o genotipu, ovisi i o složenom epigenskom zapisu u kojem transmetilacijski procesi, posredovani MT ovisnim o AdoMet, imaju značajnu ulogu. Genski kôd je u svim stanicama čovjeka isti, a sam genom je sličan genomu većine sisavaca, iako se fenotipom znatno razlikuju.

Epigenom obuhvaća promjene u ispoljavanju gena, u okviru nasljeđa neovisnog o redosljedu nukleotida DNA. Jedan od važnih mehanizama koji regulira ispoljavanje gena jest metilacija. Kôd zapisan epigenomom ključan je za međuodnos genotipa, fenotipa i okoline, poglavito utjecaja genotipa i okoline na fenotip. Ovisno o staništu jedinke, epigenom se može znatno promijeniti, prenijeti na potomstvo i odražavati se na njegovom fenotipu. Zaključno, tkivno i vremenski specifično ispoljavanje gena posredovano je tkivno i vremenski specifičnom promjenom epigenoma, nerijetko djelovanjem vanjskih čimbenika. Na taj je način svaka stanica obilježena karakterističnim obrascem uključivanja i isključivanja gena.

Razne transmetilacijske reakcije dio su epigenoma i važne su za uspostavu jedinstvenog obrasca metilacije: 1) otoka CpG u području promotora gena; 2) glasničke RNA; 3) u sklopu posttranslacijskih modifikacija raznih proteina, uključujući regulatorne podjedinice histona H3 i

proteine koji vežu RNA, primjerice heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa A1 (Strahl 2000, Han 2010, Blackwell 2012).

Osim navedenog, metilacija je neophodna u sintezi nekih važnih spojeva (slika 4) (Mudd 1975, Mudd 1980, Mudd 2007, Mudd 2011).

1.3.2. Posttranslacijske modifikacije proteina

Većina proteina se, nakon translacije u ribosomima, dodatno kovalentno modificira i na taj način „osposobljava“ za svoju jedinstvenu, tkivno-specifičnu ulogu (Allfrey 1964). Ove su posttranslacijske modifikacije (PTM) posredovane enzimima. Poznato je nekoliko vrsta PTM: metilacija, acetilacija, fosforilacija, glikozilacija, ubikvitinizacija, prenilacija itd. Količina proteina s istom vrstom modifikacije u stanici je promjenjiva. Pojedinačne, ili u kombinaciji, takve promjene su specifične za protein, stanicu i jedinku. Enzimima posredovane PTM pružaju dodatne mogućnosti regulacije posttranslacijske strukture i funkcije te time doprinose različitosti stanica i tkiva. Transkripti gena određuju primarnu strukturu proteina. Za tercijarnu i kvarternu strukturu neophodne su razne posttranslacijske promjene koje dodatno mijenjaju funkciju i sudbinu proteina. Skup svih dodatnih posttranslacijskih promjena primarne strukture proteina nazivamo proteinski kôd.

1.3.2.1. Poremećaj metilacije proteina kao moguća posljedica nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze

Posttranslacijska metilacija (PTMe) proteina je enzimom posredovan prijenos metilne skupine davatelja na protein primatelja. Univerzalni davatelj metilnih skupina je AdoMet (slika 1). Velika skupina enzima koji kataliziraju ove transmetilacijske reakcije su protein-metiltransferaze ovisne o AdoMet (P-MT). Opisane su razne reakcije posredovane raznim, za proteine i mjesto metilacije, specifičnim P-MT (slika 4). Produkt tih reakcija, AdoHcy, ujedno je i njihov snažan inhibitor. U uklanjanju metilnih skupina s pojedinih molekula posreduju enzimi, protein-demetilaze (P-deM). Pretpostavljamo da bi funkcija P-MT i P-deM mogla biti poremećena u uvjetima patoloških koncentracija spojeva AdoMet i AdoHcy. Rezultat fiziološke inhibicije je fiziološka regulacija tih reakcija, no posljedica patološke inhibicije, u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH, mogla bi biti globalna ili, za određene molekule, specifična de/hipometilacija ili neo/hipermetilacija ("dismetilopatija").

Metilacija mijenja posttranslacijsku strukturu, a time i funkciju proteina koji podliježe ciklusu transmetilacije (metilacija/demetilacija). Brojni proteini s različitim funkcijama prolaze kroz ovaj ciklus kako bi se ostvarila i/ili regulirala tkivno i vremenski specifična funkcija.

Dodavanje metilnih skupina na bočne lance određenih aminokiselina je moguće na mjestu: 1) dušika, N-metilacija, 2) kisika, O-metilacija, 3) sumpora, S-metilacija ili 4) ugljika, C-metilacija.

N-metilacija (N-CH_3) proteina je najčešći i najvažniji proces prijenosa metilne skupine na atom dušika bočnog lanca aminokiselina: a) lizina (amino skupina), b) arginina (guanidino skupina), c) histidina (imidazol skupina) i d) glutamina ili asparagina (karboksiamido skupina). Sukladno suvremenoj teoriji o dinamičkom epigenskom kôdu, novija otkrića nekih, za pojedine molekule specifičnih demetilaza, potvrđuju ranija zapažanja da je enzimom posredovana N-metilacija u fiziološkim uvjetima (PTMe) reverzibilan, a time i regulatoran proces (Freitag 1981, Forneris 2005, Whetstine 2006, Li 2006, Christensen 2007, Chang 2007, Lee i Stallcup 2009, Blackwell 2012). Neki proteini se normalno metiliraju/demetiliraju u većoj ili manjoj mjeri da bi uopće postali funkcionalni i/ili modulirali svoju već postojeću funkciju. Procesu posttranslacijske transmetilacije ne podliježu svi proteini.

U prijenosu metilne skupine s AdoMet na dušik guanidino skupine arginina posreduje jedanaest, trenutno poznatih, tipova protein-arginin metiltransferaza (PRMT1-PRMT11) (Krause 2007, Lee i Stallcup 2009, Blackwell 2012). Miš s delecijom gena *PRMT1* ugiba intrauterino što znači da je ovaj enzim važan za temeljne procese u stanici. Specifične PRMT ovisne o AdoMet prenose jednu ili dvije metilne skupine, što rezultira nastankom mono- ili dimetiliranog oblika arginina na simetričnom ili asimetričnom položaju unutar raznih proteina (Strahl 2000). Poznata su tri oblika metiliranog arginina: 1) mono-metilarginin (MMA); 2) simetrični dimetilarginin (sDMA); i 3) asimetrični dimetilarginin (aDMA). Asimetričnu dimetilaciju posreduju MT tipa I (PRMT1-4), a simetričnu MT tipa II (PRMT5), uz utrošak dvije molekule AdoMet. Za ovo istraživanje naročito su važne PRMT1, PRMT4 i PRMT5. Ove metiltransferaze prenose metilnu skupinu s AdoMet na razne proteine (histoni, osnovni protein mijelina i razni drugi), uključujući i one odabrane za ovo istraživanje: 1) heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa A1 (hnRNP-A1); 2) Sam68; i 3) protein koji veže poli-A tipa 1 (PABP-1) (Pollack 1999, Bedford 2005, Pahlich 2006, Iwasaki 2008, Lee i Stallcup 2009, Bedford 2009, Blackwell 2012).

Metabolička cijena metiliranja proteina je visoka: 12 molekula ATP po jednom prijenosu metilne skupine. Zbog svoje „skupoće“, pretpostavlja se da su transmetilacijske reakcije biološki izuzetno važne. Metiliranje arginina unutar histona putem PRMT1 i PRMT4, na primjer, određuje histonski kôd (Jenuwein 2001). Metilacija arginina je važna za funkciju proteina koji vežu RNA, uključujući hnRNP-A1 (Liu i Dreyfuss 1995, Lee i Stallcup 2009, Blackwell 2012), a važna je i za interakcije među proteinima. Tako je, na primjer, vezanje proteina kojem je poremećena funkcija u spinalnoj mišićnoj atrofiji (SMN) i proteina Sm posredovano simetrično dimetiliranim argininom (Friesen 2001, Selenko 2001).

Osim utjecaja na posttranslacijsku strukturu i veličinu proteina, metilacija arginina utječe i na polarnost proteina. Metilacija arginina je povezana s pozitivnim nabojom proteina, a naboj određuje staničnu lokalizaciju proteina. Na primjer, metilacija arginina domene RGG proteina hnRNP-A2 (Nichols 2000) i metilacija arginina na položajima Arg-93, Arg-97 i Arg-109, udružena s pozitivnim nabojom proteina SF2/ASF, određuje njihov smještaj u jezgru (Sinha 2010). Mutacije koje

onemogućuju metilaciju arginina i dovode do gubitka pozitivnog naboja i hidrofobnosti proteina SF2/ASF povezane su s njegovim nakupljanjem u citoplazmi i nedovoljnom količinom u jezgri. Manjak proteina SF2/ASF u jezgri dovodi do poremećaja procesiranja određenih pre-mRNA, njihovog alternativnog izrezivanja i procesa NMD (engl. *nonsense mediated dekay*).

PTMe arginina, u simetričnom ili asimetričnom obliku sudjeluje u:

1) inicijaciji, elongaciji i terminaciji transkripcije gena na razini DNA (metilacija otoka CpG - transkripcijski čimbenik TFEB i protein koji veže metil-CpG 2 metilirani su u obliku sDMA; *zinc finger* protein koji veže DNA, transkripcijski čimbenik STAT1 i *zinc finger* protein 408 metilirani su u obliku aDMA) (Mowen 2001, Lee i Stallcup 2009);

2) kontroli transkripcije gena na razina kromatina (metilacija arginina unutar regulatornih podjedinica histona H3 i H4) (Kirmizis 2007);

3) obradi i sazrijevanju pre-mRNA, stvaranju poli-A repa i 5'-kape, konstitutivnom i alternativnom izrezivanju mRNA i njenom transportu u citoplazmu (procesiranje RNA, uključujući *splicing code* - čimbenik izrezivanja SF2/ASF, proteini koji vežu RNA EWS i heterogeni nuklearni ribonukleoproteini tipa A1, A2 i A3 - hnRNP-A1, hnRNP-A2, hnRNP-A3 - metilirani su u obliku aDMA; hnRNP Q2 i protein koji veže RNA Sam68 metilirani su u obliku sDMA) (Cáceres 2002, Wang 2008, Hallegger 2010, Lee i Stallcup 2009, Fisette 2010, Nilsen i Graveley 2010, Blackwell 2012);

4) translaciji (razina proteina - proteini koji vežu poli-A tipa 1 i 2 metilirani su u obliku aDMA; histidil-tRNA sintetaza i ribosomni protein L7 metilirani su u obliku sDMA) (Lee i Bedford 2002, Ong 2004, Kim C 2010, Gorgoni 2011, Brook 2012);

5) aktivaciji i regulaciji funkcije brojnih proteina (proteini citoskeleta, kontraktilni proteini, enzimi, receptori, signalne molekule, proteini međustanične komunikacije, apoptoze, staničnog ciklusa, popravka DNA) uključujući i SAHH koji je metiliran u obliku aDMA (Kim 1997, Boisvert 2003, Lee i Stallcup 2009, Kim C 2010, Kim 2011, Blackwell 2012).

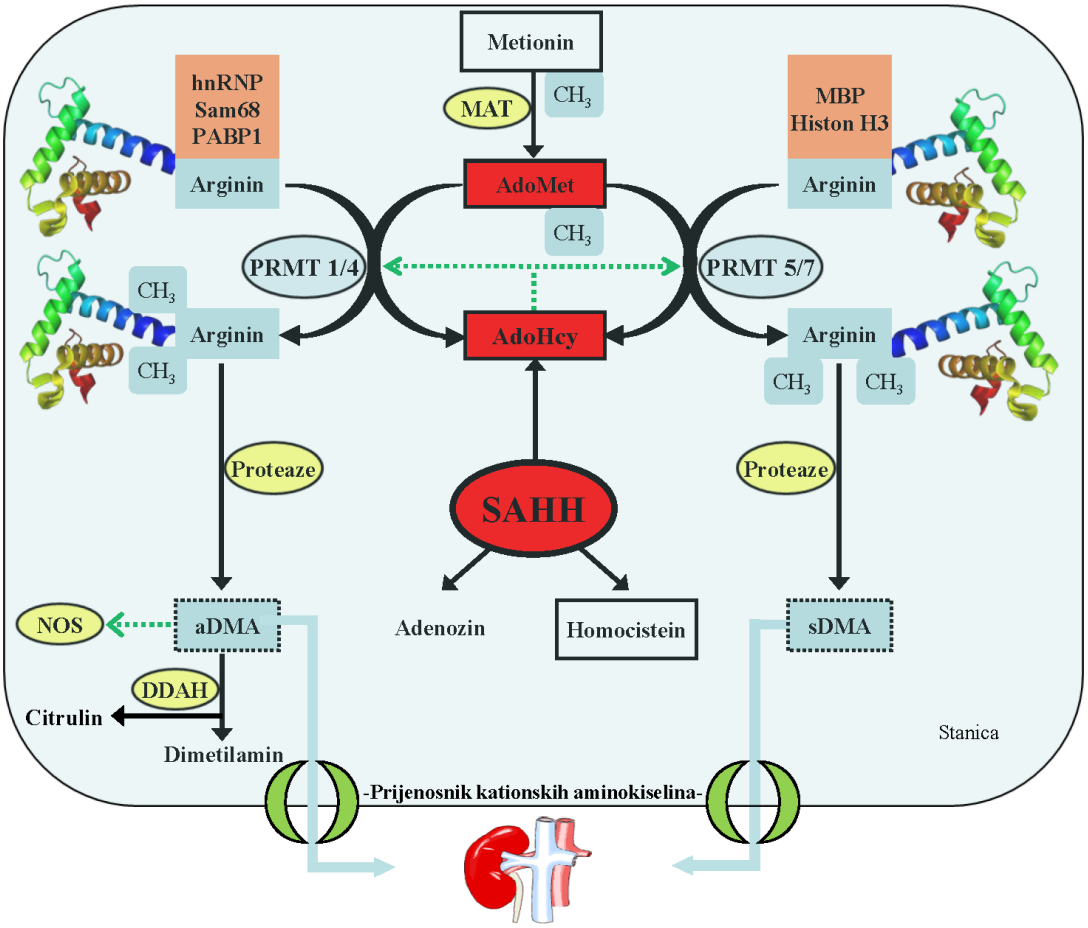
Stoga metilacija utječe na proteom i, posljedično, na funkciju interaktoma.

1.3.3. Asimetrični dimetilarginin (aDMA)

Protein-arginin metiltransferaze ovisne o AdoMet (PRMT) metiliraju bočne lance aminokiseline arginin, u proteinima s različitim funkcijama (Lee i Stallcup 2009, Blackwell 2012). Njihovom proteolizom, u citoplazmi nastaje asimetrični dimetilarginin (aDMA) koji potom ima dvojaku sudbinu: razgradnju ili izlučivanje u nerazgrađenom obliku (slika 5). Enzim koji u citoplazmi razgrađuje aDMA na citrulin i dimetilamin naziva se dimetilarginin-dimetilamino hidrolaza (DDAH). Količina aDMA koja se ne razgradi enzimatski, izlučuje se u plazmu prijenosnim sustavom za kationske aminokiseline (CAT), a potom bubrezima u mokraću.

Metabolizam aDMA je precizno reguliran proces. Ovaj spoj je kompetitivni inhibitor NO sintaze (NOS) i može uzrokovati oštećenje endotela. aDMA se povezuje s patogenezom mnogih bolesnih stanja (ateroskleroza, hiperkolesterolemija, oksidativni stres, hiperhomocisteinemija, hipertenzija i drugo). Pretpostavlja se da ova stanja dovode do poremetnje funkcije enzima ključnih u regulaciji koncentracije aDMA, uključujući PRMT1, DDAH i/ili CAT (Teerlink 2009, Blackwell 2010).

Osim u endotelnim stanicama, NOS ima važnu ulogu u miocitima, u kojima povezuje proteine membranskog kompleksa, kaveolin-3 i distrofin (Sartorelli 2005).



Slika 5. Metabolizam dimetilarginina. PRMT1-7, protein arginin metiltransferaze tipa 1 do 7 ovisne o AdoMet; MBP, osnovni protein mijelina; hnRNP, heterogeni nuklearni ribonukleoprotein; Sam68, protein koji veže RNA; PABP1, protein koji veže poli-A tipa 1; NOS, sintaza dušičnog oksida; aDMA, asimetričan oblik dimetilarginina; sDMA, simetričan oblik dimetilarginina; DDAH, dimetilarginin-dimetilamin hidrolaza. Isprekidane zelene linije sa strelicom označavaju inhibicijski učinak. AdoMet je davatelj metilnih skupina mnogim molekulama, uključujući proteine odabrane za ovo istraživanje (hnRNP-A1, Sam68, PABP1). U prijenosu metilne skupine na aminokiselinu arginin posreduju protein arginin metiltransferaze (PRMT). PRMT tipa 1 metilira arginin u asimetričnom, a PRMT tipa 5 u simetričnom obliku. Po završetku životnog vijeka, proteini se razgrađuju. Pri tome, nastaje dimetilarginin u asimetričnom (aDMA) ili simetričnom (sDMA) obliku koji potom napušta stanicu pomoću prijenosnika kationskih aminokiselina. Budući da je inhibitor sintaze dušičnog oksida, aDMA ima dodatni regulacijski mehanizam razgradnje u stanici djelovanjem enzima DDAH.

1.3.4. Proteini odabrani za ovo istraživanje: hnRNP-A1, PABP-1, Sam68

Transmetilacija je važna u procesu sazrijevanja i obrade glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA), stvaranja 5'-kape i poli-A repa te transporta mRNA u citoplazmu - procesiranje mRNA. Ukoliko procesiranje mRNA nije dovoljno brzo, uslijedit će razgradnja mRNA prije izlaska iz jezgre, zbog njenog kratkog poluvremena života. Skupina enzima, RNA-metiltransferaze (RNA-MT), ostvaruje strukturne promjene tijekom procesa sazrijevanja mRNA, prenošenjem metilne skupine s AdoMet na mRNA. Nakon što je AdoMet predao svoju skupinu CH_3 nastaje AdoHcy, snažan produkt-inhibitor te reakcije. S druge strane, osim same mRNA, posttranslacijskoj metilaciji podliježe velika skupina proteina koji vežu mRNA, uključujući heterogene nuklearne ribonukleoproteine (hnRNP), proteine koji vežu poli-A tipa 1 i 2 (PABP-1, PABP-2), Sam68 i druge. Na taj način metilacija ima ulogu u cjelokupnom procesiranju mRNA, konstitutivnom i alternativnom izrezivanju i stvaranju tkivno specifičnih izoformi zrele mRNA.

Zašto smo za ovo istraživanje odabrali baš ove, u podnaslovu spomenute, proteine? Ovo istraživanje usmjereno je proučavanju utjecaja PTMe proteina na procesiranje mRNA. Za ciljne proteine ovog istraživanja odabrali smo one koji aktivno sudjeluju u procesiranju ove makromolekule i istovremeno podliježu strukturnim PTMe modifikacijama koje moduliraju njihovu funkciju.

1.3.4.1. Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini (hnRNP)

Definicija: Proteini hnRNP su skupina proteina koji vežu glasničku RNA pomoću slijeda RRM (engl. RNA *recognition motif*) ostvarujući time regulatornu funkciju u njenom procesiranju.

Osnovnim biološki procesi vezani uz mRNA: procesiranje mRNA možemo podijeliti prema staničnom odjeljku u kojem se odvija na: a) nuklearni (transkripcija, izdvajanje odabrane hnRNA ovisno o tkivnom i vremenskom kontekstu - kodiranje, izrezivanje, metilacija i ugradnja 5'-kape i poliadenilacija repa mRNA); i b) citoplazmatski (transport prema ribosomima, translacija i razgradnja mRNA). Pri samom početku transkripcije gena u jezgri, djelovanjem RNA polimeraze II, najprije nastaje nezrela ili heterogena nuklearna RNA (hnRNA) koja se potom veže sa specifičnim proteinima, heterogenim nuklearnim ribonukleoproteinima (hnRNP) i malim nuklearnim ribonukleoproteinima (snRNP) koji, zajednički, grade višeproteinski kompleks hnRNA-hnRNP-snRNA-snRNP za sazrijevanje mRNA (ribonukleosom) i konstitutivno, odnosno alternativno, izrezivanje "*spliceosome*". Ovaj je višeproteinski kompleks ujedno i transportni kompleks na putu prema citoplazmi. Proteini hnRNP sudjeluju u procesiranju mRNA u oba odjeljka stanice pa na taj način poput mosta povezuju nuklearne i citoplazmatske procese. Zbog toga su proteini hnRNP funkcionalna spona cjelokupnog procesiranja mRNA (Piñol-Roma i Dreyfuss 1992, Han 2010).

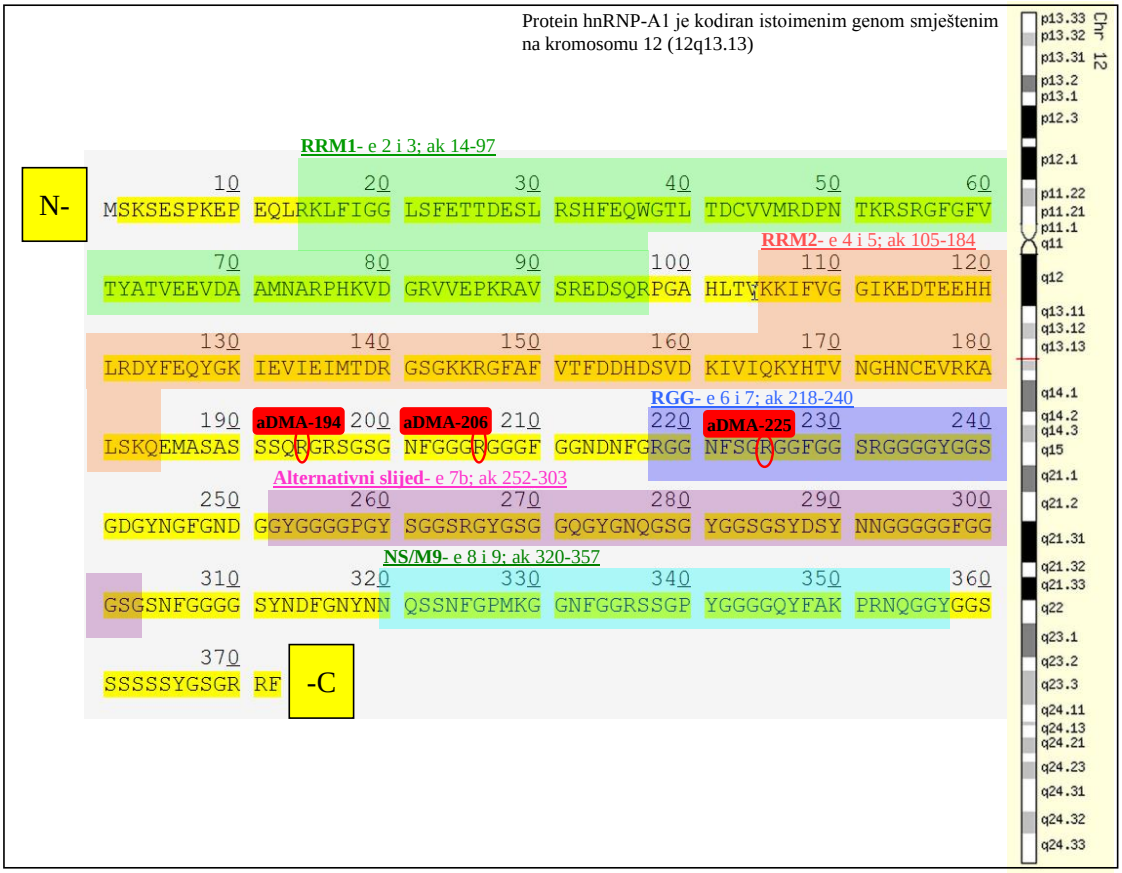
Porodica proteina hnRNP i njihova lokalizacija u stanici: protein hnRNP tipa A1 (hnRNP-A1) prvi je opisani protein koji veže mRNA. Kasnije su opisani brojni podtipovi ove porodice.

Dosada ih je poznato 20-ak i označeni su slovima od A do U. Pojedini proteini ove porodice su kodirani različitim genima, a ostali predstavljaju izoforme (Rajpurohit 1992, Han 2010). Među najzastupljenijima su proteinima koji vežu mRNA u jezgri. Uključeni su u brojne funkcije stanice: replikaciju i popravak DNA, regulaciju dužine telomera, procesiranje mRNA (transport, konstitutivno i alternativno izrezivanje) te na taj način osiguravaju ispoljavanje gena i prijenos informacije s genske na proteinsku razinu (He i Smith 2009). Po svojoj lokalizaciji, većina hnRNP su isključivo nuklearni proteini. Pojedini podtipovi ove porodice, uključujući hnRNP-A1, su i transportni citoplazmatski proteini što znači da svoju zadaću obavljaju i u jezgri i u citoplazmi (Dreyfuss 2002, Chaudhury 2010). Protein hnRNP-A1 je važan prijenosnik mRNA iz jezgre u citoplazmu (engl. *shuttling protein*) (Piñol-Roma i Dreyfuss 1992, Gama-Carvalho i Carmo-Fonseca 2001). U regulaciji funkcije proteina hnRNP-A1 metilacija arginina ima važnu ulogu zato što utječe na njegovo vezanje za ciljne molekule, što omogućuje i potiče izlazak hnRNP-A1 iz jezgre u citoplazmu (Liu i Dreyfuss 1995, Shen 1998).

Struktura: proteini hnRNP građeni su od: a) jedne ili više domena RRM koje "prepoznaju" RNA; b) domene RGG (Arg-Gly-Gly) kojom se vežu s mRNA (P-mRNA interakcije), ali i s drugim proteinima (P-P interakcije); i c) domene NS (ili M9) za smještaj u jezgru i prijenos proteina iz jezgre u citoplazmu. Proteini hnRNP podliježu opsežnim PTM među kojima je najbolje istražena upravo metilacija arginina (Lee i Stallcup 2009, Blackwell 2012). Približno 65% ukupno dimetiliranog arginina jezgre ugrađeno je u hnRNP. Od ukupne količine arginina u strukturi hnRNP, 12% je dimetilirano. Radi se o asimetričnom obliku dimetilacije arginina, aDMA (Ong 2004). Osim arginina, niti jedna druga aminokiselina, sastavnica hnRNP, nije metilirana. Domena RGG proteina hnRNP-A1, važna za vezanje i P-P interakcije sadrži arginin na položaju 225 (Arg-225 ili aDMA-225) podložan metilaciji što modulira vezanje proteina, a samim time i njegovu funkciju. Asimetričnoj dimetilaciji podliježu i arginini na položajima 194 i 206 (Arg-194, Arg-206). Metilaciju posreduje PRMT1 ovisna o AdoMet (Rajpurohit 1994). Osim metilaciji, proteini hnRNP podliježu glikozilaciji, fosforilaciji i drugim PTM (Kim 1997, Dreyfuss 2002, Chaudhury 2010, Kim C 2010). Predstavnici skupine proteina hnRNP skloni su vezanju pri čemu nastaju funkcionalni proteinski homo- (hnRNP-A1+hnRNP-A1) i hetero-kompleksi (hnRNP-A1+hnRNP-A3). U ovom procesu, naročito važnu ulogu ima domena RGG koja sadrže arginin podložan asimetričnoj dimetilaciji (Papadopoulou 2012).

Struktura hnRNP-A1: protein hnRNP-A1 je kodiran genom *HNRNPA1* smještenim na kromosomu 12. N-terminalni dio proteina sastoji se od dvije uzastopne domene RRM: RRM1 - kodiran egzonima 2 i 3, aminokiseline 14-97 i RRM2 - kodiran egzonima 4 i 5, aminokiseline 105-184 (slika 6). N-terminalni dio je gotovo identičan u svim izoformama porodice proteina hnRNP. Za protein hnRNP-A1 specifičan je C-terminalni dio koji se sastoji od tri dijela: 1) domena RGG (kodirana egzonima 6 i 7, aminokiseline 218-240) unutar koje se nalazi arginin na položaju 225 (Arg-225) koji podliježe posttranslacijskoj dimetilaciji u asimetričnom obliku (aDMA-225); 2) slijed aminokiselina 252-303 koje su kodirane egzonom 7b (ovaj slijed ne posjeduje alternativna izoforma A proteina); 3) domena NS ili M9 (egzoni 8 i 9, aminokiseline 320-357) za smještaj u jezgru i prijenos

proteina iz jezgre u citoplazmu (Bekenstein i Soreq, u tisku). Konstitutivni oblik proteina (hnRNP-A1-B) sastoji se od 372 aminokiseline i ima molekularnu masu 38.747 Da. Alternativna izoforma (hnRNP-A1-A) se sastoji od 320 aminokiselina (nedostaje egzon 7b i aminokiseline 252-303). U nastavku ovog teksta, hnRNP-A1-B ćemo nazivati „konstitutivni oblik B“ (KoB), a hnRNP-A1-A „alternativna izoforma A“ (AiA).



Slika 6. Primarna struktura proteina hnRNP-A1. Prikazane su domene RRM1, RRM2, RGG, alternativni slijed i NS/M9 te egzoni koji kodiraju odgovarajuće aminokiseline; e, egzon; ak, aminokiselina. aDMA-194, aDMA-206 i aDMA-225 predstavljaju arginine hnRNP-A1 koji se posttranslacijski asimetrično dimetiliraju. Važno je zamijetiti da se aDMA-225 nalazi u domeni RGG čija metilacija utječe na funkciju domene, a time i na funkciju proteina prilikom interakcije s drugim molekulama i integracije u funkcionalne proteinske mreže.

Funkcija: kao što je DNA "upakirana" molekulama histona tako je i mRNA isprepletena i složena u regulatorne proteine hnRNP koji time ostvaruju brojne zadaće u transkripcijskoj i posttranskripcijskoj regulaciji ekspresije gena (Dreyfuss 2002, Chaudhury 2010). Vezani za kodirajuće ili nekodirajuće područje mRNA (*UTRs*, od engl. *untranslated regions*), proteini hnRNP sudjeluju u njenom procesiranju: stabilizaciji, sazrijevanju, osiguranju i prijenosu od jezgre do ribosoma (Blackwell 2012). Osim u interakciji s mRNA (domena RRM), proteini hnRNP svoju funkciju ostvaruju u interakcijama s drugim proteinima, kroz domenu RGG (Han 2010). Vezanje proteina hnRNP i molekule supstrata je hidrofobno, specifično ili nespecifično (Han 2010). Proteini

hnRNP su *trans-acting* čimbenici u procesiranju mRNA zato što predstavljaju središnji dio funkcionalne proteinske mreže važne u ekspresiji gena.

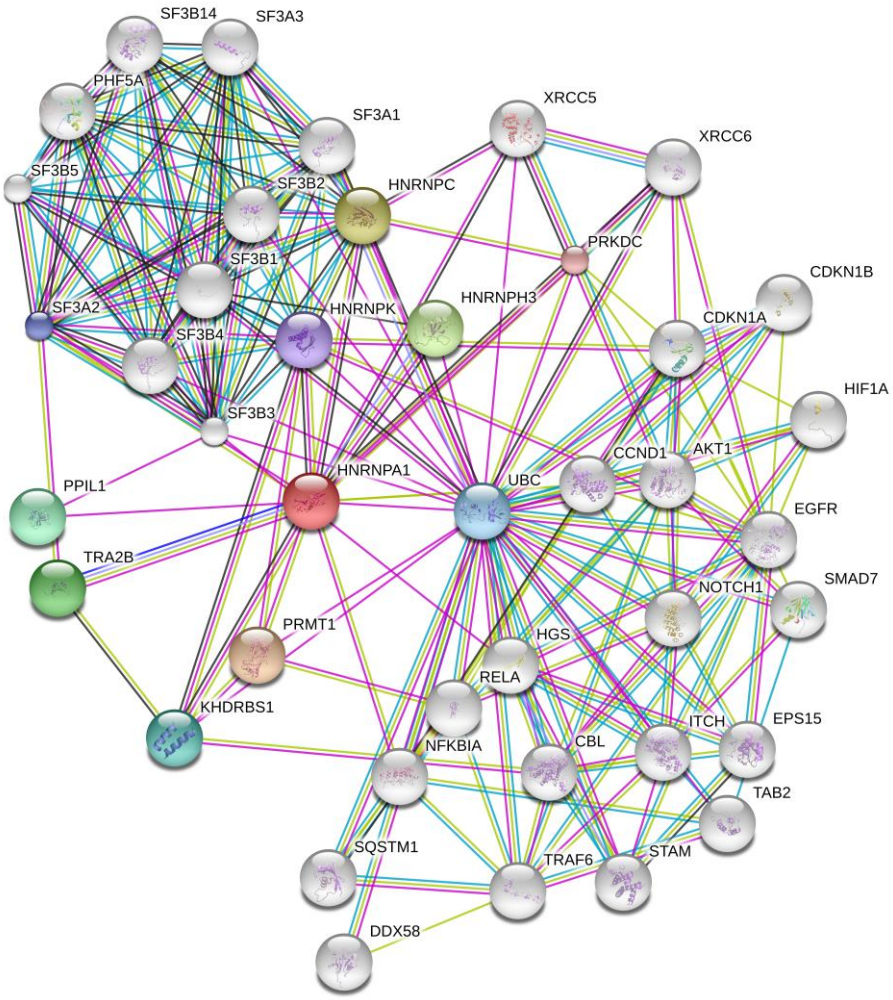
HnRNP-A1 je *trans-acting* čimbenik konstitutivnog i alternativnog izrezivanja mRNA. Svoju funkciju obavlja vezanjem na redosljed baza ESS (engl. *exonic splicing silencer*) pre-mRNA čime antagonizira drugi važan *trans-acting* čimbenik, protein SF2/ASF (čimbenik izrezivanja koji pripada porodici proteina SR). Biološki „*netto*" učinak djelovanja proteina hnRNP-A1 je isključivanje egzona (engl. *exon exclusion*) (Mayeda i Krainer 1992, Kashima 2007). Protein hnRNP-A1 regulira konstitutivno i alternativno izrezivanje mRNA za, na primjer, protein SMN, receptor NMDA, beta globin i druge. Isključivanjem egzona 7b, hnRNP-A1 regulira izrezivanje vlastite mRNA i određuje hoće li se sintetizirati potpuna, konstitutivna (KoB) ili skraćena, alternativna izoforma (AiA) (Chabot 1997, Hutchison 2002, Han 2010). U odnosu na duži konstitutivni oblik B proteina hnRNP-A1, koji veže mRNA, kraća alternativna izoforma A, veže jednolančanu molekulu DNA, ssDNA (engl. *single stranded* DNA) i mRNA za telomerazu te djeluje kao regulator dužine telomera čime sudjeluje u održavanju stabilnost genoma (Han 2010).

Proteini hnRNP-A1 su vremenski i tkivno različito eksprimirani, a nerijetko su obe izoforme prisutne u istom tkivu u isto vrijeme, pri čemu njihov odnos varira i doprinosti heterogenosti fenotipa. Protein hnRNP-A1 svoju regulatornu funkciju ostvaruju integracijom u kompleksnu proteinsku mrežu (Papadopoulou 2012) (slika 7).

Interakcija proteina hnRNP i mRNA je vrlo dinamična i tkivno i vremenski specifična. RNA polimeraza II sudjeluje u sintezi nezrele pre-mRNA (hnRNA), koja prije translacije na ribosomima u citoplazmi, prolazi temeljite strukturne promjene. Sintetizirana hnRNA se na različit način procesira, specifično u odnosu na tkivo i određeni vremenski period. Drugim riječima, u jednom tkivu će se, ovisno o potrebama mikrookoline i vremenskom kontekstu, odabrati jedna, a u drugom druga hnRNA. Dodatno će se svaka od odabranih hnRNA procesirati na tkivno specifičan način (tzv. tkivni potpisi mRNA). U kojim će se tkivima i na koji način preurediti nezrela hnRNA „određuju" proteini hnRNP koji usklađuju procesiranje mRNA s potrebama stanične mikrookoline unutar proteinskih kompleksa u kojima u određenom trenutku djeluju (tzv. tkivni i vremenski epigenski regulatori). Stoga proteini hnRNP određuju kôd izrezivanja (epigenski kôd na razini mRNA).

Utjecaj metilacije na funkciju hnRNP-A1: Asimetrični dimetilarginin koji se nalazi unutar proteinske strukture hnRNP-A1 je vrlo važan za njegovu funkciju (Rajpurohit 1994, Kim 2010, Blackwell 2012). Prisustvo asimetrično dimetiliranog arginina smanjuje sposobnost vezanja jednolančanih nukleinskih kiselina i otpornost na digestiju tripsinom (Rajpurohit 1994). Osim toga, metilacija hnRNP-A1 sprječava stvaranje vodikovih veza ovisnih o argininu, odnosno, argininom posredovano prepoznavanje mRNA (Calnan 1991, Najbauer 1993). Ukratko, metilacija arginina unutar proteina hnRNP regulira njegovu funkciju koja se odražava na jedinstvenu kombinaciju proteina unutar proteinskog kompleksa koji veže pre-mRNA (vrsta i količina proteina, nazočnost i

opseg PTMe arginina) čime se određuje njena specifična sudbina u prostoru i vremenu (tzv. regulacija regulatora) (Kim 1997, Dreyfuss 2002, Chaudhury 2010).



Slika 7. Interakcija proteina hnRNP-A1 s proteinima-partnerima i integracija u funkcionalnu proteomsku cjelinu. HnRNP-A1 je u interakciji s brojnim proteinima unutar kompleksne mreže proteina. Stvara homodimere (hnRNP-A1+hnRNP-A1), heterodimere (hnRNP-A1+hnRNP-H3), u interakciji je s drugim proteinima koji vežu mRNA (hnRNP-K, hnRNP-C), enzimom PRMT1 te brojnim čimbenicima izrezivanja (SF3B1, SF3B2, SF3B3 i drugi). Preuzeto sa *STRING - Known and Predicted Protein-Protein Interactions* (http://string-db.org).

1.3.4.2. Protein koji veže poli-A tipa 1 (PABP-1)

PABP-1 (engl. *polyadenylate-binding protein 1*) je protein koji veže dio mRNA bogat adenilnim skupinama u jezgri, tijekom izrezivanja nezrele mRNA, i u citoplazmi prilikom translacije. PABP-1 je kodiran genom *PABPC1* smještenim na kromosomu 8. Građen je od 636 aminokiselina. Sastoji se od četiri domene (RRM1 - RRM4) koje sudjeluju u prepoznavanju mRNA i domene PABC (engl. *poly-A binding C-terminal domain*) koja veže poli-A mRNA. PABP-1 je višefunkcionalan protein. Jedan je

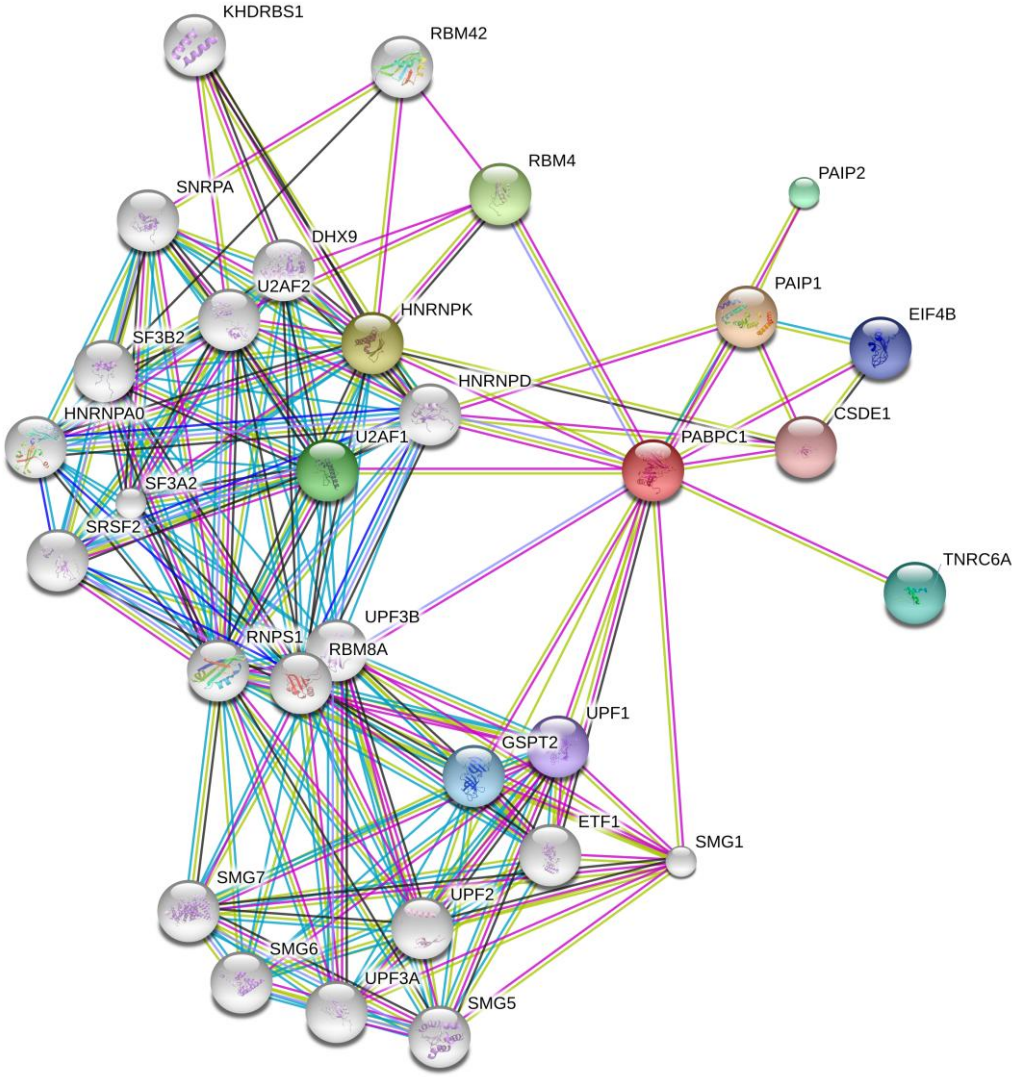
od središnjih regulatora procesiranja mRNA. Sudjeluje u izrezivanju nezrele mRNA, prijenosu zrele mRNA u citoplazmu, okupljanju ribosoma, translaciji i razgradnji mRNA (Kozlov 2001, Brook 2012).

PABP-1 podliježe procesu opsežnih posttranslacijskih modifikacija koje, osim metilacije arginina, uključuju i metilaciju glutamata, aspartata i lizina te acetilaciju lizina (Brook 2012). Metilaciju arginina u asimetričnom obliku na položajima Arg-455, Arg-460 i Arg-493 katalizira metiltransferaza ovisna o AdoMet, CARM1 (engl. *coactivator-associated arginine methyltransferase 1*, sinonim PRMT4) (Lee i Bedford 2002, Ong 2004, Kim D 2010, Gorgoni 2011, Brook 2012). PABP-1 povezuje mRNA, brojne čimbenike translacije i transportne molekule u funkcionalne komplekse, polisome, o kojima ovisi sudbina mRNA. U okviru funkcionalnog proteoma, PABP-1 ostvaruje brojne interakcije s proteinima-partnerima (slika 8).

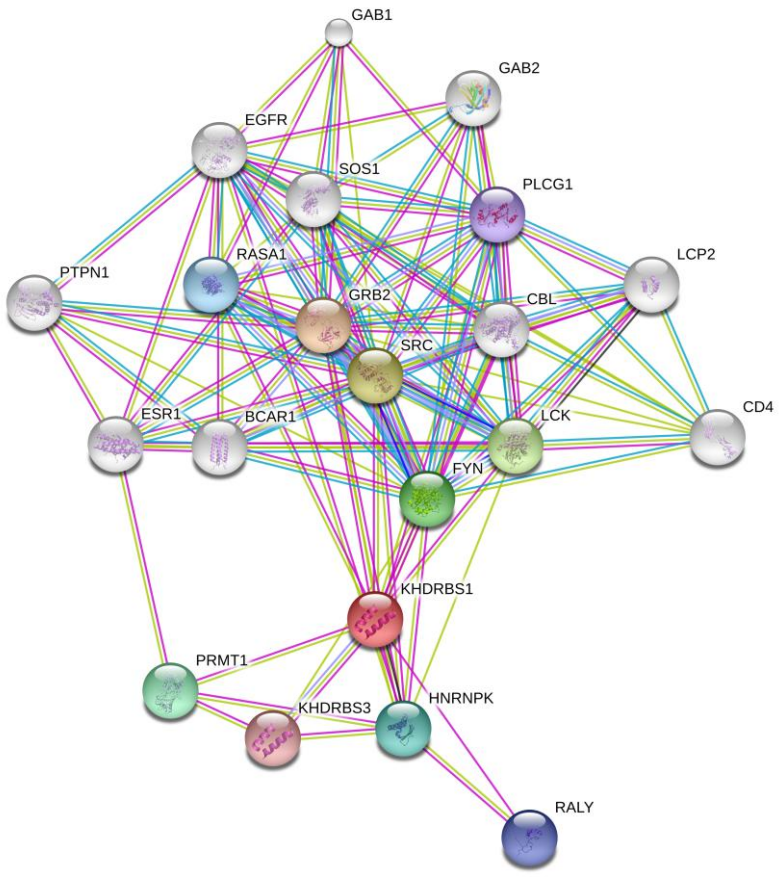
Utjecaj asimetrične dimetilacije arginina na funkciju PABP-1: aDMA se nalazi na položajima 455, 460 i 493. Aminokiseline arginina na tim položajima nisu dio domena RRM i PABC. Stoga se pretpostavlja da ove aminokiseline ne utječu niti na prepoznavanje i vezanje mRNA s kompleksom za translaciju, niti na lokalizaciju proteina PABP-1 u stanici. aDMA-455, aDMA-460 i aDMA-493 se nalaze u području bogatom prolinom koje je smješteno između domene RRM4 i PABC. Ovo područje sudjeluje u oligomerizaciji PABP-1 i vezanju drugih proteina (Melo 2003, Brook 2012). Stoga bi dismetilacija arginina mogla biti povezana s poremećajem oligomerizacije PABP-1 i interakcijama s drugim proteinima i molekulama.

1.3.4.3. Protein Sam68

Protein Sam68 (službeni naziv - KHDRBS1, od engl. *KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1*, sinonim p68) je protein jezgre koji veže mRNA. Sam68 je kodiran genom *KHDRBS1* smještenim na kromosomu 1, koji je ispoljen u svim stanicama. Građen je od 443 aminokiseline. U interakciji s drugim proteinima regulira stanični ciklus, sudjeluje u prijenosu unutarstaničnog signala, osigurava stabilnost i transport mRNA u citoplazmu (slika 9). Podliježe procesu posttranslacijskih modifikacija, uključujući i metilaciju posredovanu metiltransferazom ovisnom o AdoMet, PRMT1. Aminokiseline arginina na položajima Arg-291, Arg-331 i Arg-346 se metiliraju u obliku aDMA. Pretpostavlja se da je asimetrično dimetiliran arginin proteina Sam68 važan za prijenos i interakciju s drugim molekulama (Côté 2003). Stoga, dismetilacija arginina u Sam68 može biti povezana s poremećenim transportom mRNA i poremećenim interakcijama s drugim proteinima i molekulama.



Slika 8. Interakcija proteina PABP-1 s proteinima-partnerima i integracija u funkcionalnu proteomsku cjelinu. PABP-1 je u interakciji s brojnim proteinima unutar kompleksne mreže proteina. PABP-1 je u interakciji s: proteinom PAIP1 (engl. *poly(A) binding protein interacting protein 1*) koji aktivira translaciju proteina; proteinom PAIP2 (engl. *poly(A) binding protein interacting protein 2*) koji inhibira translaciju proteina; drugim proteinima koji vežu mRNA (hnRNP-D, hnRNP-K); proteinom eIF4B (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4B*) koji sudjeluje u vezanju mRNA za ribosome; proteinom U2AF1 (engl. *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*) koji sudjeluje u izrezivanju mRNA i drugim proteinima. Preuzeto sa STRING - *Known and Predicted Protein-Protein Interactions* (http://string-db.org).



Slika 9. Interakcija proteina Sam68 (KHDRBS1) s proteinima-partnerima i integracija u funkcionalnu proteomsku cjelinu. Sam68 je u interakciji s brojnim proteinima unutar kompleksne mreže proteina uključujući: proteine koji vežu mRNA, hnRNP-K, Raly (engl. *hnRNP associated with lethal yellow protein homolog*) koji sudjeluje u pre-mRNA izrezivanju; protein GRB2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*) koji sudjeluje u prijenosu signala; protein KHDRBS3 (engl. *KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3*) koji sudjeluje u regulaciji alternativnog izrezivanja pre-mRNA; enzim PRMT-1 i druge proteine. Preuzeto sa *STRING - Known and Predicted Protein-Protein Interactions* (http://string-db.org).

1.3.5. Konstitutivno i alternativno izrezivanje nezrele mRNA (kôd izrezivanja, engl. *splicing code*)

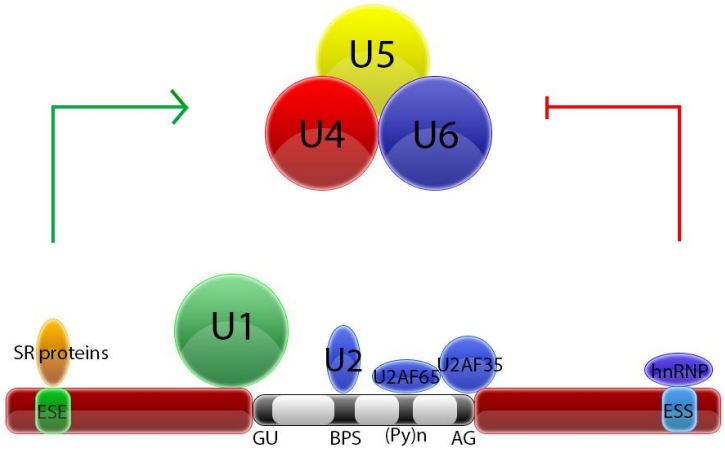
Pri samom početku transkripcije, djelovanjem RNA polimeraze II, najprije nastaje nezrela ili heterogena nuklearna RNA (hnRNA) koja se potom veže sa specifičnim proteinima: heterogenim nuklearnim ribonukleoproteinima (hnRNP) i malim nuklearnim ribonukleoproteinima (snRNP) koji, svi zajedno, grade višeproteinski kompleks hnRNA-hnRNP-snRNA-snRNP za sazrijevanje mRNA (ribonukleosom) i konstitutivno, odnosno alternativno izrezivanje "*spliceosome*". Isti višeproteinski kompleks je ujedno i transportni kompleks na putu prema citoplazmi.

Nezrela mRNA (hnRNA) se izrezuje na jednak, konstitutivni, ili različit, alternativni način. Približno 95 % gena koji sadrže veći broj egzona podliježe alternativnom izrezivanju hnRNA (Pan 2008, Wang 2008, Nilsen i Graveley 2010). Jedan gen, nekoliko hnRNA i vrlo velik broj izoformi proteina, samo su dio složenosti molekularnog života stanice (Cáceres 2002, Wang 2008, Hallegger

2010, Fisette 2010, Nilsen i Graveley 2010). Od prepisivanja jednog gena do proizvodnje nekoliko specifičnih proteinskih izoformi - s nerijetko, antagonističkim funkcijama zbog razlike u strukturi i lokalizaciji, nekoliko je koraka. Kritični korak je odabir mjesta izrezivanja i način spajanja izrezane mRNA (engl. *splicing*). U taj su složeni proces uključeni "*spliceosome*" i proteini koji vežu mRNA, ponajprije proteini hnRNP i SR (proteini bogati serinom i argininom). Proteini SR su poticatelji konstitutivnog izrezivanja, a proteini hnRNP sprječavatelji. Međudjelovanje spomenutih proteina - regulatora rezultira izrezivanjem 90 % dužine primarnog transkripta pre-mRNA tako da se svega preostalih 10 % zrele mRNA prenosi u citoplazmu i translatira u protein.

1.3.5.1. Regulacija i važnost izrezivanja nezrele mRNA

Izrezivanje mora biti brzo i precizno. Ključnu ulogu u preciznoj regulaciji alternativnog izrezivanja imaju: a) pozitivni *cis-acting* elementi, ESE (engl. *exonic splicing enhancer*) i ISE (engl. *intronic splicing enhancer*); b) negativni *cis-acting* elementi, ESS (engl. *exonic splicing silencer*) i ISS (engl. *intronic splicing silencer*) i c) *trans-acting* elementi: čimbenici izrezivanja uključujući proteine SR i hnRNP. Proteini SR specifično vežu redoslijed baza ESE čime promoviraju konstitutivni „*exon inclusion*“, dok hnRNP specifično vežu redoslijed baza ESS/ISS promovirajući konstitutivni „*exon exclusion*“ ili „*exon skipping*“ (slika 10). Antagonizam djelovanja i dinamička ravnoteža proteina hnRNP i SR određuje proizvodnju specifične izoforme mRNA, samim time i proteina, što nužno modificira i njegovu funkciju (Kashima i Manley 2003, Kashima 2007, Hua 2008).



Slika 10. "*Spliceosome*" i mjesta vezanja nekih čimbenika izrezivanja. Osnovne podjedinice "*spliceosome*" su male nuklearne ribonukleinske kiseline (U1, U2, U4, U5 i U6 snRNA) i proteini (hnRNP, SR, U2AF65, U2AF35 i brojni drugi). GU, mjesto izrezivanja 5' (engl. 5' *splice site*); AG, mjesto izrezivanja 3' (engl. 3' *splice site*); BPS, (engl. *branch site*); Py, područje bogato pirimidinom. Vezani domenom RRM na redoslijed baza pre-mRNA ESE (engl. *exonic splicing enhancer*), proteini SR dovode do stvaranja podjedinica i proteinskog sastava "*spliceosome*" na način koji potiče konstitutivni „*exon inclusion*“ (zelena strelica). Vezani domenom RRM na redoslijed baza pre-mRNA ESS (engl. *exonic splicing silencer*), proteini hnRNP dovode do sprječavanja formiranja podjedinica i proteinskog sastava "*spliceosome*" za promociju uključivanja konstitutivnih egzona, što rezultira s „*exon exclusion*“ ili „*exon skipping*“ (crvena linija) i proizvodnjom alternativnog produkta. Preuzeto iz reference Will 2011.

Kôd izrezivanja mRNA je teško predvidiv zato što je tkivno i vremenski specifičan. Značajno doprinosi raznovrsnosti proteoma proizašlog iz istovrsnog genoma. Biološka različitost transkriptoma i proteoma, njegova složenost i funkcionalnost u velikoj je mjeri određena kôdom izrezivanja (Wang 2008, Hallegger 2010, Barash 2010, Fisette 2010, Nilsen i Graveley 2010). Jedinka posjeduje iznimno veliku mogućnost različitog prekrajanja, što dovodi do postojanja različitog broj različitih izoformi proteina, i to u različitim omjerima. Na primjer, prepisivanjem gena za staničnu adhezijsku molekulu Downovog sindroma vinske mušice nastaje, dokazano, 49 različitih izoformi mRNA. Predviđeno je da ovaj gen, u teoriji, može posjedovati 38 016 izoformi mRNA. Taj broj višestruko nadmašuje ukupan broj gena (14 500) tog organizma (Schmucker 2000, Nilsen i Graveley 2010). Zbog toga je individualni kôd izrezivanja praktički nemoguće predvidjeti suvremenim znanjem i tehnologijom (Wang 2008, Hallegger 2010). Određenu pomoć pružaju programske podrške, na primjer *Human Splicing Finder* (http://www.umd.be/HSF/) (Desmet 2009).

Tijekom života stanice, različite izoforme proteina mogu se proizvoditi povremeno, učestalo, prolazno, trajno ili iznenada. Proizvodnja određenih izoformi proteina može biti povezana i s razvojem karcinoma. Na primjer, stanice tumora umjesto PK1 (piruvat kinaza tipa 1), uz pomoć proteina hnRNP, počinju proizvodi izoformu PK2 (piruvat kinaza tipa 2) koja stimulira anaerobni metabolizam glukoze i na taj način pogoduje rastu stanica tumora (Chen 2010, David 2010). Općenito, poremećaji *cis*- ili *trans-acting* čimbenika narušavaju ravnotežu u proizvodnji specifičnih izoformi proteina i dovode do bolesti, uključujući i, na primjer, spinalnu mišićnu atrofiju, SMA (Mourelatos 2001). Dodatnu tkivnu i vremensku složenost kôda izrezivanja potvrđuje primjer ubacivanja egzona „*exon inclusion"* koji u odraslih osoba dovodi do procesa NMD (engl. *nonsense mediated dekay*) i degradacije mRNA, a preskakanje egzona, „*exon skipping"*, u embrija - do sinteze proteina (Barash 2010).

1.3.5.2. "*Spliceosome*"

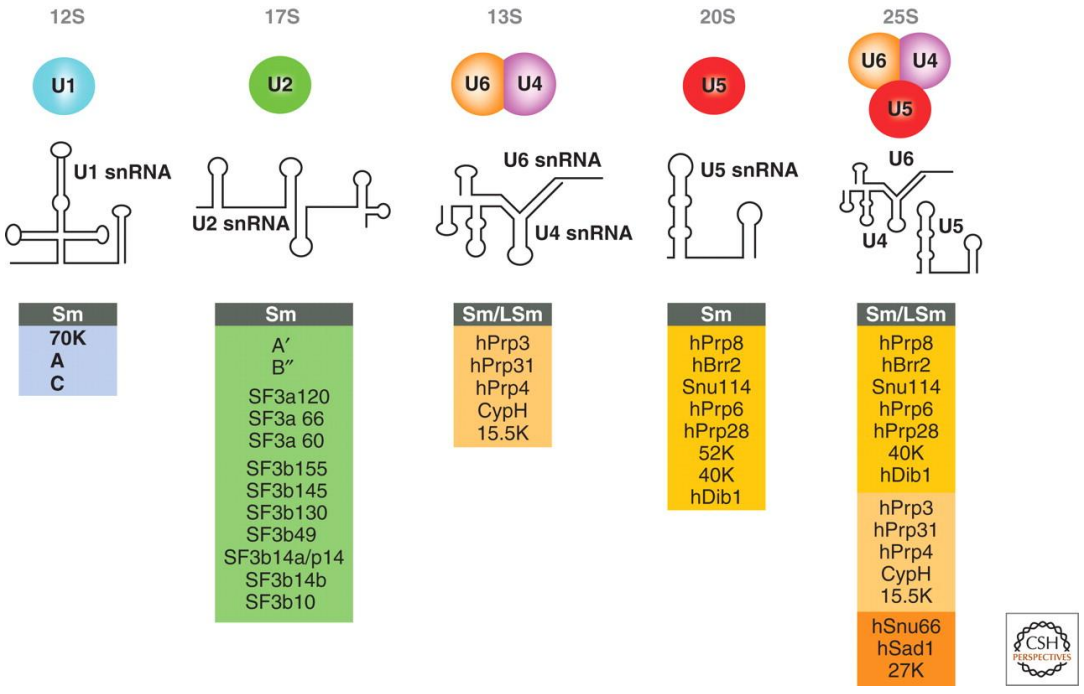
"*Spliceosome*" je ribonukleoproteinski kompleks jezgre koji sudjeluje u procesiranju i izrezivanju nezrele mRNA. Sastoji se od pet podtipova malih nuklearnih RNA (U1-, U2-, U4-, U5- i U6-snRNA) i više od 300 različitih proteina. Stoga predstavlja jednu od najsloženijih makromolekularnih struktura u stanici (slike 11 i 12). Proteini osnovnog kompleksa"*spliceosome*" su:

1) skupina malih nuklearnih ribonukleoproteina (snRNP):
   a) proteini *„core"*- snRNP (proteini Sm B/B', D1, D2, D3, E1, F1 i G1, proteini LSm1, LSm2, LSm3, LSm4, LSm5, LSm6, LSm7, LSm8);
   b) proteini U1-snRNP (70K, A i C);
   c) proteini U2-snRNP (A', B", SF3a60 i drugi);
   d) proteini U4/U6-snRNP (hPrp3, hPrp4 i drugi);
   e) proteini U5-snRNP (hPrp8, hBrr2, Snu114 i drugi);

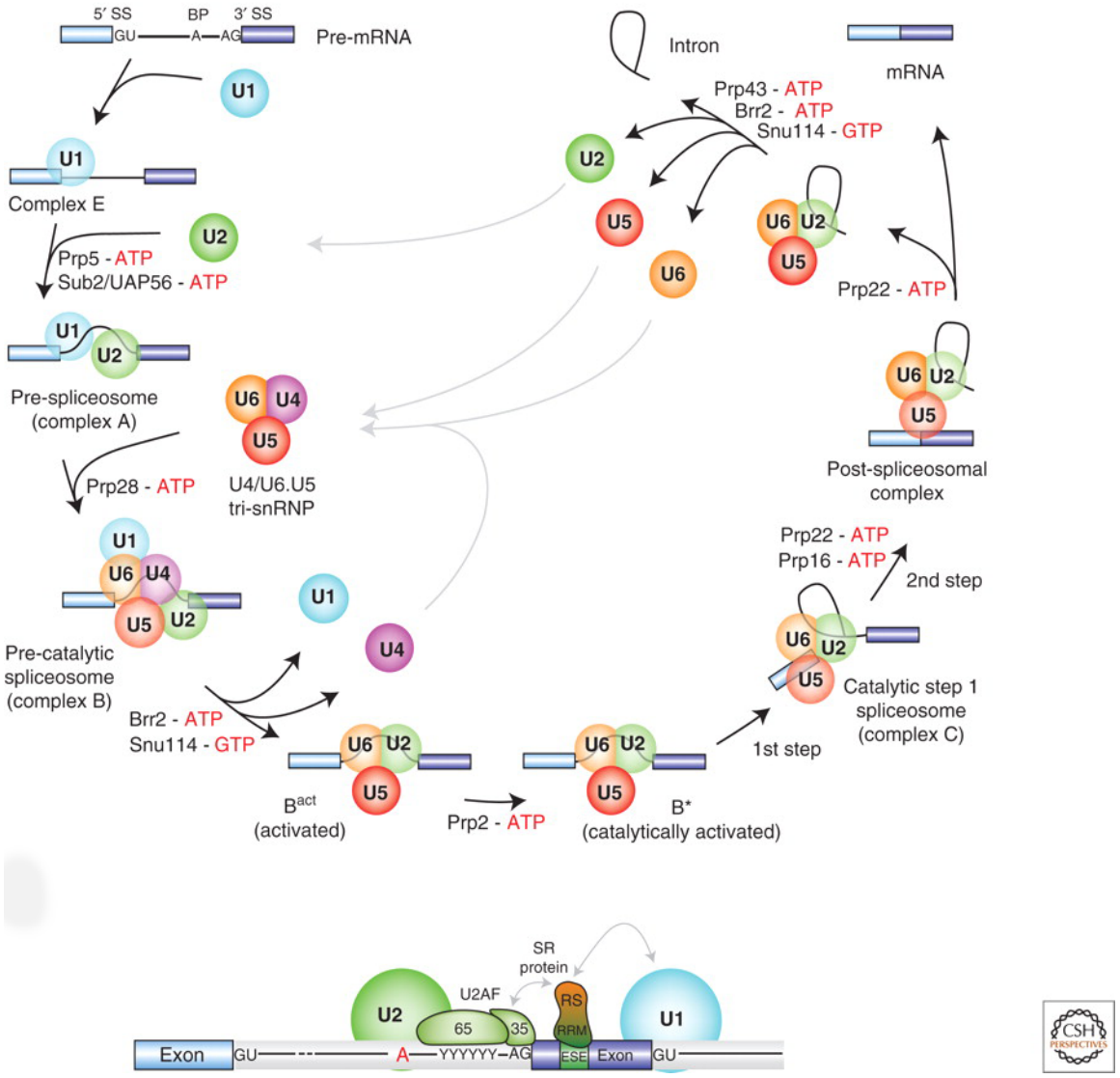
2) proteini koji ne pripadaju prvoj skupini (non-snRNP): čimbenici izrezivanja nezrele mRNA (U2AF35, U2AF65, SF2/ASF i drugi), proteini SR (SRm300, SRp40 i drugi), proteini hnRNP (podtipovi A1, A3, C, D, F, G, H1, K, L, M, R, U i RALY) i brojni drugi (Jurica 2003, Nilsen 2003, Jurica 2008, Will 2011).

Osnovni proteinski kompleks "*spliceosome*" sastoji se od približno 45 „stalnih“ proteina koji su uključeni u većinu procesa izrezivanja nezrele mRNA (slike 11 i 12). Prisustvo preostalih proteina, njih više od 250, ovisi o tkivnom i vremenskom kontekstu procesa izrezivanja, za određenu nezrelu mRNA. Konačni sastav proteina i prostorna struktura "*spliceosome*" su različiti, ujedno tkivno i vremenski specifični. Izmjene sastava proteina "*spliceosome*" moguće su i tijekom samog ciklusa izrezivanja (Will i Lührmann 2011). Za razliku od ribosoma, koji svoju funkciju obavljaju u nepromjenjivom proteinskom kompleksu, specifična funkcija "*spliceosome*" povezana je s promjenjivim sastavom proteinskog kompleksa.

Za svoj rad, dinamičku, prostornu i strukturnu reorganizaciju, "*spliceosome*" troši mnogo energije i vremena pa se zbog energetske i vremenske "skupoće" neosporno smatra iznimno važnim za život stanice, njenu strukturnu i funkcionalnu jedinstvenost (Jurica i Moore 2003, Nilsen 2003, Jurica 2008, Will i Lührmann 2011). Poremećaji rada "*spliceosome*" i procesa izrezivanja povezani su s različitim bolestima (Novoyatleva 2006, Ward i Cooper 2010).



Slika 11. Podtipovi male nuklearne RNA, njena sekundarna struktura i sastav proteina osnovnog kompleksa "*spliceosome*". U1, U2, U4, U5 i U6 snRNA, podtipovi male nuklearne RNA (snRNA); Sm i LSm, skupine malih nuklearnih ribonukleoproteina (*„core“*-snRNP); SF, različiti čimbenici izrezivanja (engl. *splicing factor*); hPrp (različite RNA ATPaze/helikaze); Snu114 (RNA GTPaza). Uz pojedine podtipove snRNA vezani su odgovarajući proteini snRNP iz skupina Sm i LSm (B/B', D1, D2, D3, E, F i G i LSm2-8), čimbenici izrezivanja, enzimi koji sudjeluju u promjeni konformacije "*spliceosome*" za vrijeme ciklusa izrezivanja (hPrp, Snu) i drugi. Prema referenci Will i Lührmann 2011.



Slika 12. Dinamička struktura ribonukleoproteinskog *mega*-kompleksa "*spliceosome*" tijekom ciklusa izrezivanja. Čimbenici izrezivanja određuju način izrezivanja nezrele mRNA (donji dio slike). Potom se formiraju, za pojedine faze ciklusa izrezivanja specifični, proteinski podkompleksi koji nezrelu mRNA procesiraju do zrele mRNA. GU ili 5'SS, mjesto izrezivanja 5' (engl. 5' *splice site*); AG ili 3'SS, mjesto izrezivanja 3' (engl. 3' *splice site*); A (adenozin) ili BP, (engl. *branch point*); kompleksi E, A, B i C predstavljaju dinamičke ribonukleoproteinske strukture ili podkomplekse pojedinih faza ciklusa izrezivanja; Prp5, Prp28, Prp2, Prp16, Prp22, Prp43, Sub2, Brr2 i Snu114, enzimi, RNA-ATPaze, RNA-GTPaze ili RNA helikaze, koji sudjeluju u dinamičkim promjenama konformacije "*spliceosome*" za vrijeme ciklusa izrezivanja; SR, U2AF65 i U2AF35 su čimbenici izrezivanja; Y, područje bogato pirimidinom; RRM (engl. RNA *recognition motif*), domena proteina važna za prepoznavanje mRNA; ESE (engl. *exonic splicing enhancer*), redosljed baza mRNA važan za promoviranje konstitutivnog „*exon inclusion*“. Prema referenci Will i Lührmann 2011 i neznatno modificirano.

HIPOTEZA

2. HIPOTEZA

Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze dovodi do posttranslacijske dismetilacije proteina zbog patološki niskog metilacijskog indeksa.

Kako objašnjavamo našu hipotezu? Zbog nedostatea aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) mijenja se koncentracija S-adenozilmetionina (AdoMet) i S-adenozilhomocisteina (AdoHcy), kao i njihov međuomjer, metilacijski indeks. Posljedično, ovi spojevi postaju ključni patogenetski čimbenici za razvoj bolesti. Čini se da visoka koncentracija AdoHcy i nizak metilacijski indeks dovode do poremećaja rada velike skupine enzima, metiltransferaza (MT) ovisnih o S-adenozilmetioninu, koje su važne za procese u stanici. Protein-arginin metiltransferaza tipa 1 (PRMT1) jedna je od MT za koju pretpostavljamo da bi mogla biti inhibirana suviškom AdoHcy, odnosno niskim omjerom AdoMet/AdoHcy - metilacijskim indeksom. PRMT1 ima važnu ulogu u procesu posttranslacijske metilacije (PTMe) arginina.

Pretpostavili smo da poremećeni proces PTMe arginina narušava fiziološke interakcije proteina, kao i interakcije pojedinih aminokiselina unutar istog proteina, te na taj način narušava stvaranje funkcionalne i stabilne kvarterne strukture proteina, odnosno stvaranje funkcionalnih višeproteinskih kompleksa. Ovo bi moglo dovesti do razvoja višeorganske bolesti nastale zbog „globalne dismetilacije“.

Kako bi poremetnja posttranslacijske metilacije arginina samo jednog od proteina koje smo istražili (hnRNP-A1, PABP-1, Sam68) mogla remetiti njegovu funkciju? Pretpostavili smo da bi se poremećaj PTMe arginina mogao očitovati na slijedeće načine: a) otežati vezanje proteina na mRNA; b) otežati stvaranje proteinskih kompleksa; c) poremetiti regulaciju uspostave proteinske mreže signala. Manjak metilnih skupina, na mjestima gdje bi one trebale biti istaknute mogao bi dovesti do pogreške u prepoznavanju ciljnih molekula što bi moglo uzrokovati poremetnju stvaranja 5'-kape i poli-A repa te prijevremenu razgradnju mRNA. Višak metilnih skupina mogao bi „smetati“ zauzimanjem veznog mjesta namijenjenog nekoj drugoj molekuli, priječiti pristup supstratu u katalitičko središte enzima, otežavati spontanu ili programiranu razgradnju proteina i spriječavati prijenos molekula u odjeljke stanice.

Pretpostavili smo da bi poremećaji u metilaciji na sličan način mogli ometati interakcije brojnih proteina i funkciju brojnih proteinskih kompleksa zbog toga što metilna skupina mijenja alosterička obilježja arginina.

CILJEVI

3. CILJEVI

Glavni cilj: utvrditi utječe li nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze na posttranslacijsku metilaciju arginina odabranih proteina.

Specifični ciljevi:

1) utvrditi na koji način različite koncentracije spojeva S-adenozilhomocisteina, S-adenozilmetionina i promijenjeni metilacijski indeks utječu na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina (aDMA), u plazmi pacijenata i kontrolne skupine. Istražiti da li je i na koji način promijenjena koncentracija asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata, zbog promijenjene vrijednosti metilacijskog indeksa. Budući da aDMA nastaje razgradnjom metiliranih proteina, mjerenjem koncentracije tog spoja dobili bismo neizravan uvid u dinamiku metilacije proteina u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH i poremećenog metilacijskog indeksa;
2) utvrditi utječe li liječenje dijetom siromašnom metioninom na koncentraciju aDMA u plazmi pacijenata;
3) uspostaviti eksperimentalni model fibroblasta *in vitro* i izmjeriti unutarstanični metilacijski indeks i koncentraciju aDMA bez, i uz dodatak spojeva koji snižavaju MI (AdoMet i AdoHcy) u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i u kontrolnim fibroblastima. Tijek transmetilacijskih reakcija određuje MI u stanici. U kliničkoj praksi, za računanje MI koristi se koncentracija AdoMet i AdoHcy u plazmi. Budući da je važno znati koje unutarstanične koncentracije ovih spojeva odgovaraju vrijednostima koje se mjere u plazmi pacijenata, izmjeriti unutarstanični MI u uspostavljenom eksperimentalnom modelu *in vitro*. Istražiti mijenja li se, i na koji način, koncentracija aDMA u uvjetima dodatka spojeva koji snižavaju MI;
4) odrediti razinu i utvrditi potencijalna odstupanja u posttranslacijskoj metilaciji arginina u proteinima hnRNP-A1, Sam68 i PABP-1, ovisno o metilacijskom indeksu. Procijeniti odražavaju li se razlike u stupnju PTMe arginina na funkciju proteina. Primjenom protutijela na metilacijom modificiran arginin, istražiti razlike u razini posttranslacijske metilacije arginina odabranih proteina (hnRNP-A1, Sam68, PABP-1), u usporedbi s kontrolnim uzorcima.

Ostvareni ciljevi doprinosili bi boljem razumijevanju patogeneze bolesti koja nastaje zbog nedostatne aktivnosti enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze.

MATERIJALI I METODE

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici i kontrolne skupine

Nakon pristanka obaviještenih roditelja i ispitanika, istražili smo dvije vrste uzoraka u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$:

1) Uzorci plazme - koristili smo preostale uzorke venske krvi prikupljene na EDTA, venepunkcijom, prilikom uzimanja uzoraka krvi za ranije predviđenu dijagnostičku obradu. U istraživanje smo uključili četvero pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. U svakog smo analizirali uzorake plazme uzete u određenoj životnoj dobi, prije i nakon uvođenja liječenja dijetom siromašnom metioninom, u dozi od 15 mg/kg/dan. Analizirali smo ukupno 24 uzorka plazme;
2) Uzorci fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ - od ranije uspostavljenih i pohranjenih kultura fibroblasta dobivenih od četvero pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ uspostavili smo ukupno 12 subkultura fibroblasta. Budući da smo mjerenja provodili u mediju i fibroblastima, analizirali smo ukupno 24 uzorka.

Nakon pristanka obaviještenih roditelja i ispitanika, kontrolnu skupinu smo pažljivo odabrali među osobama istovjetnog spola i starosti u kojih niti klinička slika, niti laboratorijski pokazatelji nisu upućivali na nedostatnu aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze. Kriteriji za uključivanje u istraživanje: odsustvo bolesti mišića, jetre i središnjeg živčanog sustava, fiziološka aktivnost kreatin kinaze i SAHH i fiziološke koncentracije S-adenozilhomocisteina i S-adenozilmetionina u krvi. U ovih smo ispitanika analizirali uzorke plazme i kulture fibroblasta:

1) Uzorci plazme - koristili smo preostale uzorke venske krvi prikupljene na EDTA, venepunkcijom, prilikom uzimanja uzoraka za ranije predviđenu dijagnostičku obradu. Analizirali smo ukupno osam uzoraka plazme. Na taj način je svaki uzorak pacijenta imao dvije, po spolu i dobi, istovjetne kontrole;
2) Uzorci fibroblasta - koristili smo preostale kulture fibroblasta, ranije pohranjene u sklopu dijagnostičke obrade zbog drugih indikacija. Od četiri odabrane kulture, uspostavili smo ukupno 12 subkultura. Budući da smo mjerenja provodili u mediju i fibroblastima, analizirali smo ukupno 24 kontrolna uzorka.

Svi su uzorci bili na jednak način pohranjeni od vremena uzorkovanja do analize (na -20 ^{0}C ili u tekućem dušiku).

4.2. ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Koncentraciju asimetričnog dimetilarginina (aDMA) u plazmi izmjerili smo sukladno uputama proizvođača (ADMA direct ELISA Kit, BioSupply, UK) (Schulze 2004).

Kemikalije i uzorci:

1. Pufer BM *Wash Buffer* - pufer za ispiranje;
2. STD - standard;
3. CTRL - kontrolni uzorak;
4. SAMPLE - uzorci seruma;
5. Pufer DERBUF - pufer za pokretanje reakcije;
6. DER - reagens za aciliranje;
7. Pufer CODIL - pufer za razrjeđivanje;
8. AB - protutijelo aDMA;
9. 2.AB - sekundarno protutijelo;
10. SUB - supstrat TMB (tetrametilbenzidin);
11. STOP - otopina za zaustavljanje reakcije.

Instrument:

1. Spektrofotometrijski čitač mikrotitarskih pločica (MRX, Dynex Technologies, SAD).

Postupak:

Jažice mikrotitarske pločice isprane su s 250 µl pufera za ispiranje. Potom je dodano, u za to određene jažice, po 50 µl otopine standarda i kontrolnog uzorka te 20 µl ispitivanog uzorka. U jažice s uzorcima je dodano i 40 µl pufera DERBUF. U svaku jažicu je dodano 10 µl reagensa DER, nakon čega su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi (18-26 ^{0}C), u trajanju od 30 minuta. Nakon inkubacije, u svaku je jažicu dodano 80 µl pufera CODIL i uslijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi (18-26 ^{0}C), u trajanju od pet minuta. Uslijedilo je dodavanje 50 µl protutijela aDMA te inkubacija u trajanju od pet sati na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije je aspiriran sadržaj jažica, koje su potom isprane s 250 µl pufera BM. U njih je dodano 200 µl sekundarnog protutijela i pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi, u trajanju od sat vremena. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je aspiriran, a jažice su pet puta isprane s 250 µl pufera BM. U isprane jažice je dodano 200 µl substrata TMB i sve zajedno je inkubirano na sobnoj temperaturi, u mraku, u trajanju od 15 minuta. Na kraju je dodano 100 µl otopine STOP. Apsorpcija razvijene boje izmjerena je na valnoj duljini od 450 nm i referentnoj valnoj duljini od 620 nm. Dobivene vrijednosti apsorpcije izražene su pomoću kalibracijske krivulje, kao koncentracija aDMA (µM).

4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Koncentraciju spojeva S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina iz uzorka pune krvi izmjerili smo tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom DAD (HPLC).

Kemikalije:

1. Perklorna kiselina, 0,6 M;
2. Pufer kalijevog karbonata; pH 9,5: 2 M kalijev karbonat (K_2CO_3) i 1 M kalijev dihidrogen-fosfat (KH_2PO_4) pomiješani u omjeru 1:1 i izmjeren pH;
3. HCl, 0,1 M: 0,84 ml 36,4 % klorovodične kiseline (HCl) dodano u 100 ml redestilirane vode;
4. Mravlja kiselina, 0,1 M: 4,2 ml mravlje kiseline (HCOOH, Mt 46,03) dodano u 100 ml redestilirane vode;
5. Pufer Tris-HCl, 0,02 M; pH 7,4: 0,24 g Tris (trihidroksimetilaminometan) otopljen u 100 ml redestilirane vode, pH podešen s 0,1 M HCl;
6. Tris-HCl-metanol (70:30): 70 ml pufera Tris-HCl, pH 7,4 + 30 ml metanola;
7. Citratni pufer, 10 mM; pH 8,8: 0,21 g limunske kiseline ($C_6H_8O_7xH_2O$) otopljeno u 100 ml redestilirane vode, pH podešen s 0,1 M HCl;
8. S-adenozilmetionin (AdoMet), 1 mM, "SIGMA" A-7007: 0,0056 g otopljeno u 10 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,4;
9. S-adenozilhomocistein (AdoHcy), 1 mM, "SIGMA" A-9384: 0,0038 g otopljeno u 10 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,4;
10. 1-Metiladenozin, 1 mM (matična otopina internog standarda), „SIGMA" M-5001: 0,028 g otopljeno u 100 ml 0,6 N perklorne kiseline;
11. Radna otopina internog standarda: 200 μl matične otopine 1-metiladenozina (#10) pomiješano s 800 μl otopine Tris-HCl (#5);
12. Perklorna kiselina s internim standardom (otopina za deproteiniziranje): 5 ml perklorne kiseline (#1) pomiješano s 25 μl radne otopine internog standarda (#11);
13. Mobilna faza A: 50 mM NaH_2PO_4 x H_2O (6,9 g NaH_2PO_4), 8 mM heptansulfonska kiselina (1,62 g 85 % orto-fosforna kiselina). Otopljeno u 0,8 L vode, pH podešen na 3,0, pažljivim dodavanjem orto-fosforne kiseline. Otopina prelivena u odmjernu tikvicu od 1 L, volumen napunjen vodom do 1 L. Profiltrirano kroz 0,45 μm celulozni filter;
14. Mobilna faza B (metanol): plin uklonjen vakuumom u ultrazvučnoj kupelji;
15. Matična smjesa AdoMet + AdoHcy: 200 μl 1 mM AdoMet pomiješano s 25 μl 1 mM AdoHcy i 775 μl 0,6 % perklorne kiseline.

Instrumenti i pribor:

1. Ekstrakcijska kolona BondElut LRC_PBA, 100MG (Varian, SAD);
2. Vakuum sustav (Varian, SAD);
3. Sustav HPLC (engl. *High Perfomance Liquid Chromatography*) - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom DAD (Shimadzu, Japan);
4. Kolona za HPLC NUCLEODUR C18, Gravity 5 μm (Macherey-Nagel, Njemačka);
5. Predkolona (Macherey-Nagel, Njemačka);
6. Centrifuga MPW 223e (Medical Instruments, EU);
7. Ostali pribor - pipete, nastavci, epruvete, pH trakice, filter papirići (Eppendorf, Njemačka).

Postupci:

Uzimanje krvi i predanalitička faza - unutar pola sata od uzorkovanja, 2 ml pune krvi vađene na EDTA smo naslojili na 5 ml ledeno hladne perklorne kiseline s internim standardom. Ovako pripremljen i deproteiniziran uzorak smo pohranili na -20 ^{0}C ili nastavili postupak kako slijedi. Epruvetu smo protresli i centrifugirali brzinom od 4000 okretaja u minuti, u trajanju od 10 minuta. Supernatant smo odvojili u posebnu epruvetu i podesili pH na 5,5 koristeći pufer kalijevog karbonata. Potom smo ga zamrznuli na -20 ^{0}C, u trajanju od 10 minuta. Nakon toga smo uzorak ponovno centrifugirali brzinom od 4000 okretaja u minuti, u trajanju od 10 minuta i supernatant prenijeli u novu epruvetu. Tako pripravljen uzorak smo ili: a) odmah nanijeli na ekstrakcijsku kolonu, ili b) pohranili na -20 ^{0}C.

Postupak izdvajanja AdoMet i AdoHcy - ekstrakcijske kolone BondElut postavili smo na vakuum sustav tipa Varian. Najprije smo zatvorili sve ventile na kadici i uključili vakuum (od -5 do -15 atmosfera). Potom smo započeli s ispiranjem kolonice s 5 ml 0,1 M HCl. Nakon što je otopina #3 lagano kapajući prošla kroz kolonicu, naslojili smo 5 ml 0,1 M mravlje kiseline (#4) koju smo preciznim reguliranjem ventila pustili da polako, kap po kap, prolazi kroz kolonu. Kao posljednje u nizu, kolonu smo isprali s 5 ml 0,02 M Tris-HCl-metanol na isti način kao i s prethodnim otopinama. Nakon ispiranja, na kolonu smo naslojili uzorak-supernatant te ga, kap po kap, polako propuštali kroz kolonicu. Potom smo je isprali s 1,5 ml citratnog pufera. Na kraju ovog dijela postupka, u epruvetu tipa Eppendorf smo eluirali AdoMet i AdoHcy s 0,5 ml HCl. Eluat smo odmah nanijeli na kolonu HPLC ili pohranili na -20 ^{0}C.

Postupak razdvajanja AdoMet i AdoHcy sustavom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti - HPLC (engl. *High Perfomance Liquid Chromatography*) je kromatografska tehnika za razdvajanje i analizu smjese molekula. Osnovne komponente sustava su pumpa HPLC, detektor DAD, injektor i kolona. Mehanizam razdvajanja temelji se na interakciji uzorka koji prolazi kolonom (stacionarna faza) pod visokim tlakom i mobilne faze. Interakcija uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom određuje brzinu eluiranja i razdvajanje molekula u uzorku. Stoga se komponente

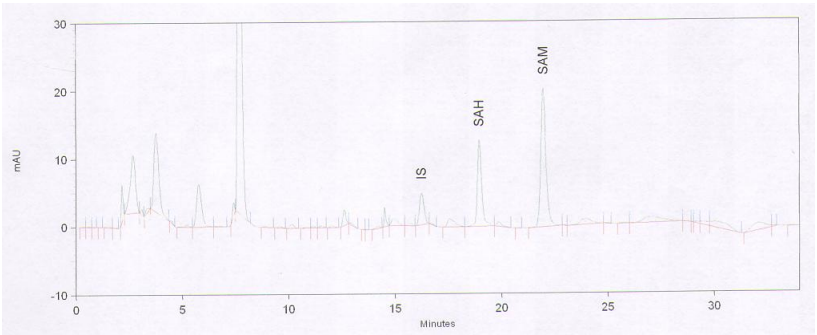
eluiraju s kolone različitom brzinom. Eluat protječe detektorom DAD koji mjeri apsorpciju svjetla određene valne duljine. Učinkovitost razdvajanja molekula ovisna je o primjeni odgovarajuće stacionarne i mobilne faze te o brzini protoka mobilne faze kroz kolonu. Prije nanošenja uzoraka potrebno je kondicionirati kolonu HPLC u trajanju od minimalno 10 sati. Osim toga, potrebno je „pustiti" kontrolne uzorke minimalne i maksimalne očekivane koncentracije. Zbog toga smo iz matične smjese standarda priredili slijedeća razrijeđenja:

1) koncentracija broj 1 - 2000 nM AdoMet i 250 nM AdoHcy;
2) koncentracija broj 2 - 1000 nM AdoMet i 125 nM AdoHcy;
3) koncentracija broj 3 - 500 nM AdoMet i 62,5 nM AdoHcy;
4) koncentracija broj 4 - 250 nM AdoMet i 31,25 nM AdoHcy.

Svaku koncentraciju standarda pripremili smo kao uzorak. Prikazani su odabrani kromatogrami i retencijska vremena spojeva AdoMet i AdoHcy koje smo dobili mjerenjima u plazmi pacijenata (slika 13) i kontrole (slika 14).

4.4. Spektrofotometrija

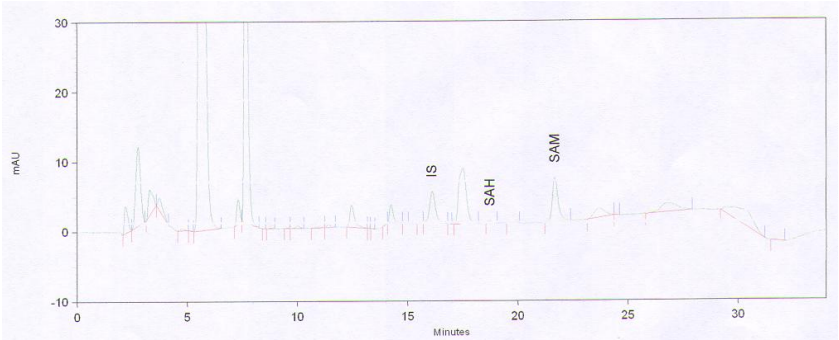
Aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze mjerili smo postupkom spektrofotometrije u fibroblastima pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnih ispitanika. Najprije smo izmjerili koncentraciju proteina metodom po Bradfordu (Bradford 1976). Potom smo izmjerili aktivnost SAHH u smjeru hidrolize, uz supstrat S-adenozilhomocistein i enzime adenozin deaminazu, nukleozid fosforilazu i ksantin oksidazu. Pri tome smo mjerili stvaranje mokraćne kiseline (292 nm) koje je proporcionalno aktivnosti enzima (Hermes 2005).



1: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Units	ISTD concentration
IS	16.245	70292	nmol/L	1.000
SAH	18.955	180225	nmol/L	4243.766
SAM	21.973	344861	nmol/L	11334.409

Slika 13. Primjer kromatograma plazme pacijenta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. IS, interni standard; SAH ili AdoHcy, S-adenozilhomocistein; SAM ili AdoMet, S-adenozilmetionin.



1: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Units	ISTD concentration
IS	16.107	83196	nmol/L	1.000
SAH	18.720	4801	nmol/L	95.515
SAM	21.675	113049	nmol/L	3139.243

Slika 14. Primjer kromatograma plazme kontrolnog ispitanika. IS, interni standard; SAH ili AdoHcy, S-adenozilhomocistein; SAM ili AdoMet, S-adenozilmetionin.

4.5. Imunoprecipitacija

Imunoprecipitacija (IP) je metoda za pročišćavanje i izdvajanje željenih proteina iz složene proteinske smjese, specifičnim protutijelima. Stvoreni imunokompleksi antigena i protutijela se potom uklanjaju iz otopine uz pomoć netopljivog oblika vežućeg proteina, na primjer proteina A ili proteina G. Uspješnost imunoprecipitacije ovisi o afinitetu protutijela prema antigenu i vežućem proteinu.

Kemikalije i protutijela:

1. Pufer RIPA (engl. *Radio Immuno Precipitation Assay Buffer*) - 150 mM natrijevog klorida, 1,0 % NP-40 ili Triton X-100, 0,5 % natrijev deoksikolat, 0,1 % SDS (engl. *Sodium Dodecylsulphate* - natrijev dodecilsulfat), 50 mM Tris-HCl, pH 8,0;
2. Pufer C1 za aktivaciju magnetnih kuglica (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
3. Pufer C2 za pokretanje kovalentnog vezanja protutijela na magnetne kuglice (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
4. Pufer s visokom koncentracijom soli - 10 mM Tris-HCl, 0,1 % NP-40, 0,05 % natrijev deoksikolat, 500 mM natrijev klorid, pH 7,5 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
5. Pufer s niskom koncentracijom soli - 10 mM Tris-HCl, 0,1 % NP-40, 0,05 % natrijev deoksikolate, pH 7,5 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
6. Pufer SB za pohranu (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
7. Pufer za liziranje stanica - 50 mM Tris-HCl, 150 mM natrijev klorid, 1% NP-40, 0,5 % natrijev deoksikolat, pH 7,5 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD):
8. Pufer za nanošenje uzorka - glicerol, Tris-baza, Tris-HCl, LDS (litijev dodecilsulfat), EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina), „Serva Blue“ G250, fenolno crvenilo, deionizirana voda (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);

9. Pufer LB za denaturaciju proteina i redukciju disulfidne veze lakih lanaca protutijela - 50 mM Tris, 2 % SDS, 10 % glicerol, 12,5 mM EDTA, 1 mM beta-merkaptoetanol, pH 6,8 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
10. Clone 10E10 - protutijelo na protein koji veže poli-A (PABP-1, miš, monoklonalno, Millipore, SAD);
11. R9778 - protutijelo na heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa A1 (hnRNP-A1, clone 4B10, miš, monoklonalno, Sigma Aldrich, SAD);
12. ab54733 - protutijelo na S-adenozilhomocistein hidrolazu (SAHH, miš, monoklonalno, Abcam, UK).

Instrumenti i sitna oprema:

1. Magnetni stalak „Dynal“ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
2. Hibridizacijska pećnica SL 1013 (Shel Lab, SAD);
3. Centrifuga MPW 223e (Medical Instruments, EU);
4. Mješalica IKA MS 3 Vortexer (IKA Werke GmbH, Staufen, Njemačka);
5. Ostali pribor: pipete, nastavci, epruvete, pH trakice, filter papirići (Eppendorf, Njemačka).

Postupak:

Uzorke smo pročistili inkubiranjem s proteinom G tijekom 60 minuta uz pomoć tresilice, u svrhu smanjivanja nespecifičnog vezanja. Potom smo ih centrifugirali na 12000 x g u trajanju od 20 sekundi. Odizanjem supernatanta dobili smo talog koji smo u dva navrata isprali puferom za liziranje, potom u dva navrata puferom za ispiranje s visokom koncentracijom soli te na kraju puferom za ispiranje s niskom koncentracijom soli. Zatim smo na talog, u dva navrata, dodali pufer za nanošenje uzorka nakon čega smo uzorke inkubirali na 99 ºC u trajanju od tri minute. Protein G smo odvojili centrifugiranjem na 12,000 x g u trajanju od 30 sekundi, supernatant prenijeli u novu epruvetu i pripremili ga za elektroforezu u gelu poliakrilamida s natrijevim dodecilsulfatom (SDS PAGE). Za pročišćavanje i izdvajanje ciljnih proteina koristili smo protutijelo na protein koji veže poli-A (PABP-1, clone 10E10, miš, monoklonalno, Millipore, SAD) i protutijelo na heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa A1 (hnRNP-A1, R9778, clone 4B10, miš, monoklonalno, Sigma Aldrich, SAD) (tablica 1). Prema protokolu smo koristili pufer za uzorke (Lee 2004). Najprije smo odvagali 6 mg magnetnih kuglica u epruvetu tipa Ependorf i dodali 1 ml pufera C1 za njihovu aktivaciju, promiješali te razdijelili po 250 µl u 4 epruvetice koje smo položili na magnetni stalak. Nakon što je magnetno polje odvojilo magnetne kuglice, odstranili smo višak pufera. Potom smo, na svakih 1,5 mg magnetnih kuglica, dodali 10 µg protutijela i promiješali. Nakon toga smo dodali po 75 µl pufera C2 za pokretanje kovalentnog vezanja protutijela na magnetne kuglice, do ukupnog volumena reakcije od 150 µl. Sve zajedno smo inkubirali u hibridizacijskoj pećnici na 37 ^{0}C u trajanju od dva sata, uz stalno mješanje na 10 okretaja u minuti. Nakon inkubacije, iz epruveta smo odstranili supernatant, a talog koji je sadržavao vezana protutijela na magnetne kuglice, ispirali s po 800 µl pufera HB koji smo

nakon mješanja odstranili, a talog isprali s istom količinom pufera LB. Potom smo isti postupak ispiranja proveli s puferom SB u tri navrata, nakon čega smo epruvete pohranili u hibridizacijskoj pećnici na 22 ^{0}C u trajanju od 15 minuta, uz stalno mješanje od 10 okretaja u minuti. Pufer smo odstranili, a na talog, koji smo prethodno isprali s 500 µl PBS, dodali lizat fibroblasta. Sve zajedno smo inkubirali u hibridizacijskoj pećnici na 4 ^{0}C u trajanju od 16 sati, uz stalno mješanje na 10 okretaja u minuti. Nakon specifičnog vezanja, odstranili smo ostatak staničnog lizata, a proteine vezane na magnetne kuglice, uz miješanje, isprali u četiri navrata s po 200 µl pufera RIPA kako bismo uklonili nespecifično vezana protutijela. Potom smo dodali 20 µl pufera LB kako bi se proteini denaturirali i istovremeno reducirale disulfidne veze lakih lanaca protutijela. Nakon što smo uzorke zagrijali na 100 ^{0}C u trajanju od pet minuta i promiješali, na magnetnom smo stalku odvojili supernatant s ciljnim proteinima od taloga, u svrhu odvajanja specifično vezanih proteina od kompleksa magnetnih kuglica i protutijela.

4.6. Elektroforeza u gelu poliakrilamida s natrijevim dodecilsulfatom

Za karakterizaciju proteina koristili smo elektroforezu u gelu poliakrilamida s natrijevim dodecilsulfatom (SDS PAGE). Osnovu ove metode čini razdvajanje proteina istosmjernom strujom. Proteini su, u fiziološkim uvjetima, pozitivno ili negativno nabijeni. Tijekom elektroforeze SDS PAGE molekule proteina su izložene natrijevom dodecilsulfatu (SDS), spoju koji svim proteinima u smjesi daje negativan naboj na njihovoj vanjskoj površini. Naime, SDS je anionski deterdžent koji se čvrsto veže na hidrofobne dijelove proteinske molekule prilikom pripreme uzorka. Nakon vezivanja, SDS razbija kovalentne veze u proteinu što dovodi do razmatanje proteinske molekule u polipeptidne lance. Ogoljena, svaka molekula proteina veže veliki broj negativno nabijenih molekula detergenta SDS, zbog čega se kretanje svih proteina usmjerava prema pozitivnoj elektrodi. Budući da tijekom ovog postupka svi proteini imaju negativan naboj, međusobno se razlikuju jedino po svojoj veličini, koja je obrnuto proporcionalna brzini njihovog putovanja gelom. Na taj način se iz složene smjese proteina odvajaju molekule na osnovi njihove veličine. Lanci polimeriziranog akrilamida ukriženo su povezani s N,N'-metilenbisakrilamidom.

Kemikalije:

1. SDS - natrijev dodecilsulfat (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
2. 10 % gel poliakrilamida (*NuPAGE* 10 % Bis-TRIS Gel 1,0 mm x 10 well, Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
3. Pufer MOPS SDS - pufer za elektroforezu koji sadrži 3-N-morfolinopropan-sulfonsku kiselinu (MOPS), Tris-bazu, natrijev dodecilsulfat (SDS), etilendiaminotetraoctenu kiselinu (EDTA) i deioniziranu vodu;
4. *Antioksidant NuPAGE*.

Instrumenti i sitna oprema:

1. Uređaj za elektroforezu X Cell Sure Mini-Cell (Invitrogen Corporation Carlsbad, SAD);
2. Centrifuga MPW 223e (Medical Instruments, EU);
3. Mješalica IKA MS 3 Vortexer (IKA Werke GmbH, Staufen, Njemačka);
4. Ostali pribor: pipete, nastavci, epruvete, pH trakice, filter papirići (Eppendorf, Njemačka).

Postupak:

U svaki smo uzorak dodali pufer za nanošenje uzorka. Za reduciranje uzoraka smo upotrijebili ditiotreitol, 10 % ukupnog volumena. 10 % gel poliakrilamida smo, prije nanošenja uzoraka, izložili naponu od 180 V, u trajanju od 20 minuta („*prerun*"). Za to vrijeme smo uzorke inkubirali na 99 ^{0}C, u trajanju od tri minute. U svaku jažicu smo nanijeli 20 µl uzorka staničnog lizata u koncentraciji od 1µg/ml, na način da su za detekciju svakog proteina korištene 4 jažice. Za elektroforezu SDS PAGE koristili smo pufer MOPS SDS na pH 7,7. U pokusima u kojima su uzorci bili reducirani, dodali smo *antioksidant NuPAGE* u 200 ml pufera MOPS SDS gornje komore uređaja za elektroforezu.

4.5. Imunološka detekcija imobiliziranog proteina

Imunološka detekcija imobiliziranog proteina (engl. *Western Blot*, WB) je analitička, imunokemijska metoda za selektivno obilježavanje proteina. Odlikuje se visokom specifičnošću i osjetljivošću temeljenoj na specifičnoj reakciji antigena i protutijela. Nakon što su postupkom elektroforeze razdvojeni, proteini se prenose s gela poliakrilamida na nitrocelulozu ili najlonsku membranu na koju se kovalentno vežu.

Kemikalije:

1. Pufer za prijenos proteina (engl. *NuPAGE Transfer Buffer*) - bicin, bis-tris, etilendiaminotetraoctena kiselina, klorbutamol i deionizirana voda, pH 7,2;
2. Metanol;
3. *Antioksidant NuPAGE*;
4. Nemasno mlijeko;
5. Pufer TBST (engl. *Tris Bufferd Saline with Tween 20*) - 100 ml 10x TBS + 899 ml H_2O + 1 ml detergenta *Tween* 20;
6. Koncentrat 10x TBS (engl. *Tris Bufferd Saline*) - 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 800 ml H_2O, pH 7,6:
7. ASYM24 - protutijelo na metilacijom modificiran arginin u asimetričnom obliku (aDMA, kunić, poliklonalno, Millipore, SAD);

8. NA931-1ML - sekundarno protutijelo IgG, *Horseradishe Peroxidase* HRP (miš, monoklonalno, Amersham Biosciences, UK);
9. ECL (engl. *Enhanced Luminol-based Chemiluminescent Substrate*) - supstrat za kemiluminiscenciju (Amersham Biosciences, UK).

Instrumenti i sitna oprema:

1. Uređaj za elektroforezu X Cell SureLock Mini-Cell (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
2. Uređaj za prijenos proteina Xcell II Blot Modul (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD);
3. Uređaj za snimanje obilježenih proteina na membrani Uvitec Alliance (Cambridge, UK);
4. Hibridizacijska pećnica SL 1013 (Shel Lab, SAD);
5. Centrifuga MPW 223e (Medical Instruments, EU);
6. Mješalica IKA MS 3 Vortexer (IKA Werke GmbH, Staufen, Njemačka);
7. Ostali pribor: pipete, nastavci, epruvete, pH trakice, filter papirići (Eppendorf, Njemačka).

Postupak:

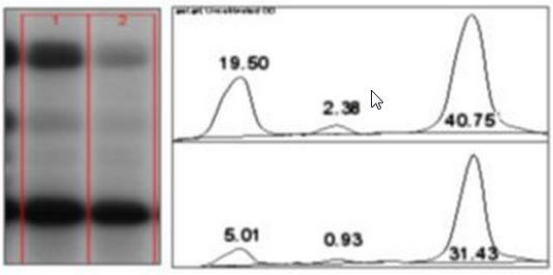
Za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu koristili smo napon od 30 V (200 mA), u trajanju od 60 minuta i u puferu za prijenos proteina na pH 7,2. Prije uporabe, u ovaj smo pufer dodali metanol do konačnog volumena od 10 %. Pri prijenosu proteina na nitroceluloznu membranu upotrijebili smo *antioksidant NuPAGE*. Membranu smo najprije inkubirali nemasnim mlijekom čime smo spriječili vezanje nespecifičnih proteina. Potom smo je inkubirali sa specifičnim protutijelom na odabrani protein u trajanju od dva sata na temperaturi od 22 ^{0}C, u puferu TBST. Pri tome smo koristili razrjeđenja protutijela prema uputama proizvođača (SAHH 1:500, hnRNP-A1 1:1000, PABP-1 1:1000). Za selektivno obilježavanje proteina koristili smo protutijelo na metilacijom modificiran arginin u asimetričnom obliku (aDMA, ASYM24, Millipore, SAD) (tablica 1). Potom smo nitroceluloznu membranu inkubirali sa sekundarnim protutijelom u razrjeđenju od 1:2000, u trajanju od 60 minuta na temperaturi 22 ^{0}C uz miješanje u puferu TBST. Nakon toga smo membranu isprali puferom TBST u tri navrata, na temperaturi od 22 ^{0}C, u trajanju od 10 minuta uz miješanje kako bi uklonili nevezana sekundarna protutijela. Uslijedila je detekcija proteina pomoću supstrata ECL. Aktivnošću konjugiranih enzima na kraju postupka vizualizirali smo odabrani protein. Reakciju smo zaustavili nakon dostizanja odgovarajuće obojenosti, potom membranu osušili na sobnoj temperaturi i poslikali.

Tablica 1. Korištena protutijela.

Protutijela	Koncentracija	Porijeklo	Oznaka i proizvođač
Protutijela na ciljne proteine			
SAHH	1,63 mg/ml	miš	ab54733, Abcam ,UK
hnRNP-A1	2 mg/ml	miš	R9778, clone 4B10, Sigma Aldrich, SAD
PABP-1	1 mg/ml	miš	clone10E10, Millipore, SAD
Protutijelo na metilacijom modificiran arginin			
Asimetrični dimetilarginin	0,5 mg/ml	kunić	ASYM24, Millipore, SAD
Kontrolna protutijela (engl. *loading control*)			
Beta aktin	0,2 mg/ml	kunić	ab8227, Abcam ,UK
GAPDH	1 mg/ml	miš	ab9484, Abcam ,UK

4.8. Kvantifikacija detektiranog signala imunološki imobiliziranog proteina

Za kvantifikaciju detektiranog signala služili smo se programskom podrškom ImageJ 1.42q http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/ kojom se slika imunološki imobiliziranog proteina prevodi u krivulju kojoj se potom računa površina u arbitrarnim jedinicama (AU, engl. *Arbitrary Units*) (slika 15).



Slika 15. Kvantifikacija detektiranog signala imunološki imobiliziranog proteina. Lijevo - signal imunološki imobiliziranog proteina na membrani. Desno - krivulje odgovarajućih signala membrane i izračun njihovih površina.

4.9. Kulture fibroblasta

Nakon pristanka obaviještenih roditelja uspostavljene su kulture fibroblasta u sterilnim uvjetima, iz bioptata kože.

Instrumenti i laboratorijski pribor:

1. Sterilni kabinet s laminarnim protokom zraka Safemate 1.2 Bioair (EuroClone Division, Italija);
2. CO_2-inkubator (Kambič Laboratorijska oprema, Slovenija);
3. Invertni mikroskop s faznim kontrastom Olympus IX50-S8F2 (Olympus Optical CO LTD, Japan);
4. Sterilne bočice s filtrom za uzgoj adherentnih stanica, 25 i 75 cm^2 (TPP, Švicarska);
5. Sterilne plastične epruvete za zamrzavanje suspenzije fibroblasta od 2 ml (Sigma Aldrich, SAD);
6. Sterilne pipete od 5 i 10 ml (TPP, Švicarska);
7. Sterilne epruvete za centrifugiranje od 15 i 50 ml (Sigma Aldrich, SAD);
8. Sterilni kirurški instrumenti (Braun, Njamačka);
9. Sterilne pincete sa zakrivljenim i tupim vrhom (Weck Closure Systems, NC, SAD);
10. Sterilni kirurški instrumenti i „punch“ igla promjera 4 mm za biopsiju kože (Stiefel Laboratories, SAD);
11. Filteri Millipore 0,2 μm (Merck Milipore, SAD);
12. Pipetori (Hirschmann, Eberstat, Njemačka);
13. Sterilne pipete (Hirschmann, Eberstat, Njemačka);
14. Sterilno stakleno posuđe - bočice s čepom od 500 ml, čaše raznih veličina (TPP, Švicarska);
15. Sterilne Petrijeve posudice od 60 i 100 mm (TPP, Švicarska);
16. Sterilne rukavice Sempermed (Semperit, Austrija);
17. Sterilni medicinski ogrtači (Mediplan, Hrvatska);
18. Maske za jednokratnu upotrebu (Hygiene, Kina);
19. Aspirator (TPP, Švicarska);
20. Plamenik (TPP, Švicarska);
21. Pokrovna stakalca (TPP, Švicarska);
22. Hladnjak s temperaturom od +4 ^oC i -20 ^oC (Gorenje, Slovenija);
23. Hladnjak s temperaturom od -86 ^oC Heto-Ultra Freeze (Heto-Holten, Danska);
24. Spremnik s tekućim dušikom na temperaturi od -186 ^oC Taylor-Wharton 35WHC (Assistent, SAD).

Mediji i kemikalije:

1. Medij za transport (Quantum, PAA Laboratories, Austrija);
2. Medij za uzgoj (Kompletan medij za rast fibroblasta s L-glutaminom, Quantum, PAA Laboratories, Austrija);
3. Pufer PBS - fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffer Saline, Dulbecco's PBS*, PAA Laboratories, Austrija);
4. Otopina tripsin-EDTA (0.25 % tripsina i 0.02 % EDTA, Sigma-Aldrich, SAD);
5. FBS - fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovin Serum*, Life Technologies, SAD);
6. L-glutamin (200 mM, Sigma-Aldrich, SAD);
7. Otopina ABAM (engl. *Antibiotic/Antymicotic Solution Penicilin-Streptomycin-Neomycin* 5000 IJ, Sigma-Aldrich, SAD);
8. Puref DPBS-CMF - Dulbekov fosfatni pufer bez iona Ca^{+2} i Mg^{+2}, (engl. *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline Calcium and Magnesium Free,* PAA Laboratories, Austrija);
9. Otopina 0.9 % NaCl - fiziološka otopina (Braun, Njemačka);
10. Alkohol za dezinfekciju ruku Skinman complete (Ecolab GmbH, Njamačka);
11. Tripansko modrilo (Sigma-Aldrich, SAD).

Postupci

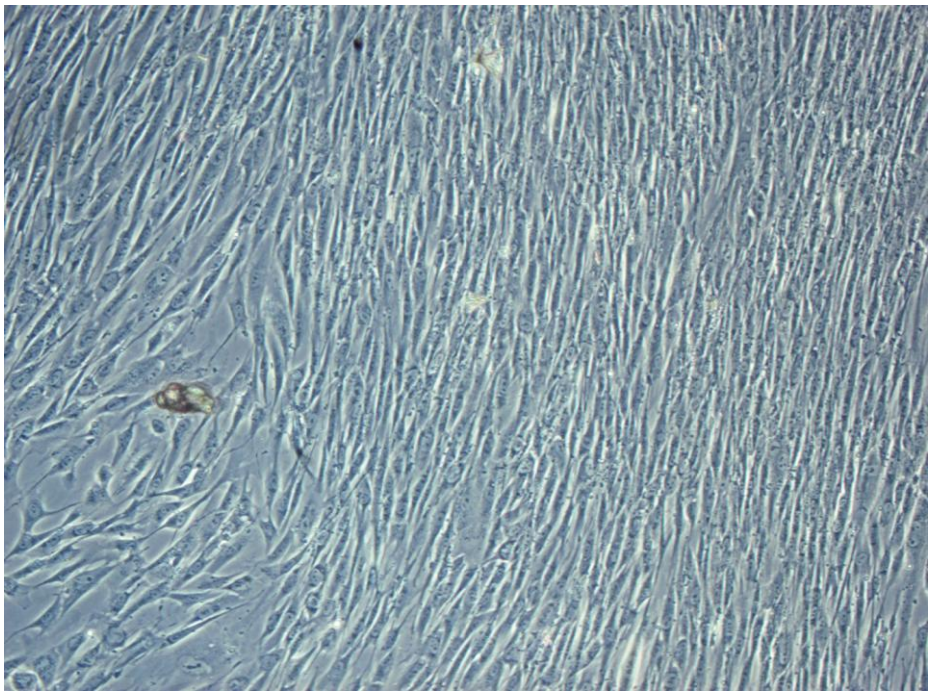
Postupak biopsije kože - nakon pripreme i pranja kože s alkoholom i ispiranja s 250 ml 0.9 % NaCl, uzorci kože su, u sterilnim uvjetima, uzeti s područja glutealne regije „punch" iglom za biopsiju promjera 4 mm u Specijalističkom zavodu za bolesti metabolizma.

Transport uzoraka - budući da se brzina i potencijal dijeljenja fibroblasta s vremenom smanjuju, uzorci kože su uronjeni u transportni medij Quantum na sobnoj temperaturi i žurno otpremljeni u Kliničku jedinicu za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Postupak uspostave primarne kulture fibroblasta - uzorci kože su u sterilnim uvjetima najprije isprani u Petrijevoj posudici s 5 ml otopine PBS te potom usitnjeni sterilnim kirurškim instrumentima do komadića $\leq$ 2 mm. Dobiveni komadići kože su sterilnom pipetom jednakomjerno razdijeljeni u bočicu za kultivaciju i uzgoj adherentnih stanica s filterom veličine 25 cm^2 bez dodatka medija, u trajanju od 10 minuta. Nakon što su se komadići uzorka kože učvrstili o dno bočice, dodan je medij za uzgoj stanica Quantum. Uzorci su potom pohranjeni u CO_2-inkubatoru na temperaturi od 37 ^{0}C uz 5 % CO_2. Nakon tri do četiri dana, uspostavljena je primarna kultura fibroblasta te je, po prvi puta, promijenjen medij za uzgoj stanica koji je nakon toga mijenjan svaki treći dan. Navedenim postupkom, stanice fibroblasta su se primjereno umnožavale i bile pričvršćene o podlogu bočice za uzgoj.

Postupak održavanja rasta kulture i uspostave subkulture fibroblasta - da bi stanice pričvršćene o podlogu bočice za uzgoj fibroblasta održale sposobnost proliferacije, redovno su subkultivirane. Idealno vrijeme za uspostavu subkulture odredili smo pomoću invertnog mikroskopa s

faznim kontrastom na način da smo pratili izgled i konfluenciju fibroblasta u bočici za uzgoj. U trenutku kada je konfluentnost primarne kulture dosegla 70-80 % (slika 14), što je prosječno uslijedilo sedmog do desetog dana od početka uzgoja, stanice su tripsinizirane te je uspostavljena subkultura fibroblasta.



Slika 16. Fibroblasti u konfluenciji od 70-80 %, pod invertnim mikroskopom s faznim kontrastom.

Za raskidanje međustaničnih i veza između stanica i podloge bočice koristili smo otopinu tripsin-EDTA. Najprije smo otopinu tripsin-EDTA ugrijali na temperaturu od 37 ^{0}C, potom sterilnom pipetom uklonili postojeći medij, isprali stanice s 5 ml otopine PBS, dodali 3 ml otopine tripsin-EDTA te bočicu pohranili u CO_2-inkubator na temperaturu od 37 ^{0}C uz 5 % CO_2 u trajanju od tri minute. Ukoliko su se stanice nakon inkubacije s otopinom tripsin-EDTA odvojile od podloge, što smo provjeravali pregledom pod invertnim mikroskopom s faznim kontrastom, dodali smo 5 ml medija Quantum za prekidanje djelovanja otopine tripsin-EDTA, potom bočicu s uzorkom centrifugirali na 1100 okretaja u minuti u trajanju od pet minuta, nadtalog odstranili, a talog stanica sterilnom pipetom jednakomjerno raspodijelili u nove bočice za uzgoj, ovaj put veličine 75 cm^2. Ukoliko smo pregledom pod invertnim mikroskopom s faznim kontrastom procijenili da se stanice nisu odvojile od podloge, bočicu za uzgoj smo dodatno pohranili u CO_2-inkubator na temperaturu od 37 ^{0}C uz 5 % CO_2 u trajanju od minutu do dvije. Nakon ponovljene inkubacije u svim kulturama su stanice bile odvojene od podloge. Nakon toga je slijedio isti, gore naveden postupak. Označene odgovarajućim brojem, bočice za uzgoj fibroblasta smo pohranili u CO_2-inkubator na temperaturu od 37 ^{0}C uz 5 % CO_2. Fibroblaste smo, svaka 24 sata, pregledavali pod invertnim mikroskopom s faznim

kontrastom kako bismo procijenili njihovu vitalnost, konfluentnost te odredili vrijeme uspostave slijedeće subkulture.

Određivanje broja fibroblasta pojedinih kultura i njihovo usklađivanje - suspenziju fibroblasta obojili smo tripanskim modrilom. Kap obojene suspenzije kapnuli smo u Neubauerovu komoricu i poklopili pokrovnim stakalcem. Prebrojali samo žive fibroblaste kojima stanična membrana nije bila oštećena, odnosno, one koji nisu pomodrili. Prije uspostave subkulture, broj živih fibroblasta u suspenziji smo prilagodili dodatkom medija do željene koncentracije od oko $2x10^6$ fibroblasta po kulturi odnosno $3\text{-}5x10^4$ po cm^2. Na taj smo način uskladili broj fibroblasta svih kultura.

Pohranjivanje fibroblasta - nakon uzgoja, a prije predviđenih mjerenja, fibroblaste smo pohranili u mediju za zaleđivanje na način da su najprije osam sati pohranjeni na temperaturi od -86 ^oC, a zatim u tekućem dušiku na temperaturi od -186 ^oC.

4.10. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podatata služili smo se deskriptivnom statistikom i neparametrijskim metodama. Za razlike u kvantitativnim vrijednostima među uzorcima koristili smo Studentov t-test, Mann-Whitney U-test, F-test i Wilcoxonov test. P-vrijednost manju od 0,05 smatrali smo statistički značajnom. Za izradu grafova i statističku analizu koristili smo programsku podršku GraphPad Prism, Statistica v8.0 i SPSS (GraphPad, San Diego, California, SAD; StatSoft, Inc., SAD; Softonic International S.L. Barcelona, Španjolska). Rezultate smo prikazali tablično i grafički.

REZULTATI

5. REZULTATI

5.1. Utjecaj povišene koncentracije S-adenozilhomocisteina, S-adenozilmetionina i patološki niskog metilacijskog indeksa na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$

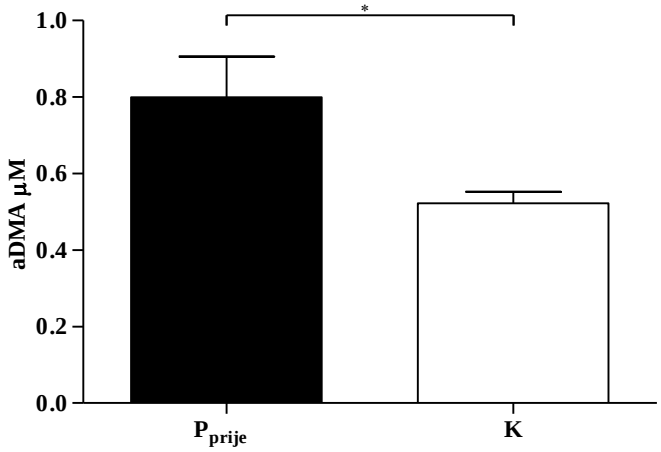
Istražili smo da li je i na koji je način promijenjena koncentracija asimetričnog dimetilarginina (aDMA) u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ zbog patološki niskog metilacijskog indeksa. Budući da aDMA nastaje razgradnjom metiliranih proteina, rezultati mjerenja koncentracije tog spoja pružili su nam neizravan uvid u katabolizam dismetiliranih proteina, u uvjetima patološki niskog metilacijskog indeksa zbog nedostatne aktivnosti enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (tablica 2).

Tablica 2. Srednje vrijednosti koncentracija AdoMet, AdoHcy i MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije i nakon uvođenja liječenja dijetom siromašnom metioninom, u usporedbi s kontrolom.

Srednje vrijednosti	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**	**K1**	**K2**	**K3**	**K4**
AdoMet *Broj mjerenja (referentna vrijednost 77-109 nM)*	*4*	*4*	*4*	*4*	*2*	*2*	*2*	*2*
Prije liječenja	2971	220	196	1530	92	109	109	78
Nakon liječenja	738	114	109	6321	99	92	92	109
AdoHcy *Broj mjerenja (referentna vrijednost 15-45 nM)*	*4*	*4*	*4*	*4*	*2*	*2*	*2*	*2*
Prije liječenja	5044	259	292	1900	17	15	15	43
Nakon liječenja	971	56	67,5	1443	16	17	17	15
Metilacijski indeks (AdoMet/AdoHcy)								
Prije liječenja	0,59	0,84	0,67	0,8	5,4	7,3	7,3	1,8
Nakon liječenja	0,76	2,03	1,6	4,3	6,2	5,4	5,4	7,3
Promjena MI	**+1,29**	**+2,42**	**+2,39**	**+5,38**	**+1,15**	**-1,35**	**-1,35**	**+4,05**

P1-P4, pacijenti $^{Y143C}SAHH_{W112X}$; K1-K4, kontrole. Napomena za kontrolne uzorke: ispitanici nisu bili na dijeti siromašnoj metioninom.

Patološki snižen metilacijski indeks u plazmi svih pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ povezan je s povišenom koncentracijom aDMA u plazmi (tablice 2 i 3; slika 17).



Slika 17. Srednje vrijednosti koncentracija aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije uvođenja liječenja u usporedbi s kontrolom. Koncentracija aDMA u plazmi je statistički značajno viša u pacijenata u usporedbi s kontrolama (*Mann Whitney U-test P<0,05).

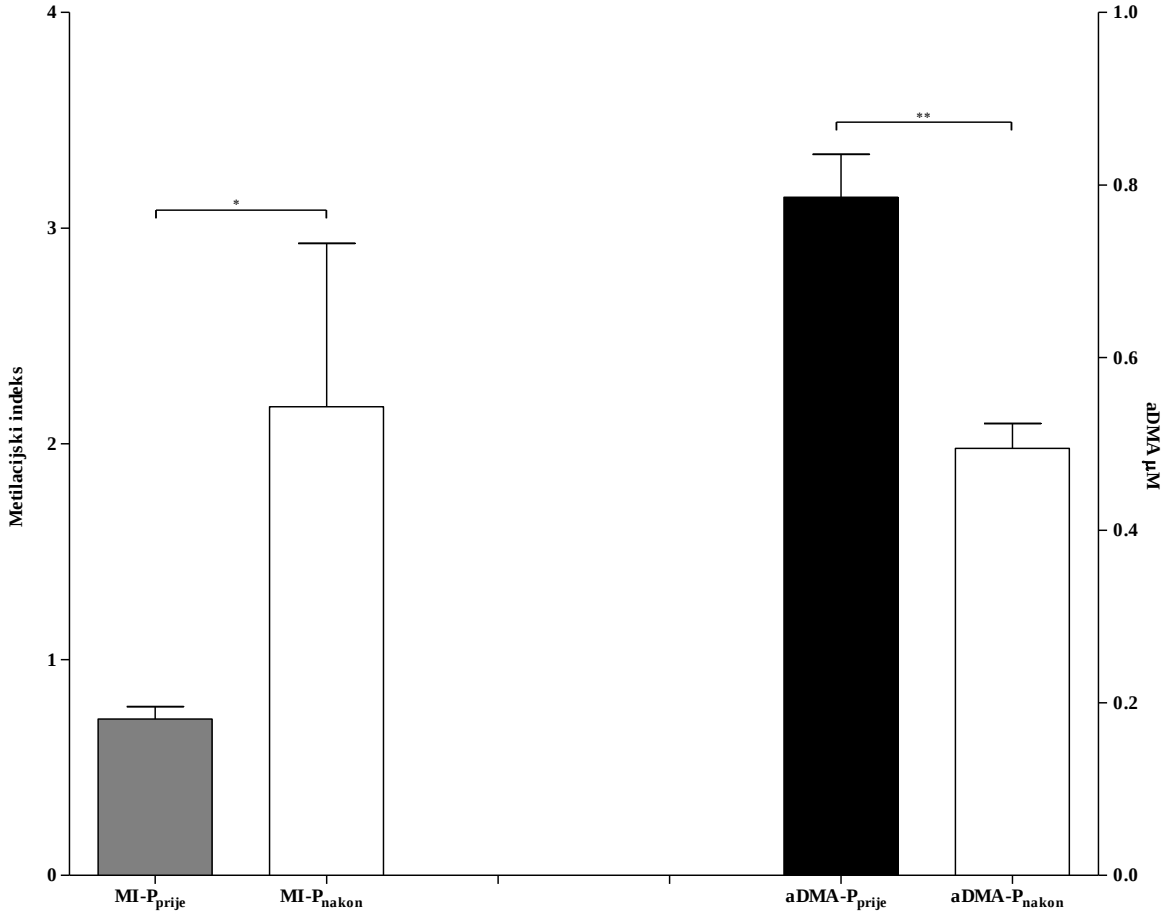
Tablica 3. Koncentracija aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije i nakon uvođenja liječenja dijetom siromašnom metioninom.

Koncentracija aDMA u plazmi (µM)	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**	**Referentna vrijednost** (µM)
Broj mjerenja	*5*	*2*	*2*	*3*	0,26-0,64
Prije liječenja	0,737	1,209	0,630	0,806	
	0,755	0,993	0,581	0,660	
	0,799	-	-	0,690	
	0,726	-	-	-	
	0,845	-	-	-	
Srednja vrijednost	***0,772***	***1,101***	***0,606***	***0,719***	
Broj mjerenja	*3*	*3*	*3*	*3*	
Nakon liječenja	0,504	0,523	0,214	0,504	
	0,636	0,460	0,458	0,560	
	0,520	0,520	0,535	0,503	
Srednja vrijednost	***0,553***	***0,501***	***0,402***	***0,522***	
Promjena u koncentraciji aDMA, nakon uvođenja liječenja dijetom	**-1.4**	**-2,2**	**-1,51**	**-1,38**	
aDMA u plazmi (*srednja vrijednost*)	**K1**	**K2**	**K3**	**K4**	
Broj mjerenja	*2*	*2*	*2*	*2*	
„Prije liječenja“	***0,524***	***0,480***	***0,480***	***0,606***	
Broj mjerenja	*2*	*2*	*2*	*2*	
„Nakon liječenja“	***0,512***	***0,524***	***0,524***	***0,480***	
Omjer aDMA (oboljeli/zdravi)	**P1/K1**	**P2/K2**	**P3/K3**	**P4/K4**	
Prije liječenja	***1,47***	***2,29***	***1,26***	***1,19***	
Nakon liječenja	***1,08***	***0,96***	***0,77***	***1,08***	

P1-P4, pacijenti; K1-K4, kontrole.

5.2. Utjecaj liječenja dijetom siromašnom metioninom na metilacijski indeks i koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$

Uvođenje liječenja dijetom siromašnom metioninom povezano je sa statistički značajnim povećanjem metilacijskog indeksa u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (promjena MI u plazmi od +1,29 do +5,38; srednja vrijednost promjene +2.97; P<0,05) (tablica 2 i 4; slika 18). Oporavak, odnosno povećanje, metilacijskog indeksa u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ povezano je sa statistički značajnim sniženjem koncentracije aDMA (promjena koncentracije aDMA u plazmi od -1,4 do -2,2; srednja vrijednost promjene -1,62; P<0,05) (tablica 3 i 4; slika 18).

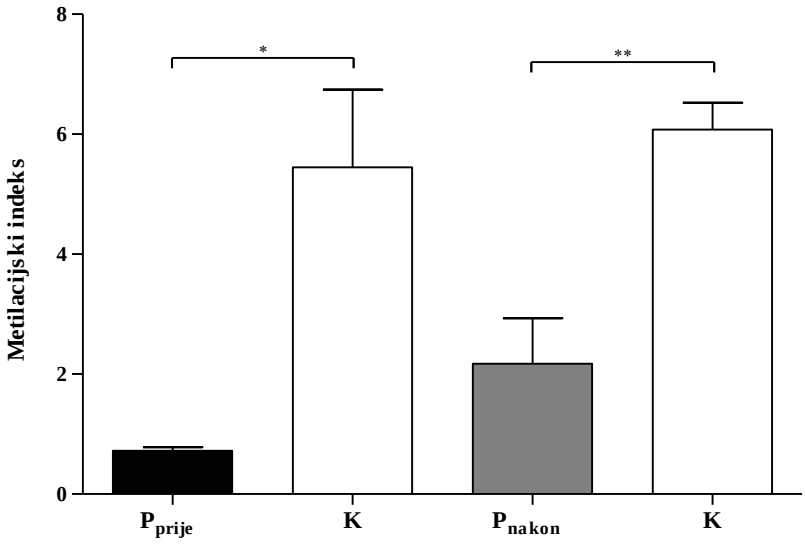


Slika 18. Srednje vrijednosti metilacijskog indeksa u plazmi (MI-P_{prije}) i koncentracija aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije (aDMA-P_{prije}) i nakon (MI-P_{nakon} i aDMA-P_{nakon}) uvođenja liječenja dijetom siromašnom metioninom. Nakon uvođenja liječenja, MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno viši u usporedbi s razdobljem prije početka liječenja (*F-test P<0,05), dok je koncentracija aDMA statistički značajno niža (**Mann Whitney U-test P<0,05). U plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je porast MI povezan sa sniženjem koncentracije aDMA.

Tablica 4. Srednje vrijednosti za sve ispitanike: aDMA (plazma) i MI, na temelju omjera koncentracija AdoMet/AdoHcy, u plazmi.

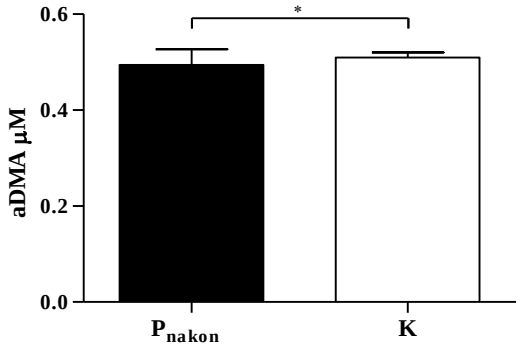
Plazma	**Pacijenti $^{Y143C}SAHH_{W112X}$**		**Kontrole**		**Referentna vrijednost aDMA** (μM)
Broj mjerenja	*16*	*24*	*8*	*8*	0,26-0,64
	MI	**aDMA** (μM)	**MI**	**aDMA** (μM)	
Prije liječenja	0,73	0,800	5,45	0,522	
Nakon liječenja	2,17	0,494	6,07	0,51	
PROMJENA:	**+2,97**	**-1,62**	**+1,11**	**-1,02**	

Metilacijski indeks u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno manji u usporedbi s MI u plazmi kontrola, prije uvođenja liječenja (P<0,05) (slika 19). Unatoč liječenju, koje je povezano sa značajnim povećanjem MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, taj parametar je, i nakon uvođenja liječenja, statistički značajno manji u usporedbi s MI u plazmi kontrola (P<0,05) (slika 19).



Slika 19. Srednje vrijednosti metilacijskog indeksa u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije (P_{prije}) i nakon (P_{nakon}) uvođenja liječenja, u usporedbi s kontrolama (K). Mjereno u plazmi, MI u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno manji u usporedbi s MI u kontrola prije (*Studentov t-test P<0,05), i nakon uvođenja liječenja (**Studentov t-test P<0,05).

Uvođenje liječenja dijetom siromašnom metioninom povezano je sa snižavanjem koncentracije aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, do dosezanja referentne vrijednosti (tablica 4). Nakon uvođenja liječenja, koncentracija aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ se značajnije ne razlikuje u odnosnu na koncentraciju aDMA u plazmi kontrola (P=0,885) (slika 20).



Slika 20. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nakon uvođenja liječenja dijetom siromašnom metioninom (P_{nakon}), u usporedbi s kontrolama (K). Ne postoji statistički značajna razlika (*Mann Whitney U-test P=0,885).

5.3. Analize u eksperimentalnom modelu fibroblasta *in vitro*

Budući da je bolest zbog manjka S-adenozilhomocistein hidrolaze tek nedavno otkrivena i da se u nas, zasada, liječi samo četvero djece s potvrđenom bolešću, uspostavili smo kulture fibroblasta kao eksperimentalni model *in vitro*, pogodan za daljnje istraživanje. Prikazujemo rezultate analize fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, kontrolnih fibroblasta i medija u nativnim uvjetima - bez, i s dodatkom AdoMet (2,5 mM) i AdoHcy (0,3 mM) u trajanju od 24 sata.

5.3.1. Metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastim te usporedna analiza s vrijednostima u plazmi

Za računanje metilacijskog indeksa koristimo se koncentracijama AdoMet i AdoHcy u plazmi. Tijek transmetilacijskih reakcija određuje MI u stanici. Stoga je važno poznavati omjer između MI u fibroblastima i plazmi.

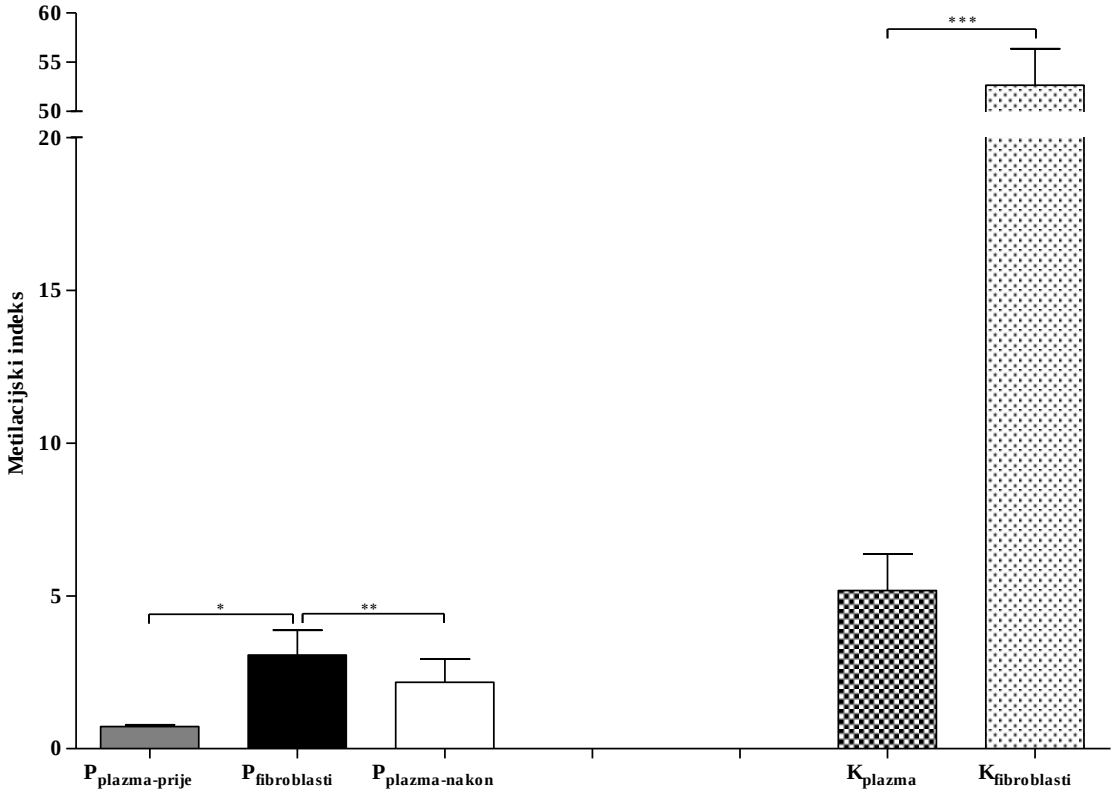
Prije uvođenja liječenja, metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je četiri puta veći od MI u plazmi, koji rutinski mjerimo u pacijenata s nedostatnom aktivnošću SAHH (omjer srednjih vrijednosti $MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}prije}$ = 4,23; P<0,05) (tablica 5; slika 21). Uvođenje liječenja je dovelo do znatnog smanjenja omjera srednjih vrijednosti ($MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}nakon}$ = 2,12) (tablica 5). Nakon uvođenja liječenja, MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nije se statistički razlikovao od MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P=0,485) (slika 21).

Mjereno u kontrola, srednja vrijednost MI u plazmi (5,16) se statistički značajno razlikuje u usporedbi sa srednjom vrijednošću MI u fibroblastima (52,9) (P<0,05) (tablica 2 i 6; slika 21). Srednja vrijednost omjera metilacijskog indeksa fibroblasti/plazma u kontrola (kontrolni $MI_{fibroblasti}/MI_{plazma}$ = 10,3) je dva i pol puta veća od srednje vrijednosti omjera MI u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}prije}$ = 4,23).

Tablica 5. Srednje vrijednosti i omjeri metilacijskog indeksa (MI) u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije ($MI_{plazma\text{-}prije}$) i nakon uvođenja liječenja ($MI_{plazma\text{-}nakon}$), u usporedbi s fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy.

Pacijenti	$MI_{plazma\text{-}prije}$	$MI_{plazma\text{-}nakon}$	$MI_{fibroblasti}$	Omjer $MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}prije}$	Omjer $MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}nakon}$
P1	0,59	0,76	3,40	5,76	4,47
P2	0,84	2,03	5,22	6,21	2,57
P3	0,67	1,60	1,45	2,16	0,91
P4	0,80	4,30	2,22	2,78	0,52
Srednje vrijednosti:	***0,73***	***2,17***	***3,06***	***4,23***	***2,12***
PROMJENA nakon liječenja:	**+2,97***		**-**	**-1,99****	

*Promjena metilacijskog indeksa u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nakon uvođenja liječenja.
**Promjena omjera metilacijskog indeksa fibroblasti/plazma pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nakon uvođenja liječenja.



Slika 21. Srednje vrijednosti metilacijskog indeksa u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije ($P_{plazma\text{-}prije}$) i nakon ($P_{plazma\text{-}nakon}$) uvođenja liječenja, u usporedbi s fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P_{fibroblasti}$) te srednje vrijednosti MI u plazmi (K_{plazma}), u usporedbi s kontrolnim fibroblastima ($K_{fibroblasti}$). MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno manji prije uvođenja liječenja, u usporedbi s MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (*Mann Whitney U-test P<0,05). Mjereno nakon uvođenja liječenja, ne postoji statistički značajna razlika. (**Mann Whitney U-test P=0,485). Mjereno u kontrola, MI u plazmi (K_{plazma}) se statistički značajno razlikuje u usporedbi s fibroblastima ($K_{fibroblasti}$) (***Mann Whitney U-test P<0,05).

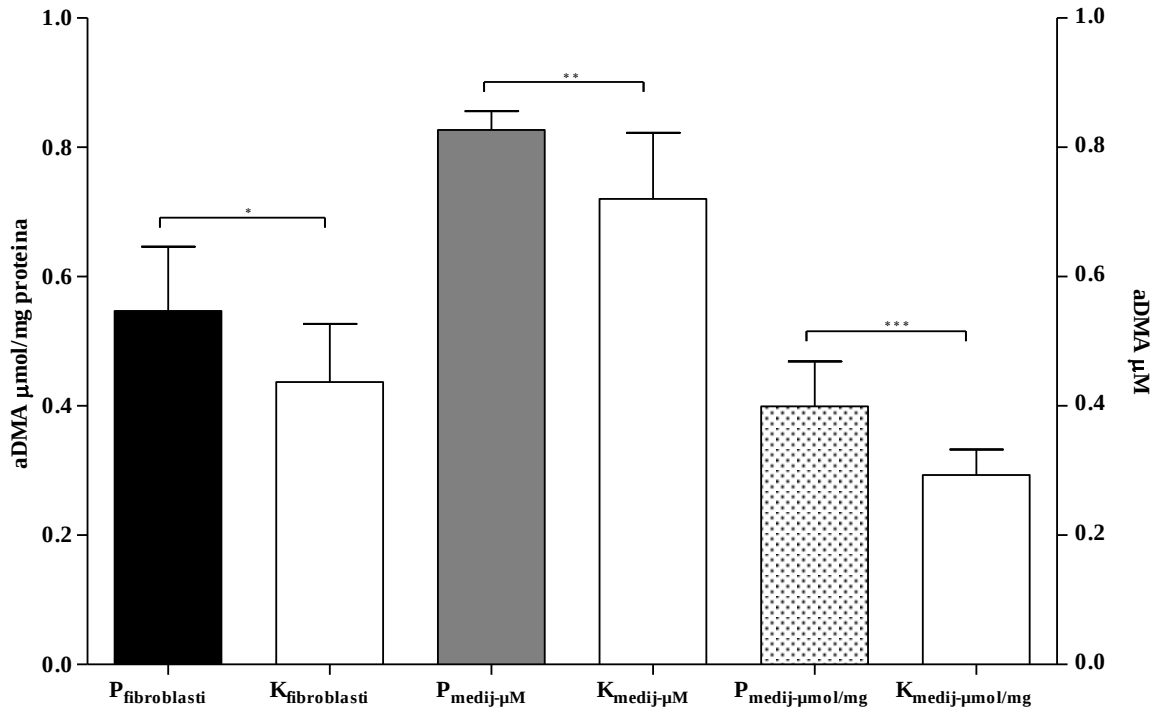
5.3.2. Metilacijski indeks i koncentracija asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy

Srednje vrijednosti koncentracije aDMA i u mediju, i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ su povišene u usporedbi s kontrolama u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy (tablica 6), ali se ta razlika nije pokazala statistički značajnom u ovom modelu (slika 22). Ovakav rezultat može biti posljedica neuspješnog uzgoja jedne linije fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P3F), što je dodatno ograničilo broj uzoraka.

Tablica 6. Srednje vrijednosti metilacijskog indeksa (MI) i koncentracije aDMA u fibroblastima, aDMA (F) (μmol/mg proteina), i mediju - M1 (μM) i M2 (μmol/mg proteina).

	P1F	**P2F**	**P4F**	***Srednja vrijednost***	**K1F**	**K2F**	**K4F**	***Srednja vrijednost***
Nativni uvjeti - bez dodatka AdoMet/AdoHcy								
MI	3,40	5,22	2,22	***3,61***	50	48,70	60	***52,9***
aDMA (F)	0,351	0,618	0,672	***0,547***	0,273	0,452	0,585	***0,436***
aDMA (M1)	0,774	0,834	0,873	***0,827***	0,520	0,785	0,856	***0,720***
aDMA (M2)	0,336	0,538	0,324	***0,399***	0,266	0,371	0,243	***0,293***
***+ AdoMet** **								
MI	1,10	2,29	1,80	***1,73***	4,95	10,70	6,30	***7,3***
aDMA (F)	0,201	0,300	0,594	***0,365***	0,098	0,203	0,019	***0,106***
aDMA (M1)	0,706	0,567	0,809	***0,694***	0,479	0,633	0,539	***0,550***
aDMA (M2)	0,250	0,442	0,205	***0,299***	0,193	0,323	0,143	***0,220***
***+ AdoHcy** ***								
MI	0,67	0,50	1,45	***0,87***	1,22	0,24	2,90	***1,45***
aDMA (F)	0,140	0,189	0,175	***0,168***	0,058	0,138	0,042	***0,079***
aDMA (M1)	0,489	0,358	0,547	***0,464***	0,332	0,593	0,417	***0,447***
aDMA (M2)	0,205	0,303	0,122	***0,210***	0,154	0,179	0,120	***0,151***

P1F, P2F, P4F, fibroblasti $^{Y143C}SAHH_{W112X}$; K1F, K2F, K4F, kontrolni fibroblasti. Nismo uspjeli uzgojiti subkulture P3F do broja i koncentracije proteina koji su bili dovoljni za nastavak istraživanja.
*AdoMet: 2,5 mM/24^h
**AdoHcy: 0,3 mM/24^h



Slika 22. Srednje vrijednosti koncentracija aDMA u mediju i fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P_{fibroblasti}$, P_{medij}), u usporedbi s kontrolom ($K_{fibroblasti}$, K_{medij}) u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy. U mediju i fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je koncentracije aDMA viša u usporedbi s kontrolnim fibroblastima, ali ta razlika nije statistički značajna (Studentov t-test *P=0,457; **P=0,372; ***P=0,254).

5.3.3. Utjecaj dodavanja AdoMet i AdoHcy na metilacijski indeks u fibroblastima *in vitro*

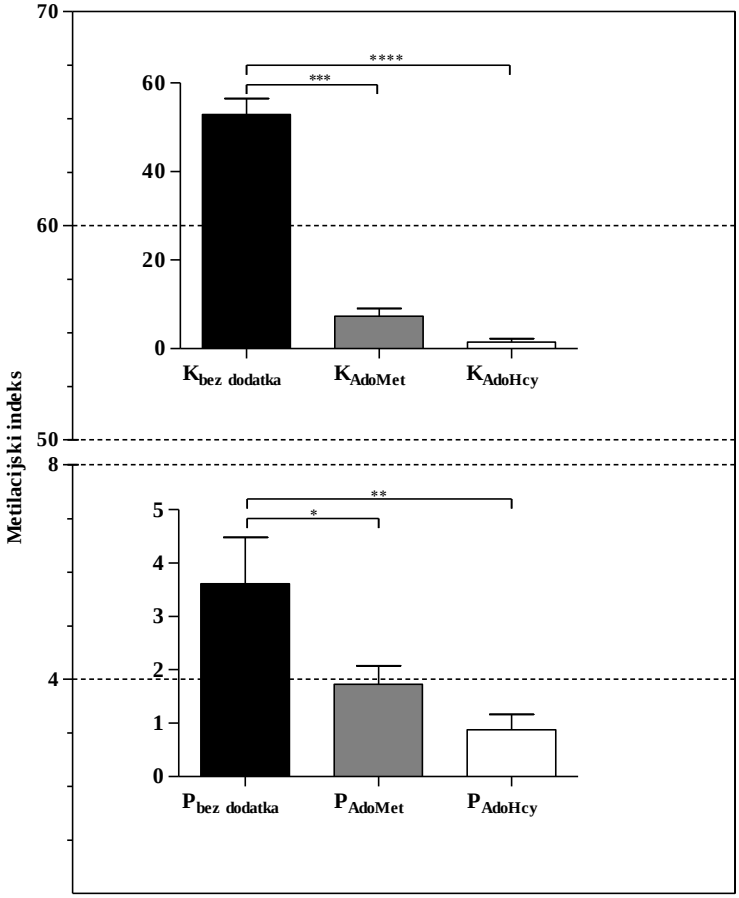
Na uzorku od tri kulture fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nismo uspjeli dokazati statistički značajnu razliku u koncentraciji aDMA, u usporedbi s kontrolnim fibroblastima u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy. Stoga smo te spojeve, koji snizuju MI, dodali u nastavku istraživanja u konačnoj koncentraciji od 2,5 mM (AdoMet) i 0,3 mM (AdoHcy), u trajanju od 24 sata.

U nativnim uvjetima, bez dodavanja AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (3,61) je statistični značajno niži (14,7 x) u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (52,9) ($P<0,05$) (tablica 6, slika 23).

Nakon dodavanja AdoMet, metilacijski se indeks statistički značajno snizio u kontrolnim fibroblastima ($P<0,05$), dok statistički značajno sniženje u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nije postojalo ($P=0,115$) (tablica 6, slika 23).

Nakon dodavanja AdoHcy, metilacijski indeks se statistički značajno snizio i u kontrolnim, i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P<0,05$) (tablica 6, slika 23).

Nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks u kontrolnim fibroblastima je dosegao vrijednosti MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$.



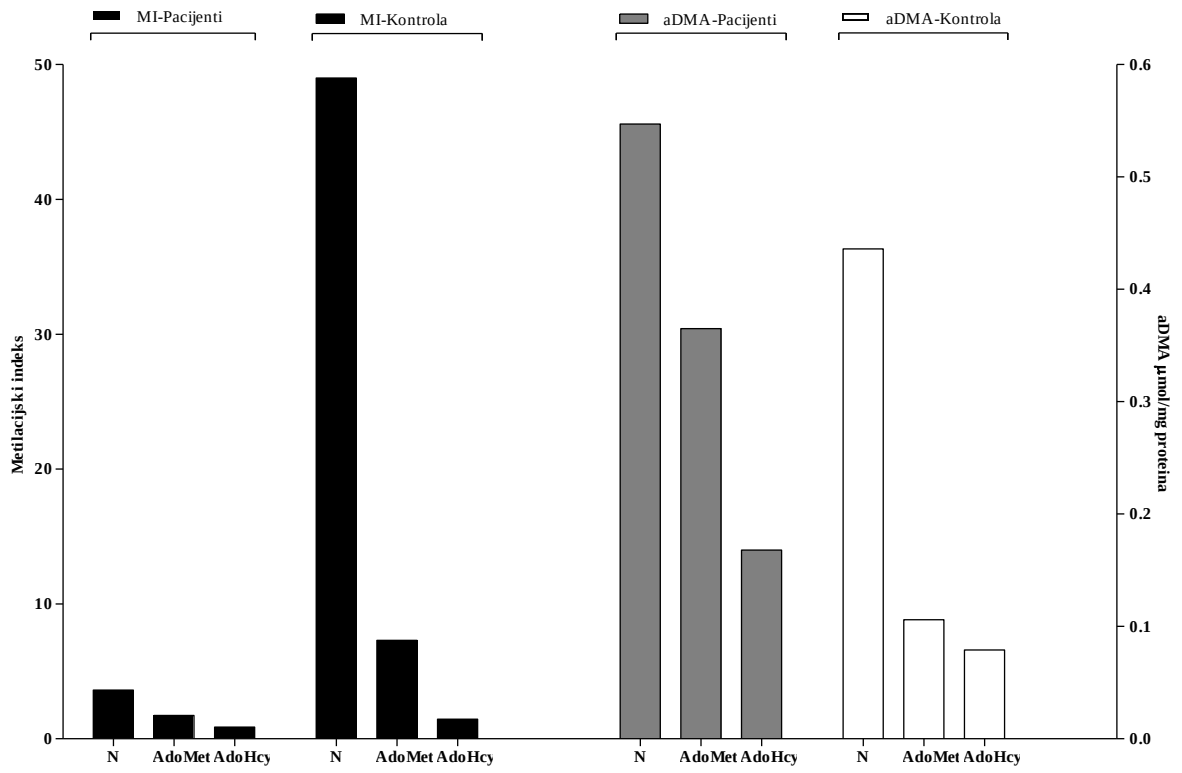
Slika 23. Srednje vrijednosti metilacijskog indeksa u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P) i kontrolnim fibroblastima (K) u uvjetima sa, i bez dodatka AdoMet i AdoHcy. Prije dodavanja AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statističi značajno niži (~15 x) u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (~60/4; Studentov t-test P<0,05). *Nakon dodavanja AdoMet, nije došlo do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (Studentov t-test, P=0,115). Do statistički značajnog smanjenja metilacijskog indeksa došlo je nakon dodavanja AdoHcy (**Mann Whitney U-test P<0,05). U kontrolnim je fibroblastima dodavanje i ***AdoMet, i ****AdoHcy dovelo do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa (Mann Whitney U-test P<0,05). Metilacijski indeks u kontrolnim fibroblastima je dosegao vrijednosti MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$.

5.3.4. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju

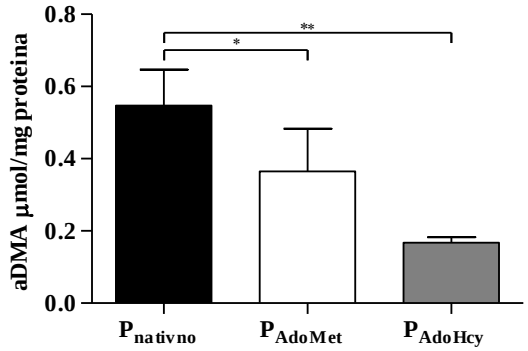
U uvjetima koji su doveli do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa, nakon dodavanja AdoHcy (P<0,05), izmjerili smo koncentraciju aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju.

Dodatak AdoHcy je doveo do statistički značajnog sniženja koncentracije aDMA i u mediju, i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P<0,05) (tablica 6, slike 24-27).

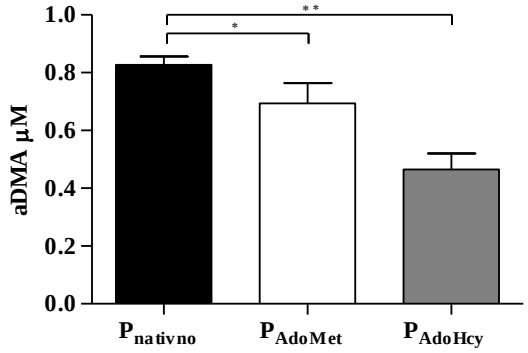
Nakon dodavanja AdoMet, ove razlike nije bilo ni u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P=0,303), ni i mediju (P=0,154, odnosno P=0,374) (tablica 6). Sveukupni prikaz ovih promjena prikazan je na slici 24, dok je detaljan prikaz promjena, vezano uz specifične parametre prikazan na slikama 25-27.



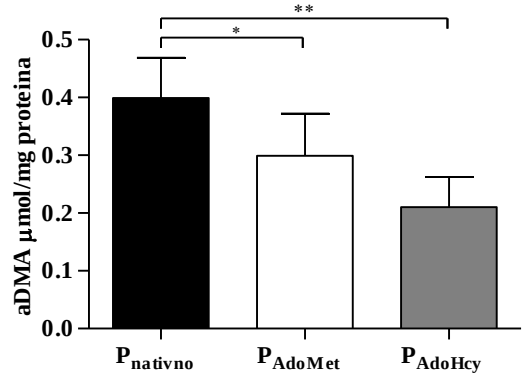
Slika 24. Srednje vrijednosti metilacijskog indeksa i koncentracije aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima u nativnim uvjetima bez (N), i uz dodatak AdoMet i AdoHcy. Metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je, uz dodatak AdoHcy, statistički značajno snižen (Mann Whitney U-test P<0,05). Metilacijski indeks u kontrolnim fibroblastima je, uz dodatak i AdoMet i AdoHcy, statistički značajno snižen (Mann Whitney U-test P<0,05). Patološki nizak metilacijski indeks uzrokovan dodatkom AdoHcy povezan je sa statistički značajno nižom koncentracijom aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ bez dodatka AdoHcy (Studentov t-test P<0,05). Nakon dodavanja AdoMet u medij fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, ova razlika nije postojala (Studentov t-test P=0,303). Patološki nizak metilacijski indeks, uzrokovan dodatkom i AdoMet i AdoHcy, povezan je sa statistički značajno nižom koncentracijom aDMA u kontrolnim fibroblastima (Studentov t-test P<0,05). U nativnim je uvjetima, patološki nizak metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ povezan s povišenom koncentracijom aDMA u usporedbi s koncentracijom aDMA u kontrolnim fibroblastima, ali ta razlika nije statistički značajna (Studentov t-test P=0,457). Uz dodatak AdoHcy, dodatno snižen metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ povezan je sa statistički značajno višom koncentracijom aDMA, u usporedbi s koncentracijom aDMA u kontrolnim fibroblastima s akutno sniženim metilacijskim indeksom (Studentov t-test P<0,05). Nakon dodavanja AdoMet, ova razlika nije postojala (Studentov t-test P=0,116).



Slika 25. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ bez ($P_{nativno}$) i uz dodatak AdoMet (P_{AdoMet}) i AdoHcy (P_{AdoHcy}). Sniženje metilacijskog indeksa dodatkom AdoHcy povezano je sa statistički značajno sniženom koncentracijom aDMA u ovim uzorcima (**Studentov t-test P<0,05). Ove razlike nije bilo nakon dodavanja AdoMet (*Studentov t-test P=0,303).



Slika 26. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u mediju fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u uvjetima bez ($P_{nativno}$) i uz dodatak AdoMet (P_{AdoMet}) i AdoHcy (P_{AdoHcy}). Sniženje metilacijskog indeksa dodatkom AdoHcy povezano je sa statistički značajno sniženom koncentracijom aDMA u ovim uzorcima (**Studentov t-test P<0,05). Ove razlike nije bilo nakon dodavanja AdoMet (*Studentov t-test P=0,154).



Slika 27. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u mediju fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, izražene u µmol/mg proteina, u uvjetima bez ($P_{nativno}$) i uz dodatak AdoMet (P_{AdoMet}) i AdoHcy (P_{AdoHcy}). Sniženje metilacijskog indeksa dodatkom AdoHcy povezano je sa statistički značajno sniženom koncentracijom aDMA u ovim uzorcima (**Studentov t-test P<0,05). Ove razlike nije bilo nakon dodavanja AdoMet (*Studentov t-test P=0,374).

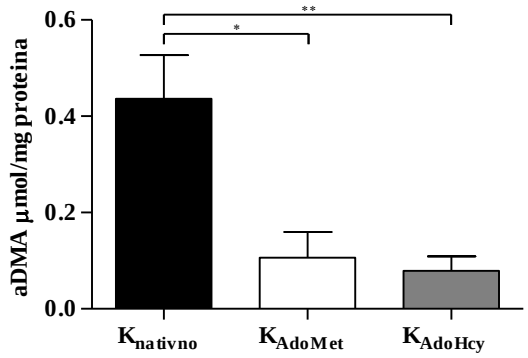
5.3.5. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u kontrolnim fibroblastima i mediju

U uvjetima koji su doveli do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa, nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy (P<0,05), izmjerili smo koncentraciju aDMA u kontrolnim fibroblastima i mediju.

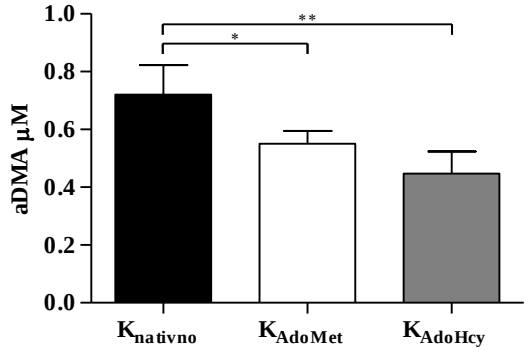
Koncentracija aDMA je statistički značajno niža u kontrolnim fibroblastima, u usporedbi s koncentracijom prije dodavanja i AdoMet i AdoHcy (P<0,05) (tablica 6, slike 24 i 28).

Koncentracija aDMA je niža i u mediju, u usporedbi s koncentracijom prije dodavanja AdoMet (P=0,202) i AdoHcy (P=0,099), ali ta razlika nije statistički značajna (tablica 6, slika 29).

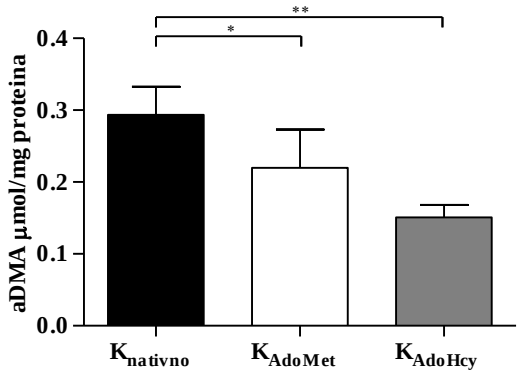
Izražena u μmol/mg proteina, koncentracija aDMA je statistički značajno niža u mediju kontrolnih fibroblasta, u usporedbi s koncentracijom prije dodavanja AdoHcy (P<0,05) (tablica 6, slika 30). Ove razlike nije bilo nakon dodavanja AdoMet (P=0,330) (tablica 6, slika 30).



Slika 28. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u kontrolnim fibroblastima bez ($K_{nativno}$) i uz dodatak AdoMet (K_{AdoMet}) i AdoHcy (K_{AdoHcy}). Sniženje metilacijskog indeksa dodatkom i AdoMet (*Studentov t-test P<0,05) i AdoHcy povezano je sa statistički značajno sniženom koncentracijom aDMA u ovim uzorcima (**Studentov t-test P<0,05).



Slika 29. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u mediju kontrolnih fibroblasta u nativnim uvjetima bez ($K_{nativno}$) i uz dodatak AdoMet (K_{AdoMet}) i AdoHcy (K_{AdoHcy}). Sniženje metilacijskog indeksa dodatkom AdoMet i AdoHcy povezano je sa sniženom koncentracijom aDMA u ovim uzorcima, ali ta razlika nije statistički značajna (Studentov t-test *P=0,202; **P=0,099).



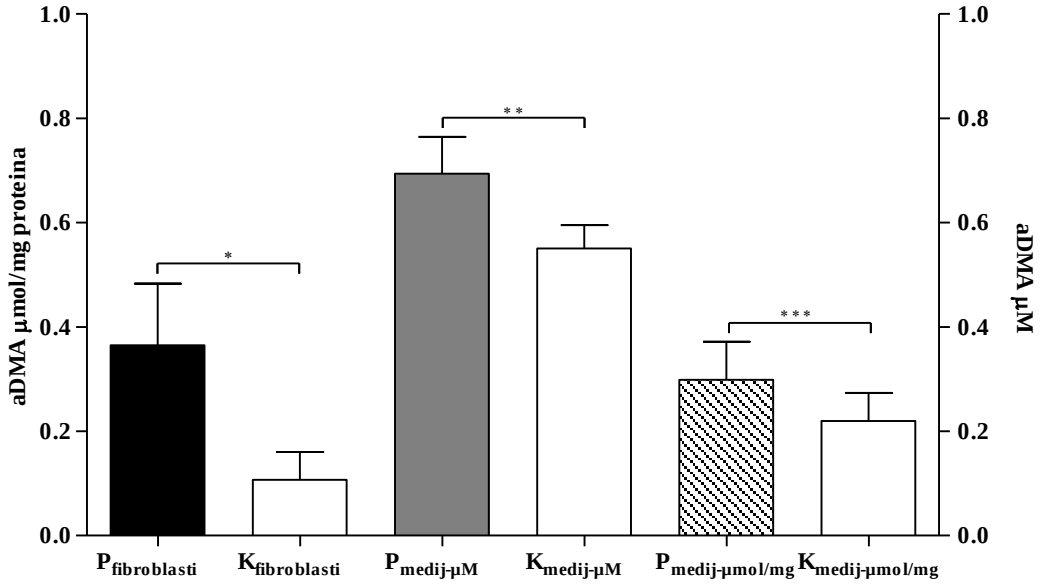
Slika 30. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u mediju kontrolnih fibroblasta, izražene u µmol/mg proteina, u nativnim uvjetima bez ($K_{nativno}$) i uz dodatak AdoMet (K_{AdoMet}) i AdoHcy (K_{AdoHcy}). Sniženje metilacijskog indeksa dodatkom AdoHcy povezano je sa statistički značajno sniženom koncentracijom aDMA u ovim uzorcima (**Studentov t-test P<0,05). Ove razlike nije bilo nakon dodavanja AdoMet (*Studentov t-test P=0,330).

5.3.6. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem

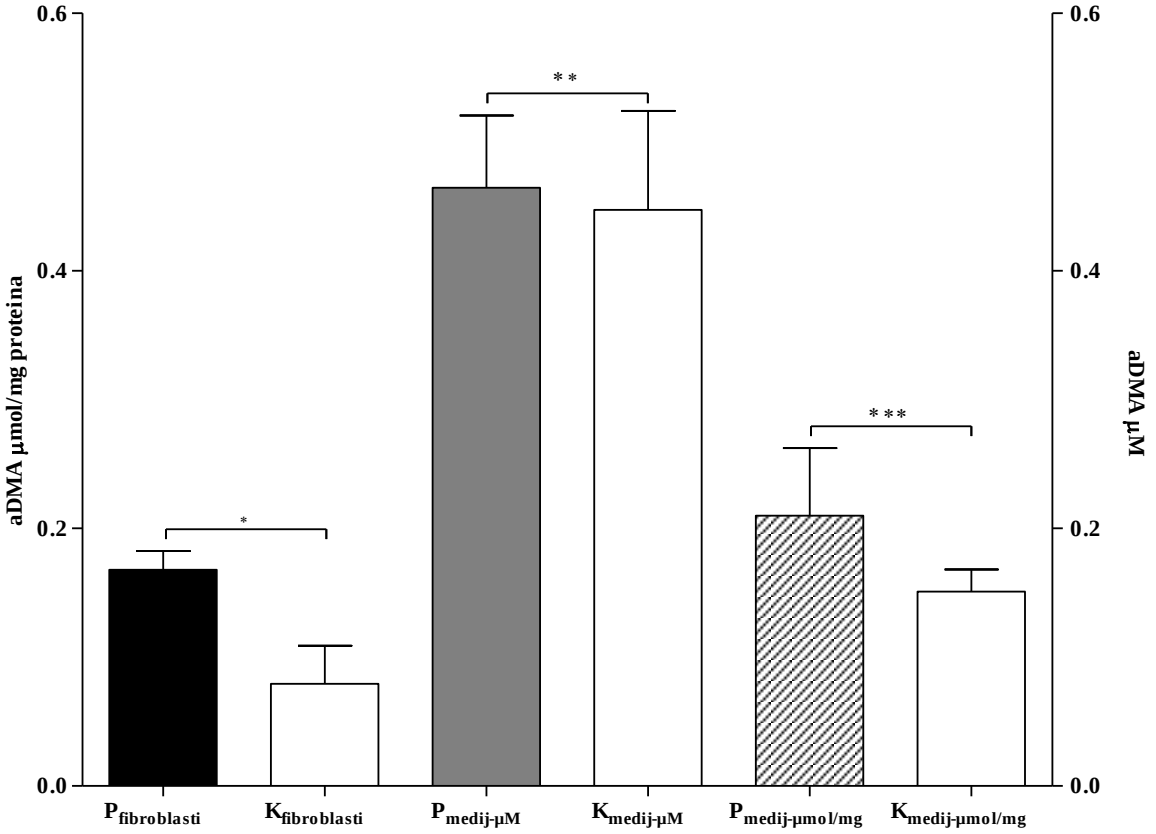
U uvjetima koji su doveli do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa, nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy (P<0,05), izmjerili smo koncentraciju aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju te usporedili vrijednosti s kontrolnim fibroblastima i medijem.

Nakon dodavanja AdoMet, koncentracija aDMA je viša u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P=0,116) i njihovom mediju (P=0,159; P=0,429) u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem, ali ta razlika nije statistički značajna (tablica 6, slika 31).

Nakon dodavanja AdoHcy, koncentracija aDMA je statistički značajno viša u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (P<0,05) (tablica 6, slika 32). U mediju, ova razlika nije postojala, bez obzira na način izračuna (P=0,864; P=0,344)) (tablica 6, slika 32).



Slika 31. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju ($P_{fibroblasti}$, P_{medij}), u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem ($K_{fibroblasti}$, K_{medij}) nakon dodavanja AdoMet. Koncentracija aDMA je viša u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju u usporedbi s kontrolnim fibroblastima, ali ta razlika nije statistički značajna (*Studentov t-test *P=0,116; **P=0,159; ***P=0,429).



Slika 32. Srednje vrijednosti koncentracije aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju ($P_{fibroblasti}$, P_{medij}) u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem ($K_{fibroblasti}$, K_{medij}) nakon dodavanja AdoHcy. Koncentracija aDMA je statistički značajno viša u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (*Studentov t-test P<0,05). U mediju, ova razlika nije postojala (Studentov t-test **P=0.864; ***P=0.344).

5.4. Utjecaj patološki niskog metilacijskog indeksa na posttranslacijsku metilaciju arginina odabranih proteina

Prethodno prikazanim rezultatima (analize u plazmi i eksperimentalnom modelu fibroblasta *in vitro*) je pokazano da je metabolizam aDMA, u okviru nedostatne aktivnosti SAHH, poremećen. Stoga je nastavak istraživanja bio usmjeren prema višefunkcionalnim proteinima čija bi funkcija mogla biti promijenjana u uvjetima patološki niskog MI.

5.4.1. Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein tipa A1 (hnRNP-A1)

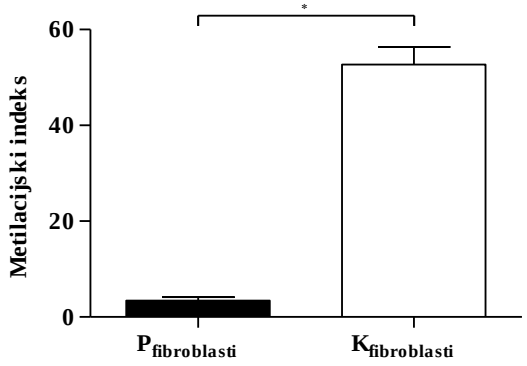
Primjenom protutijela usmjerenih na metilacijom modificiran arginin i protutijela usmjerenih na hnRNP-A1 analizirali smo značajke ovog proteina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (tablice 7 i 8, slike 33-38).

Tablica 7. Srednje vrijednosti koncentracije AdoMet, AdoHcy, proteina, aktivnosti SAHH i MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima.

Uzorci pacijenata (broj uzoraka)	**Broj uzoraka**	**AdoMet** (nM)	**AdoHcy** (nM)	**MI**	**Proteini** (mg/ml)	**Aktivnost enzima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$** (nM/mg proteina/sat)
P1F (2)	N=2	218	64	3,4	0,88	N=2; ***srednja vrijednost 0,17*** *(9.5% ostatne enzimske aktivnosti)*
P2F (2)	N=2	134	25	5,2	1,67	
P2aF (2)	N=2	130	26	5	0,93	
P3F (2)	N=2	312	137	2,2	0,63	
P4F (2)	N=2	157	108	1,45	2,12	
Srednje vrijednosti	***Σ10***	***190***	***72***	***3,45***	**-**	
Uzorci kontrolne skupine						**Aktivnost enzima SAHH** (nM/mg proteina/sat)
K1F (2)	N=2	166	3,3	50	0,56	N=4; ***srednja vrijednost 1,8***
K2F (2)	N=2	73	1,5	48	1,05	
K4F (2)	N=2	120	2	60	1,36	
Srednje vrijednosti	***Σ6***	***120***	***2.3***	***53***	**-**	
Omjeri izmjerenih srednjih vrijednosti:		**+1,6**	**+31,3** (P<0,05)	**-15,4** (P<0,05)		**10,6** (P<0,05)

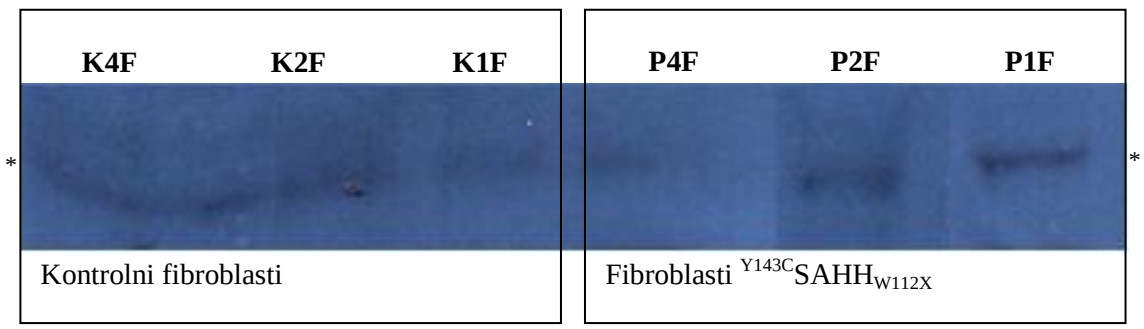
P1F, P2F, P2aF (kultura fibroblasta P2F uzgojena dva puta zbog kontrole reproducibilnosti), P4F, fibroblasti $^{Y143C}SAHH_{W112X}$; K1F, K2F, K4F, kontrolni fibroblasti.

U nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno niži u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (P<0,05) (tablica 7, slika 33).



Slika 33. Srednje vrijednosti metilacijskog indeksa fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P_{stanice}$) i kontrolnih fibroblasta ($K_{stanice}$), u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy. Metilacijski indeks fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno niži u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (*Mann Whitney U-test P<0,05).

Stoga smo, u nativnim uvjetima koji su povezani sa statistički značajno sniženim metilacijskim indeksom (P<0,05), analizirali posttranslacijsku metilaciju arginina hnRNP-A1 u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima. Nakon imobiliziranja hnRNP-A1, koristili smo protutijelo usmjereno na dimetilacijom asimetrično modificiran arginin (aDMA) kako bi izravno odredili razinu posttranslacijske metilacije (PTMe). PTMe podliježe svega 0.8 % aminokiselina proteina hnRNP-A1 (metilirane su samo tri aminokiseline na položajima 194, 206 i 225, od ukupno 372 aminokiseline koje grade protein hnRNP-A1). Iako nismo očekivali jasnu vizualnu razliku primjenom metode imunološke detekcije imobiliziranog proteina, ona je ipak dobivena što govori u prilog osjetljivosti metode i značenju dobivenog rezultata. Količina aDMA konstitutivnog oblika B proteina hnRNP-A1 (KoB) je, u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, različita u odnosu na kontrolne fibroblaste (slika 34).



Slika 34. Različita količina dimetilarginina (aDMA) u konstitutivnom obliku proteina hnRNP-A1 (*KoB) u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P1F, P2F, P4F) i kontrolnim fibroblastima (K1F, K2F, K4F).

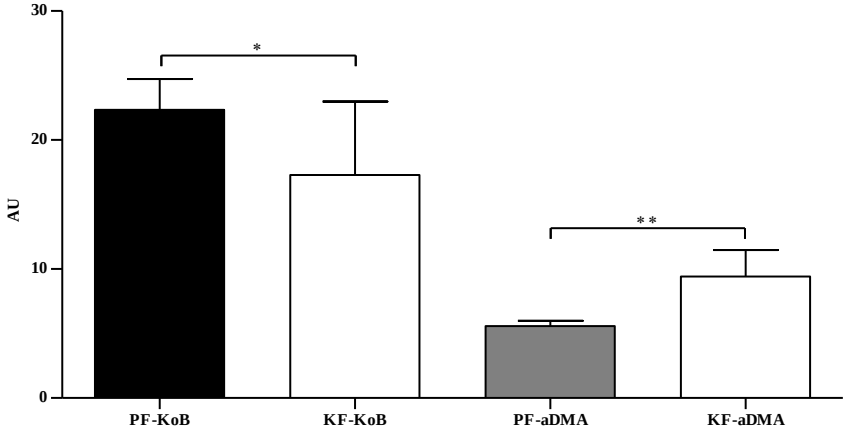
U fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, srednje vrijednosti signala KoB (P=0,458) i aDMA (P=0,141) nisu se statistički značajno razlikovale (tablica 8, slika 35).

Omjer izmjerenih srednjih vrijednosti signala aDMA/KoB u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (0,252) je statistički značajno niži u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (0,588) (P<0,05) (tablica 8, slike 36 i 37). Ovo upućuje na značajnu razliku u razini posttranslacijske metilacije arginina proteina KoB u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ odnosno, na poremećaj posttranslacijske metilacije arginina konstitutivnog oblika proteina hnRNP-A1 zbog patološki niskog metilacijskog indeksa, u okviru manjka SAHH.

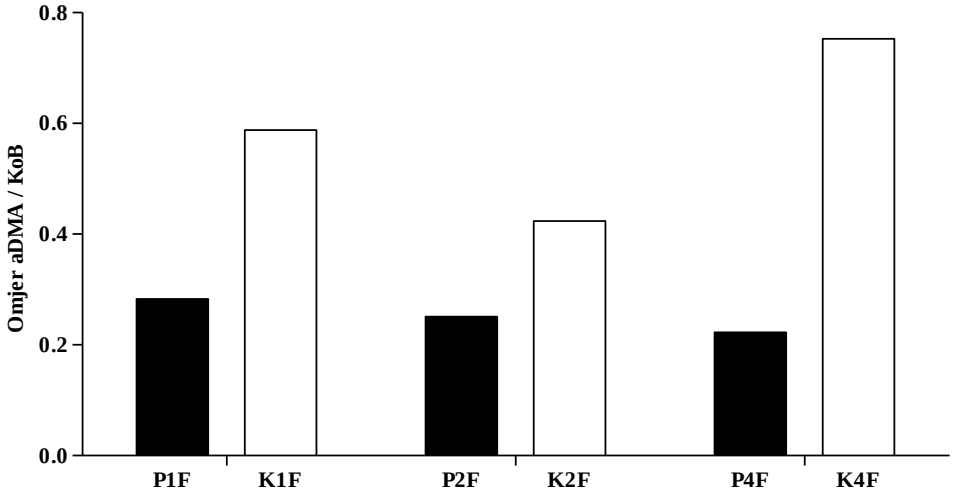
Tablica 8. Kvantitativne vrijednosti i omjeri signala za ukupni KoB i dimetilirani KoB (aDMA) dobivene programskom podrškom ImageJ 1.42q, izražene u arbitrarnim jedinicama (AU).

Uzorci	Signal proteina KoB (AU)	Signal protutijela na aDMA (AU)	Omjer signala aDMA/KoB
P1F	20.973,187	5.934,832	0,282972349
P2F	19.135,267	4.803,489	0,251028062
P4F	26.978,338	6.012,894	0,222878592
Srednje vrijednosti	***22,35***	***5,584***	***0,252***
K1F	9.080,589	5.338,673	0,587921444
K2F	28.249,267	11.965,421	0,423565716
K4F	14.520,095	10.932,380	0,752913807
Srednje vrijednosti	***17,28***	***9,412***	***0,588***
Omjer izmjerenih srednjih vrijednosti:	1,29	1,69	**2,33** (P<0,05)

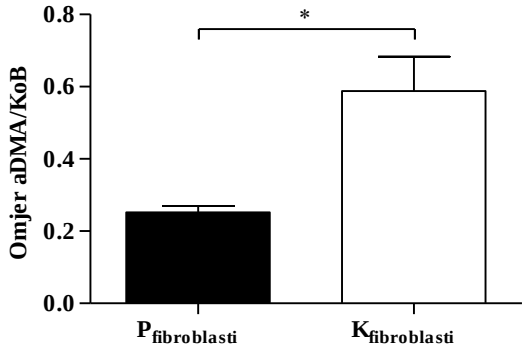
P1F, P2F, P4F, fibroblasti $^{Y143C}SAHH_{W112X}$; K1F, K2F, K3F, kontrolni fibroblasti; AU, arbitrarne jedinice koje koristi računalni program *ImageJ* za kvantifikaciju signala; KoB, konstitutivni oblik proteina hnRNP-A1.



Slika 35. Vrijednosti signala KoB i aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (PF-KoB, PF-aDMA) i kontrolnim fibroblastima (PF-KoB, KF-aDMA). Nema statistički značajne razlike (Mann Whitney U-test *P=0,700; **P=0,400).

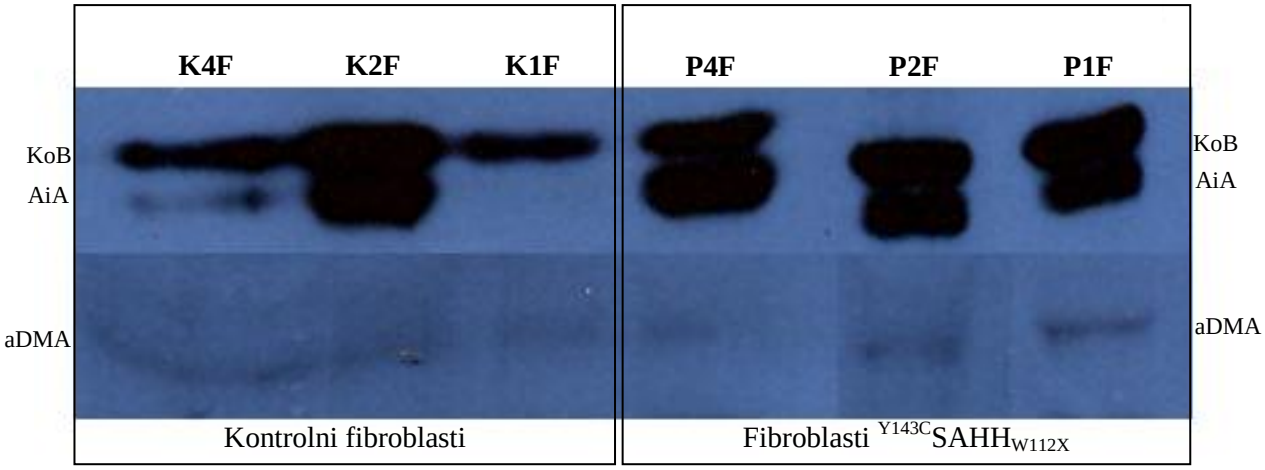


Slika 36. Pojedinačni omjeri signala asimetrične dimetilacije (aDMA) i konstitutivnog oblika proteina hnRNP-A1 (KoB) u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P1F, P2F, P4F) u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (K1F, K2F, K4F). Omjer aDMA/KoB je niži u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$.



Slika 37. Omjer srednjih vrijednosti signala asimetrične dimetilacije (aDMA) i konstitutivnog oblika proteina hnRNP-A1 (KoB) u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P_{fibroblasti}$) i kontrolnim fibroblastima ($K_{fibroblasti}$). Omjer aDMA/KoB je statistički značajno niži u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (*Mann Whitney U-test $P<0,05$).

Budući da protein hnRNP-A1 regulira izrezivanje vlastite mRNA i određuje hoće li se, i u kojoj količini sintetizirati konstitutivni oblik B (KoB) ili alternativna izoforma A (AiA), ko-imunoprecipitacijom ovih izoformi smo željeli istražiti ima li posttranslacijska hipometilacija arginina konstitutivnog oblika B, proteina hnRNP-A1, utjecaja na njegovu regulatornu funkciju (slika 38).



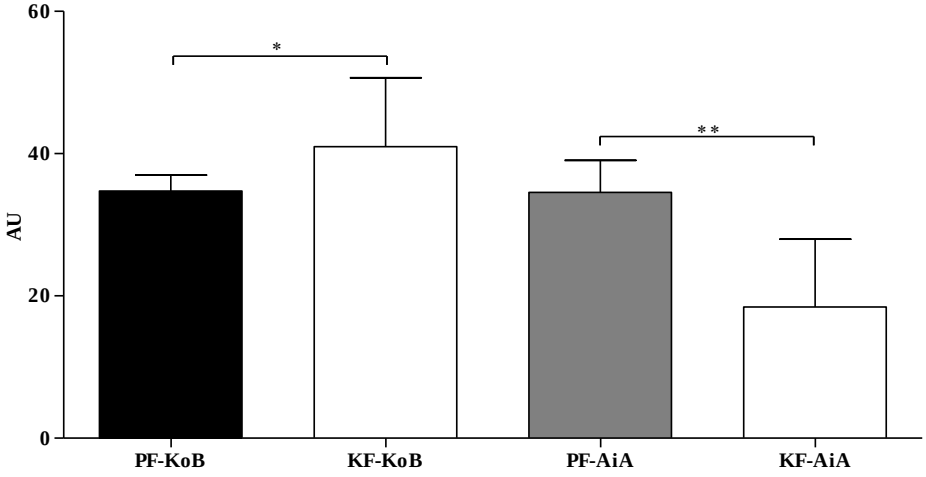
Slika 38. Različite količine konstitutivnog oblika B (KoB) i alternativne izoforme A (AiA) proteina hnRNP-A1 i metilacijski, aDMA signal-KoB. KoB i AiA izdvojeni su iz fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnih fibroblasta.

Signal obje izoforme, KoB i AiA, kvantificirali smo programskom podrškom ImageJ 1.42q. U fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, srednje vrijednosti signala KoB (P=0,565) i AiA (P=0,202) se nisu statistički značajno razlikovale (tablica 9, slika 39).

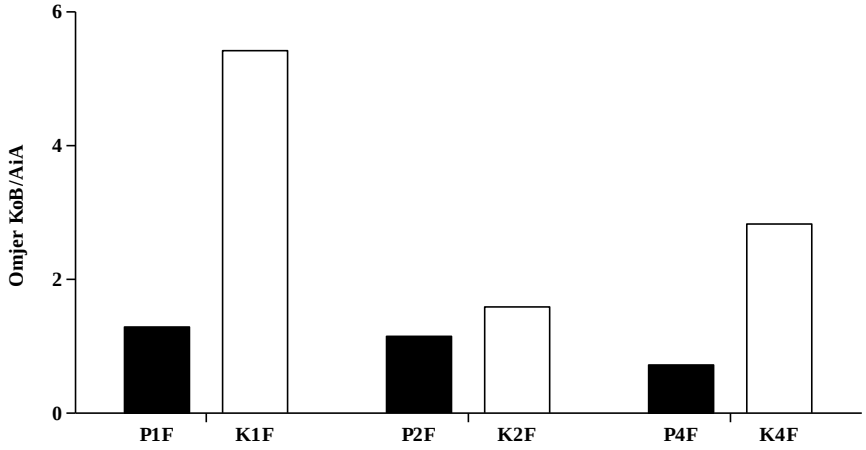
Omjer izmjerenih srednjih vrijednosti signala KoB/AiA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (1,05) je statistički značajno niži u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (3,00) (P<0,05) (tablica 9, slike 40 i 41). Ovo upućuje na značajnu razliku u količini pojedinih izoformi proteina hnRNP-A1, odnosno na mogući poremećaj u regulaciji proizvodnje KoB i AiA zbog patološki niskog metilacijskog indeksa, u okviru manjka SAHH.

Tablica 9. Kvantitativne vrijednosti i omjeri signala konstitutivnog oblika B (KoB) i alternativne izoforme A (AiA)

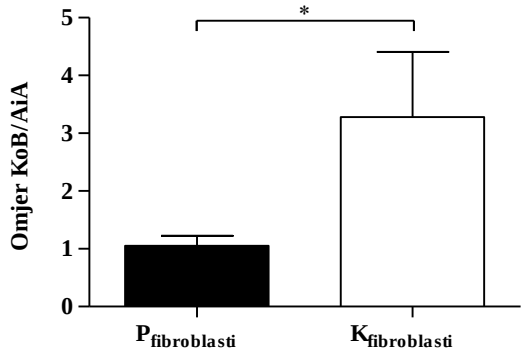
Uzorci	**Signal KoB** (AU)	**Signal AiA** (AU)	**Omjer signala KoB / AiA**
P1F	35.127,673	27.276,309	1,29
P2F	38.429,087	33.551,359	1,15
P4F	30.695,350	42.827,350	0,72
Srednje vrijednosti	***34.750,70***	***34.551,67***	***1,05***
K1F	24.774,642	4.570,832	5,42
K2F	58.325,567	36.715,451	1,59
K4F	39.847,898	14.092,271	2,83
Srednje vrijednosti	***40.982,70***	***18.459,52***	***3,00***
Omjer izmjerenih srednjih vrijednosti:	**1,18**	**1,87**	**2,86** (P<0,05)



Slika 39. Kvantitativne vrijednosti signala KoB i AiA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (PF-KoB, PF-AiA) i kontrolnim fibroblastima (PF-KoB, KF-AiA). Nema statistički značajne razlike (Studentov t-test *P=0,565; **P=0,202).



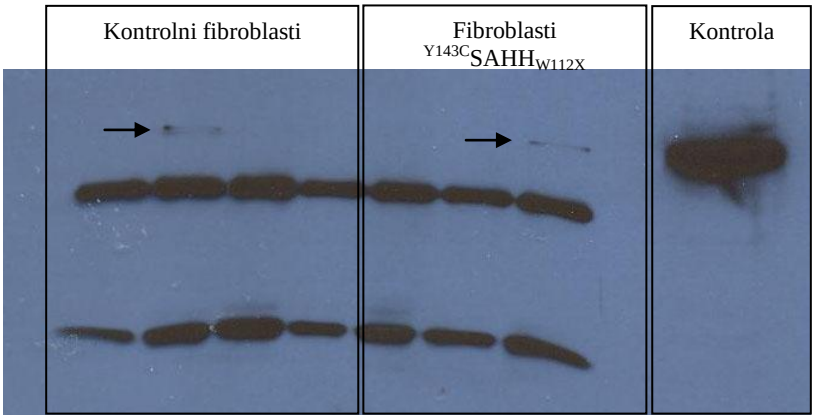
Slika 40. Pojedinačni omjeri signala konstitutivnog oblika B proteina hnRNP-A1 (KoB) i alternativne izoforme A (AiA) u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P1F, P2F, P4F) i kontrolnim fibroblastima (K1F, K2F, K4F). Omjer KoB/AiA je niži u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$.



Slika 41. Omjer srednjih vrijednosti signala konstitutivnog oblika B proteina hnRNP-A1 (KoB) i alternativne izoforme A (AiA) u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P_{fibroblasti}$) i kontrolnim fibroblastima ($K_{fibroblasti}$). Omjer KoB/AiA je statistički značajno niži u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (*F-test P<0,05).

5.4.2. Protein koji veže poli-A tipa 1 (PABP-1)

Primjenom protutijela usmjerenih na metilacijom modificiran arginin i protutijela usmjerenih na PABP-1 željeli smo dokazati ispoljenost i eventulnu promjenu metilacije ovog proteina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (slika 42). Dokazali smo ispoljenost PABP-1 u samo dva uzorka (jedna kontrolna linija i jedna linija $^{Y143C}SAHH_{W112X}$). Signal metilacije nismo dokazali.



Slika 42. Protein PABP-1. Prikazan je vrlo slab signal PABP-1 u dva od sedam uzoraka (strelice).

5.5. Pregledni sažetak rezultata

Rezultati potvrđuju hipotezu o utjecaju nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze na posttranslacijsku metilaciju proteina, omogućuju donošenje zaključaka i postizanje glavnog cilja ovog znanstvenog istraživanja - patološki snižen metilacijski indeks u uvjetima nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze ($^{Y143C}SAHH_{W112X}$) povezan je s hipometilacijom konstitutivnog oblika proteina hnRNP-A1 (KoB) i posljedično, s njegovom disfunkcijom.

Rezultati istraživanja specifičnih ciljeva pokazuju:

1) povišene koncentracije S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i patološki nizak metilacijski indeks povezani su s povišenom koncentracijom aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$;
2) liječenje dijetom siromašnom metioninom povezano je s povišenjem metilacijskog indeksa i sniženjem koncentracije aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$;
3) metilacijski indeks u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je niži od metilacijskog indeksa fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. Dodatne analize fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnih fibroblasta *in vitro,* ukazuju na poremećaj u metabolizmu aDMA, u uvjetima patološki niskog metilacijskog indeksa;
4) patološki nizak metilacijski indeks povezan je s poremećajem posttranslacijske metilacije proteina hnRNP-A1 što se očituje hipometilacijom arginina (aDMA-194, aDMA-206, aDMA-225). Ovo za posljedicu može imati disfunkciju proteina hnRNP-A1, koja se može manifestirati poremećenim alternativnim izrezivanjem vlastite mRNA i neuravnoteženom sintezom i/ili razgradnjom izoformi KoB i AiA.

RASPRAVA

6. RASPRAVA

6.1. Utjecaj povišene koncentracije S-adenozilhomocisteina, S-adenozilmetionina i patološki niskog metilacijskog indeksa na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$

Rezultati istraživanja su pokazali da su povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy te patološki nizak MI, zbog nedostatne aktivnosti SAHH, povezani s povišenom koncentracijom aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (tablice 2 i 3).

Prije uvođenja liječenja dijetom siromašnom metioninom, koncentracija aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno viša, u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P<0.05$) (slike 17 i 18).

Budući da aDMA nastaje razgradnjom metiliranih proteina, mjerenje koncentracije tog spoja pružilo nam je neizravan uvid u njihov katabolizam. Rezultati neizravno pokazuju da je katabolizam metiliranih proteina poremećen, a povišena koncentracija aDMA govori u prilog povećane razgradnje dismetiliranih proteina u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$.

Analizom dostupne literature nismo pronašli istraživanja o utjecaju metilacijskog indeksa na koncentraciju aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i dismetilaciju proteina. Stoga ovaj dio naših rezultata nedvojbeno predstavlja originalan doprinos znanosti.

6.2. Utjecaj liječenja dijetom siromašnom metioninom na metilacijski indeks i koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$

Uvođenje liječenja dijetom siromašnom metioninom (15 mg/kg/dan) povezano je sa statistički značajnim povećanjem metilacijskog indeksa u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (promjena MI u plazmi od +1,29 do +5,38; srednja vrijednost promjene +2.97; $P<0,05$) (tablica 2 i 4; slika 18). Oporavak, odnosno povećanje, metilacijskog indeksa u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ povezano je sa statistički značajnim sniženjem koncentracije aDMA (promjena koncentracije aDMA u plazmi od -1,4 do -2,2; srednja vrijednost promjene -1,62; $P<0,05$) (tablica 3 i 4; slika 18).

Metilacijski indeks u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno manji u usporedbi s MI u plazmi kontrola, prije uvođenja liječenja ($P<0,05$) (slika 19). Unatoč liječenju, koje je povezano sa značajnim povećanjem MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, taj parametar je, i nakon uvođenja liječenja, statistički značajno manji u usporedbi s MI u plazmi kontrola ($P<0,05$) (slika 19).

Uvođenje liječenja dijetom siromašnom metioninom povezano je sa snižavanjem koncentracije aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, do dosezanja referentne vrijednosti (tablica 4). Nakon uvođenja liječenja, koncentracija aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ se ne razlikuje značajnije u odnosu na koncentraciju aDMA u plazmi kontrola ($P=0,885$) (slika 20).

Smanjeni unos metionina smanjuje radno opterećenje metaboličkog puta koji je, u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH, disfunkcionalan. Smanjenje opterećenja povezano je s oporavkom, odnosno, povećanjem metilacijskog indeksa. Povećanje MI trebalo bi povoljno utjecati na razinu posttranslacijske dismetilacije proteina koji su, u novonastalim uvjetima, manje skloni razgradnji. Ovo je povezano sa sniženjem, odnosno normalizacijom, koncentracije aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. Budući da su rezultati pokazali da se metabolizam aDMA, nakon uvođenja liječenja dijetom siromašnom metioninom u određenoj mjeri mijenja, pretpostavljamo da se dio dismetilacijskih poremećaja ispravi ili bude kompenziran drugim čimbenicima. Ispravljanje dismetilacijskih poremećaja, uvođenjem liječenja, moguće je povezano s ublažavanjem oštećenja stanica i tkiva u djece s manjkom SAHH, što ovu dijetu čini blagotvornom.

Rezultati pokazuju da liječenje dijetom siromašnom metioninom normalizira koncentraciju aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. Molekularna osnova snižavanja koncentracije aDMA povezana je s povoljnijim transmetilacijskim uvjeta, manjim stupnjem dismetilacije i, posljedično, smanjenom razgradnjom dismetiliranih proteina.

Budući da je razlika u koncentracijama aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ prije uvođenja liječenja značajno viša te da se njena koncentracija normalizira uvođenjem liječenja, ovaj bi parametar mogao biti koristan u otkrivanju i praćenju pacijenata i donošenju odluka o daljnjem tijeku njihovog liječenja.

6.3. Analize u eksperimentalnom modelu fibroblasta *in vitro*

6.3.1. Metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastim te usporedna analiza s vrijednostima u plazmi

U kliničkom radu, za računanje metilacijskog indeksa koristimo koncentracije AdoMet i AdoHcy u plazmi. Pitanje je, naravno, da li MI u plazmi vjerno odražava metilacijski indeks u stanici. Stoga smo dio istraživanja usmjerili upravo na mjerenje koncentracije ova dva spoja u fibroblasitma,

kako bismo, na temelju ovih omjera, mogli zaključiti na koji način plazma odražava metilacijski indeks u samoj stanici.

Prije uvođenja liječenja, metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je četiri puta veći od MI u plazmi, koji rutinski mjerimo u pacijenata s nedostatnom aktivnošću SAHH (omjer srednjih vrijednosti $MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}prije} = 4,23$; $P<0,05$) (tablica 5; slika 21). Uvođenje liječenja je dovelo do znatnog smanjenja omjera srednjih vrijednosti ($MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}nakon} = 2,12$) (tablica 5).

Nakon uvođenja liječenja, MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nije se statistički razlikovao od MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P=0,485$) (slika 21).

U kontrola je srednja vrijednost MI u plazmi (5,16) statistički značajno različita u usporedbi sa srednjom vrijednošću MI u fibroblastima (52,9) ($P<0,05$) (tablica 2 i 6; slika 21). Srednja vrijednost omjera metilacijskog indeksa fibroblasti/plazma u kontrola (kontrolni $MI_{fibroblasti}/MI_{plazma} = 10,3$) je dva i pol puta veća od srednje vrijednosti omjera MI u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($MI_{fibroblasti}/MI_{plazma\text{-}prije} = 4,23$).

Rezultati su pokazali da jeu kontrolnih ispitanika, MI u fibroblastima 10 puta veći od vrijednosti u plazmi, dok je u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ veći samo četiri puta. Uvođenje liječenja povezano je s trostrukim povećanjem MI u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. Unatoč oporavku uslijed liječenja, razlike MI i u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ su i dalje značajne, u usporedbi s kontrolama (slika 21).

Zbog svoje uloge u regulaciji transmetilacijskih reakcija, metilacijski indeks u stanicama je precizno reguliran na način da se koncentracije spojeva koji ga određuju (AdoMet i AdoHcy), održavaju u uskom koncentracijskom rasponu. SAHH je glavni regulator koncentracije AdoHcy, a time i metilacijskog indeksa. Osim SAHH, na regulaciju MI utječe i izravno uklanjanje AdoHcy kroz membranu stanice u izvanstaničnu tekućinu. Ovaj mehanizam uklanjanja je naročito važan zato što omogućuje stanici da se vrlo učinkoviti „riješi“ inhibitora mnogih procesa u stanici. Time objašnjavamo razliku u MI stanica i plazme u fiziološkim uvjetima, ali i u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH iako je tada ta razlika značajno manja, prvenstveno zbog smanjenja MI u stanicama.

U dostupnoj literaturi nema preciznih podataka o razlici između staničnog i izvanstaničnog MI za pojedine stanice i tkiva. Za različita bolesna stanja ovakvi podaci ne postoje. Moguće je da je MI u stanici, kao i omjer staničnog i izvanstaničnog MI, tkivno i vremenski specifičan te da ovisi o mikrookolišu pojedine stanice. Naši rezultati pokazuju da je srednji MI u kontrolnim fibroblastima 52,9, dok je MI u plazmi kontrola približno 6. Prema tim podacima, omjer MI stanica/plazma u kontrolnih bi ispitanika bio približno 8 što je, u usporedbi s pacijentima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, dvostruko više. Iz toga se može pretpostaviti da je omjer MI stanica/plazma, u okviru nedostatne aktivnosti SAHH, dvostruko niži od fiziološkog.

Rezultati govore u prilog poremetnje održavanja apsolutnih koncentracija, ali i omjera AdoMet i AdoHcy u staničnom i izvanstaničnom odjeljku, u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH.

6.3.2. Metilacijski indeks i koncentracija asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy

Srednje vrijednosti koncentracije aDMA i u mediju, i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ su povišene u usporedbi s kontrolama u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy (tablica 6), ali se ta razlika nije pokazala statistički značajnom u ovom modelu (P=0,457; P=0,372; P=0,254) (slika 22).

Slično kao u plazmi pacijenata, koncentracija aDMA je u mediju i fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ povišena. Za razliku od rezultata dobivenih mjerenjima u plazmi, ovdje nije bilo statistički značajne razlike. Ovakav rezultat može biti posljedica neuspješnog uzgoja jedne linije fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P3F), što je dodatno ograničilo ionako mali broj uzoraka. Kako bismo premostili manjak uzoraka, osigurali reproducibilnost rezultata i nastavili daljnje analize, koncentraciju aDMA smo mjerili nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy, spojeva koji snizuju MI.

6.3.3. Utjecaj dodavanja AdoMet i AdoHcy na metilacijski indeks u fibroblastima *in vitro*

Na uzorku od tri kulture fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nismo uspjeli dokazati statistički značajnu razliku u koncentraciji aDMA, u usporedbi s kontrolnim fibroblastima u nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy. Stoga smo te spojeve, koji snizuju MI, dodali u nastavku istraživanja u konačnoj koncentraciji od 2,5 mM (AdoMet) i 0,3 mM (AdoHcy), u trajanju od 24 sata.

U nativnim uvjetima, bez dodavanja AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (3,61) je statistični značajno niži (14,7 puta) u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (52,9) (P<0,05) (tablica 6, slika 23).

Nakon dodavanja AdoMet, metilacijski se indeks statistički značajno snizio u kontrolnim fibroblastima (P<0,05), dok statistički značajno sniženje u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ nije postojalo (P=0,115) (tablica 6, slika 23).

Nakon dodavanja AdoHcy, metilacijski indeks se statistički značajno snizio i u kontrolnim, i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (P<0,05) (tablica 6, slika 23).

Nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks u kontrolnim fibroblastima je dosegao vrijednosti MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$.

Rezultati su potvrdili ispravnost i funkcionalnost uspostavljenog modela fibroblasta *in vitro* čime je premošten problem koji je nastao zbog malog broj uzoraka te su nastavljene daljnje analize koncentracije aDMA nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy i, time postignutog, dodatnog sniženja metilacijskog indeksa i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i u kontrolnim fibroblastima.

6.3.4. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju

U uvjetima koji su doveli do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa, nakon dodavanja AdoHcy ($P<0,05$), izmjerili smo koncentraciju aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju. Dodatak AdoHcy je doveo do statistički značajnog sniženja koncentracije aDMA i u mediju, i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P<0,05$) (tablica 6, slike 24-27).

Nakon dodavanja AdoMet, statistički značajne razlike nije bilo, niti u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P=0,303$), niti i mediju, bez obzira na način izračuna ($P=0,154$, odnosno $P=0,374$) (tablica 6, slike 24-27).

U mediju i fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, oba spoja dovode do sniženja koncentracije aDMA zbog dodatnog, akutno izazvanog, sniženja MI, ali u različitoj mjeri. Dodavanje AdoMet u medij fibroblasta $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u manjoj mjeri dovodi do sniženja MI (slika 23) u usporedbi s AdoHcy. Prema našim rezultatima, AdoMet ima manji potencijal u snižavanju MI (i, posljedično koncentracije aDMA), u odnosu na AdoHcy, u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. U literaturi nema sličnih istraživanja o tome koji je spoj potentniji u snižavanju MI, s kojima bismo mogli usporediti naše rezultate.

Patološki nizak MI u plazmi pacijenata je povezan s povišenom koncentracijom aDMA u plazmi. Ovaj je rezultat u suprotnosti s rezultatima dobivenim mjerenjima u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$.U modelu fibroblasta *in vitro* dodatno je sniženje MI, dodatkom AdoHcy, dovelo do sniženja koncentracije aDMA. Sličan rezultat je upravo objavila istraživačka skupina koja se bavi sličnom problematikom (Esse 2013). Naši rezultati jasno pokazuju da je metabolizam aDMA promijenjen u uvjetima patoloških vrijednosti MI. Na rezultat u plazmi, kao dijelu izvanstanične tekućine, utječe metabolizam aDMA svih stanica u tijelu, pa stoga predstavlja odraz stanja uravnoteženosti biokemijskih promjena organizma *(*engl. *steady state*). U modelu fibroblasta *in vitro* je odraz metabolizma samo jedne vrste stanica i trenutnog stanja budući da su opterećenja, zbog toksičnosti, trajala samo 24 sata. Na temelju ovih rezultata pretpostavljamo da je kronično nizak MI u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ povezan s dismetilacijom proteina i, posljedično, njihovom pojačanom razgradnjom u stanicama. Zbog toga je aDMA, kao produkt njihove razgradnje, povišena u izvanstaničnoj tekućini koja služi njenoj odvodnji, daljnjoj razgradnji i izlučivanju. Akutno sniženje MI, koje smo izazvali dodavanjem AdoHcy u našem eksperimentalnom modelu fibroblasta *in vitro,* moglo bi biti povezano s akutnom posttranslacijskom hipometilacijom proteina. Zbog toga bi proteini, koji su u vrijeme trajanja izloženosti fibroblasta povišenoj koncentraciji AdoHcy bili „obilježeni“ za proces razgradnje, sadržavali manje količine aDMA, što smo i izmjerili. Moguće je da bi se u uvjetima dugotrajnijeg opterećenja stanica AdoMet i AdoHcy dobili rezultati mjerenja slični rezultatima mjerenja u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, pod pretpostavkom da stanice prežive dugotrajnije izlaganje ovim spojevima, u deseterostruko višim koncentracijama u odnosu na fiziološke.

6.3.5. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u kontrolnim fibroblastima i mediju

U uvjetima koji su doveli do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa, nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy ($P<0,05$), izmjerili smo koncentraciju aDMA u kontrolnim fibroblastima i mediju.

Koncentracija aDMA je statistički značajno niža u kontrolnim fibroblastima, u usporedbi s koncentracijom prije dodavanja i AdoMet i AdoHcy ($P<0,05$) (tablica 6, slike 24 i 28).

Koncentracija aDMA je niža i u mediju, u usporedbi s koncentracijom prije dodavanja AdoMet ($P=0,202$) i AdoHcy ($P=0,099$), ali ta razlika nije statistički značajna (tablica 6, slika 29).

Izražena u μmol/mg proteina, koncentracija aDMA je statistički značajno niža u mediju kontrolnih fibroblasta, u usporedbi s koncentracijom prije dodavanja AdoHcy ($P<0,05$) (tablica 6, slika 30). Ove razlike nije bilo nakon dodavanja AdoMet ($P=0,330$) (tablica 6, slika 30).

I u kontrolnim fibroblastima, i u mediju, dodavanje i AdoMet ($P=0,330$) i AdoHcy ($P<0,05$) dovodi do sniženja koncentracije aDMA zbog akutno izazvanog, statističkog značajnog sniženja MI ($P<0,05$) (slika 23). Prema ovim rezultatima, oba su spoja snažni regulatori MI i, posljedično, koncentracije aDMA u kontrolnim fibroblastima. Za sada, koliko nam je poznato, nema rezultata koji bi ukazivali na egzogene utjecaje AdoMet i AdoHcy, u regulaciji metilacijskog indeksa. Stoga ovaj dio naših rezultata ne možemo raspraviti u usporednoj analizi rezultata drugih istraživačkih skupina.

Pretpostavljamo da je akutno sniženje MI u kontrolnim fibroblastima povezano s akutnom posttranslacijskom hipometilacijom proteina i sniženjem koncentracije aDMA prema istom mehanizmu kao i u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. Obzirom na normalnu funkciju SAHH u kontrolnim fibroblastima, za pretpostaviti je da se koncentracija aDMA nije "stigla" značajno poremetiti u mediju, iako je tendencija snižavanja postojala. Budući je sniženje koncentracije aDMA, mjereno na količinu proteina statistički značajno, moguće je da bi se u uvjetima dugotrajnije sniženog MI slično desilo i s koncentracijom aDMA u izravnom mjerenju u mediju.

6.3.6. Utjecaj sniženja metilacijskog indeksa, postignut dodavanjem AdoMet i AdoHcy, na koncentraciju asimetričnog dimetilarginina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem

U uvjetima koji su doveli do statistički značajnog sniženja metilacijskog indeksa, nakon dodavanja AdoMet i AdoHcy ($P<0,05$), izmjerili smo koncentraciju aDMA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i mediju te usporedili vrijednosti s kontrolnim fibroblastima i medijem.

Nakon dodavanja AdoMet, koncentracija aDMA je viša u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ ($P=0,116$) i njihovom mediju ($P=0,159$; $P=0,429$) u usporedbi s kontrolnim fibroblastima i medijem, ali ta razlika nije statistički značajna (tablica 6, slika 31).

Nakon dodavanja AdoHcy, koncentracija aDMA je statistički značajno viša u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (P<0,05) (tablica 6, slika 32). U mediju, ova razlika nije postojala, bez obzira na način izračuna (P=0,864; P=0,344)) (tablica 6, slika 32).

U uvjetima akutno izazvanog sniženja MI u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, dobili smo rezultat kakav smo izmjerili i u plazmi pacijenata - koncentracija aDMA u pacijenata je statistički značajno viša u usporedbi s kontrolama (P<0,05) (slike 17 i 32).

Ovi su rezultati dodatno potkrijepili našu pretpostavku o poremetnji metabolizma aDMA u uvjetima patološki niskog MI zbog manjka SAHH i omogućili nam opravdani nastavak istraživanja dismetilacije proteina na izravniji način, primjenom protutijela usmjerenih na metilne skupine.

6.4. Utjecaj patološki niskog metilacijskog indeksa na posttranslacijsku metilaciju arginina odabranih proteina

6.4.1. Hipometilacija arginina hnRNP-A1

Nakon pretraživanja literature i provedenih preliminarnih istraživanja, odabrali smo višefunkcionalne proteine čija bi funkcija mogla biti promijenjana u uvjetima patološki niskog MI.

Primjenom protutijela usmjerenih na metilacijom modificiran arginin i protutijela usmjerenih na hnRNP-A1 analizirali smo razinu ispoljenosti i metiliranosti u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (tablice 7 i 8, slike 33-38).

U nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno niži u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (P<0,05) (tablica 7, slika 33). Nakon imobiliziranja hnRNP-A1, koristili smo protutijelo usmjereno na dimetilacijom asimetrično modificiran arginin (aDMA) kako bisno izravno odredili razinu posttranslacijske metilacije (PTMe). PTMe podliježe svega 0.8 % aminokiselina proteina hnRNP-A1 (metilirane su samo tri aminokiseline na položajima 194, 206 i 225, od ukupno 372 aminokiseline koje grade protein hnRNP-A1). Iako nismo očekivali jasnu vizualnu razliku primjenom metode imunološke detekcije imobiliziranog proteina, ona je ipak dobivena što govori u prilog osjetljivosti metode i značenju dobivenog rezultata. Količina aDMA u konstitutivnom obliku B proteina hnRNP-A1 (KoB) je, u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, različita u odnosu na kontrolne fibroblaste (slika 34). Rezultati pokazuju da je metilacija arginina poremećena u uvjetima patološki niskog MI. Oba signala smo kvantificirali programskom podrškom ImageJ 1.42q. U fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, srednje vrijednosti signala KoB (P=0,458) i aDMA (P=0,141) nisu se statistički značajno razlikovale (tablica 8, slika 35). Ova činjenica potvrđuje da rezultat mjerenja metilacijskog signala aDMA nije posljedica značajne razlike pojedinih signala KoB u ispitivanim uzorcima. Omjer izmjerenih srednjih vrijednosti signala aDMA/KoB u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (0,252) je statistički značajno niži u

usporedbi s kontrolnim fibroblastima (0,588) ($P<0,05$) (tablica 8, slike 36 i 37). Ovo upućuje na značajnu razliku u razini posttranslacijske metilacije arginina proteina KoB u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ odnosno, na poremećaj posttranslacijske metilacije arginina konstitutivnog oblika proteina hnRNP-A1 zbog patološki niskog metilacijskog indeksa, u okviru manjka SAHH. Specifičnu asimetričnu dimetilaciju arginina hnRNP-A1 obavlja PRMT1 (Rajpurohit 1994). Budući da nizak MI u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH inhibira PRMT1, dobiveni rezultati hipometilacije proteina hnRNP-A1 su u skladu s dosadašnjim spoznajama (Pollack 1999, Bedford 2000, Bedford 2005, Pahlich 2006, Iwasaki 2008, Bedford 2009, Lee i Stallcup 2009, Blackwell 2012). U prilog tomu ide i rezultat dobiven analizom endotelnih stanica u eksperimentalnom modelu, u kojima je, kemijskom inhibicijom enzima SAHH (AdOx), porasla koncentracija AdoHcy za 2.5 puta što je dovelo do smanjenja metilacija arginina za 10 % (Esse 2013). Analizom dostupne literature nismo pronašli istraživanja o hipometilaciji arginina u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i stoga ovaj dio naših rezultata nedvojbeno predstavlja originalan doprinos znanosti.

6.4.2. Dovodi li hipometilacija proteina hnRNP-A1 do njegove disfunkcije?

Isključivanjem egzona 7b, protein hnRNP-A1 regulira izrezivanje vlastite mRNA i određuje hoće li se sintetizirati potpuna, konstitutivna (KoB) ili skraćena, alternativna izoforma (AiA) (Chabot 1997, Hutchison 2002, Han 2010).

Dovodi li hipometilacija arginina konstitutivnog oblika proteina hnRNP-A1 (KoB) do njegove disfunkcije istražili smo ko-imunoprecipitacijom, nakon čega smo u gelu mogli razdvojiti, a na membrani detektirati, oba oblika proteina hnRNP-A1: konstitutivni oblik B (KoB) i alternativnu izoformu A (AiA).

U nativnim uvjetima, bez dodatka AdoMet i AdoHcy, metilacijski indeks u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je statistički značajno niži u usporedbi s kontrolnim fibroblastima ($P<0,05$) (tablica 7, slika 33). Stoga smo analizirali količinu pojedinih izoformi KoB i AiA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima. U fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblastima, srednje vrijednosti signala KoB ($P=0,565$) i AiA ($P=0,202$) nisu se statistički značajno razlikovale (tablica 9, slika 39). Ova činjenica potvrđuje da rezultat mjerenja signala KoB i AiA nije posljedica značajne razlike pojedinih signala u ispitivanim uzorcima. Omjer izmjerenih srednjih vrijednosti signala KoB/AiA u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ (1,05) je statistički značajno niži u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (3,00) ($P<0,05$) (tablica 9, slike 40 i 41). Ovo upućuje na značajnu razliku u količini pojedinih izoformi proteina hnRNP-A1, odnosno na mogući poremećaj u regulaciji proizvodnje KoB i AiA zbog patološki niskog metilacijskog indeksa, u okviru manjka SAHH.

Prema našim rezultatima hipometilacija konstitutivnog oblika B proteina hnRNP-A1 dovodi do disfunkcije proteina koja se očituje kao poremetnja izrezivanja vlastite mRNA s, posljedično,

neuravnoteženom proizvodnjom izoformi KoB i AiA (slika 38). Metilacija arginina posredovana enzimom reverzibilna je PTM brojnih proteina i općenito važan regulatorni mehanizam (Forneris 2005, Whetstine 2006, Li 2006, Christensen 2007, Chang 2007, Bedford 2009, Lee i Stallcup 2009, Blackwell 2010, Blackwell i Ceman 2012). Specifična asimetrična dimetilacija arginina regulira funkciju proteina hnRNP-A1 (Rajpurohit 1994, Kim 1997, Kim 2010, Blackwell 2012). Zaključujemo da hipometilacija proteina hnRNP-A1 može uzrokovati njegovu disfunkciju i dovesti do poremetnje procesa u kojima sudjeluje (izrezivanje mRNA, interakcije proteina hnRNP-A1 s DNA, RNA i drugim proteinima i molekulama).

Metilacija/hipermetilacija arginina inhibira vezanje hnRNP-A1 (KoB) s drugim molekulama, smanjuje sposobnost vezanja jednolančanih nukleinskih kiselina i otpornost na digestiju tripsinom (Rajpurohit 1994) te spriječava stvaranje vodikovih veza ovisnih o argininu odnosno, argininom posredovano prepoznavanje mRNA (Calnan 1991, Najbauer 1993). S druge strane, hipo/demetilacija dovodi do pojačanog vezanja hnRNP-A1 (KoB) s drugim molekulama (Bedford 2000). Stoga zaključujemo da se hipometilirani protein hnRNP-A1, u uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH i patološki niskog MI, pojačano veže za ciljne molekule. Protein hnRNP-A1 je inhibitor konstitutivnog izrezivanja mRNA brojnih proteina uključujući i vlastite mRNA tako da njegovo pojačano vezanje može imati nesagledive posljedice na kôd izrezivanja stanica, što se može očitovati višeorganskom bolešću (Mayeda i Krainer 1992, Chabot 1997, Hutchison 2002, Kashima 2007, Han 2010). Budući da su važne za interakciju s drugim molekulama, hipometilirane domene RGG proteina hnRNP-A1 koje sadrže arginine podložne asimetričnoj dimetilaciji mogu narušiti stvaranje funkcionalnih proteinskih kompleksa u kojim hnRNP-A1 obavlja svoju funkciju (homokompleks hnRNP-A1+hnRNP-A1 ili heterokompleks hnRNP-A1+hnRNP-A3 i dr.) (Papadopoulou 2012).

Protein hnRNP-A1 (KoB) sudjeluje u nukleo-citoplazmatskom prebacivanju mRNA (Piñol-Roma i Dreyfuss 1992) za što mu je potrebna metilacija arginina koja omogućuje i promovira izlazak proteina hnRNP-A1 iz jezgre u citoplazmu (Liu 1995, Shen 1998). Budući da je metilacija arginina hnRNP-A1 važna za izlazak kompleksa mRNA-hnRNP-A1 iz jezgre, logično je pretpostaviti da hipometiliran hnRNP-A1, u pacijenata s manjkom SAHH, zaostaje u jezgri i, posljedično, ne dolazi do prijenosa njegove mRNA u citoplazmu. Sličan poremećaj prijenosa, nakupljanja i razgradnje može se odraziti i na druge mRNA čije izrezivanje hnRNP-A1 regulira (tablica 10). Poremećaj transporta hipometiliranog proteina hnRNP-A1 mogao bi imati posebno važnu ulogu u neuronima zbog velike udaljenost između jezgre i citoplazme što bi moglo doprinjeti oštećenju neurona. Slično dismetilaciji proteina hnRNP-A1, protein hnRNP-A2 koji selektivno veže mRNA-MBP (glasnička RNA bazičnog proteina mijelina) i određuje njenu supstaničnu lokalizaciju u oligodendrocitu (Hoek 1998) također bi mogao biti dismetiliran i hipofunkcionalan te na taj način dodatno štetiti neuronima.

Tablica 10. Proteini za čije procesiranje mRNA je odgovoran hnRNP-A1.

Proteini	Oznaka	N	Funkcija
Beta aktin	ACTB		Ubikvitarni citoskeletni globularni protein (G-aktin) koji polimerizira u filamentozni oblik (F-aktin). Dio je tankog filamenta stanica mišića koji se udružuje s miozinom i izgrađuje miofibrile. Podliježe metiliranju histidina H73.
Alfa aktinin 4	ACTN4	**3**	Citoskeletni protein koji veže aktin unutar miofibrila te ga time učvršćuje u području Z diska stanice mišića. Izoforme su tkivno specifične. Tijekom miogeneze omjer izoformi je promijenjiv (Khaitlina 2001, Mizuno 2009, Perrin 2010).
RNA helikaza A (ovisna o ATP)	DHX9	**2**	Razmotavajući dvostruku uzvojnicu RNA i kompleks DNA-RNA, djeluje kao čimbenik transkripcije u jezgri. Za transport u citoplazmu, važna je asimetrična metilacija arginina u domeni NTD koja je posredovana PRMT1 (Smith 2004).
Transkripcijski čimbenik	ERG	**6**	Čimbenik transkripcije koji je u interakciji sa SETDB1-histon metiltransferazom.
HnRNP-A1	hnRNP-A1	**2**	Konstitutivni oblik proteina (KoB) važan u procesiranju mRNA. Podložan asimetričnoj dimetilaciji posredovanoj PRMT1 (aDMA 194, aDMA-206, aDMA-225). Alternativna izoforma (AiA) veže ssDNA.
HnRNP-AB	hnRNP-AB	**4**	Procesiranje mRNA. Podložan asimetričnoj dimetilaciji posredovanoj PRMT1 (aDMA-322).
HnRNP-D	hnRNP-D	**4**	Procesiranje mRNA. Podložan asimetričnoj dimetilaciji posredovanoj PRMT1 (aDMA-345) koja je važna za naknadno fosforiliranje tirozina.
HnRNP-L	hnRNP-L	**2**	Procesiranje mRNA.
HnRNP-U	hnRNP-U	**2**	Procesiranje mRNA. Podložan asimetričnoj dimetilaciji posredovanoj PRMT1 (aDMA-733 i aDMA-739).
HnRNP-Q	SYNCRIP	**3**	Procesiranje mRNA. Izoforme Q1, Q2 i Q3.
HnRNP-A2B1	hnRNP-A2B1		Procesiranje mRNA.
HnRNP-R			Procesiranje mRNA.
Heat shock protein	HSPA1B	**2**	
Heat shock protein	HSPA8		
Nuclear cap-binding protein 1	NCBP1		Sudjeluje u monometilaciji 5'-kape mRNA, izrezivanju pre-mRNA, transportu mRNA iz jezgre u citoplatmu i NMD.
Nucleolin	NCL		Glavni eukariotski fosfoprotein jezgre važan za sazrijevanje ribosoma. Veže histon H1, pre-rRNA, mRNA i ssDNA. Važan u transkripciji pre-rRNA i izgradnji ribosoma. Podložan asimetričnoj dimetilaciji posredovanoj PRMT1 (aDMA-656, aDMA-660, aDMA-666, aDMA-670, aDMA-673).
Poly-A binding protein C1	PABP-C1	**2**	Ubikvitarni protein koji veže poly-A rep mRNA te na taj način sudjeluje u njenom transportu u citoplazmu. U citoplazmi sudjeluje u aktivaciji ribosoma i započinjanju translacije. Skraćuje poly-A rep i započinje NMD. Prepoznaje prijevremene terminacijske kodone, PTC. Podložan asimetričnoj dimetilaciji posredovanoj PRMT1 i CARM1 posredovanoj simetrična dimetilacija (a/sDMA-455, a/sDMA-493).
Poly-A binding protein C4	PABP-C4		Procesiranje mRNA. Podložan asimetričnoj dimetilaciji posredovanoj PRMT1 (aDMA-518).
Poly-A binding protein N1	PABP-N1	**3**	Procesiranje mRNA**.** U interakciji s MyoD1 (slika 42) utječe na regulaciju gena specifičnih za mišićnu stanicu (Kim 2001). Mutacije gena dovode do okulofaringealne mišićne distrofije nastale zbog intranuklearnh agregata u kojima se zajedno s PABP-N1, nalazi i hnRNP-A1 (Fan 2003). PRMT1 i PRMT3 katakiziraju opsežne asimetrične dimetilacije domene koja je važna za homooligomerizaciju - aDMA-238, 259, 263, 265, 267, 269, 277, 279, 287, 289, 291, 294, 296, 298.
Podjedinice ribosoma	RPLP0, S3, S3A, S4X, S8, S9		Translacija. Time hnRNP-A1 sudjeluje i u procesu translacije.
Protein porodice septin-6 GTPaza	SEPT6	**4**	Važan u izgradnji citoskeleta aktina i citokinezi.

N, broj izoformi nastalih alternativnim izrezivanjem pomoću proteina hnRNP-A1.

Poznato je da se prilikom metilacije 5'-kape mRNA aktivnost SAHH povećava kako bi se postigao odgovarajući MI, ufiziološkim granicama za taj proces (Fernandez-Sanchez 2009). Inhibira li se SAHH i povisi koncentracija AdoHcy, metilacija 5'-kape mRNA se u štakora neće pravilno obaviti jer dolazi do poremećaja u raspodjeli proteina hnRNP između jezgre i citoplazme s apsolutnim smanjenjem količine u jezgri (Radomski 2002). Moguće je da tom prilikom nastala hipometilacija proteina hnRNP prekida njegov transport u jezgru i sprječava funkciju u transkripcijski aktivnim stanicama, u procesu metilacije 5'-kape mRNA. U kvasaca, koji ne posjeduju enzim za metilaciju

arginina, homolog hnRNP-A1 ostaje "zarobljen" u jezgri (Shen 1998). U oboljelih od okulofaringealne mišićne distrofije nastale zbog mutacije gena i disfunkcije proteina koji veže mRNA (PABP-N1) u intranuklearnim se agregatima, osim PABP-N1, nalazi i hnRNP-A1, protein partner, što sve zajedno dovodi do smrti stanice mišića (Fan 2003). Općenito, hiperprodukcija hipofunkcionalnog proteina koji se ne transportira tamo gdje bi trebao, može dovesti do nakupljanja nesvrsishodnog proteina i propadanja stanice. Jednako tako, hipometilacija arginina u pacijenata s manjkom SAHH može dovesti do nakupljanja hnRNP-A1 ili drugih dismetiliranih proteina u određenom staničnom odjeljku (jezgri ili citoplazmi), disfunkcije prijenosa raznih mRNA u citoplazmu i propadanja stanica.

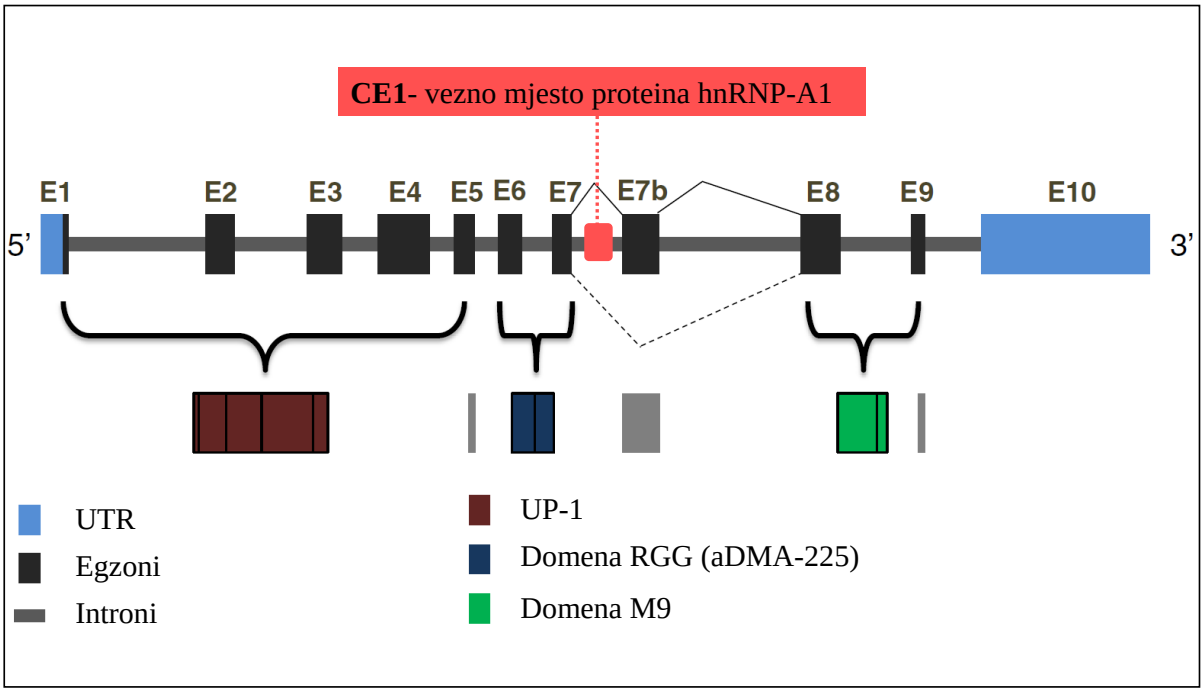
Jedinstvena kombinacija proteina unutar proteinskog kompleksa koji veže pre-mRNA (vrsta i količina proteina hnRNP, nazočnost i opseg PTMe arginina) određuje način njezinog procesiranja u prostoru i vremenu (Dreyfuss 2002, Chaudhury 2010) Stoga bi hipometiliran protein hnRNP-A1 mogao dovesti do sveopćeg poremećaja u procesiranju mRNA. Opsežnost poremećaja, do kojeg bi disfunkcija proteina hnRNP-A1 mogla dovesti, potvrđuje činjenica da je približno 10% svih reakcija izrezivanja pre-mRNA posredovano proteinom hnRNP-A1 (Venables 2008). Proteini hnRNP su poveznica pojedinih koraka procesiranja mRNA, čime se ostvaruju cjelina i funkcionalnost biološkog sustava (Piñol-Roma i Dreyfuss 1992, Han 2010). Narušavanje cjeline osnovnog staničnog procesa poput procesiranja mRNA te poremećene interakcije hipometiliranog hnRNP-A1, najvjerojatnije, dovode do zahvaćenosti više organa kao što je to u pacijenata s manjkom SAHH.

6.4.3. Moguće pogreške u procesu izrezivanja mRNA u okviru manjka SAHH

Pretpostavljamo da su različite količine izoformi proteina hnRNP-A1 (KoB i AiA) u kontrolnim fibroblastima odraz dinamičke proizvodnje i razgradnje ovog regulatornog proteina (slika 38). Izostanak tih razlika i gubitak dinamičnosti proizvodnje regulatornog proteina hnRNP-A1 u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ moguća je posljedica pogreške u izrezivanju mRNA.

Vezani na primarni transkript pre-mRNA, hnRNP su inhibitori konstitutivnog izrezivanja, odnosno promotori alternativnog izrezivanja i ubacivanja alternativnih egzona za primjerice Ras, SMN2, beta-tropomiozin i c-src. Protein hnRNP-A1 se veže i na vlastitu mRNA i inhibira njeno konstitutivno, a promovira alternativno izrezivanja i proizvodnju izoforme AiA (Expert-Bezancon 2004, Bekenstein i Soreq, u tisku). Način na koji se određuje hoće li se izrezivanje obaviti s ciljem proizvodnje izoforme KoA ili AiA, ovisi o, evolucijom dobro očuvanom, slijedu baza introna između konstitutivnog egzona 7 i alternativnog egzona 7b, gena koji kodira protein hnRNP-A1 (slika 40). Taj slijed baza introna primarnog transkripta pre-mRNA sadrži konzervirani element CE1 (engl. *conserved element 1*) koji promovira "preskakanje" egzona 7b. Kada se hnRNP-A1 veže i prekrije element CE1 vlastite mRNA uslijedi isključivanje egzona 7b (engl. *exon exclusion* ili *exon skippimg*), što rezultira sintezom kraće i funkcionalno drugačije alternativne izoforme A proteina hnRNP-A1, AiA (Chabot 1997). U uvjetima manjka SAHH, hipometilirani protein hnRNP-A1 se pojačano veže

na vlastitu pre-mRNA što dovodi do pretjeranog isključivanja egzona 7b, pogreške u izrezivanju i, posljedično, neuravnoteženoj proizvodnji izoformi KoB i AiA.



Slika 40. Gen odnosno primarni transkript pre-mRNA hnRNP-A1, mRNA i protein. Vezanje proteina hnRNP-A1 na redosljed CE1 pre-mRNA hnRNP-A1 dovodi do isključivanja alternativnog egzona E7b i sinteze kraće, alternativne izoforme A proteina hnRNP-A1, AiA, koja ne sadrži dio proteina važnog u interakcijama s drugim molekulama (nedostaju 52 aminokiseline u domeni bogatoj glicinom). Stoga izoforma AiA ostvaruje manje interakcija. Na taj način protein hnRNP-A1 (konstitutivni oblik B, KoB) određuje vlastitu sudbinu, a time i funkciju. Prema referenci Bekenstein i Soreq, u tisku, uz dodatnu modifikaciju.

6.5. Primjeri bolesnih stanja u čiju su patogenezu uključeni proteini hnRNP - moguće poveznice s bolešću zbog manjka SAHH

Demijelinizacija središnjeg živčanog sustava (SŽS) jedna je od karakteristika bolesti zbog manjka SAHH. Istraživanja su pokazala da je protein hnRNP-A1 sudjeluje u procesu alternativnog izrezivanje mRNA koja kodira protein MAG (engl. *Myelin-associated* glycoprotein). Uključivanjem egzona 12 nastaje duža izoforma L-MAG (engl. *long-MAG*) koja je funkcionalna u SŽS dok isključivanjem tog egzona nastaje kraća izoforma S-MAG (engl. *short-MAG*). Pretpostavlja se da protein hnRNP-A1 dovodi do preskakanja egzona i proizvodnje duže i funkcionalne izororme (Zearfoss 2013). Disfunkcionalan, hnRNP-A1 može biti povezan s demijelinizacijom.

Protein hnRNP-A2 selektivno veže mRNA proteina MBP (bazični protein mijelina) i određuje njenu lokalizaciju u oligodendrocitu (Hoek 1998). Na taj način i drugi proteini iz porodice hnRNP mogu biti uključeni u poremećaj procesa mijelinizacije, karakterističan za bolest zbog manjka SAHH.

Poznato je da neke neurodegenerativne bolesti i manjak SAHH u određenoj mjeri povezuje povišena koncentracija homocisteina i AdoHcy (Chang 2010, Herrmann 2011). Rezultati našeg istraživanja ne isključuju mogućnost da im je u patogenezi važan protein hnRNP-A1. Alzheimerovu bolest (AD) obilježava nedostatna funkcija hnRNP-A1, a multiplu sklerozu protutijela usmjerena protiv domene RGG i M9 proteina hnRNP-A1 (Levin 2002, Levin 2005, Lee 2006, Lee 2011, Bekenstein i Soreq, u tisku). Moguće je da, ovisno o stupnju metilacije, aDMA-225 predstavlja jači ili slabiji neo-epitop protiv kojeg su usmjerena autoprotutijela u okviru multiple skleroze. Pojačano ispoljavanje proteina hnRNP-A1 u staničnim kulturama je dovelo do pojačanog isključivanja konstitutivnog egzona i smanjene sinteze proteina APP (engl. *amyloid precusor protein*) u punoj dužini. Obrnuto, siRNA posredovano utišavanje hnRNP-A1 dovelo je do uključivanja konstitutivnog egzona, povećane sinteze proteina APP u punoj dužini, povećane sekrecije i nakupljanja Aß (engl. *beta-amyloid peptide*) u plakovima mozga i neurotoksičnosti kakvu viđamo u oboljelih od Alzheimerove bolesti (Donev 2007). Analize tkiva mozga u oboljelih od Alzheimerove bolesti, najnovijim generacijama mikropločica, otkrile su značajne razlike u alternativnom izrezivanju transkripata entorinalnog područja kore u odnosu na zdrave (Berson 2012). Autori su pokazali da je u tkivu mozgu oboljelih, 75% procesa alternativnih izrezivanja rezultat patološkog uključivanja egzona koje je nastalo zbog značajnog manjka proteina hnRNP-A1 u odnosu na protein SR (manjak inhibitora) (Berson 2012). U uvjetima nedostatne aktivnosti SAHH, hipometiliran hnRNP-A1 se pojačano veže na vlastitu pre-mRNA, što je povezano s pojačanim djelovanjem inhibitora konstitutivnog izrezivanja i dovodi do isključivanja konstitutivnog egzona (engl. *exon exclusion*). Na taj bi se način naši rezultati mogli uklopiti u ova istraživanja.

Manjak hnRNP-A1 povezuje se s patogenezom i/ili težinom kliničke prezentacije frontotemporalne lobarne degeneracije (FTLD), amiotrofične lateralne skleroze (ALS), hereditarne spastične pareze (HSP) i drugih patoloških stanja (Bekenstein i Soreq, u tisku). Manjak hnRNP-A1 dovodi do poremećaja interakcija neurona i oligodendrocita u mozgu (Bekenstein i Soreq, u tisku).

Na primjeru spinalne mišićne atrofije (SMA) uzrokovane mutacijom gena SMN1 i manjka istoimenog proteina može se puno naučiti o alternativnom izrezivanju, proteinima hnRNP i njihovoj disfunkciji, u kontekstu razumijevanja patogeneze bolesti zbog manjka SAHH. Nekoliko je zanimljivosti: 1) Tijekom evolucije, duplikacijom je nastao gen SMN1, paralog gena SMN2, koji se međusobno razlikuju u samo jednoj bazi u exonu 7 (umjesto C, na poziciji +6 je T). Translacijom mRNA SMN2 nastaje protein istog aminokiselinskog slijeda kao SMN1, ali u nedovoljnoj količini (svega 10-15%). Iako ubikvitarno eksprimiran i važan, manjak proteina SMN1 dovest će do simptoma isključivo u alfa-motoneuronima u kojima ovih 10-15 % „rezervnog“ proteina kodiranog genom SMN2, nije dovoljno za preživljavanje, za razliku od svih ostalih stanica. Zašto je većini stanica dovoljna i ta mala količina zamjenskog proteina SMN2 u odnosu na alfa-motoneurona zanimljiva je činjenica. Važno pitanje je zašto se ne proizvodi veća količina „rezervnog proteina“ kada već postoje dva gena za isti koji kodiraju njegov nastanak. Istraživanje patogeneze spinalne mišićne atrofije je

otkrilo zašto je, evolucijski stariji gen SMN2 selekcijom zamijenjen novim, "mlađim i boljim" genom SMN1. "Stariji" gen SMN2 sadrži spomenutu zamjenu jedne baze (T umjesto C u egzonu 7) koja dovodi do nastajanja novog veznog mjesta ESS (engl. *exonic splicing silencer*, redosljed baza mRNA na koju se vežu proteini hnRNP). Na redosljed ESS veže se hnRNP-A1. Vezanje inhibitora hnRNP-A1 za ESS dovodi do pogrešnog alternativnog izrezivanja koje rezultira izrezivanjem egzona 7 i proizvodnjom krnjeg proteina koji se razgradi. To je primjer utišavanja utišavača što rezultira određenom akcijom, ovom prilikom prekomjernim izrezivanjem egzona mRNA i razgradnjom proteina. Budući da je 10-15 % normalno izrezane mRNA i normalno proizvedenog proteina SMN2 dovoljno za većinu stanica, SMA ima svoju prepoznatljivu kliničku sliku mišićne slabosti, zbog disfunkcije alfa-motoneurona, bez zahvaćenosti ostalih organa; 2) dodatna zanimljivost je da hipoksija pojačava isključivanje egzona u genu SMN2 koje je posredovano proteinom hnRNP-A1 (engl. *exon exclusion*). To potvrđuje koliko mikrookolina utječe na promjenu funkcije proteina hnRNP-A1 (Bebee 2012); 3) Kako SMN1 ostvaruje svoju funkciju u preživljavanju alfa-motoneurona? Protein SMN1 (jednako i SMN2) stupa u interakciju s domenom proteina hnRNP-Q. Interakcije se ostvaruju sa tri postojeće izoforme (Q1, Q2, Q3) koje nastaju prepisivanjem istog gena, procesom alternativnog izrezivanja mRNA. Unutar domene RGG, arginin podliježe metilaciji, slično kao hnRNP-A1. Protein SMN1 stvara višeproteinske komplekse (ponajprije s hnRNP-Q) i tako sudjeluje u alternativnom izrezivanju pre-mRNA u alfa-motoneuronima. Rezultat fizioloških interakcija SMN1 i hnRNP-Q jest preživljavanje stanica, a poremećaj tih interakcija i "posredovanja" u alternativnom izrezivanju dovodi da SMA. Zaključno, pretpostavlja se da SMA nastaje zbog mutacije gena SMN1 koja dovodi do poremećaja interakcije proteina SMN1 s proteinom hnRNP-Q (Mourelatos 2001).

Spomenuti primjeri samo su neki od dokaza koji ukazuju na važnu ulogu proteina hnRNP u patogenezi različitih bolesti. Prema sličnom mehanizmu, disfunkcionalan hnRNP-A1 bi mogao doprinjeti patogenezi bolesti zbog manjka SAHH. Analizom dostupne literature nismo pronašli istraživanja o hipometilaciji i mogućoj disfunkciji proteina hnRNP-A1 u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ stoga ovaj dio naših rezultata nedvojbeno predstavlja originalan doprinos znanosti.

6.6. Uzročno-posljedična veza između dismetilacije proteina, poremećenog izrezivanja i mišićne distrofije u pacijenata s manjkom SAHH

Globalna dismetilacija u okviru manjka SAHH može poremetiti svaki stanični proces, od transkripcije gena i procesiranja mRNA do sinteze proteina i metabolita te na taj način dovesti do globalne poremetnje epigenskog kôda u svim stanicama, uključujući i stanice poprečnoprugastog mišića. Ranije smo pokazali dismetilaciju ukupne leukocitne DNA i spojeva kolina i kreatina (Barić 2004, Barić 2005, Buist 2006, Ćuk 2007, Barić 2009, Vugrek 2009, Grubbs 2010, Barić 2012). Rezultati

ovog istraživanja su pokazali dismetilaciju proteina, preciznije hipometilaciju hnRNP-A1 u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. Pretpostavljamo da hipometilirani hnRNP-A1 remeti kôd mRNA, izrezivanja i sintezu proteina. Po sličnom mehanizmu, ne isključujemo mogućnost da su i druge molekule, i drugi proteini, u drugim stanicama i na drugim razinama kodiranja dismetilirani te da doprinose složenoj kliničkoj slici "globalne dismetilacije" koju nazivamo bolest zbog manjka SAHH.

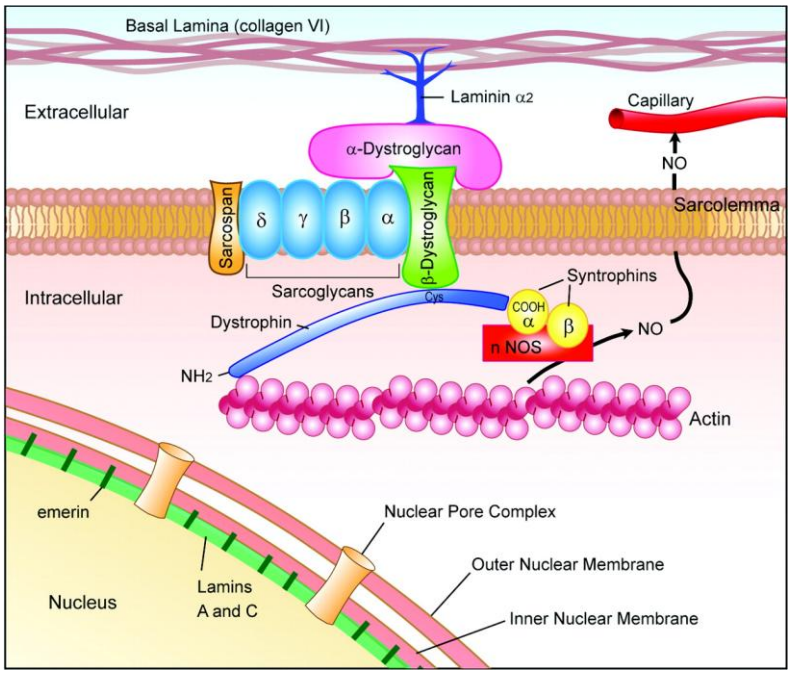
6.6.1. Bolest zbog manjak SAHH - "proteinska izoformopatija"

Rezultati ovog istraživanja potkrijepljuju našu pretpostavku da bi bolest zbog manjka SAHH mogla biti povezana s poremećenim kôdom izrezivanja i neuravnoteženom proizvodnjom odgovarajućih izoformi proteina, kako u mišićima, tako i u drugim tkivima. Dismetilacija proteina i, posljedična, pogreška u izrezivanju bi mogla biti jedna od patogenetskih mehanizama bolesti zbog manjka SAHH. Mišićnu distrofiju kakvu viđamo u tih pacijenata mogli bismo objasniti poremećenim izrezivanja i proizvodnjom neodgovarajućih izoformi proteina specifičnih za mišić. Slično se može reći i za druga tkiva uključujući i mozak. Mozak i mišić su, u odnosu na druga tkiva, posebno sklona procesu alternativnog izrezivanja (Nilsen i Graveley 2010). Poprečnoprugasti mišić je među tkivima s najvećim brojem različito ispoljenih alternativnih egzona (Pan 2008, Wang 2008, Castle 2008).

Različita ekspresija izoformi proteina specifičnih za mišić glavna je odlika radne sposobnosti pojedinog mišićnog vlakna (Schiaffino 1996). Različite izoforme proteina ispoljene su u različitim vrstama vlakana i mišića, u pojedinim razvojnim fazama, miogenezi i regeneraciji. Proizvodnjom različitih izoformi određena su različita svojstva mišića (kemijski uvjeti sinteze i hidrolize ATP, brzina i jakost kontrakcije, osjetljivost na kalcij, otpornost na kraći i brži ili duži i sporiji rad i još puno parametara. Izoforme troponina i tropomiozina doprinose razlikama pojedinih vlakana u osjetljivosti na kalcij, izoforme titina svojim različitim elastičnim svojstvima u radu i mirovanju, a izoforme miozina i troponina svojim razlikama u izdržljivosti pojedinih mišićnih vlakana.

6.6.2. Ciljni proteini i procesi stanice mišića koji bi, u okviru manjka SAHH, a na temelju rezultata ovog istraživanja, mogli biti poremećeni

Mišić je specifičan po složenim proteinskim kompleksima koji osiguravaju strukturu, funkciju i integraciju u jedinstvenu cjelinu uključujući: 1) sarkomembranski glikodistrofinski kompleks; 2) kompleks ekstracelularnog matriksa zajedno s enzimima odgovornim za posttranslacijske modifikacije; 3) sarkoplazmatski miofibrilarni proteinski kompleks i 4) sarkonuklearni laminarni proteinski kompleks (slika 41). Svi kompleksi se sastoje od mnogobrojnih proteina i njihovih izoformi. I najmanja poremetnja samo jednog od proteina ili samo jedne izoforme narušava strukturu, funkciju i integraciju cijelog kompleksa. Zbog toga je mišić izrazito osjetljiv na promjenu strukture proteina jer to u pravilu znači disfunkciju i disintegraciju stanice mišića i mišićnog tkiva.



Slika 41. Složeni kompleksi proteina specifičnih za mišić koji osiguravaju strukturu i integraciju u funkcionalnu cjelinu stanice mišića. Prikazani su sarkomembranski glikodistrofinski kompleks, kompleks ekstracelularnog matriksa, sarkoplazmatski miofibrilarni proteinski kompleks i sarkonuklearni laminarni proteinski kompleks. Prema referenci Bekenstein i Soreq, u tisku.

Posljedice hipometilacije i disfunkcije proteina hnRNP-A1 mogle bi biti: nestabili genom, pogrešna transkripcija gena, pogrešno vremensko i tkivno konstitutivno i alternativno izrezivanje mRNA, neuravnotežena proizvodnja izoformi proteina specifičnih za mišić, proizvodanja pogrešnih izoformi proteina na pogrešnom mjestu i u pogrešno vrijeme, greške u translaciji, posttranslacijskim modifikacijama i interakcijama proteina unutar funkcionalnih proteinskih mreža te poremećaj metaboličkog kôda stanice.

Posttranslacijska metilacija arginina proteina lamina A/C posredovana s PRMT sudjeluje u diferencijaciji poprečnoprugastih mišića, posebno izoforma lamin C2, tijekom procesa fuzije mioblasta u miša (Kim 2011). Lamin A/C i emerin su kritično važni za diferencijaciju mioblasta i poprečnoprugastih mišića (Frock 2006). Mutacije gena LMNA dovode do laminopatija, skupine bolesti povezanih s mišićnom distrofijom (Astejada 2007, Maraldi 2011). Osim što je povezan s neuromuskularnim bolestima (EDMD2/3, LGMD1B, CMD1A, CMT2B1), lamin A/C je povezan s lipodistrofijama (FPLD) i drugim bolestima (MAD, HGPS, LDHPC, WRN, CCPS, RD). Jedan gen (LMNA, 12 egzona), dvije mRNA (e10/e10a), tri izoforme proteina (lamin A - 662 aminokiseline, lamin C - 572 aminokiseline, lamin Adelta10 - 634 aminokiseline), nekoliko kliničkih slika. Iako dosada nije razjašnjena raznolikost istotkivnih i tkivno specifičnih promjena povezanih s poremećajima lamina A/C (Ostlund 2003), moguće je da se radi o fenotipskim varijacijama iste bolesti koja je povezana s laminom A/C. Ovisno o tome u kojoj je mjeri i na koji način poremećena funkcija tog proteina razvija se i klinička slika. Za pretpostaviti je da se funkcija lamina A/C može

poremetiti na više načina što se očituje većim brojem kliničkih oblika. Pretpostavljamo da se radi o poremećaju konstitutivnog i alternativnog izrezivanja i posttranslacijskim modifikacijama. Za funkciju lamina C je važna PTMe arginina (Kim 2011), a da bi uopće nastao lamin A, prelamin A mora proći četiri posttranslacijske modifikacije, uključujući metilaciju C-terminalnog cisteina. Ovisno o tome koji je dio ovih procesa zahvaćen mutacijom nastaje odgovarajuća klinička slika. Budući da se radi o višestupnjevitom procesu procesiranja bioloških makromolekula, logično je da postoje mnoge kliničke slike. U određenom broju slučajeva, laminopatije su povezane s nakupljanjem aberantno posttranslacijski modificiranim proteinom i/ili pojačanim oksidativnim stresom zbog disfunkcije lamina A (Sinensky 1994, Kilic 1997, Barton 1999, Davies 2010, Davies 2011, Lattanzi 2011, Barrowman 2012, Lattanzi 2012). Lamin A i C stvaraju homodimere, a povrh toga se ostvaruju interakcije s emerinom koje bi, po sličnom mehanizmu kao i hnRNP-A1, mogle biti poremećene dismetilacijom. Na više načina i razina, dismetilacija, u okviru manjka SAHH, može poremetiti strukturu i funkciju proteina specifičnih za mišić i doprinijeti razvoju mišićne distrofije. Osim alfa aktinina čije su tri izoforme već spomenute budući ovise o hnRNP-A1 i drugi se mišićni proteini sintetiziraju u izoformama iako njihovo alternativno izrezivanje ne ovisi ili se ne zna ovisi li ili ne o hnRNP-A1 u normalnim uvjetima. Međutim, u uvjetima hipometilacije hnRNP-A1 i njegovog pojačanog vezanja na pre-mRNA ostalih proteina navest ćemo neke zanimljive primjere koji bi mogli biti poremećeni i ići u prilog patogenezi mišićne bolesti u svijetlu dismetilacijske proteinske izoformopatije. Prikazani su proteini za koje pretpostavljamo da bi mogli biti zahvaćeni dismetilacijom, pogrešnim izrezivanjem i proizvodnjom neodgovarajućih izoformi (tablici 11, slika 41).

Alfa i beta tropomiozin su kodirani s dva različita gena, sastoje se od istog broja aminokiselina (284), različito se alternativno izrezuju (alfa- u 7, a beta-tropomiozin u 3 izoforme), potom heterodimeriziraju i samo u tom obliku čine jedinstvenu funkcionalnu cijelinu. Potonje je primjer važnosti interakcija među proteinima. Dodatno, unatoč činjenici da alfa i beta tropomiozin kao samostalni proteini nisu funkcionalni u sarkoplazmatskom kompleksu, ipak mutacije jednog od proteina dovode do jednog tipa, a mutacije drugog proteina do drugog tipa kliničke slike. U uvjetima manjka SAHH i globalne dismetilacije, alternativno izrezivanje alfa i beta tropomiozina, njihova dimerizacija i tkivno specifična razdioba izoformi mogu biti poremećeni i doprinijeti razvoju bolesti mišića. Slično vrijedi za ostale proteine, posebice za velike proteine koji se proizvode u većem broju izoformi, na primjer titin, disferlin i alfa-distrobrevin (tablica 11).

Osim u endotelnim stanicama, NOS je važan u miocitima jer povezuje proteine sarkoplazmatskog kompleksa, preciznije kaveolin-3 i distrofin (Sartorelli 2005). Budući da aDMA inhibira NOS, neizravno remeti vezu proteina membranskog kompleksa poprečnoprugastih mišića caveolina-3 i distrofina što može dovesti do destabilizacije membrane i mišićne slabosti.

Tablica 11. Izoforme i interakcije proteina specifičnih za mišić koji bi mogli biti poremećeni u pacijenata s nedostatnom aktivnošću SAHH.

Protein Gen; broj ak)	**N**	**Izoforme, funkcije, interakcije i reference**
Distrofin *DMD* 3685	**6**	Protein membranskog kompleksa koji povezuje stanicu mišića s njenom okolinom (distroglikan s F-aktinom). Izoforme se proizvode u različitim omjerima u različitim tkivima uključujući poprečnoprugasti mišić, mozak, srce, jetru i bubrege. (gen duljine ~2,4 Mb).
Disferlin *DYSF* (55 egzona) 2080	**15**	Protein membrane stanice mišića koji sudjeluje u popravljanju oštećenja. Izoforme su tkivno i vremenski specifične. U miogenezi se proizvode specifične izoforme (Salani 2004, Pramono 2009). U interakciji je s kaveolinom-3 (Matsuda 2001). Mutacije ovog gena, na različite načine mijenjaju funkciju proteina s posljedično različitom kliničkom slikom (Krahn 2009).
α-tropomiozin *TPM1* 284	**7**	Protein specifičan za mišić koji veže aktin. U interakciji s troponinom ima ulogu u regulaciji o kalciju ovisne mišićne kontrakcije. Alternativni egzoni su tkivno specifično ispoljeni (Balvay 1994, Gooding 2008). Izoforma 1 specifična je za poprečnoprugasti mišić; izoforma 2 za glatki, a preostalih pet, za nemišićna tkiva. Opisana je i nova izoforma (Denz 2004). Izoforme su u specifičnoj interakciji s aktinom, miozinom i destrinom (Gunning 2005). Funkcionalan je nakon heterodimerizacije s β-tropomiozinom. Mutacije gena dovode do hipertrofične kardiomiopatije.
β-tropomiozin *TPM2* 284	**3**	Protein specifičan za mišić koji veže aktin. U interakciji s troponinom ima ulogu sličnu α-tropomiozinu. Alternativni egzoni gena *TPM2* su važni za alternativno izrezivanje (Gallego 1996). Izoforma 1 specifična je za skeletni mišić, a preostale dvije za nemišićna tkiva. Funkcionalan je nakon heterodimerizacije s α-tropomiozinom. Mutacije gena dovode do nemalinske miopatije i distalne artrogripoze.
Titin *TTN* (364 egzona) 34350	**12**	Najveći protein specifičan za mišić. Povezuje pojedine mikrofilamente i osigurava njihovu organizaciju, elastičnost i čvrstoću tijekom kontrakcije. U interakciji je s aktinom, miozinom, tropomiozinom, laminom A i kalmodulinom. Izoforme nastaju mehanizmom isključivanja egzona i tkivno su specifične (3,7 i 8 - srce; 4 i 6 - skeletni mišić) (Freiburg 2000). Mutacije gena dovode do miopatije sa zatajenjem disanja, hipertrofične i dilatacijske kardiomiopatije, tardivne tibijalne i pojasne mišićne distrofije, ovisno o tome na koji je način, mutacijom, poremećenja funkcija titina. (gen s najdužim redoslijedom egzona)
Destrin *DSTN;* 165	**2**	Ubikvitarni protein koji depolimerizira aktin, na način da prekida lanac F-aktina i veže G-aktin. Sinonim je ADF.
Distroglikan (α i β) *DAG1* 895	**-**	Specifična proizvodnja - najprije signalni protein (ak 1-29), potom α-distroglikan (ak 30-653), na kraju β-distroglikan (ak 654-895) - po principu jedan gen > jedan signalni peptid, važan za lokalizaciju > dva lanca > naknadna heterodimerizacija u funkcionalnu cijelinu. Funkcionalan je u dvije strukturne varijente: 1) kao heterodimer (α-β-distroglikan) povezuje distrofin i ekstracelularni matriks i time učvršćuje membranu mišića; 2) kao monomer (β-distroglikan), budući da je ispoljen i u drugim dijelovima stanice i u drugim tkivima, sudjeluje u procesu migracije i preživljavanja stanica, mijelinizacije i polarizacije epitela. Mutacije gena dovode do mišićne distrofije i mentalne retardacije, a mutacije povezane s O-glikozilacijom, dovode do mišićne distrofije i poremećaja razvoja mozga.
α-SG *SGCA* 387	**2**	α-sarkoglikan - proizvodi se gotovo isključivo u poprečnoprugastom i tek neznatno, u mišiću srca. Dio je sarkoplazmatskog glikodistrofinskog kompleksa. U interakciji s β-, ɗ- i ɣ-sarkoglikanom. Mutacije dovode do mišićne distrofije.
β-SG *SGCB*; 318	**-**	β-sarkoglikan - Proizvodi se u srcu i poprečnoprugastom mišiću, manje u mozgu. Mutacije dovode do mišićne distrofije.
ɗ-SG *SGCD*; 289	**3**	ɗ-sarkoglikan - Proizvodi se u srcu i poprečnoprugastom mišiću, manje u mozgu. U interakciji je s distroglikanom.
ɣ-SG *SGCG*; 291	**-**	ɣ-sarkoglikan - U interakciji je s drugim sarkoglikanima i filaminom C.
Filamin C *FLNC* 2725	**2**	Protein specifičan za mišić koji veže aktin. Ispoljen isključivo u mišiću. Funkcionalan kao homodimeru interakcijama s brojnim proteinima-partnerima čime povezuje signalne putove i kontrakciju. Uz to, sudjeluje u stabilizaciji mreže aktina (Stossel 2001). Izoforme su u specifičnim interakcijama s proteinima-partnerima specifičnim za mišić.
Sintaza NO *NOS1;* 1434	**5**	Proizvodi neurotransmitor i vazodilatotor NO i S-nitrozilira cistein. Izoforma 1 je ispoljena ubikvitarno uključujući mišić i mozak, izoforma 3 samo u testisima, a izoforma 4 samo u testisima i poprečnoprugastom mišiću.
α-distrobrevin *DTNA* 743	**11**	Proizvodi se u srcu, poprečnoprugastom mišiću i mozgu. Izoforme su tkivno, a neke i funkcionalno, specifične (7 i 8 samo u poprečnoprugastom mišiću). Sve izoforme su u interakciji s distrofinom, osim 7 i 8, i utrofinom i sintrofinima. Alternativni egzon gen *DTNA* predodređuje izoforme (Sadoulet-Puccio 1997). Pojedine su izoforme vremenski specifične i izražene samo u mioblastima i miotubama, a druge u zreloj stanici (Nawrotzki 1998). Mutacije gena dovode do poremećaja morfogeneze lijeve klijetke i hipertrofične kardiomiopatije.
β-distrobrevin *DTNB*; 627	**6**	Nastaje samo u mozgu. U interakciji je s izoformom Dp71 distrofina i sintrofinima. Različite izoforme u različito vrijeme i s različitim izoformama distrofina i drugih proteina grade jedinstvene proteinske komplekse (Peters 1997).
β-2-sintrofin *SNTB2* 540	**2**	Ubikvitarni protein-adapter koji je u interakciji s brojnim proteinima specifičnim za mišić uključujući i proteine sarkoplazmatskog glikodistrofinskog kompleksa. Upravlja i određuje njihovu lokalizaciju u stanici, povezuje razne membranske receptore s citoskeletom aktina. Lokaliziran je u blizini neuromuskularne spojnice. Izoforma 1 se proizvodi u svim tkivima i predstavlja aktivni oblik proteina. Izoforma 2 je građena od dvostruko manje aminokiselina (267), u stanici mišića ne ostvaruje interakcije s distrofinom, a, u srcu i jetri, se ne ispoljava zbog preuranjenog stop kodona.
Kloridni kanala *CLCN1* 988	**-**	Ne podliježe fiziološkom alternativnom izrezivanju, ali mutacije gena dovode do nastajanja novih veznih mjesta za proteine koji vežu mRNA što rezultira poremećenim izrezivanjem i bolešću: miotona distrofija tipa 1 i 2 (Charlet 2002), FXTAS (engl. *fragile X tremor ataxia syndrome*), SCA8 (engl. *spinocerebellar ataxia type 8*) i HDL2 (engl. *Huntington's disease-like 2*) (Ranum 2006).

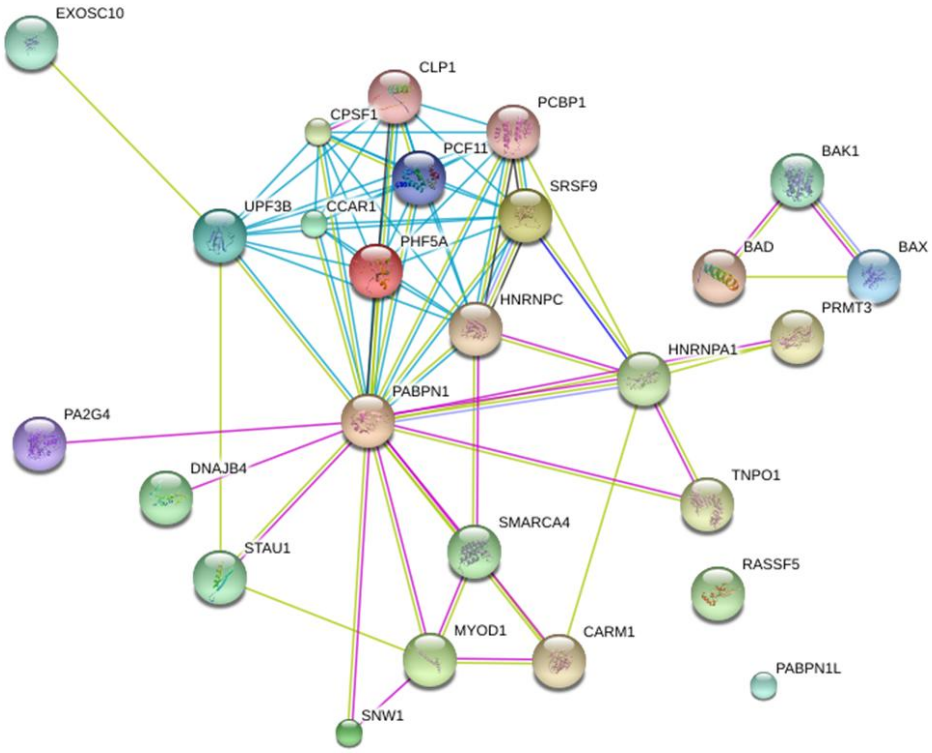
N, broj izoformi; ak, broj aminokiselina.

Budući da je hnRNP-A1 regulatorni protein koji sudjeluje u konstitutivnom i alternativnom izrezivanje mRNA, njegova hipometilacija i sklonost pojačanom vezanju može imati utjecaja na proizvodnju mnogih proteina i njihovih izoformi, ponajprije onih, u čijem izrezivanju sudjeluje (tablica 10). Pretpostavljamo da bi proteini porodice hnRNP-A1 i drugi proteini koji sudjeluju u procesiranju mRNA u uvjetima manjka SAHH, izravno ili neizravno, mogli biti odgovorani za patogenezu mišićne distrofije. Izoforme spomenutih proteina u određenim tkivima obavljaju specifične funkcije. Poremećaj omjera tkivno specifičnih izoformi narušava stanične procese i dovodi do oštećenja brojnih organa, uključujući i mišić. To je posebno vidljivo iz primjera proteina PABP-N1 koji u suradnji s MyoD1 utječe na ekspresiju gena specifičnih za mišić, a čije mutacije dovode do mišićne distrofije zbog taloženja degradiranih proteina među kojima je i hnRNP-A1 (Kim 2001, Fan 2003). Protein hnRNP-A1 stupa u interakcije s proteinom PABP-N1 unutar višeproteinske mreže (slika 42). Osim toga, hnRNP-A1 se veže i na UTR drugih mRNA. U uvjetima manjka SAHH, hipometiliran hnRNP-A1 se, zbog povećanog afiniteta, može vezati na potencijalno svaku mRNA s kojom inače nije u vezi i dovesti do različitih pogrešaka konstitutivnog i alternativnog izrezivanja i poremećaja sinteze izoformi mišićnih proteina od strukturnih, enzimskih i kanalnih do transportnih i drugih. Sličan mehanizam vrijedi za druga tkiva. Poremećaj rada hnRNP-A1 i PABP-N1 dovodi do nastajanja nakupina u jezgri (intranuklearni agregati) i destrukcije mišične stanice u okulofaringealnoj mišićnoj distrofiji (Fan 2003). Mijeline figure viđene u biopsijama mišića bolesnika s manjkom SAHH mogle biti odgovarati agregatima dismetiliranih i/ili degradiranih proteina koji vode destrukciji mišićne stanice i mišićnoj distrofiji. Osim toga, svaki protein, ne samo u mišiću, kojemu funkcija ovisi o metilaciji, neovisno o hnRNP-A1, može biti disfunkcionalan u uvjetima manjka SAHH.

U uvjetima patološki niskog metilacijskog indeksa brojni drugi procesi u mišiću mogu biti poremećeni, uključujući inhibiciju velike skupine enzima, metiltransferaza. Ti enzimi na različite načine doprinose strukturi i funkciji mišića. Tijekom diferencijacije mioblasta u miotube, posebnu ulogu ima H3-K4 histon-metiltransferaza koja sudjeluje u aktivaciji transkripcijskog čimbenika MyoD i pokretanju gena koji kodiraju proteine specifične za mišić (Tao 2011). Pretpostavljamo da bi inhibicija ovog enzima dovela do oštećenja stanice mišića.

Primjenom protutijela usmjerenih na metilacijom modificiran arginin i protutijela usmjerenih na PABP-1 željeli smo dokazati ispoljenost i eventulnu promjenu metilacije ovog proteina u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ u usporedbi s kontrolnim fibroblastima (slika 42). Dokazali smo ispoljenost PABP-1 u samo dva uzorka (jedna kontrolna linija i jedna linija $^{Y143C}SAHH_{W112X}$). Signal metilacije nismo dokazali.

O miRNA i ssDNA i telomerama u ovom tekstu nije bilo posebnog osvrta jer bi to previše proširilo okvire ove rasprave.



Slika 42. Interakcije hnRNP-A1, PABP-N1 i MyoD1. Struktura pojedinog proteina predodređuje njegovu. Interakcije s drugim proteinima određuju integraciju pojedinih funkcija u složene komplekse koji rezultiraju odvijanjem životnih funkcija stanice. Preuzeto sa STRING- *Known and Predicted Protein-Protein Interactions* (http://string-db.org).

6.7. Zaključak rasprave

Na kraju rasprave može se reći da svaki, ili barem neki od ovdje spomenutih proteina, može na razne načine biti zahvaćen i dovesti do distrofije mišića zbog manjka SAHH. Na temelju naših rezultata sa sigurnošću možemo reći da se može raditi i o poremećaju izrezivanja, i o neuravnoteženoj proizvodnji izoformi, poremećaju posttranslacijske strukture, funkcije i integracije proteina u složene proteinske komplekse stanice mišića zbog globalne dismetilopatije. Slična se rasprava može voditi i u svijetlu poremećaja bilo kojeg drugog organa uključujući mozak i jetru koji su također stradali u višeoganskoj bolesti zbog manjka SAHH.

Ovim istraživanjem smo pokazali i raspravom argumentirali da manjak SAHH i patološki nizak metilacijski indeks dovode do poremećaja metabolizma asimetričnog dimetilarginina (aDMA), razgradnog produkta metiliranih proteina, poremećaja u posttranslacijskoj metilaciji proteina hnRNP-A1 i poremećaja funkcije dismetiliranih proteina (hipometiliranog proteina hnRNP-A1) koji rezultiraju pogrešnim izrezivanjem mRNA i neuravnoteženom proizvodnjom "pogrešnih" izoformi proteina.

ZAKLJUČAK

7. ZAKLJUČAK

7.1. O hipotezi i glavnom cilju disertacije

Zaključujemo da je patološki nizak metilacijski indeks, u uvjetima nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze povezan s hipometilacijom konstitutivnog oblika proteina hnRNP-A1 (KoB) i posljedično, s njegovom disfunkcijom, aberantnim alternativnim izrezivanjem vlastite mRNA i neuravnoteženom proizvodnjom i/ili razgradnjom "pogrešnih" izoformi KoB i AiA.

7.2. O specifičnim ciljevima disertacije

1) Povišene koncentracije S-adonozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i patološki nizak metilacijski indeks povezani su s povišenom koncentracijom asimetričnog dimetilarginina (aDMA) u plazmi pacijenata, što upućuje na pojačanu razgradnju dismetiliranih proteina.
2) Liječenje dijetom siromašnom metioninom povezano je s povišenjem metilacijskog indeksa i sniženjem koncentracije aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$. Koncentracija aDMA u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, liječenjem, doseže referentne vrijednosti. Ovo upućuje na to da dijeta siromašna metioninom dovodi do smanjenja opsega dismetilacije, a time i razgradnje proteina, što ovo liječenje, u pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, čini djelotvornim.
3) Metilacijski indeks u plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je niži od metilacijskog indeksa u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, što upućuje na to da su uvjeti u stanici, u određenoj mjeri, povoljniji za odvijanje transmetilacijskih reakcija. Dodatne analize u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ i kontrolnim fibroblasta *in vitro,* potvrđuju poremećaj u metabolizmu aDMA, u uvjetima patološki niskog metilacijskog indeksa, što na neizravan način ukazuje na dismetilaciju proteina.
4) Patološki nizak metilacijski indeks povezan je s poremećajem posttranslacijske metilacije proteina hnRNP-A1 koji se očituje hipometilacijom arginina (aDMA-194, aDMA-206, aDMA-225), što na izravan način ukazuje na dismetilaciju proteina. Ovo dovodi do disfunkcije proteina hnRNP-A1, poremećenog alternativnog izrezivanja vlastite mRNA i neuravnotežene sinteze i/ili razgradnje izoformi KoB i AiA.

Istražujući multifunkcionalan protein S-adenozilhomocistein hidrolazu (SAHH), koji je ključni enzim u transmetilacijskim reakcijama, otkrili smo posttranslacijsku strukturnu i funkcionalnu

poremetnju drugog multifunkcionalnog proteina, hnRNP-A1. Ovaj protein sudjeluje u procesiranju mRNA. Poremetnje u funkciji ova dva proteina dovode do niza sekundarnih poremetnji.

Općenito, monogenska mutacija koja za posljedicu ima manjak aktivnosti SAHH dovodi do funkcionalnih poremetnji u epigenomu. Poseban patogenetski aspekt bolesti zbog manjka SAHH koji smo ovim istraživanjem pokazali je hipometilacija odabranog proteina hnRNP-A1 koja remeti njegovu funkciju, a time i integraciju u složeni višemolekularni sustav, što u konačnici dovodo do nastanka višeorganske bolesti kakvu viđamo u pacijenata s nedostatnom aktivnošću S-adenozilhomocistein hidrolaze ("globalna dismetilopatija").

Budući da patološki nizak metilacijski indeks u uvjetima nedostatne funkcije SAHH dovodi do hipometilacije s poremećajem izrezivanja, bolest zbog manjka SAHH bismo mogli nazvati „bolešću izrezivanja“ ili „hipometilacijskom izoformopatijom“.

7.3. Ostali zaključci disertacije

1) Proučavanje patogeneze bolesti zbog manjka SAHH u okviru ovog istraživanje bit će korisno za veći broj ljudi zato što se povišena koncentracija AdoHcy nalazi i kod mnogo češćih bolesnih stanja, uključujući ona povezana s hiperhomocisteinemijom (nasljedne hiperhomocisteinemije, stečene neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti itd.).
2) Rezultati nam daju za pravo zaključiti da i druge molekule u okviru nedostatne aktivnost SAHH mogu biti slično dismetilirane (DNA, RNA, proteini).
3) Dokaz poremećaja metilacije aminokiseline arginina, sastavnog dijela za ovo istraživanje odabranog proteina (hnRNP-A1) dovodi nas do zaključka da bi na sličan način i neke druge aminokiseline (lizin, histidin) i drugi proteini (histoni - H3K4, H3K9 i nehistonski proteini - aktin, miozin, tropomiozin, tinin, lamin A/C i drugi strukturni proteini poprečnoprugastog mišića i drugih organa, enzimi, transporteri, ionski kanali i drugi) mogli biti dismetilirani.
4) Proizašla saznanja doprinijet će razumijevanju važnih bioloških procesa, ponajprije uloge i važnost SAHH u transmetilacijskim reakcijama, posttranslacijskim promjenama građe proteina i epigenetici i proteomici općenito.
5) Razjašnjenje ili pojašnjenje mehanizma nastanka bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH unaprijedit će mogućnosti liječenja bolesnika.

SAŽETAK

8. SAŽETAK

Manjak aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) je novootkrivena nasljedna višeorganska bolest koju biokemijski karakteriziraju povišene koncentracije S-adenozilmetionina (AdoMet) i S-adenozilhomocisteina (AdoHcy) te patološki nizak metilacijski indeks (MI). Nedovoljno jasna patogeneza i nemogućnost izlječenja povod su za istraživanje posttranslacijske metilacije proteina. Razinu metilacije smo određivali neizravno, mjerenjem koncentracije asimetričnog dimetilarginina (aDMA) u plazmi i modelu fibroblasta *in vitro,* u različitim uvjetima, prije i nakom liječenja, te izravno, primjenom protutijela usmjerenih na ciljne proteine i metilne skupine.

Rezultati istraživanja su pokazali da patološki snižen metilacijski indeks, koji se javlja u okviru nedostatne aktivnosti SAHH, dovodi do poremećaja metabolizma aDMA zbog dismetilacije proteina. U plazmi pacijenata $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, koncentracija aDMA je statističi značajno povišena, a liječenje dijetom siromašnom metioninom je normalizira. U modelu *in vitro,* koncentracija aDMA u mediju i fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ je značajno niža u uvjetima dodatno sniženog MI, uz dodatak AdoHcy. Dodavanje AdoMet i AdoHcy kontrolnim fibroblastima, dovelo je do sniženja koncentracije aDMA, slično kao što je to u fibroblastima $^{Y143C}SAHH_{W112X}$, u nativnim uvjetima. Na većem broju eksperimenata pokazali smo reproducibilnost rezultata.

Istražujući multifunkcionalan protein SAHH koji je, uključen u brojne transmetilacijske reakcije, otkrili smo poremetnju u procesiranju (količina izoformi proteina i njihov omjer, razina posttranslacijske metilacije) drugog multifunkcionalan proteina, heterogenog ribonuklearnog proteina tipa A1 (hnRNP-A1), uključenog u procesiranje mRNA i kôd izrezivanja. Ovo za posljedicu može imati disfunkciju proteina hnRNP-A1, koja se može manifestirati poremećenim alternativnim izrezivanjem vlastite mRNA i neuravnoteženom sintezom i/ili razgradnjom izoformi KoB i AiA.
Poremećaj na razini ova dva proteina dovodi do niza posljedica na razini funkcioniranja proteinskih mreža te time ionako kompleksnu patogenezu bolesti zbog manjka SAHH dodatno kompliciraju.

Istražili smo posttranslacijsku razinu metilacije arginina odabranih proteina. Manjak SAHH dovodi do promjena na razini posttranslacijske metilacije proteina, s vrlo vjerojatno, raznim dodatnim sekundarnim, tercijarnim i brojnim drugim međudjelovanjima koja vode stvaranju "dismetilacijskog kruga". Stoga bismo lako mogli pretpostaviti da je bolest zbog manjka SAHH „globalna dismetilopatija ili epigenopatija“.

Poseban patogenetski aspekt bolesti zbog manjka SAHH koji smo pokazali je hipometilacija arginina hnRNP-A1 koja remeti njegovu funkciju prilikom izrezivanja i procesiranja mRNA, a time i integraciju u složenu proteinsku mrežu što u konačnici vodi višeorganskoj bolesti kakvu viđamo u pacijenata s nedostatnom aktivnošću S-adenozilhomocistein hidrolaze.

SUMMARY

9. SUMMARY

Impact of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Deficiency on Protein Methylation

Mario Ćuk, Zagreb, 2013

S-Adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) deficiency (Y143CSAHHW112X) is a recently discovered inherited multiple organ disease characterized by elevated plasma S-adenozilmethionine (AdoMet) and S-Adenosylhomocysteine (AdoHcy) concentrations, and pathologically low methylation index (MI). Both, an unclear pathogenesis and limited treatment options were major reasons for studying posttranslational protein methylation in terms of SAHH deficiency. This was analyzed both indirectly, by measuring asymmetric dimethylarginine (aDMA) concentration in both, plasma and fibroblasts, (aDMA), before the treatment and during the treatment, and directly, using specific antibodies against methylated target proteins.

The obtained results showed that an abnormally low methylation index, associated with SAHH deficiency, relates to disturbances of aDMA metabolism and protein hypomethylation. In $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ patients, aDMA concentrations were statistically significantly increased, but normalized following low methionine diet. In $^{Y143C}SAHH_{W112X}$ fibroblast, aDMA concentrations were statistically significantly reduced after addition of AdoHcy. In control fibroblasts, addition of both AdoMet and AdoHcy have led to statistically significant reduction of aDMA concentrations, reaching the value similar to those in Y143CSAHHW112X fibroblast, in native conditions. The reproducabilty of these results has been confirmed in several independent experiments.

Exploring deficiency of SAHH, a multiple functioning enzyme involved in numerous transmethylation reactions, we discovered hypomethylation of another multifunctional protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein type A1 (hnRNP-A1), a substantial regulator of mRNA processing and splicing. The results showed arginine hypomethylation of hnRNP-A1. This may result hnRNP-A1 dysfunction , which could be manifested as abnormal alternative splicing of its own mRNA and unbalanced synthesis and/or degradation of both

constitutive (KoB) and alternative (AiA) protein isoform. Any kind of dysfunction including these proteins may lead to a series of secondary consequences, in particular those affecting protein interactions and networks. All these additionally complicate the pathogenesis of SAHH deficiency.

The level of posttranslational arginine methylation of selected proteins in terms of SAHH deficiency was further investigated and hnRNP-A1 was found to be hypomethylated. This change surely influnce the hnRNP-A1 secondary and tertiary structure and, consequentially, its interaction with another bio-macromolecules, contributing to development of disease that we now assume to be a "global dismethylopathy or epigenopathy".

Reduced level of hnRNP-A1 arginine methylation additionaly contributes to this dysfuncionality which reflects to the processes of mRNA splicing and processing, in various tissues and organs. This ultimately leads to a multiple organ disease, present in patients with SAHH deficiency.

LITERATURA

10. POPIS ODABRANE LITERATURE

Ahn AH, Kunkel LM. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. J Cell Biol 1995;128:363-71.

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc Natl Acad Sci 1964;51:786-94.

Astejada MN, Goto K, Nagano A, i sur. Emerinopathy and laminopathy clinical, pathological and molecular features of muscular dystrophy with nuclear envelopathy in Japan. Acta Myol 2007;26:159-64.

Balvay L, Fiszman MY. Analysis of the diversity of tropomyosin isoforms. C R Seances Soc Biol Fil 1994;188:527-40.

Barash Y, Calarco JA, Gao W, i sur. Deciphering the splicing code. Nature 2010;465:53-9.

Barić I, Ćuk M, Fumić K, i sur. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. J Inher Metab Dis 2005;28:885-902.

Barić I, Ćuk M, Petković-Ramadža D, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency - a review of nine patients. Mol Genet Metab 2012;105:303.

Barić I, Fumić K, Glenn B, Ćuk M, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:4234-9.

Barić I. Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. J Inherit Metab Dis 2009;28:885-902.

Barrowman J, Hamblet C, Kane MS, Michaelis S. Requirements for efficient proteolytic cleavage of prelamin A by ZMPSTE24. PLoS One 2012;7:e32120.

Barton RM, Worman HJ. Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein. J Biol Chem 1999;274:30008-18.

Bebee TW, Dominguez CE, Samadzadeh-Tarighat S, Akehurst KL, Chandler DS. Hypoxia is a modifier of SMN2 splicing and disease severity in a severe SMA mouse model. Hum Mol Genet 2012;21:4301-13.

Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. Mol Cell 2009;33:1-13.

Bedford MT, Frankel A, Yaffe MB, Clarke S, Leder P, Richard S. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. J Biol Chem 2000;275:16030-6.

Bedford MT, Richard S. Arginine methylation: An emerging regulator of protein function. Mol Cell 2005;18:263-72.

Bekenstein U, Soreq H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles. Mol Cell Neurosci doi: 10.1016/j.mcn.2012.12.002., u tisku

Beluzić R, Ćuk M, Pavkov T, i sur. A single mutation at tyrosine 143 of human S-adenosylhomocysteine hydrolase renders the enzyme thermosensitive and effects the oxidation state of bound cofactor NAD. Biochem J 2006;400:245-53.

Berson A, Barbash S, Shaltiel G, i sur. Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. EMBO Mol Med 2012;4:730-42.

Blackwell E, Ceman S. Arginine methylation of RNA-binding proteins regulates cell function and differentiation. Mol Reprod Dev 2012;79:163-75.

Blackwell S. The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine. Ann Clin Biochem 2010;47:17-28.

Boisvert FM, Côté J, Boulanger MC, Richard S. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. Mol Cell Proteomics 2003;2:1319-30.

Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

Brook M, McCracken L, Reddington JP, Lu ZL, Morrice NA, Gray NK. The multifunctional poly(A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modelling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. Biochem J 2012;441:803-12.

Buist NRM, Glenn B, Vugrek O, i sur. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. J Inherit Metab Dis 2006;29:538-45.

Cáceres JF, Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. Trends Genet 2002;18:186-93.

Calarco JA, Superina S, O'Hanlon D, i sur. Regulation of vertebrate nervous system alternative splicing and development by an SR-related protein. Cell 2009;138:898-910.

Calnan BJ, Tidor B, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. Science 1991;252:1167-71.

Cantoni GL, Chiang PK. The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylations. U: Cavallini D, Gaull GE, Zappia V, ur. Natural Sulfur Compounds. Novel Biochemical and Structural Aspects. New York: Plenum Press; 1980, str. 67-80.

Cantoni GL. Biological methylation: selected aspects. Annu Rev Biochem 1975;44: 435-51.

Castle JC, Zhang C, Shah JK, i sur. Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. Nat Genet 2008;40:1416-25.

Chabot B, Blanchette M, Lapierre I, La Branche H. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. Mol Cell Biol 1997;17:1776-86.

Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 is a histone arginine demethylase. Science 2007;318:444-7.

Chang PY, Lu SC, Chen CH. S-adenosylhomocysteine: a better marker of the development of Alzheimer's disease than homocysteine? Alzheimers Dis 2010;21:65-6.

Charlet-B N, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. Mol Cell 2002;10:45–53.

Chaudhury A, Chandler P, Howe PH. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. RNA 2010;16:1449-62.

Chen M, Zhang J, Manley JL. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA. Cancer Res 2010;70:8977-80.

Chiang PK, Gordon RK, Tal J, i sur. S-Adenosylmethionine and methylation. FASEB J 1996;10:471-80.

Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. Pharmacol Ther 1998;77:115-34.

Christensen J, Agger K, Cloos PA, i sur. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. Cell 2007;128:1063-76.

Clarke S, Banfield K. S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases. U: Carmel R,Jacobsen DW, ur. Homocysteine in health and disease. Cambridge: Cambridge University Press; 2001, str. 63-78.

Côté J, Boisvert FM, Boulanger MC, i sur. Sam68 RNA binding protein is an *in vivo* substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. Mol Biol Cell 2003;14:274-87.

Crawford JB, Patton JG. Activation of alpha-tropomyosin exon 2 is regulated by the SR protein 9G8 and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H and F. Mol Cell Biol 2006;26:8791–802.

Ćuk M, Lovrić M, Fumić K, i sur. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: Further evidence of congenital miopathy. Clin Chem Lab Med 2007;5:A43.

David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. Nature 2010;463:364-68.

Davies BS, Barnes RH 2nd, Tu Y, i sur. An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. Hum Mol Genet 2010;19:2682-94.

Davies BS, Coffinier C, Yang SH, i sur. Investigating the purpose of prelamin A processing. Nucleus 2011;2:4-9.

Denz CR, Narshi A, Zajdel RW, Dube DK. Expression of a novel cardiac-specific tropomyosin isoform in humans. Biochem Biophys Res Commun 2004;320:1291-7.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Béroud G, Claustres M, Béroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acids Res 2009;37:e67.

Donev R, Newall A, Thome J, Sheer D. A role for SC35 and hnRNPA1 in the determination of amyloid precursor protein isoforms. Mol Psychiatry 2007;12:681-90.

Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:195-205.

Esse R, Rocha MS, Barroso M, i sur. Protein arginine methylation is more prone to inhibition by s-adenosylhomocysteine than DNA methylation in vascular endothelial cells. PLoS One 2013;8:e55483.

Expert-Bezancon A, Sureau A, Durosay P, i sur. HnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of ß-tropomyosin exon 6B. J Biol Chem 2004;279:38249–59.

Fan X, Messaed C, Dion P, i sur. HnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. Can J Neurol Sci 2003;30:244-51.

Fernandez-Sanchez ME, Gonatopoulos-Pournatzis T, Preston G, Lawlor MA, Cowling VH. S-adenosylhomocysteine hydrolase is required for Myc-induced mRNA cap methylation, protein synthesis, and cell proliferation. Mol Cell Biol 2009;29:6182-91.

Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. J Nutr Biochem 1990;1:228-37.

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. Eur J Pediatr 1998;157:S40-4.

Fisette JF, Toutant J, Dugré-Brisson S, Desgroseillers L, Chabot B. HnRNP A1 and hnRNP H can collaborate to modulate 5' splice site selection. RNA 2010;16:228-38.

Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Battaglioli E, Mattevi A. Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. J Biol Chem 2005;280:41360–5.

Freiburg A, Trombitas K, Hell W, i sur. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. Circ Res 2000;86:1114-21.

Freitag C, Clarke S. Reversible methylation of cytoskeletal and membrane proteins in intact human erythrocytes. J Biol Chem 1981;256:6102-8.

Frezza M, Surrenti C, Manzillo G, i sur. Oral S-adenosylmethionine in the symptomatic treatment of intrahepatic cholestasis: A double-blind, placebo controlled study. Gastroenterology 1990;99:211-5.

Friessen WJ, Massenet S, Paushkin S, Wyce A, Dreyfuss G. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. Mol Cell 2001;7:1111-7.

Frock RL, Kudlow BA, Evans AM, Jameson SA, Hauschka SD, Kennedy BK. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. Genes Dev 2006;20:486-500.

Gallego ME, Sirand-Pugnet P, Durosay P, i sur. Tissue-specific splicing of two mutually exclusive exons of the chicken beta-tropomyosin pre-mRNA: positive and negative regulations. Biochimie 1996;78:457-65.

Gama-Carvalho M, Carmo-Fonseca M. The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. FEBS Lett 2001;498:157-63.

Gaull GE, Bender AN, Vulovic D, Tallan HH, Schaffner F. Methioninemia and myopathy: A new disorder. Ann Neurol 1981;9:423-32.

Gooding C, Smith CW. Tropomyosin exons as models for alternative splicing. Adv Exp Med Biol 2008;644:27-42.

Gorgoni B, Richardson WA, Burgess HM, i sur. Poly(A)-binding proteins are functionally distinct and have essential roles during vertebrate development. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108:7844-9.

Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. J Inherit Metab Dis 2010;33:705-13.

Gunning PW, Schevzov G, Kee AJ, Hardeman EC. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. Trends Cell Biol 2005;15:333-41.

Hallegger M, Llorian M, Smith CW. Alternative splicing: global insights. FEBS J 2010;277:856-66.

Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. Biochem J 2010;430:379-92.

He Y, Smith R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. Cell Mol Life Sci 2009;66:1239-56.

Hermes M, von Hippel S, Osswald H, Kloor D. S-adenosylhomocysteine metabolism in different cell lines: effect of hypoxia and cell density. Cell Physiol Biochem 2005;15:233-44.

Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. Clin Chem Lab Med 2011;49:435-41.

Hoek KS, Kid GJ, Carson JH, Smith R. HnRNP-A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. Biochemistry 1998;37:7021-9.

Honzík T, Magner M, Krijt J, i sur. Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. Mol Genet Metab 2012;107:611-3.

Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. Am J Hum Genet 2008;82:834-48.

Human Splicing Finder (http://www.umd.be/HSF/).

Hutchison S, LeBel C, Blanchette M, Chabot B. Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor. J Biol Chem 2002;277:29745-52.

ImageJ 1.42q (http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/).

Iwasaki H. Involvement of PRMT1 in hnRNPQ activation and internalization of insulin receptor. Biochem Biophys Res Comm 2008;372:314-9.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science 2001;293:1074-80.

Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. Mol Cell 2003;12:5-14.

Jurica MS. Detailed close-ups and the big picture of spliceosomes. Curr Opin Struct Biol 2008;18:315–20.

Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. Nat Genet 2003;34:460-3.

Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. HnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. Hum Mol Genet 2007;16:3149-59.

Khaitlina SY. Functional specificity of actin isoforms. Int Rev Cytol 2001;202:35-98.

Kilic F, Dalton MB, Burrell SK, Mayer JP, Patterson SD, Sinensky M. *In vitro* assay and characterization of the farnesylation-dependent prelamin A endoprotease. Biol Chem 1997;272:5298-304.

Kim C, Lim Y, Yoo BC, Won NH, Kim S, Kim G. Regulation of post-translational protein arginine methylation during HeLa cell cycle. Biochim Biophys Acta 2010;1800:977-85.

Kim D, Lee J, Cheng D, i sur. Enzymatic activity is required for the *in vivo* functions of CARM1. J Biol Chem 2010;285:1147-52.

Kim S, Merrill BM, Rajpurohit R, i sur. Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. Biochemistry 1997;36:5185-92.

Kim SJ, Yoo BC, Uhm CS, Lee SW. Posttranslational arginine methylation of lamin A/C during myoblast fusion. Biochim Biophys Acta 2011;1814:308-17.

Kim YJ, Noguchi S, Hayashi YK, Tsukahara T, Shimizu T, Arahata K. The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. Hum Mol Genet 2001;10:1129-39

Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, i sur. Arginine methylation as histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. Nature 2007;449:928-32.

Kozlov G, Trempe JF, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K. Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:4409-13.

Krahn M, Béroud C, Labelle V, i sur. Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients. Hum Mutat 2009;30:E345-75.

Krause CD, Yang ZH, Kim YS, Lee JH, Cook JR, Pestka S. Protein arginine methyltransferases: Evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. Pharm Therapeut 2007;113:50-87.

Lattanzi G, Marmiroli S, Facchini A, Maraldi NM. Nuclear damages and oxidative stress: new perspectives for laminopathies. Eur J Histochem 2012;56:e45.

Lattanzi G. Prelamin A-mediated nuclear envelope dynamics in normal and laminopathic cells. Biochem Soc Trans 2011;39:1698-704.

Lee J, Bedford MT. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. EMBO Rep 2002;3:268-73.

Lee J, Cheng D, Bedford MT. Techniques in Protein Methylation. U: Dickson RC, ur. Methods in Molecular Biology: Signal Transduction Protocols. New York: Humana Press Inc; 2004, str. 195-208.

Lee S, Xu L, Shin Y, i sur. A potential link between autoimmunity and neurodegeneration in immune-mediated neurological disease. J Neuroimmunol 2011;235:56-69.

Lee SM, Dunnavant FD, Jang H, Zunt J, Levin MC. Autoantibodies that recognize functional domains of hnRNPA1 implicate molecular mimicry in the pathogenesis of neurological disease. Neurosci Lett 2006;401:188-93.

Lee YH, Stallcup MR. Minireview: Protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. Mol Endocrinol 2009;23:425-33.

Levin MC, Lee SM, Kalume F, i sur. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. Nat Med 2002;8:509-13.

Levin MC, Lee SM, Morcos Y. Autoimmunity to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in neurological disease. Ann Neurol 2005;57:931-2.

Li H, Ilin S, Wang W, i sur. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. Nature 2006;442:91-5.

Liu Q, Dreyfuss G. *In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA binding proteins. Mol Cell Biol 1995;15:2800-8.

Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, Haefeli WE, Fower B. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: A cause for disturbed methylation reactions? Nephrol Dial Transplant 1998;13:656-61.

Maraldi NM, Capanni C, Cenni V, Fini M, Lattanzi G. Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. J Cell Biochem 2011;112:979-92.

Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, i sur. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. Hum Mol Genet 2001;10:1761-6.

Mayeda A, Krainer AR. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP-A1 and splicing factor SF2. Cell 1992;68:365-75.

Melo EO, Dhalia R, Martins de Sa C, Standart N, de Melo Neto OP. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. J Biol Chem 2003;278:46357-68.

Michel V, Singh RK, Bakovic M. The impact of choline availability on muscle lipid metabolism. Food Funct 2011;2:53-62.

Miller MW, Duhl DMJ, Winkes BM, i sur. The mouse lethal nonagouti (ax) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (Ahcy) gene. EMBO J 1994;13:1806-16.

Mizuno Y, Suzuki M, Nakagawa H, Ninagawa N, Torihashi S. Switching of actin isoforms in skeletal muscle differentiation using mouse ES cells. Histochem Cell Biol 2009;32:669-72.

Mourelatos Z, Abel L, Yong J, Kataoka N, Dreyfuss G. SMN interacts with a novel family of hnRNP and splicesomal proteins. EMBO J 2001;20:544-52.

Mowen KA, Tang J, Zhu W, i sur. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN-induced transcription. Cell 2001;104:731-741.

Mudd SH, Brosnan JT, Brosnan ME, i sur. Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. Am J Clin Nutr 2007;85:19-25.

Mudd SH, Cantoni GL. Activation of methionine for transmethylation. The methionine-activating enzyme of Baker's yeast. J Biol Chem 1958;231:481-92.

Mudd SH, Cerone R, Schiaffino MC, i sur. Glycine N-methyltransferase deficiency: a novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. J Inherit Metab Dis 2001;24:448-64.

Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: The role of sarcosine. Metabolism 1980;29:707-20.

Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. Metabolism 1975;24:721-35.

Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2011;157:3-32.

Mull L, Ebbs ML, Bender J. A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in *Arabidopis* S-adenosylhomocysteine hydrolase. Genetics 2006;174:1161-71.

Najbauer J, Johnson BA, Young AL, Aswad DW. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. J Biol Chem 1993;268:10501-9.

Nawrotzki R, Loh NY, Ruegg MA, Davies KE, Blake DJ. Characterisation of alpha-dystrobrevin in muscle. J Cell Sci 1998;111:2595-605.

Nichols RC, Wang XW, Tang J, i sur. The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. Exp Cell Res 2000;256:522-32.

Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature 2010;463:457-63.

Nilsen TW. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? Bioessays 2003;25:1147-9.

Novoyatleva T, Tang Y, Rafalska I, Stamm S. Pre-mRNA missplicing as a cause of human disease. Prog Mol Subcell Biol 2006;44:27-46.

Ohmori O, Hirano H, Ono T, Abe K, Mita T. Down-regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the active methyl transfer system in the brain of genetically epileptic E1 mice. Neurochem Res 1996;21:1173-80.

Ong SE, Mittler G, Mann M. Identifying and quantifying *in vivo* methylation sites by heavy methyl SILAC. Nat Methods 2004;1:119-26.

Ostlund C, Worman HJ. Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases. Muscle Nerve 2003;27:393-406.

Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H. Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. Biochem Biophy Acta 2006;1764:1890-903.

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nat Genet 2008;40:1413–15.

Papadopoulou C, Boukakis G, Ganou V, Patrinou-Georgoula M, Guialis A. Expression profile and interactions of hnRNP-A3 within hnRNP/mRNP complexes in mammals. Arch Biochem Biophysics 2012;523:151-60.

Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. Cytoskeleton 2010;67:630-4.

Peters MF, O'Brien KF, Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM, Adams ME, Froehner SC. Beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. J Biol Chem 1997;272:31561-9.

Piñol-Roma S, Dreyfuss G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. Nature 1992;355:730-2.

Pistoni M, Ghigna C, Gabellini D. Alternative splicing and muscular dystrophy. RNA Biol 2010;7:441-52.

Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. J Biol Chem 1999;274:31531-42.

Pramono ZA, Tan CL, Seah IA, i sur. Identification and characterisation of human dysferlin transcript variants: implications for dysferlin mutational screening and isoforms. Hum Genet 2009;125:413-20.

Prigge ST, Chiang PK. S-Adenosylhomocysteine hydrolase. U: Carmel R, Jacobsen DW, ur. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge: Cambridge University Press; 2001, str. 63-78.

Radomski N, Barreto G, Kaufmann C, Yokoska J, Mizumoto K, Dreyer C. Interaction of S-adenosylhomocysteine hydrolase of *Xenopus laevis* with mRNA(guanine-7-) methyltransferase: implication on its nuclear compartmentalisation and on cap methylation of hnRNA. Biochim Biophys Acta 2002;1590:93-102.

Rajpurohit R, Lee SO, Park JO, Paik WK, Kim S. Enzymatic methylation of recombinant heterogeneous nuclear RNP protein A1. Dual substrate specificity for S-adenosylmethionine:histone-arginine N-methyltransferase. J Biol Chem 1994;269:1075-82.

Rajpurohit R, Paik WK, Kim S. Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. Biochem J 1994;304:903-9.

Rajpurohit R, Paik WK, Kim S. Enzymatic methylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in isolated liver nuclei. Biochim Biophys Acta 1992;1122:183-8.

Ranum LP, Cooper TA. RNA-mediated neuromuscular disorders. Annu Rev Neurosci 2006;29:259-77.

Rocha PS, Sheikh M, Melchoirre R, i sur. The *Arabidopis* homology-dependent gene silencing1 gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. Plant Cell 2005;17:404-17.

Sadoulet-Puccio HM, Feener CA, Schaid DJ, Thibodeau SN, Michels VV, Kunkel LM. The genomic organization of human dystrobrevin. Neurogenetics 1997;1:37-42.

Salani S, Lucchiari S, Fortunato F, i sur. Developmental and tissue-specific regulation of a novel dysferlin isoform. Muscle Nerve 2004;30:366-74.

Sartorelli V, Caretti G. Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. Curr Opin Genet Dev 2005;15:1-8.

Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiol Rev 1996;76:371-423.

Schmucker D, Clemens JC, Shu H, i sur. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. Cell 2000;101:671-84.

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, i sur. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA asssy. Clin Chem Lab Med 2004;42:1377-83.

Selenko P, Sprangers R, Stier G, Bühler D, Fischer U, Sattler M. SMN Tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. Nature Struct Biol 2001;8:27-31.

Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. Am J Clin Nutr 1994;55:131-8.

Shen EC, Henry MF, Weiss VH, Valentini SR, Silver PA, Lee MS. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. Genes Dev 1998;12:679-91.

Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, Dalton M. The processing pathway of prelamin A. J Cell Sci 1994;107:61-7.

Sinha R, Allemand E, Zhang Z, Karni R, Myers MP, Krainer AR. Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. Mol Cell Biol 2010;30:2762-74.

Smith WA, Schurter BT, Wong-Staal F, David M. Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. J Biol Chem 2004;279:22795-8.

Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, i sur. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:138-45.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modification. Nature 2000;403:41-5.

STRING - Known and Predicted Protein-Protein Interactions (http://string-db.org).

Surtees R, Leonard J, Austin S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. Lancet 1991;338:1550-4.

Surtees R. Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway. Eur J Pediatr 1998;157:S118-21.

Tao Y, Neppl RL, Huang ZP, i sur. The histone methyltransferase Set7/9 promotes myoblast differentiation and myofibril assembly. J Cell Biol 2011;194:551-65.

Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: Regulation and action. Pharmacol Res 2009;60:448-60.

Tehlivets O, Malanovic N, Visram M, Pavkov-Keller T, Keller W. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system. Biochim Biophys Acta 2013;1832:204–15.

Venables JP, Koh CS, Froehlich U, i sur. Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. Mol Cell Biol 2008;28:6033-43.

Vugrek O, Beluzić R, Nakić N, Mudd SH. S-Adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: Two novel mutations with lethal outcome. Human Mutation 2009;30:555-65.

Wang ET, Sandberg R, Luo S, i sur. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature 2008;456:470–6.

Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. J Pathol 2010;220:152-63.

Whetstine JR, Nottke A, Lan F, i sur. Reversal of histone lysine trimethylatione by the JMJD2 family of histone demethylases. Cell 2006;125:467-81.

Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:a003707.

Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. J Biol Chem 2000;275:29318-23.

Zearfoss NR, Johnson ES, Ryder SP. hnRNP A1 and secondary structure coordinate alternative splicing of Mag. RNA 2013;19:948-57.

ŽIVOTOPIS

11. ŽIVOTOPIS



Pristupnik je rođen 26. lipnja 1973. u Zagrebu. Hrvat, državljan Republike Hrvatske. Otac dvoje djece. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1995., diplomirao s odličnim uspjehom u ljeto 2001. godine. Specijalistički ispit iz pedijatrije položio je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb s odličnim uspjehom, 2007. godine. U suradničkom je zvanju asistenta pri Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i specijalist pedijatar u Specijalističkom zavodu za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Publicirao je 62 stručna i znanstvena rada, od čega deset citiranih u bazi Current Contents. Objavljeni radovi su citirani 152 puta. Pobijedio je na natjecanju iz kemije «Nauka mladima», Zagreb, 1988. Nagrađen je Rektorovom nagradom za najbolji studentski rad «Utjecaj adrenergičkih živaca na rast i regeneraciju jetre u štakora» Zagreb, 1999. Stipendist je Grada Zagreba, kao jedan od najuspješnijih studenta, 1998-2001. Suradnik je na projektima „Nasljedne i ostale monogenske bolesti u djece“ (voditelj prof.dr.sc. Ivo Barić), „Creation of research related infrastructure for Translational Medicine and Applied Genomics“ (voditelj doc.dr.sc. Oliver Vugrek), „European registry and network for Intoxication type Metabolic Diseases, E-IMD“ (voditelj prof.dr. Stefan Koelker). U okviru pripreme disertacije boravio je u Institute of Chemistry and Structural Biology, Karl-Franzens-University, Graz; Friedrich Baur Institut, Ludwig Maximilians Universität München; Institute of Myology, Hopital de la Pitie-Salpetriere, Paris. Završio je Manchester ALSG International Course „Advanced Paediatric Life Support“ i tromjesečnu subspecijalističku naobrazbu iz područja metaboličkih bolesti u djece u Great Ormond Street Hospital for Children, University College London, UK, 2009.